

Mutations de l'amphiphysine 2 (BIN1) dans les myopathies centronucléaires récessives**Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) cause autosomal recessive centronuclear myopathy****Anne Toussaint, Anne-Sophie Nicot, Jean-Louis Mandel, Jocelyn Laporte**

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, F-67400 France; Inserm, U596, Illkirch, F-67400 France; CNRS, UMR7104, Illkirch, F-67400 France; Université Louis Pasteur, Strasbourg, F-67000 France; Collège de France, chaire de Génétique Humaine, Illkirch, F-67400 France.

mtm@igbmc.u-strasbg.fr

Les myopathies centronucléaires (CNM) sont des myopathies rares caractérisées par l'apparition d'une hypotonie associée à une histologie anormale des fibres musculaires squelettiques, avec présence de noyaux en position centrale (Figure 1). Les CNM sont classiquement répertoriées en trois formes : la forme liée au chromosome X aussi appelée myopathie myotubulaire qui est la plus fréquente et la plus sévère avec une hypotonie généralisée néonatale, la forme intermédiaire autosomique récessive apparaissant à l'enfance, et la forme autosomique dominante la plus légère apparaissant à l'âge adulte avec une hypotonie lentement progressive [1]. Des mutations dans le gène codant pour la myotubularine (MTM1) sont responsables de la forme liée au chromosome X [2], et des mutations dans la dynamine 2 (DNM2) ont été identifiées dans la majorité des cas de CNM autosomiques dominantes [3]. La myotubularine est une phosphatase à phosphoinositides impliquée dans le trafic membranaire et l'endocytose. La Dynamine 2 est quant à elle une

grande GTPase dont le rôle est également important pour l'endocytose, le trafic membranaire mais aussi l'assemblage des filaments d'actine et la fonction du centrosome [4]. L'identification de ces deux gènes suggérait que les myopathies centronucléaires seraient liées, au moins en partie, à des défauts du trafic membranaire. En revanche aucun gène impliqué dans les formes autosomiques récessives n'avait encore été identifié à ce jour.

Les patients atteints de CNM autosomiques récessives présentent une faiblesse musculaire progressive touchant leurs extrémités proximales et/ou distales, l'hypotonie s'accompagnant ou non d'une ophtalmoparésie [1]. Ne disposant que de familles de très petite taille, nous avons préféré l'approche candidats fonctionnels à celle du clonage positionnel. Les protéines candidates ont été sélectionnés pour leurs fonctions reliées à celles de la myotubularine. L'amphiphysine 2 (BIN1) est apparu comme un bon candidat par son implication dans le trafic membranaire, sa régulation par les phosphoinositides et son rôle dans la biogenèse des tubules-T du muscle squelettique [5], ces derniers semblant altérés dans les CNM liées au chromosome X. De plus il a été montré que l'absence de l'orthologue de BIN1 chez la drosophile conduisait à des anomalies du muscle squelettique [6]. Nous avons tout d'abord identifié une mutation dans *BINI* créant un codon stop prématuré chez un malade atteint de CNM autosomique récessive. La cartographie par homozygotie sur puce SNPs Affymetrix à partir de cas sporadiques issus de familles consanguines nous a permis d'identifier 2 substitutions d'acides aminés dans 2 familles homozygotes pour la région 2q14 contenant *BINI*. BIN1 est constitué d'un domaine BAR (Bin1/amphiphysin/RVS167) capable de courber les membranes, d'un domaine de fixation au facteur de transcription Myc, et d'un domaine SH3 (Src homology 3) liant des protéines à domaine riche en proline tels que la synaptojanine et la dynamine 2. Dans le cas de l'isoforme 8 de BIN1, spécifique du muscle squelettique, la protéine possède également un domaine qui se lie aux phosphoinositides et permettrait la tubulation des membranes lors de la formation des tubules-T dans le muscle [5].

Les deux substitutions d'acides aminés sont localisées dans le domaine BAR tandis que le codon stop prématuré est situé dans le domaine SH3. Afin d'étudier l'impact des mutations du domaine BAR, nous avons observé la capacité de BIN1-iso8 sauvage et muté à tubuler les membranes après surexpression dans des cellules COS-1 (Figure 2), cette propriété de BIN1-iso 8 sauvage ayant déjà été décrite [5]. Les deux substitutions abolissent la capacité de la protéine à produire des tubules, tandis que le mutation non-sens permet une tubulation normale. Il a été montré que la dynamine 2, qui est mutée dans la forme dominante des CNM, se liait au domaine SH3 de BIN1 [7]. Des tests d'interaction par GST-pull down avec le domaine SH3 sauvage ou muté démontrent que le codon stop prématuré, enlevant la moitié du domaine SH3, diminue fortement l'interaction entre les deux protéines. *Ex vivo*, cette mutation perturbe le recrutement par BIN1-iso8 de la dynamine 2 aux tubules membranaires. Ces résultats permettent donc l'identification du premier gène muté pour les myopathies centronucléaires autosomiques récessives, et suggèrent que plusieurs fonctions de BIN1 pourraient être altérées [8]. Rappelons que BIN1 (amphiphysine 2) est également proposé jouer un rôle dans le cancer du sein comme modificateur négatif de la progression tumorale [9] et que l'amphiphysine 1 est un régulateur du recyclage des vésicules synaptiques. Il est intéressant de noter que ces résultats permettent aussi de relier les formes autosomiques récessives et dominantes et suggèrent qu'un découplage entre BIN1 et la dynamine 2 serait à l'origine des CNM. De plus, ces deux protéines sont régulées par les phosphoinositides ce qui pourrait constituer le lien avec la myotubularine. Il reste à identifier les autres gènes des CNM autosomiques récessives, les mutations de BIN1 ne rendant compte que d'environ 5% des familles étudiées.

Le système sarcotubulaire est constitué d'une invagination de la membrane plasmique, le tubule-T, encadrée des citernes du réticulum sarcoplasmique et permet le couplage excitation-contraction musculaire. L'immuno-marquage d'une biopsie musculaire de patient,

avec des marqueurs associés aux tubules-T au cours du développement ou dans le muscle mature, met en évidence une augmentation du marquage de la caveoline-3 et du DHPR α à l'intérieur des fibres, et des vacuoles élargies cerclées de caveoline-3 [8]. Une perturbation de la biogenèse des tubules-T et/ou de l'endocytose par des mutations dans *BINI* pourrait donc être à l'origine de la pathologie musculaire chez les patients. La caractéristique la plus marquante des CNM est la localisation centrale des noyaux. Au cours de la myogenèse, les noyaux migrent du centre des fibres vers la périphérie. Les patients atteints de myopathies centronucléaires ne présentent pas de phénomènes de nécrose-régénération qui sont la cause de la centralisation des noyaux dans certaines dystrophies telle que la dystrophie de Duchenne, et le modèle souris généré pour la forme liée à l'X ne présente pas de défaut de maturation des fibres musculaires [10]. Diverses hypothèses pourraient expliquer que le défaut des protéines mutées dans les CNM conduise à la centralisation des noyaux : (1) des anomalies de remodelage des membranes affecteraient également la membrane nucléaire ; (2) la myotubularine et BIN1 réguleraient la fonction de la dynamine 2 sur le centrosome ; (3) il existerait une fonction encore inconnue de ces trois protéines sur le positionnement des noyaux.

Remerciements

Les familles et les cliniciens ayant participé à l'étude, et Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Collège de France, Agence Nationale de la Recherche et Association Française contre les Myopathies.

Références

1. Pierson CR, Tomczak, K, Agrawal, P, *et al.* X-linked myotubular and centronuclear myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 555-64.
2. Laporte J, Hu, LJ, Kretz, C, *et al.* A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* 1996; 13: 175-82.
3. Bitoun M, Maugey, S, Jeannet, PY, *et al.* Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* 2005; 37: 1207-9.
4. Praefcke GJ, and McMahon, HT The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 133-47.
5. Lee E, Marcucci, M, Daniell, L, *et al.* Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 2002; 297: 1193-6.
6. Razzaq A, Robinson, IM, McMahon, HT, *et al.* Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 2001; 15: 2967-79.
7. Owen DJ, Wigge, P, Vallis, Y, *et al.* Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *Embo J* 1998; 17: 5273-85.
8. Nicot AS, Toussaint, A, Tosch, V, *et al.* Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* 2007:
9. Chang MY, Boulden, J, Sutanto-Ward, E, *et al.* Bin1 ablation in mammary gland delays tissue remodeling and drives cancer progression. *Cancer Res* 2007; 67: 100-7.
10. Buj-Bello A, Laugel, V, Messaddeq, N, *et al.* The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15060-5.

Légendes

Figure 1. Immuno-marquage à l'hématoxyline-éosine d'une coupe transversale de muscle de patient atteint de myopathie centronucléaire récessive (muté dans le gène BIN1). La majorité des fibres musculaires présente une localisation anormalement centrale des noyaux (violet).
Photo: Anders Oldfors.

Figure 2. Test de tubulation des membranes *ex vivo*. Des cellules COS-1 ont été transfectées avec une construction BIN1-iso8 sauvage fusionnée à la GFP. En surexpression, la protéine induit la formation de tubules membranaires.