



HAL
open science

Rôle du collagène spécifique ColQ dans la formation de la jonction neuromusculaire

Séverine Monique Sigoillot

► **To cite this version:**

Séverine Monique Sigoillot. Rôle du collagène spécifique ColQ dans la formation de la jonction neuromusculaire. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT : 2010PA066332 . tel-00596679

HAL Id: tel-00596679

<https://theses.hal.science/tel-00596679v1>

Submitted on 28 May 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Centre d'Etude de la Sensori-Motricité
CNRS UMR 8194 - Université Paris Descartes

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité Sciences de la Vie

Ecole doctorale : Complexité du Vivant

Présentée par

Mlle Séverine SIGOILLOT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Rôle du collagène spécifique ColQ dans la formation de la jonction neuromusculaire

soutenue le 30 Septembre 2010

devant le jury composé de :

Pr. Marc VIGNY	Président
Dr. Pascal MAIRE	Rapporteur
Dr. Laurent SCHAEFFER	Rapporteur
Dr. Jean-Louis BESSEREAU	Examineur
Dr. Annie CARTAUD	Examineur
Dr. Françoise HELMBACHER	Examineur
Pr. Claire LEGAY	Directeur de thèse

A Mimi,

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Claire Legay pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir encadrée tout au long de ces quatre années. J'ai apprécié la liberté qu'elle m'a laissée dans mon travail ainsi que nos discussions qui m'ont apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects de mon sujet. Merci pour vos petites attentions que j'ai toujours très sincèrement appréciées.

Je tiens à remercier les rapporteurs et examinateurs de cette thèse, Pr. Marc Vigny, Dr. Pascal Maire, Dr. Laurent Schaeffer, Dr. Jean-Louis Bessereau, Dr. Annie Cartaud et Dr. Françoise Helmbacher.

Je remercie toutes les personnes qui ont croisé mon chemin de près ou de loin et ont ainsi participé à mes travaux,

Monique Lambergeon et Annie Gonzales qui m'ont guidées lors de mes premiers pas au laboratoire,

Francine Bourgeois pour son aide, ses conseils et son point de vue critique toujours bienvenus ainsi que pour avoir fleuri mon jardin de tant de couleurs,

Laure Strohlic, Emmanuelle Girard et Perrine Delers pour tous ces bons moments passés au laboratoire ou ailleurs, mais toujours devant quelque chose à grignoter (les club-sandwichs, cookies et macarons en tous genres vont me manquer...),

Eric Krejci, Anna Hrabovska, Alexandre Dobbertin, Véronique Bernard pour leur participation et leurs conseils scientifiques avisés,

Le troisième étage, avec dans le désordre Séverine Deforges, Anne-Sophie Armand, Sylvie Lecolle, Frédéric Charbonnier, Olivier Biondi et les autres,

Toujours au troisième, Françoise Levavasseur, Karine Hérault pour son aide en temps de crises des incubateurs,

Jean Cartaud pour ses conseils très appréciés un certain été de 2009...

Et tous les autres que j'oublie bien involontairement...

J'exprime toute ma gratitude envers mes relecteurs qui ont participé à l'amélioration de ce manuscrit.

Pour finir, je tiens à remercier tous ceux qui me sont chers et plus particulièrement Maxime, pour son amour et son soutien depuis tant d'années...

Mon frère Frédéric, l'océan que tu as mis entre nous n'a probablement pas fait de moi une meilleure nageuse mais m'a donné l'opportunité de découvrir des endroits et des gens inoubliables. Merci de m'avoir donné goût à la recherche,

Mes parents, Jocelyne et Daniel, pour leur présence à chaque instant.

Séverine

*« Connâître, ce n'est point démontrer, ni expliquer. C'est accéder à la vision.
Mais, pour voir, il convient d'abord de participer. (...) »*

Antoine de Saint-Exupéry

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	II
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	VII
LISTE DES ABREVIATIONS	IX
RESUME	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCTION.....	1
CONTEXTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE.....	2
I. LES ETAPES PRECOCES DE LA DIFFERENCIATION MUSCULAIRE ET NERVEUSE.....	7
A. <i>La différenciation musculaire précoce</i>	7
1. Des cellules somitiques mésenchymateuses aux myoblastes.....	7
2. Des myoblastes aux myotubes.....	10
3. Des myotubes aux fibres musculaires.....	11
B. <i>La différenciation du motoneurone</i>	18
1. Du tube neural au motoneurone.....	18
2. Motoneurones et croissance axonale.....	20
II. LA FORMATION DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE.....	24
A. <i>La différenciation pré- et post-synaptique</i>	24
1. La différenciation pré-synaptique.....	24
a. Guidage axonal terminal.....	24
b. Développement de la terminaison axonale.....	26
2. La différenciation post-synaptique.....	28
a. Agrégation du récepteur nicotinique de l'acétylcholine.....	28
b. Mise en place d'un domaine transcriptionnel synaptique.....	34
B. <i>Maturation, stabilisation et fonctionnement de la jonction neuromusculaire</i>	39
1. Maturation des différents composants de la jonction neuromusculaire.....	39
a. Maturation pré-synaptique.....	39
b. Maturation post-synaptique.....	41
2. Fonctionnement de la jonction neuromusculaire.....	45
a. Genèse du potentiel d'action neuronal.....	46
b. Libération de l'acétylcholine.....	47
c. Activation des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine de la membrane post-synaptique.....	48
d. Fin de la transmission synaptique : dégradation de l'acétylcholine.....	50
C. <i>La matrice extracellulaire</i>	51
1. Les composants de la matrice extracellulaire musculaire.....	51
2. Les récepteurs de la lame basale musculaire.....	53
III. LES SYNDROMES MYASTHENIQUES CONGENITAUX, PATHOLOGIES DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE ...	56
A. <i>Les différentes mutations à l'origine des syndromes myasthéniques congénitaux</i>	57
1. Mutation dans des gènes codant pour des protéines pré-synaptiques.....	57
2. Mutation dans des gènes codant pour des protéines synaptiques.....	58
a. Mutations dans le gène codant pour ColQ, queue collagénique de l'acétylcholinestérase.....	58
b. Mutations dans le gène codant pour la laminine-β2.....	61
c. Mutations dans le gène codant pour l'agrine.....	61
3. Mutation dans des gènes codant pour des protéines post-synaptiques.....	62
a. Mutations dans les gènes codant pour les sous-unités du récepteur nicotinique de l'acétylcholine.....	63
b. Mutations dans le gène codant pour la rapsyne.....	64
c. Mutations dans le gène codant pour Dok-7.....	65
d. Mutations dans le gène codant pour MuSK.....	66
e. Mutation dans le gène codant pour le canal sodique Nav1.4.....	67
B. <i>ColQ et les modèles d'étude du syndrome myasthénique congénital avec déficience en acétylcholinestérase</i>	69
1. L'histoire de ColQ.....	69
a. Découverte de ColQ et de ses différentes formes.....	69
b. Séquence et structure de ColQ.....	71

c. Localisation de ColQ	72
d. Les partenaires de ColQ	73
2. La souris modèle du syndrome myasthénique congénital avec déficience en acétylcholinestérase	76
a. Génération de la souris déficiente pour ColQ	76
b. Phénotype de la souris déficiente pour ColQ	76
3. La lignée cellulaire déficiente pour ColQ	77
LES OBJECTIFS DE LA THESE	79
A. <i>Le rôle de ColQ dans la formation de la jonction neuromusculaire</i>	79
B. <i>La Doublecortine dans le muscle (travaux collaboratifs)</i>	80
C. <i>Wnt et le guidage axonal à la jonction neuromusculaire (travaux collaboratifs)</i>	81
RESULTATS	82
I. QUEL EST LE ROLE DE COLQ DANS L'AGREGATION ET L'EXPRESSION DU RECEPTEUR DE L'ACÉTYLCHOLINE ?	83
A. <i>Introduction</i>	83
B. <i>Principaux résultats obtenus</i>	83
C. <i>Conclusion et Perspectives</i>	85
D. <i>Article</i>	90
II. L'ABSENCE DE COLQ-ACHE PEUT-ELLE ETRE COMPENSEE ?	103
A. <i>Introduction</i>	103
B. <i>Principaux résultats obtenus</i>	103
C. <i>Conclusion et Perspectives</i>	105
D. <i>Article</i>	105
III. QUEL EST LE ROLE DE COLQ DANS L'ORGANISATION DE LA LAME BASALE ?	112
A. <i>Introduction</i>	112
B. <i>Principaux résultats obtenus</i>	112
C. <i>Conclusion et Perspectives</i>	114
D. <i>Article en préparation</i>	115
IV. DOUBLECORTINE, UNE PROTEINE MUSCULAIRE ?	149
A. <i>Introduction</i>	149
B. <i>Principaux résultats obtenus</i>	150
C. <i>Conclusion et Perspectives</i>	157
V. WNT4 ET LE GUIDAGE AXONAL A LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE	160
A. <i>Introduction</i>	160
B. <i>Principaux résultats obtenus</i>	160
C. <i>Conclusion et Perspectives</i>	162
D. <i>Article en préparation</i>	164
DISCUSSION	183
I. COMMENTAIRES METHODOLOGIQUES CONCERNANT L'ETUDE	184
A. <i>RT-PCR en temps réel et Microarray : Description et Comparaison</i>	184
1. La RT-PCR en temps réel : détection et quantification	184
a. Systèmes de détection	184
b. Quantifications et contrôles	185
2. Le microarray	187
3. Comparaison des différentes techniques d'analyse du transcriptome	188
B. <i>Le RNA-seq</i>	189
II. APPORT DE MES TRAVAUX A LA COMPREHENSION DU SYNDROME MYASTHENIQUE CONGENITAL AVEC DEFICIENCE EN ACÉTYLCHOLINESTERASE	191
A. <i>Lame basale et différenciation synaptique</i>	191
B. <i>ColQ et l'innervation du muscle</i>	193
C. <i>ColQ et le syndrome myasthénique congénital avec déficience en acétylcholinestérase</i>	194
D. <i>Les souris sont-elles de bons modèles pour les pathologies ?</i>	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	200

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

Figure 1. La jonction neuromusculaire (p3)

Figure 2. Du muscle à la jonction neuromusculaire (p5)

Figure 3. Représentation schématique de la différenciation musculaire précoce (p8)

Figure 4. Sarcomère et contraction musculaire (p13)

Figure 5. « Pré-empreinte » musculaire et récepteur nicotinique de l'acétylcholine (p17)

Figure 6. Régionalisation dorso-ventrale et antéro-postérieure du tube neural (p19)

Figure 7. Filament d'actine, microtubule et cône de croissance (p23)

Figure 8. Agrégation du récepteur nicotinique de l'acétylcholine *via* l'activation par l'agrine de voies de signalisation intracellulaires (p31)

Figure 9. Action coordonnée de signaux positifs et négatifs dans l'assemblage de la jonction neuromusculaire (p33)

Figure 10. Les voies de signalisation impliquées dans la transcription des gènes synaptiques (p38)

Figure 11. Maturation de l'appareil post-synaptique (p42)

Figure 12. Maintien de l'appareil post-synaptique chez l'adulte (p45)

Figure 13. Fonctionnement de la jonction neuromusculaire (p49)

Tableau 1. Les différents composants de la lame basale de la matrice extracellulaire et leur localisation (p53)

Figure 14. Les partenaires de ColQ à la jonction neuromusculaire (p55)

Figure 15. Structure et mutations de ColQ (p60)

Tableau 2. Tableau récapitulatif des différentes mutations responsables de syndromes myasthéniques congénitaux (p68)

RESULTATS

Figure 16. Activité transcriptionnelle de la sous-unité δ du récepteur nicotinique de l'acétylcholine dans des myotubes wt et ColQ^{-/-} à T2 (p87)

Figure 17. Quantité d'ARNm et de protéines HuR dans des myotubes wt et ColQ^{-/-} à T2 (p88)

Figure 18. Expression de la DCX au cours du développement musculaire (p151)

Figure 19. Les défauts pré- et post-synaptiques chez les embryons DCX^{-/-} à E16.5 (p153)

Figure 20. Localisation de la DCX et détermination de ses partenaires musculaires *in vitro* (p156)

Figure 21. La DCX est sous-exprimée en absence de ColQ (p159)

DISCUSSION

Figure 22. Systèmes de détection utilisés pour les analyses de RT-PCR quantitative (p186)

Tableau 3. Symptômes associés aux syndromes myasthéniques congénitaux provoqués par des mutations des gènes codant pour ColQ, MuSK, Dok-7 et l'agrine chez l'homme (p195-196).

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Abl :	<i>Abelson</i>
	ACh :	AcétylCholine
	AChE :	AcétylCholinEstérase
	Actine F :	Actine Filamenteuse
	Actine G :	Actine Globulaire
	ADP/ADP-P :	Adénosine DiPhosphate/Adénosine DiPhosphate-Phosphate
	AP :	AdaPtine
	APC :	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
	AR :	Acide Rétinoïque
	ARE :	<i>AU-Rich Element</i>
	ATP :	Adénosine TriPhosphate
B	BaF3 :	Lignée cellulaire immortalisée de pro-B-lymphocytes dérivée de la moelle osseuse de souris
	BChE :	ButyrylCholinEstérase
	BDNF :	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
	BMP :	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
C	Cdc42 :	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
	Cdk5 :	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
	ChAT :	Choline AcétylTransférase
	CHM :	Colonne Hypaxiale Motrice
	CLM :	Colonne Latérale Motrice
	CMM :	Colonne Médiane Motrice
	CMS-1c :	<i>Congenital Myasthenic Syndrome with AChE deficiency</i>
	ColQ :	Collagène Q, Queue Collagénique de l'acétylcholinestérase
	COS-7 :	Lignée cellulaire immortalisée de fibroblastes dérivée de rein de singe vert d'Afrique
	CPG :	Colonne Pré-Ganglionnaire
	CRD :	<i>Cystein-Rich Domain</i>
D	DCX :	Doublecortine
	DCLK :	<i>DoubleCortin-Like Kinase</i>
	DG :	DystroGlycan
	Dok :	<i>Downstream of kinase</i>
	DRB :	5,6-Dichloro-1-β-D-RibofluranosylBenzimidazole
	Dvl :	<i>Dishevelled</i>
E	EMG :	ElectroMyoGramme
	ERK :	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
	Erm :	<i>ETS related molecule</i>
	ETS :	<i>E-Twenty Six</i>
	Eya :	<i>Eyes absent</i>
F	FGF :	<i>Fibroblastic Growth Factor</i>
	FIRE :	<i>Fast Ionotropic Regulatory Element</i>
	FRET :	<i>Förster/Fluorescence-resonance energy transfert</i>
	FXR1 :	<i>Fragile X-mental Retardation syndrome protein 1</i>
G	GABP :	<i>GA Binding Protein</i>
	GAPDH :	<i>GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase</i>
	Gdf11 :	<i>Growth differentiation factor 11</i>

	GEF :	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
	GFP :	<i>Green Fluorescent Protein</i>
	GGT :	<i>GeranylGeranylTransférase</i>
	GPI :	<i>GlycoPhosphatidylInositol</i>
	GTP :	<i>Guanosine TriPhosphate</i>
H	HA :	<i>HemAgglutinin</i>
	Hb9 :	<i>Homeobox Hb9</i>
	HBS :	<i>Heparin Binding Site</i>
	HEK :	<i>Human Embryonic Kidney cell line</i>
	Hox :	<i>Homeobox</i>
	Hsp :	<i>Heat shock protein</i>
	HSPG :	<i>Heparan Sulfate ProteoGlycan</i>
	HuR :	<i>ELAV-like protein 1</i>
I	Ig :	<i>Immunoglobuline</i>
	IN :	<i>InterNeurone</i>
	Isl :	<i>Insulin gene enhancer protein</i>
J	JNK :	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
	JNM :	<i>Jonction NeuroMusculaire</i>
L	Lbx :	<i>Lady bird homeobox</i>
	LRE :	<i>Leu-Arg-Glu</i>
	LRP4 :	<i>low density Lipoprotein Receptor-related Protein 4</i>
	Lhx :	<i>LIM/homeobox protein</i>
M	MAP :	<i>Microtubule-Associated Protein</i>
	MAPK :	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
	MHC :	<i>Myosin Heavy Chain</i>
	miR :	<i>microRNA</i>
	MKK7 :	<i>Mitogen-activated protein Kinase Kinase 7</i>
	MLCL :	<i>Lignée de cellules musculaires générée au laboratoire</i>
	MN :	<i>MotoNeurone</i>
	MRF :	<i>Myogenic Regulatory Factor</i>
	MuSK :	<i>Muscle-Specific Kinase</i>
	Myf :	<i>Myogenic factor</i>
	MyoD :	<i>Myogenic Differentiation antigen</i>
N	nAChR :	<i>nicotinic AcetylCholine Receptor</i>
	NF :	<i>NeuroFilament</i>
	Nrg :	<i>Neuréguline</i>
P	P :	<i>Pompe</i>
	PAK1 :	<i>p21-Activated Kinase</i>
	PAMC :	<i>Potentiel d'Action Musculaire Composé</i>
	Pax :	<i>Paired box</i>
	PH :	<i>Pleckstrin Homology</i>
	PI3K :	<i>PhosphatidylInositol 3 Kinase</i>
	PKC :	<i>Protein Kinase C</i>
	Ppm :	<i>Potentiel de plaque motrice</i>
	Ppmm :	<i>Potentiel de plaque motrice miniature</i>
	PRAD :	<i>Proline-Rich Attachment Domain</i>
	PRiMA :	<i>Proline-Rich Membrane Anchor</i>
	PTB :	<i>PhosphoTyrosine Binding domain</i>
R	RATL :	<i>Rapsyn-Associated Transmembrane Linker</i>
	RDh :	<i>Récepteur Dihydropyridine</i>

	RhoGEF :	<i>Rho Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
	RhoGTPase :	<i>Rho Guanosine TriPhosphatase</i>
	RnACh :	Récepteur nicotinique de l'AcétylCholine
	RRy :	Récepteur de la Ryanodine
S	Shh :	<i>Sonic hedgehog</i>
	Shp2 :	<i>protein tyrosine phosphatase Shatterproof 2</i>
	Six :	<i>Sine oculis homeobox</i>
	SMC :	Syndrome Myasthénique Congénital
	SMC-1c :	Syndrome Myasthénique Congénital avec déficience en AChE
	SNAP25 :	<i>SyNaptosomal-Associated Protein 25</i>
	SNARE :	<i>SNAP REceptor</i>
	Src :	<i>Sarcoma, proto-oncogenic tyrosine kinase</i>
	SURE :	<i>Slow Upstream Regulatory Element</i>
	Syn :	Synaptophysine
T	TGFβ :	<i>Transforming Growth Factor β</i>
	Tid1 :	<i>Tumorous imaginal discs 1</i>
	TLDA :	<i>TaqMan Low Density Array</i>
	TPR :	<i>TetratricoPeptides Repeat</i>
	Tubule T :	Tubule Transverse
U	UTP :	Uridine TriPhosphate
	UTR :	<i>UnTranslated Region</i>
V	VACHT :	<i>Vesicular AcetylCholine Transporter</i>
	VAMP :	<i>Vesicle-Associated Membrane Protein</i>
W	WAT :	<i>Tryptophan (W) Amphiphilic Tetramerization domain</i>
	Wnt :	<i>Wingless</i>

RESUME

Rôle du collagène spécifique ColQ dans la formation de la jonction neuromusculaire

ColQ est un collagène spécifique ancrant l'acétylcholinestérase (AChE) dans la fente synaptique de la jonction neuromusculaire (JNM). L'importance du complexe AChE-ColQ dans le fonctionnement de cette synapse a été révélée par l'identification de mutations dans le gène humain codant pour ColQ qui sont à l'origine du syndrome myasthénique congénital avec déficience en AChE (SMC-1c). Les défauts présents chez les patients et le phénotype des souris ColQ^{-/-} modèles pour le SMC-1c sont complexes, la déficience en AChE ne rendant probablement pas compte de tous les symptômes. Nous avons donc fait l'hypothèse que ColQ pourrait réguler la formation de la JNM afin d'expliquer certains des défauts observés. J'ai montré que ColQ régule l'expression des sous-unités du récepteur de l'acétylcholine (RACH) *via* le récepteur tyrosine kinase MuSK, molécule clé dans la formation de la synapse et cela indépendamment de l'AChE. La conséquence de cette régulation est que ColQ contrôle la formation des agrégats de RACH impliqués dans la transmission synaptique. Par ailleurs, mes résultats ont révélé que l'absence de ColQ entraîne une réduction de l'expression de MuSK à la membrane. Cette observation prend tout son intérêt dans un contexte clinique montrant que certains symptômes sont communs aux patients atteints du SMC-1c et du SMC lié à des mutations de MuSK. De plus, des signes d'atrophie musculaire ont été découverts chez la souris ColQ^{-/-} pouvant laisser penser à une dénervation au moins partielle du muscle en absence de ColQ. Mes recherches ont ainsi permis de mettre en évidence des modifications pouvant être à l'origine des défauts fonctionnels observés lorsque ColQ est muté ou absent.

Mots clés : Jonction neuromusculaire, Syndrome myasthénique congénital, ColQ, Récepteur nicotinique de l'acétylcholine, Cholinestérases, MuSK.

ABSTRACT

Role of the specific collagen ColQ in the neuromuscular junction formation

ColQ is a specific collagen that anchors acetylcholinesterase (AChE) in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. The importance of AChE-ColQ complex in the physiology of this synapse has been highlighted by the identification of COLQ mutations in the human gene, leading to a congenital myasthenic syndrome with AChE deficiency (CMS-1c). The symptoms observed in patients and the defects of the neuromuscular junctions in adult ColQ mutant mice which are mice model for this CMS-1c are complex and AChE deficiency cannot account for all of them. We hypothesized that ColQ could play a role *per se* in synapse formation and therefore its absence would participate in the defects. I have shown that ColQ regulates the levels of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits *via* MuSK, a key protein in synapse formation, independently of AChE. The consequence of this regulation is that ColQ controls nAChR clustering implicated in synaptic transmission. Moreover, my results have shown that ColQ deficiency reduces membrane-bound MuSK. In this context, it is highly significant that the phenotypes of CMS-1c and MuSK CMS patients have similarities. In addition, atrophic signs were found in ColQ^{-/-} mice muscles suggesting a partial denervation of muscle fibers in the absence of ColQ. Modifications highlighted by my results may thus explain the origin of the functional defects linked to ColQ absence or mutation.

Key words: Neuromuscular junction, Congenital myasthenic syndrome, ColQ, Nicotinic acetylcholine receptor, Cholinesterases, MuSK.

INTRODUCTION

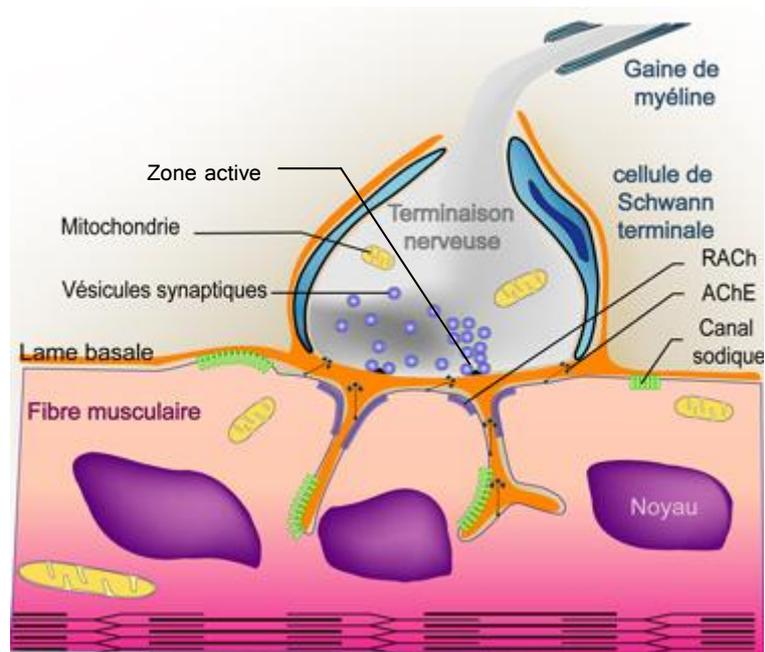
CONTEXTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

La jonction neuromusculaire squelettique est une structure de forme ovale constituée de quatre grands composants hautement spécialisés :

- une terminaison nerveuse correspondant à l'extrémité de l'axone du motoneurone, aussi appelée domaine pré-synaptique,
- une cellule de Schwann terminale, cellule gliale du système nerveux périphérique recouvrant la synapse,
- une lame basale constituant la fente synaptique,
- et une zone située au centre de la fibre musculaire squelettique ne dépassant pas 0.5% de la longueur totale de la cellule musculaire, le domaine post-synaptique.

Cette synapse peut mesurer de 20 à 50 μm , sa surface étant proportionnelle au diamètre de la fibre musculaire. Ce sont les travaux de René Couteaux qui ont fourni les premières bases morphologiques clairement définies de cette synapse (Tsuji, 2006).

La terminaison nerveuse est spécialisée dans la libération du neurotransmetteur, l'acétylcholine. Son cytoplasme présente de nombreuses vésicules synaptiques contenant l'acétylcholine, ainsi que de nombreuses mitochondries fournissant l'énergie nécessaire aux différents processus intracellulaires. Des vésicules synaptiques sont également accrochées au niveau de zones actives, sites de libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique en regard du muscle. La cellule de Schwann entourant la terminaison nerveuse permet de l'isoler de son environnement. Une fois libérée, l'acétylcholine diffuse dans la fente synaptique pour atteindre le muscle au niveau de domaines post-synaptiques enfoncés dans des gouttières peu profondes sous la terminaison nerveuse. A cet endroit, le muscle présente des invaginations ou replis sous-synaptiques s'ouvrant directement en face des zones actives pré-synaptiques. Les domaines post-synaptiques sont spécialisés dans la reconnaissance du neurotransmetteur et dans la transformation de l'information en provenance du nerf en un signal musculaire aboutissant à la contraction du muscle (Figure 1).



Copyright AFM

Figure 1. La jonction neuromusculaire

La terminaison nerveuse recouverte par la cellule de Schwann terminale occupe une gouttière peu profonde au centre de la fibre musculaire. Les zones actives de la terminaison nerveuse, apposées directement aux invaginations ou replis du domaine post-synaptique, centralisent la libération du neurotransmetteur, l'acétylcholine dans la fente synaptique. L'acétylcholine est reconnue par ses récepteurs post-synaptiques (RACH) puis dégradée par l'acétylcholinestérase (AChE).

Les vertébrés possèdent deux catégories de muscles : les muscles lisses et les muscles striés, ces derniers comprenant le muscle cardiaque et les muscles squelettiques. Les muscles lisses assurent les mouvements des viscères et des vaisseaux sanguins alors que les muscles squelettiques assurent des fonctions telles que la motricité et la posture de l'organisme ou encore la respiration. Au cours de mes travaux de recherche, je me suis plus particulièrement intéressée au muscle squelettique et à son innervation. Le muscle squelettique est constitué d'unités contractiles élémentaires appelées fibres musculaires entourées d'une gaine conjonctive finement vascularisée, l'endomysium. Les fibres musculaires sont regroupées en faisceaux, chaque faisceau étant individualisé par une enveloppe commune où circulent de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques mais aussi des fibres nerveuses, le péri-mysium. L'épi-mysium, lame conjonctive recouvrant l'ensemble du muscle, le péri-mysium et l'endomysium sont en continuité avec la formation tendineuse du muscle permettant l'ancrage des fibres musculaires au niveau du squelette osseux (Figure 2A). La force mécanique produite par la contraction des fibres musculaires permet ainsi la mise en mouvement du squelette. Cette contraction est rendue possible par les myofibrilles présentes dans les fibres musculaires et qui contiennent des sarcomères, organisations de filaments d'actine et de myosine donnant au muscle un aspect strié (Figure 2A). La contraction musculaire est induite par le système nerveux central qui transporte *via* les motoneurones une information électrique se transformant en message chimique au niveau des terminaisons nerveuses au contact des fibres musculaires. Chaque motoneurone peut innerver plusieurs fibres musculaires formant l'unité motrice du muscle, le plus petit élément contractile que le système nerveux puisse mettre en jeu (Figure 2B). En revanche, chaque fibre musculaire n'est innervée en son centre que par une unique terminaison nerveuse formant ainsi la jonction neuromusculaire, unité de transmission de l'information, la fibre musculaire et la terminaison nerveuse étant séparées l'une de l'autre par la lame basale synaptique (Figure 2B et 2C). Cette lame basale est constituée d'un grand nombre de protéines dont un collagène particulier appelé ColQ, sur lequel mes travaux se sont focalisés.

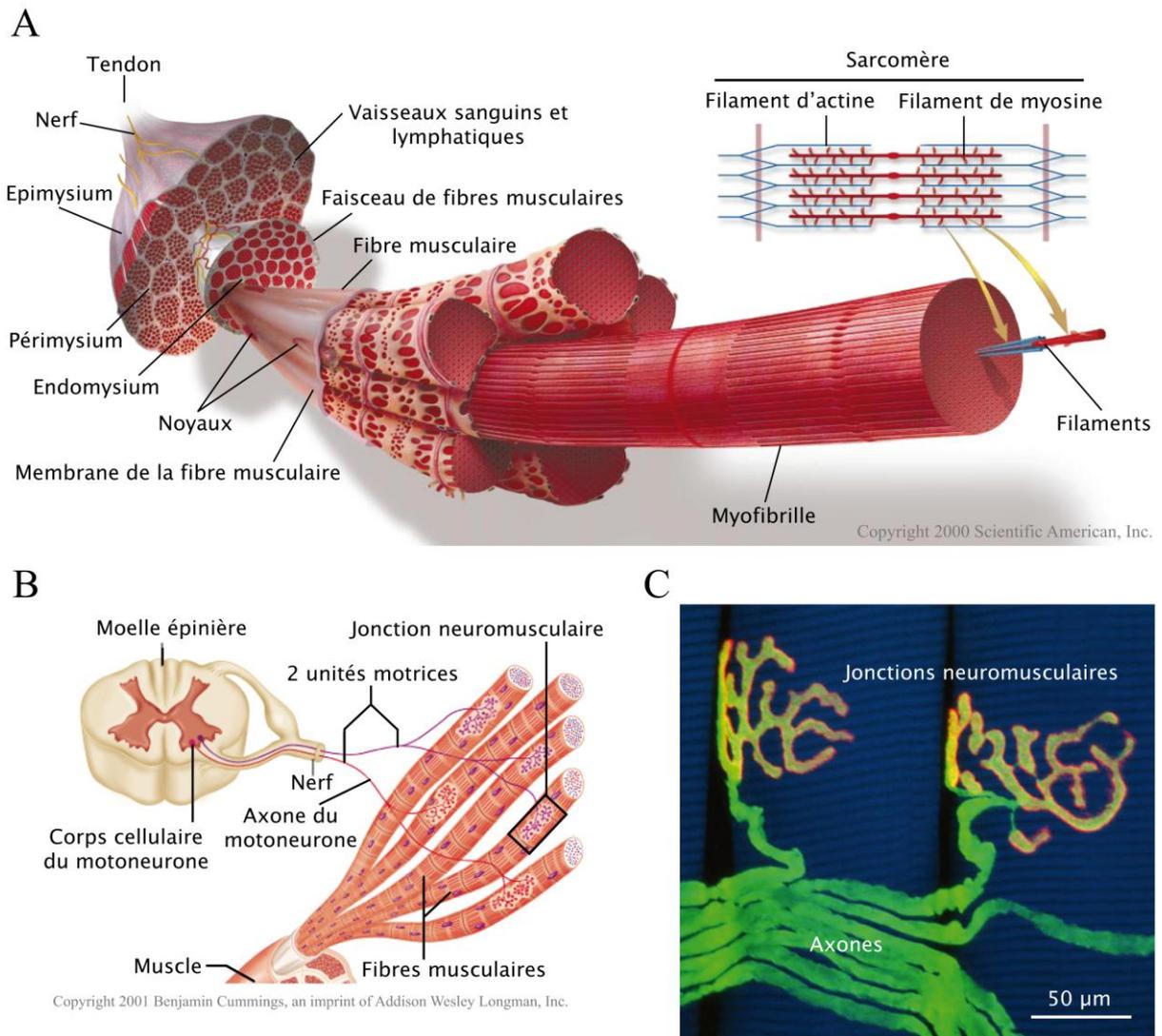


Figure 2. Du muscle à la jonction neuromusculaire

A. Le muscle squelettique est constitué d'unités contractiles, les myofibrilles formées de filaments d'actine et de myosine groupés en sarcomères. Ces unités contractiles sont associées dans des fibres musculaires assemblées en faisceaux formant ainsi le muscle. Les fibres musculaires, les faisceaux de fibres et le muscle sont entourés de lames basales conjonctives respectivement appelées endomysium, périmysium et épimysium. Ce réseau conjonctif se termine au niveau des tendons afin d'ancrer le muscle au squelette osseux.

B. Chaque motoneurone provenant de la moelle épinière peut innervé plusieurs fibres musculaires formant ainsi une unité motrice. Une fibre musculaire quant à elle ne peut être innervée en son centre que par une seule terminaison nerveuse formant ainsi la jonction neuromusculaire.

C. Image confocale de deux jonctions neuromusculaires sur deux fibres musculaires. Les axones des motoneurones sont marqués en vert, les domaines post-synaptiques (récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine) sont marqués en rouge et les sarcomères en bleu. La zone de contact entre les terminaisons nerveuses et les fibres musculaires, à savoir la lame basale synaptique, se situe entre les domaines pré- et post-synaptiques et est parfois visible en jaune (D'après Misgeld et Lichtman, 2003).

Au cours du développement embryonnaire, des étapes successives de différenciation musculaire et nerveuse précèdent et accompagnent la formation de la jonction neuromusculaire. Dans une phase précoce, les fibres musculaires et les motoneurones peuvent se développer indépendamment les uns des autres, mais très vite, des échanges d'informations entre le nerf et le muscle *via* la lame basale vont s'avérer nécessaires à la formation de la synapse puis à sa maturation. Ces étapes de différenciation musculaire et nerveuse précoces et tardives sont décrites dans les deux premières parties de cette introduction.

Un grand nombre de mutations de gènes codant pour des protéines de la terminaison nerveuse, de la lame basale ou encore du domaine post-synaptique de la fibre musculaire aboutit à des syndromes myasthéniques congénitaux, pathologies de la jonction neuromusculaire. Ces pathologies présentées dans la troisième partie de cette introduction résultent de défauts de communication entre le nerf et le muscle. Parmi ces syndromes, je me suis plus spécifiquement intéressée au syndrome myasthénique congénital de type 1c (SMC-1c) lié à des mutations du collagène spécifique ColQ. Le but de mes travaux a essentiellement été d'étudier les différents rôles de ColQ dans le développement du domaine post-synaptique de la jonction neuromusculaire d'une part et dans l'organisation de la lame basale d'autre part.

I. LES ETAPES PRECOCES DE LA DIFFERENCIATION MUSCULAIRE ET NERVEUSE

Les étapes précoces de différenciation du muscle et du nerf peuvent se produire de façon indépendante l'une de l'autre. Ces étapes se déroulent entre les stades embryonnaires E7.5 et E14 chez la souris.

A. La différenciation musculaire précoce

1. Des cellules somitiques mésenchymateuses aux myoblastes

Chez la souris, le muscle squelettique est issu du mésoderme para-axial qui se segmente en somites de chaque côté du tube neural et de la notochorde. Les premiers somites apparaissent au stade embryonnaire E7.5 et se développent selon l'axe antéro-postérieur de l'embryon (Figure 3A). Les cellules pluripotentes présentes dans ces somites vont se différencier et acquérir des propriétés différentes induites par des signaux provenant des tissus adjacents. Sous l'influence d'une forte concentration de Sonic hedgehog (Shh) produite par le tube neural et la notochorde et de protéines inhibitrices de la myogenèse (*Bone Morphogenetic Proteins, BMPs*) produites par le mésoderme latéral, les cellules de la partie ventrale du somite vont se mettre à exprimer des facteurs de transcription (Pax1 et Pax9 de la famille des gènes *paired box*, Twist et Scleraxis) spécifiques du sclérotome à l'origine du cartilage, des vertèbres et des côtes (Figure 3B). La partie dorsale quant à elle va former le dermomyotome subdivisé en dermatome qui donnera le derme et en myotome qui donnera naissance à deux populations de cellules myogéniques selon leur provenance épaxiale (dorsale par rapport à la notochorde) ou hypaxiale (ventrale par rapport à la notochorde). Les cellules de la lèvre dorso-médiane migrent sous le dermomyotome épaxial pour former le myotome primaire épaxial à l'origine de la musculature dorsale. Les cellules de la lèvre ventro-latérale migrent sous le dermomyotome hypaxial donnant naissance au myotome primaire hypaxial à l'origine des muscles abdominaux et intercostaux, du diaphragme et des muscles des membres. Une faible concentration de Shh en synergie avec des Wnts (*Wingless*) produites par le tube neural et l'ectoderme de surface vont induire l'expression des gènes spécifiques du myotome, qu'il soit épaxial ou hypaxial (Figure 3B) (Buckingham et al., 2003; Parker et al., 2003; Tajbakhsh, 2003).

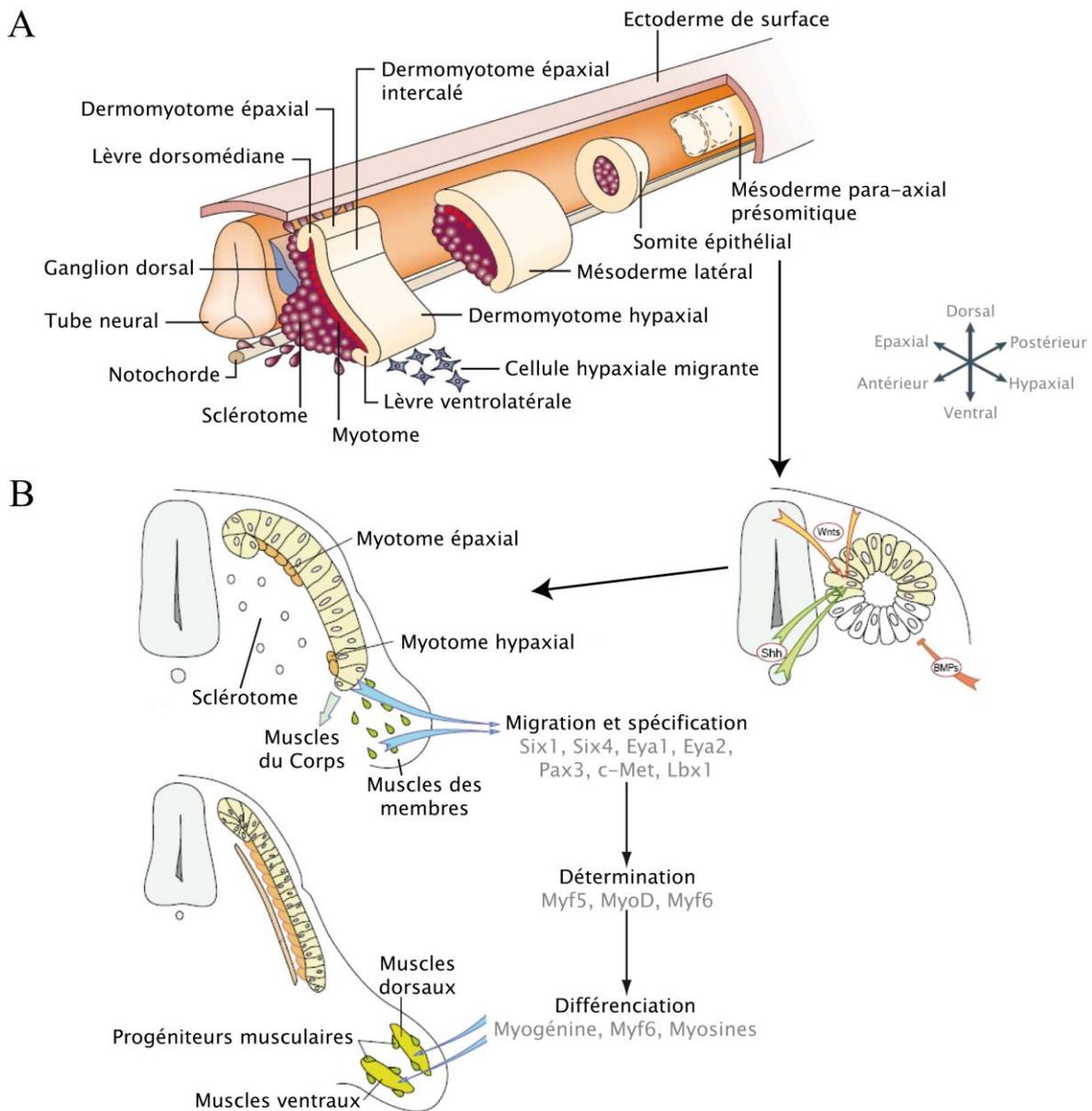


Figure 3. Représentation schématique de la différenciation musculaire précoce

A. Le mésoderme para-axial présomitique situé de chaque côté du tube neural et de la notochorde se segmente en somites le long de l’axe antéro-postérieur de l’embryon. La différenciation du somite va donner naissance au sclérotome et au dermomyotome, ce dernier étant à l’origine du myotome qui donnera naissance aux cellules myogéniques (D’après Parker, 2003).

B. Une faible concentration de Shh en synergie avec des Wnts induit l’expression des gènes spécifiques du myotome alors qu’une forte concentration de Shh associée à la présence de BMPs est responsable de l’inhibition de la myogenèse dans les cellules situées en position ventrale du somite. Une extension des cellules myogéniques du myotome donnera naissance aux muscles axiaux alors que des cellules hypaxiales migrantes délaminent de la lèvre ventro-latérale et migrent vers les bourgeons des membres. Ces myoblastes vont proliférer, se différencier et fusionner en myotubes sous l’influence d’une cascade d’expression génique (D’après Tajbakhsh, 2003).

Aux stades embryonnaires E8.5-E10.5 de la souris, la première vague de progéniteurs myogéniques donne naissance au myotome primaire. Au niveau épaxial, la détermination des myoblastes primaires se fait dès E8.5 grâce à l'expression des facteurs de régulation myogénique Myf5, Myf6 (également appelé MRF4) et MyoD sous l'influence du facteur de transcription Pax3 alors qu'au niveau hypaxial, l'inhibiteur de la myogenèse BMP4 produit par le mésoderme latéral retarde l'expression de ces mêmes facteurs myogéniques jusqu'à E10 ; l'inhibition de la myogenèse étant levée par les facteurs Wnt1 et Shh activant Noggin, un inhibiteur de BMP4 (Hirsinger et al., 1997; Dahlqvist et al., 2003; Kassam-Duchossoy et al., 2004). Puis, aux stades E9.5-E11.5, une deuxième vague de progéniteurs myogéniques issus de la partie centrale du dermomyotome va se déterminer en myoblastes secondaires sous le contrôle de Myf5 et MyoD activés par les facteurs de transcription Pax3/Pax7 (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005). Les muscles axiaux d'origine épaxiale ou hypaxiale se formeront par extension du myotome sans migration préalable alors que les muscles des membres ne se formeront qu'après migration des précurseurs myoblastiques hypaxiaux (cellules hypaxiales migrantes) au niveau des bourgeons des membres. La délamination et la migration des précurseurs myoblastiques sont le résultat de l'activation de la transition épithélium-mésenchyme au niveau du dermomyotome grâce à l'expression de Pax3, activée par les homéoprotéines Six1, Six4 et leurs co-facteurs Eya1, Eya2 (Grifone et al., 2005). Cette migration implique également l'expression de c-Met, récepteur tyrosine kinase activé par le facteur de croissance *Hepatocyte growth factor/Scatter* et de l'homéoprotéine Lbx1 (*Lady bird homeobox 1*) nécessaires au guidage des cellules hypaxiales migrantes et au maintien de leur capacité migratoire (Takayama et al., 1996; Brohmann et al., 2000). Ce n'est qu'à leur arrivée au niveau des bourgeons des membres que les précurseurs myoblastiques vont se mettre à exprimer les facteurs myogéniques Myf5 ou MyoD sous l'action de Pax3, BMP4 inhibant leur différenciation tout au long de leur migration (Bajard et al., 2006). Les myoblastes ayant atteint leur territoire vont ensuite pouvoir proliférer tant qu'ils resteront sous le contrôle de facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs). Suite à la diminution de ces facteurs, les myoblastes vont pouvoir sortir du cycle cellulaire, stopper leur division et se différencier (Figure 3B) (Hollway and Currie, 2005; Bryson-Richardson and Currie, 2008).

2. Des myoblastes aux myotubes

Suite à leur sortie du cycle cellulaire, les myoblastes primaires vont s'aligner grâce à des glycoprotéines membranaires (cadherines et intégrines) et vont fusionner de façon quasi-synchrone sous l'influence du calcium et de la myogénine, cette dernière étant activée par les facteurs myogéniques évoqués précédemment. Les myotubes multinucléés primaires formés à partir du stade E10.5 vont ensuite s'assembler en faisceaux parallèles donnant ainsi leur forme aux futurs muscles dès le stade E12.5. A ce stade, les fibres primaires sont reliées entre elles par des jonctions serrées. Par la suite, les myoblastes secondaires vont se diviser le long des myotubes primaires déjà formés et vont fusionner de façon asynchrone à partir du stade embryonnaire E14.5 pour former les myotubes secondaires ; les myotubes primaires servant ainsi de matrice aux myotubes secondaires qui vont ensuite s'individualiser en formant leur propre lame basale (Bryson-Richardson and Currie, 2008; Rigoard et al., 2009a). Tous les myoblastes secondaires ne vont pas fusionner en myotubes formant une catégorie de cellules particulières, les cellules satellites. Suite aux deux vagues successives de formation de myotubes, aucun autre nouveau myotube n'apparaîtra. Les cellules satellites seront donc les seules responsables de la croissance des muscles après la formation des myotubes secondaires. En effet, ce sont les seules cellules myogéniques capables de sortir du cycle cellulaire et de devenir quiescentes sans pour autant entrer dans le processus de différenciation. Elles pourront ensuite être activées, entrer à nouveau dans le cycle cellulaire et après plusieurs cycles de division, acquérir la capacité de se différencier. Outre la croissance, les cellules satellites sont également nécessaires à la réparation du muscle en cas de lésion des fibres suite à un traumatisme (Figure 3B) (Nabeshima et al., 1993; Hutcheson et al., 2009; Relaix and Marcelle, 2009).

Les myotubes primaires et secondaires ne sont pas homogènes en ce qui concerne l'expression de gènes spécifiques du muscle. Cette diversité réside dans le fait que tous les muscles ne vont pas avoir la même fonction. Certains muscles seront à contraction lente et peu fatigables grâce à un métabolisme oxydatif (type 1), d'autres seront à contraction rapide mais fatigables, utilisant un métabolisme glycolytique (type 2) et les derniers auront des caractéristiques intermédiaires. Ainsi, les muscles composés essentiellement de fibres lentes oxydatives pourront fournir des efforts prolongés et répétés alors que les muscles possédant des fibres rapides pourront fournir des efforts intenses mais discontinus. Cette diversité est rendue possible notamment par l'expression de différentes isoformes de protéines musculaires influençant les propriétés métaboliques et contractiles du muscle. Par exemple, la chaîne

lourde de la myosine (*Myosin Heavy Chain, MHC*) possède quatre isoformes : l'isoforme lente MHC-1 et les isoformes rapides MHC-2A, MHC-2B et MHC-2X. D'autres isoformes rapides sont également produites par le muscle en développement : la forme embryonnaire (MHC-emb) et la forme néonatale (MHC-néo) qui disparaîtront toutes les deux au stade adulte.

Au départ, les myotubes primaires expriment à la fois la myosine lente MHC-1 et la myosine rapide MHC-emb, cette dernière étant présente dans toutes les fibres néoformées. Sous l'influence de facteurs de régulation génique intrinsèques et de facteurs extrinsèques, ces fibres vont être en majorité à destinée lente grâce à la conservation de leur capacité à exprimer MHC-1 et à la perte de l'expression des myosines rapides. Cependant, une partie de ces fibres peut acquérir la capacité à exprimer les myosines rapides MHC-2B et MHC-2X et ainsi devenir des fibres rapides ; des travaux récents montrant que cette transition de fibres lentes à rapides peut être régulée par les homéoprotéines Six1 et Six4 (Niro et al., 2010). De la même manière, les myotubes secondaires exprimant la myosine rapide MHC-néo vont en général devenir des fibres rapides dans lesquelles MHC-néo sera remplacée par MHC-2A, MHC-2B et MHC-2X, sans pour autant perdre leur capacité à devenir des fibres lentes selon que l'expression de certains marqueurs rapides ou lents sera conservée (Condon et al., 1990; Lu et al., 1999; Sacks et al., 2003). Il a d'ailleurs été montré que Wnt5a peut favoriser le devenir lent des myotubes secondaires alors que Wnt4 et Wnt11 favorisent leur devenir rapide (Anakwe et al., 2003; Takata et al., 2007).

3. Des myotubes aux fibres musculaires

Le passage des myotubes primaires et secondaires aux fibres musculaires s'accompagne de la migration des noyaux d'une position jusqu'alors centrale vers la périphérie du myotube, sous le sarcolemme. La fibre musculaire ne sera ensuite fonctionnelle que lorsque l'accumulation de protéines impliquées dans la contraction atteindra une concentration suffisante. L'élaboration des myofibrilles musculaires débute par la formation de corps denses amorphes d' α -actinine qui évolueront pour donner les stries Z (Figure 4A). Les filaments fins d'actine se fixent ensuite sur les précurseurs de stries Z pour aboutir à des complexes « Bande I–Strie Z–Bande I ». Les filaments fins d'actine sont également associés à la tropomyosine et à trois troponines : la troponine I (inhibitrice), la troponine C (liant le calcium) et la troponine T (liant la tropomyosine). En parallèle et de façon indépendante à ce processus, la myosine se polymérise et s'assemble dans le cytoplasme voisin pour aboutir aux

filaments épais de myosine. L'association des précurseurs d'actine et de myosine va donner naissance au sarcomère, unité contractile de base des myofibrilles correspondant à la zone présente entre deux stries Z. Deux autres compartiments se développent en parallèle des sarcomères : d'une part les tubules transverses (tubules T), invagination du sarcolemme permettant de propager le potentiel d'action musculaire jusqu'au cœur de la cellule et d'autre part le réticulum sarcoplasmique, compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du calcium (Figure 4A) (Epstein and Fischman, 1991).

La contraction se produit en réponse à une stimulation nerveuse provoquant le changement de polarité de la membrane du tubule T en contact rapproché avec deux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique ; le tubule T et les deux citernes formant une triade. Le changement de conformation des récepteurs dihydropyridine de la membrane du tubule T entraîne l'ouverture des récepteurs de la ryanodine, canaux calciques responsables de la libération massive du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique dans l'espace intracellulaire de la fibre musculaire. La liaison du calcium sur la troponine C provoque le changement de conformation des troponine T et tropomyosine, libérant ainsi le site de liaison de la myosine sur l'actine. Dans le même temps, la fixation du calcium sur la troponine C lève l'inhibition produite par la troponine I sur l'activité ATPasique de la tête de myosine, l'hydrolyse en ADP de la molécule d'ATP fixée sur la tête de myosine permettant la formation d'un complexe actine-myosine-ADP-P. La libération de l'ADP-P entraîne alors le changement d'angle des têtes de myosine fixées sur l'actine produisant le glissement des filaments fins sur les filaments épais. La fixation de nouvelles molécules d'ATP sur les têtes de myosine provoque la rupture de la liaison actine-myosine, la tropomyosine retrouvant son rôle de masquage du site de liaison de la myosine sur l'actine et la troponine I son rôle d'inhibiteur ATPasique. Ce cycle se reproduit tant que le calcium reste en concentration élevée dans le cytoplasme, aboutissant au raccourcissement des sarcomères et de l'ensemble du muscle, un sarcomère pouvant passer de 3.4 nm à 2.4 nm de longueur (Figure 4B) (Farah and Reinach, 1995).

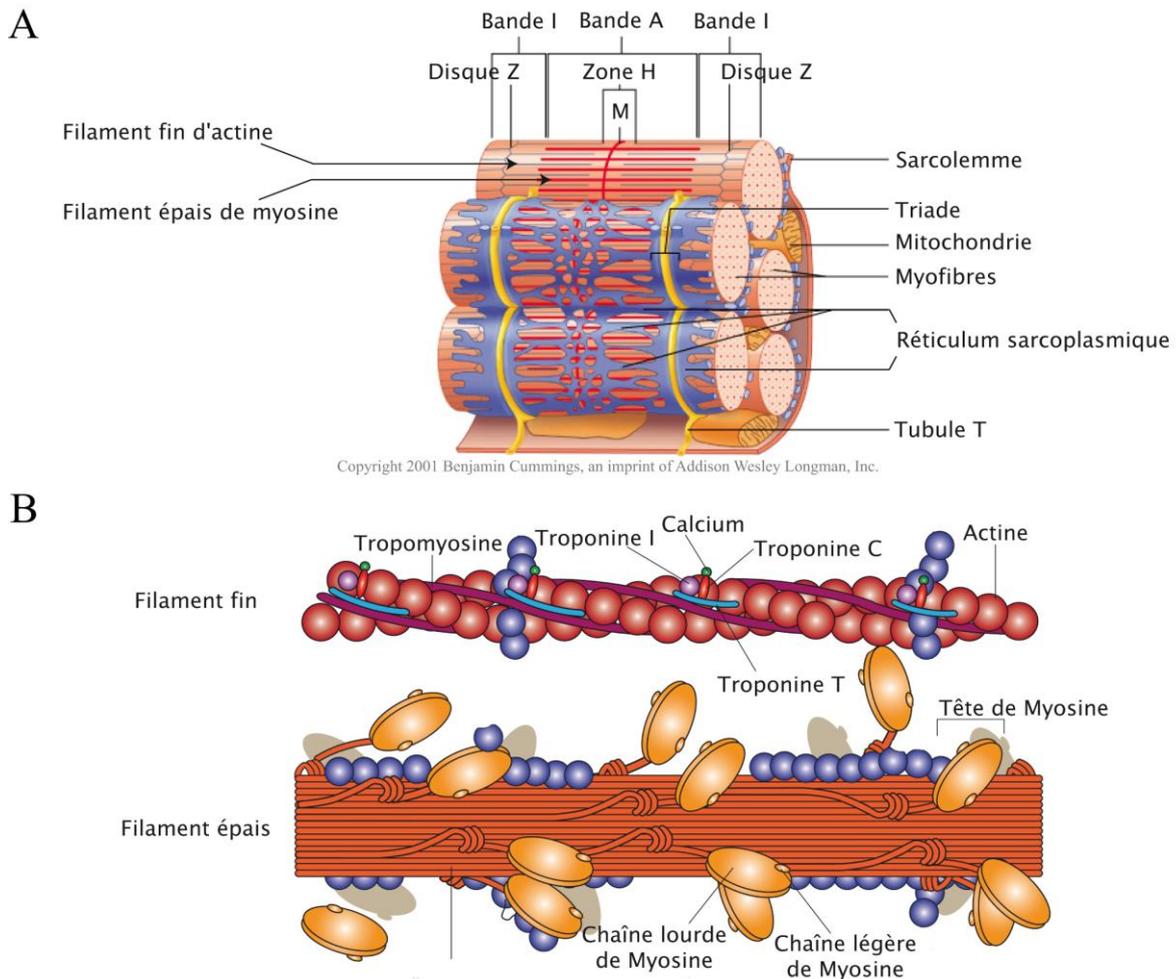


Figure 4. Sarcomère et contraction musculaire

A. Les sarcomères sont les unités contractiles responsables de l'apparence striée des muscles squelettiques. On définit un sarcomère comme étant le segment entre deux disques Z voisins (de l'allemand *zwischen*, signifiant « entre »). À côté d'un disque Z, on retrouve la bande I (pour *isotropique*), dont le constituant principal est l'actine qui s'étend jusqu'à la bande A (pour *anisotropique*). On retrouve une partie plus pâle dans cette région appelée la zone H (de l'allemand *heller*, « plus pâle ») possédant en son centre la ligne M (de l'allemand *mittel*, « centre »). Le constituant principal de cette zone H est la myosine qui s'étend jusqu'à la bande A. Une série de sarcomères va former la fibre musculaire dont la membrane plasmique, le sarcolemme s'invagine pour former les tubules T entourés du réticulum sarcoplasmique à l'origine des triades.

B. La contraction musculaire se produit suite à la dépolarisation du sarcolemme qui provoque la libération massive du calcium du réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme des fibres musculaires. Le calcium se fixe sur la troponine C provoquant le changement de conformation de la troponine T et de la tropomyosine libérant le site d'interaction actine-myosine. En parallèle, le changement de conformation de la troponine I lève l'inhibition de l'activité ATPasique des têtes de myosine permettant aux têtes de myosine de se fixer sur les filaments d'actine. Le basculement des têtes de myosine permet de faire glisser les filaments fins d'actine sur les filaments épais de myosine.

A partir du stade E12.5, après la formation des fibres musculaires primaires et suite à la migration des noyaux sous le sarcolemme, un petit nombre de noyaux situés au centre des fibres musculaires va exprimer des gènes essentiellement synaptiques. Vont alors commencer à apparaître des micro-agrégats composés de différentes protéines synaptiques au centre des fibres ; il s'agit de la « pré-empreinte » musculaire. On observe notamment l'apparition de micro-agrégats de récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (RnACh) d'environ 50 à 60 μm^3 (Figure 5A). Le RnACh est un pentamère d'environ 280 kDa constitué de deux sous-unités $\alpha 1$, d'une sous-unité $\beta 1$, d'une sous-unité δ et d'une sous-unité γ , cette dernière étant une forme embryonnaire qui sera remplacée à la naissance par la forme adulte ϵ . Deux modèles sont proposés pour l'assemblage des sous-unités du RnACh dans le réticulum endoplasmique des fibres musculaires. Le premier consiste en la formation d'hétérodimères de sous-unités « α - γ » et « α - δ » s'associant entre eux et à la sous-unité « β », le deuxième correspondant à l'association des sous-unités « α - β - γ » en trimère puis par l'ajout successif de la sous-unité « δ » et de la deuxième sous-unité « α » (Green, 1999). Les pentamères de RnACh complets, représentant seulement une petite proportion de tous les récepteurs formés vont ensuite pouvoir être transportés et incorporés dans la membrane plasmique des fibres musculaires. Le domaine extracellulaire de ce pentamère présente les deux sites de fixation de son ligand, l'acétylcholine à l'interface entre les sous-unités α - δ et α - γ/α - ϵ . Le domaine membranaire forme un canal permettant le passage à travers la membrane des ions sodium, potassium ou calcium en réponse à l'activation du RnACh par son ligand (Arias, 1997). Chaque sous-unité du RnACh possède quatre domaines transmembranaires hydrophobes (M1-M4) participant à la formation du canal et une boucle cytoplasmique, les domaines N- et C-terminaux se trouvant dans la partie extracellulaire où les domaines N-terminaux des sous-unités α participent à la reconnaissance du neurotransmetteur (Figure 5B).

Dans l'établissement de la « pré-empreinte » musculaire, l'agrégation du RnACh est induite par l'activation d'un récepteur tyrosine kinase spécifique du muscle, MuSK ; MuSK étant indispensable à ce processus puisqu'aucun agrégat de RnACh ne peut se former en son absence (Lin et al., 2001; Yang et al., 2001). En tant que récepteur tyrosine kinase, MuSK possède un domaine transmembranaire, un domaine extracellulaire lui permettant d'interagir avec ses ligands et un domaine tyrosine kinase intracellulaire. Au niveau de sa région extracellulaire, MuSK possède trois domaines *immunoglobuline-like* (Ig1, Ig2 et Ig3) en partie N-terminale, un domaine riche en cystéines (CRD) et un domaine Ig4 proche du domaine transmembranaire. Le domaine cytoplasmique quant à lui contient un site PTB

(*phosphotyrosine binding domain*), un site de liaison à l'ATP, un domaine tyrosine kinase et un site de liaison aux protéines PDZ (Strochlic et al., 2005). Lorsqu'il est activé, MuSK est capable d'induire sa propre phosphorylation mais également la phosphorylation des protéines qui interagissent avec son domaine cytoplasmique. Il a été récemment montré que LRP4 (*low density lipoprotein receptor-related protein 4*) interagit avec MuSK au niveau de son domaine extracellulaire, LRP4 étant tout comme MuSK indispensable à l'agrégation des RnACh (Weatherbee et al., 2006; Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008). En revanche, il n'a pas été démontré si LRP4 agit en amont ou directement avec MuSK dans la formation de la « pré-empreinte » musculaire. Des études ont montré que l'expression de LRP4 dans des cellules BaF3 (lignée cellulaire immortalisée de pro-B-lymphocytes dérivée de la moelle osseuse de souris) entraîne leur auto-agrégation, ce qui n'est pas le cas pour des mêmes cellules exprimant MuSK. Par contre, des cellules BaF3 exprimant LRP4 peuvent s'auto-agréger avec des cellules BaF3 exprimant MuSK. Ces résultats pourraient expliquer comment MuSK s'associe en dimères pour établir la « pré-empreinte » musculaire ; soit LRP4 seul permet la dimérisation de MuSK, soit LRP4 est le co-récepteur d'un ligand encore inconnu de MuSK entraînant son activation et donc sa dimérisation (Kim et al., 2008). A l'heure actuelle, il est également proposé que des Wnts pourraient interagir directement avec MuSK et ainsi l'activer (Jing et al., 2009). Une fois phosphorylé grâce à son co-activateur cytoplasmique Dok-7, MuSK recrute une autre protéine cytoplasmique associée à la membrane, la rapsyne. La rapsyne peut ensuite s'auto-associer et interagir avec les boucles cytoplasmiques du RnACh entraînant la phosphorylation de la sous-unité $\beta 1$ du RnACh et son agrégation. Tout comme MuSK, LRP4 et Dok-7, la rapsyne est indispensable à la formation des micro-agrégats de RnACh. Ces quatre protéines semblent donc être critiques dans le développement précoce du domaine post-synaptique (Sanes and Lichtman, 2001; Bergamin et al., 2010; Muller et al., 2010). A partir du stade embryonnaire E14, l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme qui sera par la suite nécessaire au contrôle de la transmission synaptique se trouve accumulée en position centrale du muscle, tout comme le RnACh (Lin et al., 2001).

Même si le nerf est déjà à proximité des fibres musculaires entre les stades E13 et E14, il a été montré que l'apposition de la terminaison nerveuse sur les agrégats de RnACh est encore très rare. De plus, à ces stades, ni le nerf ni ses facteurs sécrétés et notamment l'agrine ne sont nécessaires à la formation de la « pré-empreinte » musculaire puisque des souris mutantes ne présentant pas de motoneurones forment des micro-agrégats de RnACh en position centrale des fibres musculaires, tout comme des souris normales. L'agrine étant un facteur favorisant la formation des agrégats de RnACh, il a été envisagé que l'agrine dérivée

du muscle puisse participer à la formation des agrégats précoces de RnACh, bien que cette agrine non neuronale soit un variant d'épissage alternatif mille fois moins efficace sur ce processus que l'agrine neuronale (Reist et al., 1992; Gesemann et al., 1995). Des mutants déficients à la fois pour l'agrine neuronale et pour l'agrine non neuronale ont donc été créés. Cependant, l'établissement de la « pré-empreinte » musculaire n'est pas perturbée chez ces mutants, montrant que l'agrine non neuronale ne participe pas à la formation des micro-agrégats de RnACh à ce stade (Lin et al., 2001; Yang et al., 2001). Le mécanisme responsable de l'agrégation des RnACh uniquement au centre des fibres à ce stade précoce reste à l'heure actuelle mal connu. Il semblerait que l'expression préférentielle de MuSK dans les noyaux localisés au milieu des fibres soit impliquée dans ce processus. Ainsi, l'expression ectopique de MuSK dans des fibres musculaires entraîne l'expression ectopique du RnACh à l'origine de la formation d'agrégats de RnACh tout le long des fibres (Kim and Burden, 2008). Il a également été montré qu'en absence de LRP4, MuSK ainsi que plusieurs sous-unités du RnACh sont exprimés de façon ectopique au niveau des fibres musculaires. LRP4, pourrait donc être impliqué dans l'expression préférentielle des gènes synaptiques en position centrale des fibres musculaires en agissant précocement sur la spécialisation des noyaux post-synaptiques (Weatherbee et al., 2006). Bien que LRP4 semble participer à l'expression préférentielle de MuSK en position centrale des fibres, ce phénomène pourrait être le résultat direct de la fusion des myoblastes en myotubes. En effet, il est connu que MuSK se trouve exprimé de façon beaucoup plus importante dans les myoblastes en fusion que dans les myoblastes en prolifération (Valenzuela et al., 1995). La formation de la fibre musculaire se faisant par fusion de myoblastes aux deux extrémités du myotube néoformé, cela pourrait expliquer que l'expression des gènes synaptiques débute au niveau des noyaux situés en position centrale. En dehors de l'expression préférentielle de MuSK au centre des fibres musculaires, des études réalisées chez le poisson zèbre montrent la nécessité de l'interaction entre Wnt11r et unplugged, l'homologue de MuSK chez cette espèce pour former la « pré-empreinte » centrale du muscle, les mutants déficients pour Wnt11r présentant une dispersion des agrégats de RnACh le long des fibres (Jing et al., 2009). Il semblerait donc que des facteurs agissant sur MuSK favoriseraient le maintien en position centrale de la « pré-empreinte » musculaire. Quel que soit le mécanisme impliqué dans la formation de la « pré-empreinte » musculaire en position centrale des fibres, l'ensemble de ces données montrent en tout cas que la différenciation post-synaptique précoce résulte uniquement de mécanismes intrinsèques au muscle.

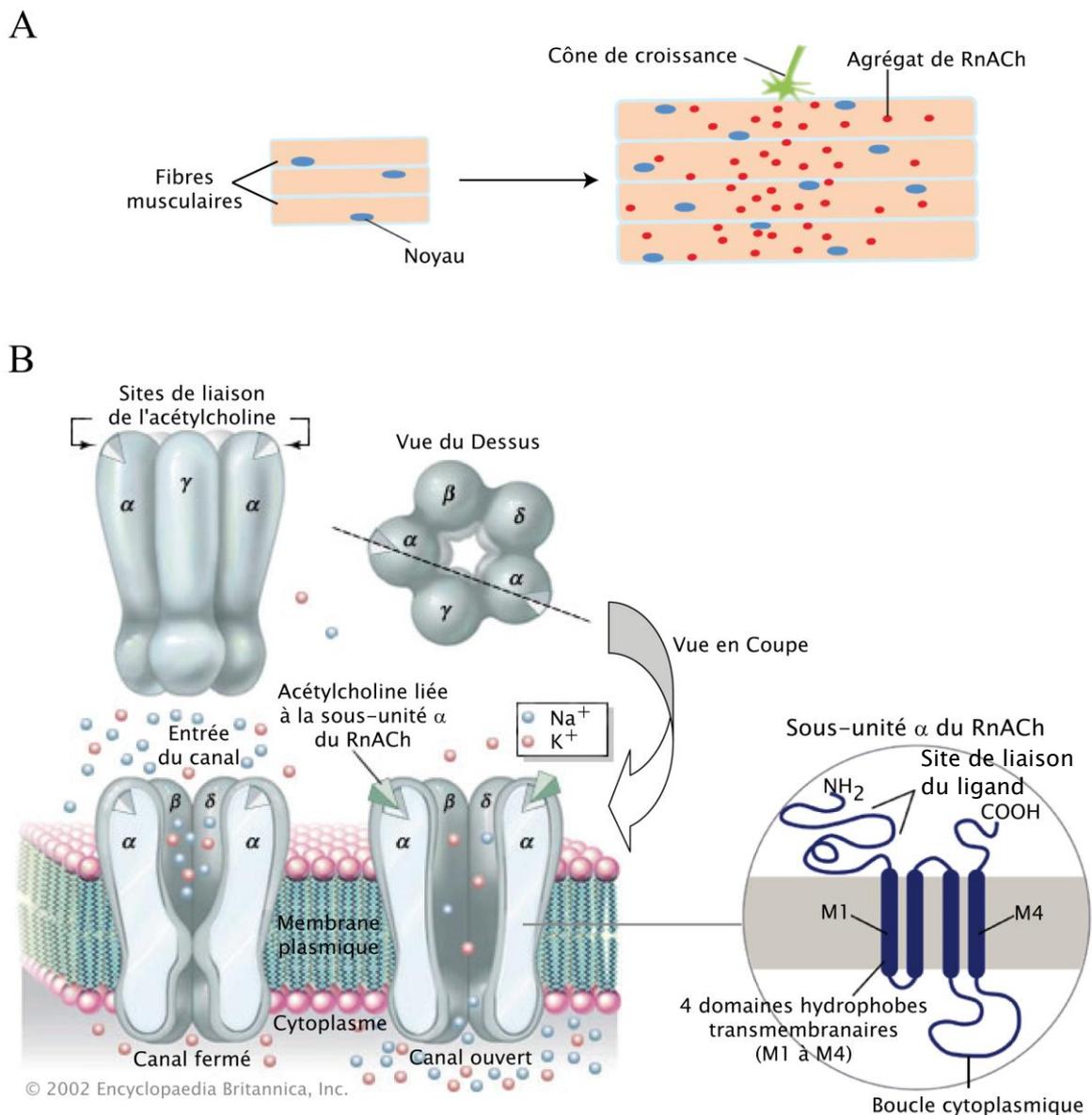


Figure 5. « Pré-empreinte » musculaire et récepteur nicotinique de l'acétylcholine

A. Les noyaux ayant migré sous le sarcolemme au centre des fibres musculaires expriment des gènes essentiellement synaptiques. Apparaissent alors des micro-agrégats composés de différentes protéines synaptiques dont le RnACh, formant la « pré-empreinte » musculaire (D'après Wu et al., 2010).

B. Le RnACh est un pentamère d'environ 280 kDa constitué de deux sous-unités α , d'une sous-unité β , d'une sous-unité δ et d'une sous-unité embryonnaire γ remplacée à la naissance par la sous-unité adulte ϵ . Suite à la fixation de deux molécules d'acétylcholine sur les sites de liaison présents au niveau du domaine N-terminal des sous-unités α du RnACh, le canal formé par les domaines hydrophobes transmembranaires des cinq sous-unités du RnACh s'ouvre pour laisser entrer les ions sodium (et calcium) et sortir les ions potassium.

B. La différenciation du motoneurone

1. Du tube neural au motoneurone

Les motoneurons et certaines classes d'interneurones sont générés par des signaux agissant sur le tube neural selon un axe dorso-ventral. Ces signaux incluent Shh sécrétée par la notochorde puis par le plancher du tube neural et des facteurs de croissance de la famille des TGF β (*Transforming growth factor β*) tels que BMP4, BMP5 et BMP7 produites à partir du toit du tube neural. Shh et TGF β sont exprimés selon des gradients opposés ; la quantité de Shh étant plus élevée en position ventrale puis progressivement décroissante jusqu'à la partie dorsale alors que les TGF β augmentent progressivement jusqu'à la zone dorsale du tube neural. Ces gradients permettent l'expression de différentes combinaisons de facteurs de transcription au niveau des précurseurs neuronaux. Des FGFs et l'acide rétinoïque provenant du mésoderme para-axial sont également impliqués dans ce processus aboutissant à la définition d'une identité pour chaque classe de neurones exprimant des facteurs spécifiques. Ainsi, les neurones spinaux peuvent être classés en deux grandes fonctions selon qu'ils sont situés en position dorsale ou ventrale du tube neural. Les neurones transmettant les informations sensorielles sont concentrés en position dorsale alors que les neurones de circuits impliqués dans la proprioception et le contrôle moteur se trouvent en position ventrale. La partie ventrale du tube neural contient des interneurones mais surtout les motoneurons qui expriment spécifiquement les facteurs de transcription Hb9, Lhx3 et Isl1/2 et cela peu de temps après leur spécification au stade E9.5 (Figure 6A) (Jessell, 2000; Dasen and Jessell, 2009).

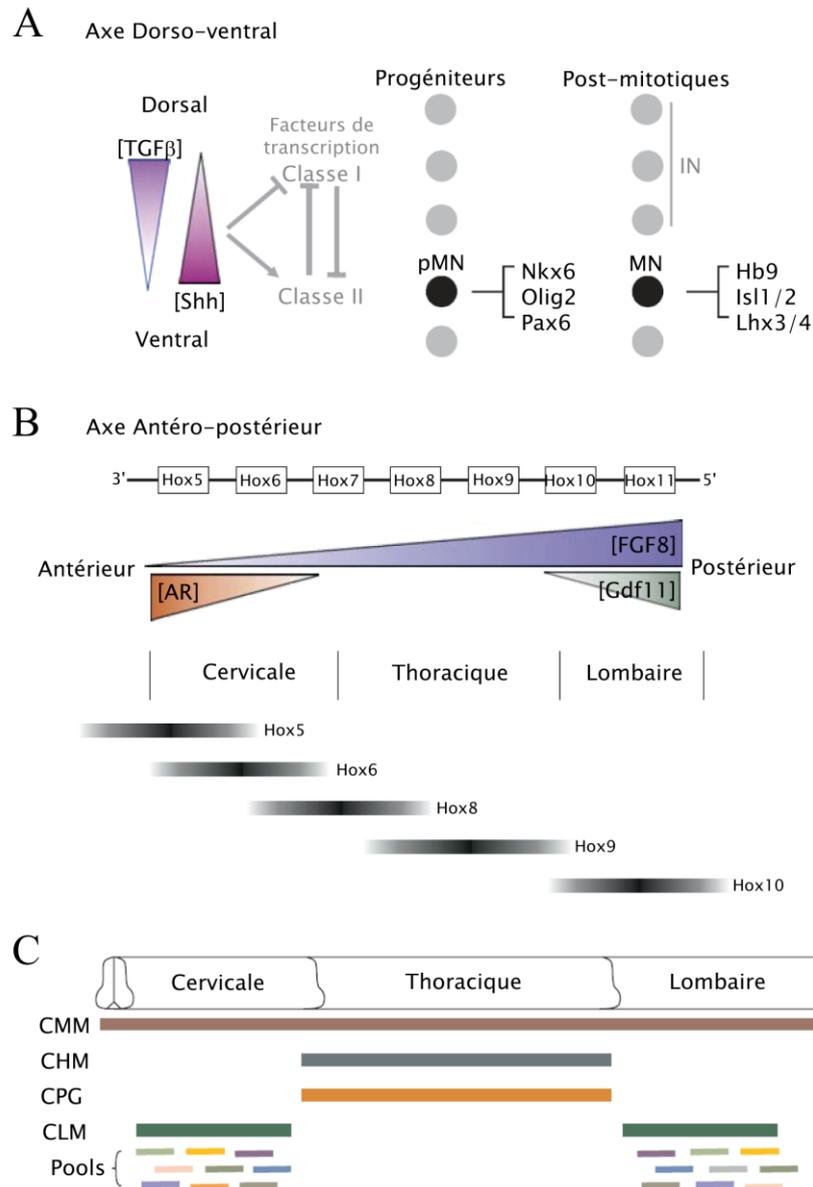


Figure 6. Régionalisation dorso-ventrale et antéro-postérieure du tube neural

A. La régionalisation dorso-ventrale du tube neural résulte de l'action de deux gradients opposés : le gradient de la protéine Shh produit à partir du plancher du tube neural et le gradient de protéines de la famille des TGFβ produit à partir du toit du tube neural. Cette régionalisation permet la formation de différentes classes d'interneurones (IN) mais aussi des motoneurones (MN).

B. La régionalisation antéro-postérieure du tube neural provient d'une combinaison de gradients d'acide rétinoïque (AR), de FGFs et de Gdf11 régulant l'expression de différentes Hox. Trois zones sont ainsi formées : la zone cervicale, la zone thoracique et la zone lombaire.

C. Les trois territoires du tube neural produits dans l'axe antéro-postérieur du tube neural sont divisés en colonnes et en pools, permettant aux motoneurones de développer des connections spécifiques à chaque type de cellules cibles. CMM, colonne médiane motrice ; CHM, colonne hypaxiale motrice ; CPG, colonne pré-ganglionnaire ; CLM, colonne latérale motrice (D'après Dasen and Jessel 2009).

Les motoneurones vont ensuite se diversifier en sous-types distincts selon l'axe antéro-postérieur du tube neural. Ainsi, plusieurs territoires du tube neural peuvent être distingués en fonction des combinaisons d'expression des protéines Hox (*Homeobox*), à savoir les zones cervicale, thoracique et lombaire. Ce sont des FGFs, l'acide rétinoïque et BMP11 (également appelé Gdf11 pour *Growth differentiation factor 11*) exprimés selon différents gradients dans l'axe antéro-postérieur qui régulent l'expression des différentes Hox présentes le long du tube neural (Figure 6B). Chacun des trois territoires du tube neural va également être divisé en colonnes permettant aux motoneurones de développer des connections spécifiques en fonction de leurs différentes cellules cibles. Les motoneurones de la colonne latérale motrice présente au niveau cervical et lombaire vont ainsi émettre des projections vers les muscles des membres alors que la colonne hypaxiale motrice présente au niveau thoracique va émettre des projections en direction des muscles intercostaux. Les motoneurones de la colonne médiane motrice vont émettre des projections vers les muscles axiaux situés tout le long de l'embryon et les motoneurones de la colonne pré-ganglionnaire thoracique émettront des projections vers la chaîne ganglionnaire sympathique. Pour finir, la colonne latérale motrice présente au niveau cervical et thoracique est subdivisée en « pools », les motoneurones d'un même pool innervant un muscle particulier (Figure 6C). Les modifications que subit le tube neural tout au long du développement de l'embryon vont alors aboutir à la genèse de la moelle épinière, forme mature du tube neural (Jessell, 2000).

2. Motoneurones et croissance axonale

Un motoneurone est constitué d'un corps cellulaire présent au niveau de la moelle épinière et émettant deux types d'extensions neuritiques. Les dendrites, projections nombreuses et ne s'étendant pas très loin du corps cellulaire, permettent au motoneurone de recueillir les informations provenant des neurones sensoriels afférents. L'axone quant à lui est une projection du corps cellulaire pouvant s'étendre sur une longue distance en dehors de la moelle épinière et permettant le transport de l'information jusqu'à la cellule cible motrice efférente.

Le motoneurone naît au niveau du tube neural, ses dendrites et son corps cellulaire restant localisés dans la partie ventrale de la moelle épinière appelée substance grise. Des vésicules contenant de l'acétylcholine sont produites et libèrent le neurotransmetteur avant même le contact avec les fibres musculaires. L'acétylcholine peut inhiber l'initiation de la

croissance axonale lorsqu'elle est présente en forte concentration près du corps cellulaire, celui-ci possédant de nombreux RnACh de type neuronal (présence de sous-unités $\alpha 7$ au niveau du RnACh). Malgré cette inhibition, un prolongement peut se former à partir du corps cellulaire grâce à la réorganisation du cytosquelette, permettant le début de croissance de l'axone. Le motoneurone émet alors une projection axonale traversant la substance blanche et qui croît en direction de sa cible par l'intermédiaire du cône de croissance situé à l'extrémité de l'axone. La mobilité du cône de croissance est ponctuée de phases d'élongation et de contraction des filopodes le constituant, ces derniers formant une sorte de treillis. Les filaments d'actine présents dans l'axone en croissance se projettent dans les filopodes et s'allongent par polymérisation des protéines d'actine globulaire grâce à la présence d'ATP. À l'opposé, vers la région centrale de ces filopodes, les filaments d'actine subissent une dépolymérisation. Ce phénomène est dû au fait que les filaments d'actine sont polarisés, l'extrémité « plus » permettant l'assemblage d'actine globulaire alors que l'actine de l'extrémité « moins » se désassemble (Figure 7A). Juste en amont du cône de croissance, l'axone s'allonge grâce à la formation d'un cytosquelette constitué de microtubules. La tubuline α s'associe en dimère avec la tubuline β en présence de GTP, les dimères s'auto-associant longitudinalement en proto-filaments s'assemblant de façon hélicoïdale en microtubules. Tout comme les filaments d'actine, les microtubules sont des polymères polarisés le long desquels des vésicules contenant des complexes protéiques se déplacent pour venir fusionner avec la membrane du cône de croissance lui permettant ainsi de s'étendre (Figure 7B). La forme en « treillis » des cônes de croissance est représentative des cônes devant « faire un choix » concernant leur migration alors que les cônes de croissance avançant sur une voie déjà frayée par d'autres axones ont tendance à avoir une forme plus linéaire (Figure 7C) (Valiron et al., 2001).

La croissance de l'axone dépend d'interactions moléculaires entre le cône de croissance et son substrat, à savoir la matrice extracellulaire formée de protéines fibreuses situées entre les cellules. Cette matrice fournit au cône de croissance des informations de navigation, la voie étant notamment balisée par des protéines permissives comme la laminine. Cette dernière se lie aux intégrines, récepteurs des laminines situées sur la membrane du cône de croissance, favorisant sa progression. D'autres protéines vont servir de repères pour le guidage de certains groupes de motoneurones. Ces protéines, répulsives cette fois, se trouvent également sur le substrat pour aiguiller encore davantage l'élongation de l'axone en l'empêchant de prendre certaines directions. Les cônes de croissance possèdent par exemple

des récepteurs spécifiques aux éphrines et sémaphorines qui selon le type de motoneurones peuvent également avoir un effet attractif. En plus d'une matrice permettant leur élongation, les cônes de croissance sont également guidés par des molécules diffusibles en provenance du tube neural. Ces molécules peuvent être attractives ou répulsives, comme les nétrines ou uniquement répulsives, comme les protéines Slit qui se fixent à leurs récepteurs respectifs sur la membrane des axones. L'acétylcholine serait également un signal attractif favorisant la croissance dans une direction donnée, à savoir vers les fibres musculaires (Zheng et al., 1994). L'initiation et l'élongation des axones à partir du corps cellulaire sont ainsi soumises à une véritable signalisation routière le long de gradients et de réseaux moléculaires complexes (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Catone and Ternaux, 2003).

Des cellules de type gliale appelées cellules de Schwann immatures sont au contact des axones lors de leur croissance. Ces cellules proviennent de cellules progénitrices de la partie dorsale du tube neural produites entre E12 et E13 et se multiplient avant de se différencier, leur survie étant directement liée à leur contact avec les axones. Entre E14 et E15, les précurseurs évoluent ensuite en cellules de Schwann embryonnaires pouvant survivre sans être en contact avec les neurones mais dépendant d'eux pour poursuivre leur différenciation. Ainsi, les cellules de Schwann embryonnaires pourront se différencier soit en cellules myélinisantes si elles sont en relation avec des axones d'au moins 1mm de diamètre, soit en cellules de Schwann non-myélinisantes qui engloberont dans leur cytoplasme plusieurs axones de petit calibre. Tout comme les axones sont nécessaires à la survie des cellules de Schwann immatures, les cellules de Schwann embryonnaires produisent des facteurs neurotrophiques indispensables à la survie des neurones ainsi qu'à la croissance et à la maturation axonale (Jessen and Mirsky, 2005).

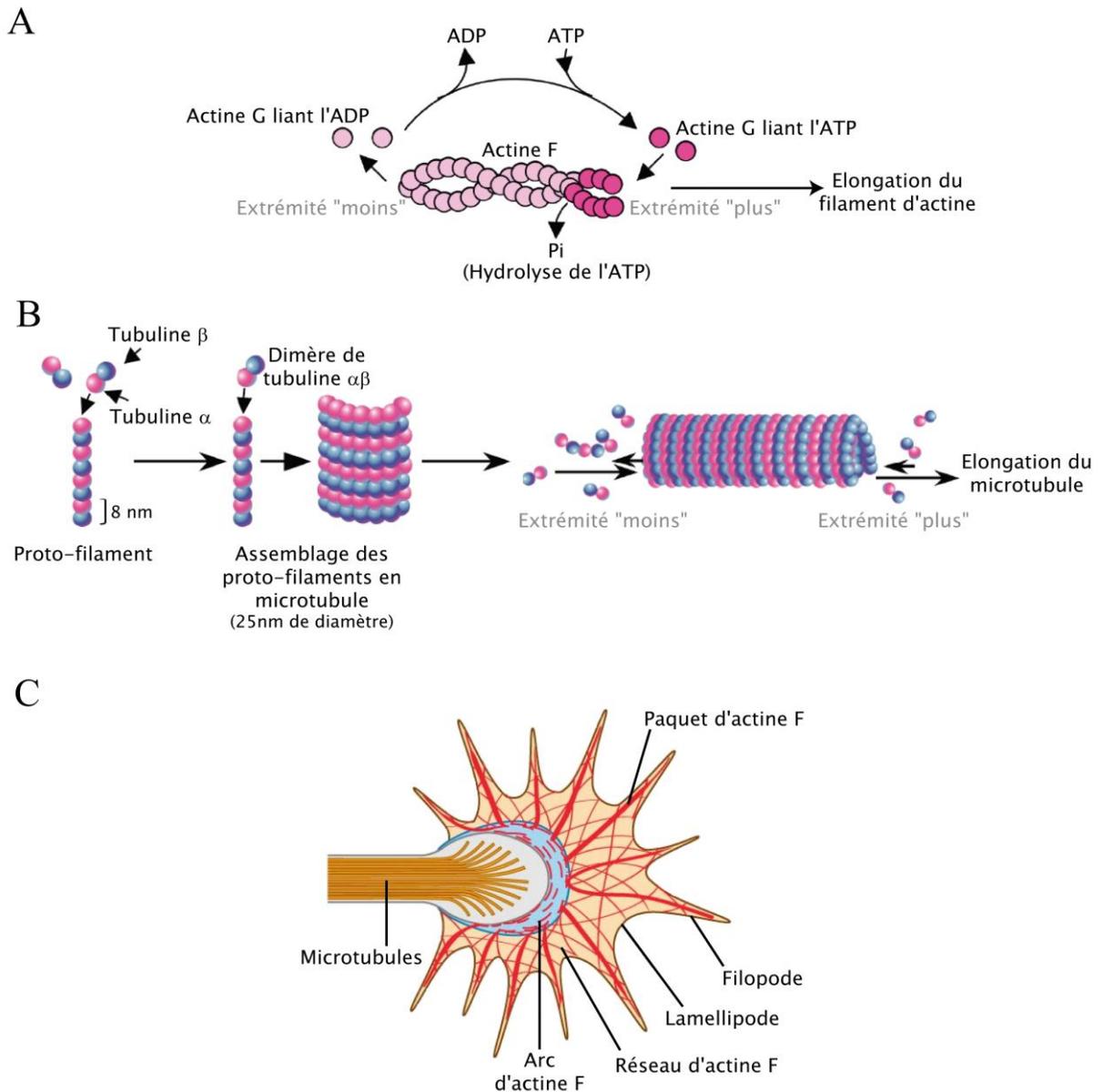


Figure 7. Filament d'actine, microtubule et cône de croissance

A. Le filament d'actine (actine F) étant polarisé, il s'allonge par polymérisation de protéines d'actine globulaire (actine G) à son extrémité « plus » grâce à la présence d'ATP. A l'inverse, le filament d'actine subit une dépolymérisation au niveau de son extrémité « moins ».

B. Les dimères de tubuline α et β s'auto-associent longitudinalement en proto-filaments s'assemblant eux-mêmes de façon hélicoïdale en microtubule. Le microtubule étant un polymère polarisé, il subit une polymérisation à son extrémité « plus » et un désassemblage au niveau de son extrémité « moins ».

C. La projection axonale émise par le motoneurone croît en direction de sa cible par l'intermédiaire du cône de croissance. Le cône de croissance forme une sorte de treillis dont la mobilité est ponctuée de phases d'élongation et de contraction des paquets d'actine F présents dans les filopodes le constituant. En amont, l'axone s'allonge grâce à la polymérisation des microtubules formés de tubuline α et β .

II. LA FORMATION DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

Suite à la croissance des axones des motoneurones en direction du muscle et à l'apparition de la « pré-empreinte » musculaire au centre des fibres, à savoir l'agrégation d'un complexe macromoléculaire incluant le RnACh, les jonctions neuromusculaires vont pouvoir se former chez les embryons. Ce sont les échanges entre le nerf et le muscle qui vont permettre de produire des synapses fonctionnelles, grâce à des facteurs musculaires participant au développement de la terminaison axonale ou domaine pré-synaptique et inversement, à des facteurs neuronaux participant au développement du domaine post-synaptique. Chez les mammifères, les synapses vont ensuite subir des étapes de maturation après la naissance pour aboutir à des jonctions neuromusculaires stables à l'âge adulte.

A. La différenciation pré- et post-synaptique

1. La différenciation pré-synaptique

a. Guidage axonal terminal

Au stade embryonnaire E14, très peu de terminaisons nerveuses sont apposées au niveau des micro-agrégats de RnACh chez la souris. C'est à partir du stade E14.5 que l'apposition va s'accroître pour arriver à 100% d'apposition entre E16.5 et E18.5. A E18.5, il est également observé une poly-innervation des fibres, plusieurs agrégats de RnACh d'une même fibre étant chacun innervé par un axone (Lin et al., 2001; Lin et al., 2008). De nombreuses expériences ont montré que l'expression de MuSK au centre du muscle instruit le cône de croissance sur la position des complexes post-synaptiques préformés afin de favoriser la formation de synapses. En effet, les premières observations réalisées sur des mutants de MuSK ont permis de montrer qu'en son absence, les axones ne s'arrêtent pas dans la zone centrale du muscle comme cela est le cas chez des souris normales mais continuent leur route le long des fibres musculaires (DeChiara et al., 1996). De plus, Kim et Burden ont récemment montré que chez les souris exprimant un transgène de MuSK de façon ectopique, l'expression de MuSK provoque la formation d'agrégats de RnACh tout au long des fibres musculaires entraînant une croissance aberrante des axones moteurs, ceux-ci ne s'arrêtant pas dans la partie centrale du muscle et allant innover les agrégats de RnACh ectopiques (Kim and

Burden, 2008). Dans ce schéma, MuSK semble donc être un signal attractif pour les axones ou du moins faire partie d'un complexe attractif.

Ainsi, plus récemment encore, il a été montré que deux partenaires de MuSK sont impliqués dans ce phénomène de guidage terminal des axones. Tout d'abord, il a été montré que MuSK nécessite la présence de LRP4 pour être exprimé de façon centrale au niveau des fibres musculaires chez la souris. Le résultat de l'absence de LRP4 est identique à celui de l'absence de MuSK : une croissance aberrante des axones moteurs (Weatherbee et al., 2006). De plus, de nouvelles données montrent le rôle critique de Wnt11r dans la centralisation de l'expression de unplugged/MuSK puisque son absence entraîne tout comme l'absence de MuSK et LRP4, une croissance aberrante des axones le long des fibres musculaires chez le poisson zèbre (Jing et al., 2009). Ces données montrent que même si MuSK semble avoir un rôle central dans le guidage axonal, son efficacité dans ce rôle est indissociable de la présence de différents partenaires. Pendant longtemps, a été émise la possibilité que la quantité de MuSK préférentiellement exprimé au centre des fibres puisse être responsable de sa propre activation, indépendamment de tout ligand et ainsi permettre de restreindre la croissance des axones des motoneurones (Burden, 1998). Les études récentes décrites ci-dessus montrent donc que MuSK doit être associé à différents partenaires pour permettre la formation correcte des synapses au centre du muscle.

D'autres éléments musculaires semblent être impliqués dans l'attraction des axones des motoneurones, ces derniers étant divisés en deux catégories : les motoneurones α et les motoneurones γ . Ainsi, les fibres musculaires extra-fusales sont innervées par des motoneurones α et génèrent la force nécessaire à la mise en mouvement du squelette alors que les fibres intra-fusales sont innervées par des motoneurones γ qui modulent la sensibilité du muscle à l'étirement. Les fuseaux neuromusculaires sont en fait des mécano-récepteurs de fibres musculaires modifiées dispersées parallèlement aux fibres du muscle et sensibles à l'allongement de celui-ci. Il semblerait donc que le devenir extra- ou intra-fusal des fibres musculaires et donc leur connexion à un type de motoneurone, soit défini bien avant le contact nerf-muscle. De plus, les cibles des deux populations de motoneurones étant différentes, les motoneurones α et γ vont avoir une taille et une forme différentes. Ainsi, les motoneurones γ sont environ deux fois plus petits que les motoneurones α , leur conduction du signal s'en trouvant diminuée. Les arbres dendritiques des deux types de motoneurones sont de même taille mais ceux des motoneurones γ sont moins branchés. De plus, leur connectivité

au niveau de la moelle épinière est également différente puisque les motoneurones γ sont dépourvus de connections avec les neurones sensoriels proprioceptifs, ce qui n'est pas le cas des motoneurones α . Les différences de cibles post-synaptiques et de connexions nerveuses impliquent un programme distinct de détermination pour chaque population de motoneurones. Même si des études récentes montrent que certains marqueurs moléculaires sont spécifiques des motoneurones α ou γ après la naissance, aucune information n'est actuellement disponible concernant les deux populations de motoneurones chez l'embryon (Kanning et al., 2010).

b. Développement de la terminaison axonale

Une fois au contact du muscle, l'axone doit arrêter de croître pour se positionner à la surface de la fibre musculaire. Des expériences plus anciennes réalisées chez la souris ont permis de mettre en évidence l'implication d'une protéine de la lame basale dans l'arrêt du cône de croissance au niveau de sa cible et dans sa différenciation en terminaison nerveuse. En effet, il a été montré que suite à la dénervation de fibres musculaires, les axones vont préférentiellement réinnervier des zones où se trouvaient précédemment des synapses et cela même si seule la lame basale a été conservée, le muscle ayant été endommagé et la régénération de celui-ci bloquée par irradiation de l'animal (Sanes et al., 1978; Glicksman and Sanes, 1983). Cette protéine a ensuite été identifiée comme étant la laminine, une glycoprotéine formant un hétérotrimère de sous-unités α , β et γ et qui est présente au niveau des lames basales de nombreux types cellulaires. Chaque sous-unité possède un grand nombre de variants exprimés par le muscle selon une localisation particulière. Par exemple, les trimères de laminine contenant la sous-unité $\beta 2$ sont exprimés de façon préférentielle au niveau de la lame basale de la synapse alors que les trimères contenant la sous-unité $\beta 1$ sont exprimés tout au long de la fibre musculaire (Patton, 2000). C'est l'expression préférentielle de la laminine- $\beta 2$ à la synapse qui agit comme un signal stop sur la croissance de l'axone, cette dernière possédant un tripeptide LRE (Leu-Arg-Glu) connu pour stopper la croissance des axones (Hunter et al., 1989; Hunter et al., 1991). Cela a été montré *in vitro* par des expériences de croissance de neurones de poulet sur une matrice de laminine (ne contenant pas la sous-unité $\beta 2$) ou de laminine fusionnée au peptide LRE (laminine-LRE). Les neurites ne s'étendent qu'en présence de laminine, le peptide LRE empêchant leur croissance. De plus, sur une matrice constituée de bandes de laminine suivies de bandes de laminine-LRE, les neurites croissent sur le support laminine et s'arrêtent au contact de la matrice laminine-LRE

(Green et al., 1992; Porter et al., 1995). Plus récemment, Dimitropoulou et Bixby ont montré que le complexe agrine/MuSK pourrait faire partie du signal stop nécessaire à l'axone pour se positionner correctement à la surface du muscle. Pour cela, ils ont mis des neurones en culture avec des cellules non musculaires HEK exprimant MuSK à leur surface. Ils ont pu observer que l'expression de MuSK inhibe la croissance des neurites, un effet qui peut être totalement inversé en traitant les cellules avec un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de MuSK. De plus, les neurites et les cellules HEK produisant de l'agrine de façon endogène, ils ont montré que des complexes agrine/MuSK se forment à la surface des cellules HEK et que l'utilisation d'anticorps dirigé contre l'agrine inverse partiellement l'effet d'inhibition de MuSK sur la croissance neuritique. Ces données sont donc cohérentes avec une fonction de signal stop pour le complexe agrine/MuSK (Dimitropoulou and Bixby, 2005).

Une fois l'axone apposé correctement au niveau du muscle, la terminaison nerveuse va pouvoir se différencier. A ce stade, la terminaison nerveuse forme une sorte de bulbe élargi au contact du muscle. La transmission synaptique se produit dès les premiers contacts synaptiques, mais son efficacité reste modeste du fait de la faible quantité de vésicules synaptiques libérant peu de neurotransmetteurs, mais également du fait de la faible concentration de RnACh au niveau des agrégats post-synaptiques. Parmi les signaux rétrogrades provenant du muscle et de la lame basale synaptique, des FGFs et les sous-unités $\alpha 1/\alpha 2$ du collagène IV sont impliqués dans l'agrégation des vésicules pré-synaptiques au niveau de la terminaison nerveuse (Fox et al., 2007). C'est l'accumulation de canaux calciques voltage-dépendants qui induit l'agrégation de ces vésicules synaptiques, permettant ainsi la formation de zones actives pré-synaptiques, sites de libération du neurotransmetteur. Il a également été montré qu'en plus d'être un signal stop dans la croissance axonale, la laminine- $\beta 2$ participe au développement du domaine pré-synaptique. Ainsi, grâce à son domaine LRE, la laminine- $\beta 2$ interagit avec les canaux calciques voltage-dépendants présents au niveau de la membrane pré-synaptique permettant leur agrégation. Bien que la laminine- $\beta 2$ ne soit pas nécessaire au développement embryonnaire de la terminaison nerveuse, elle a un rôle important dans la maintenance des zones actives. Cela a été montré par l'étude de mutants déficients pour la laminine- $\beta 2$ qui a révélé que très vite après la naissance, les zones actives diminuent chez ces mutants (Nishimune et al., 2004). Tout comme la laminine- $\beta 2$, les sous-unités $\alpha 3$ à $\alpha 6$ du collagène IV participent à la maintenance du domaine pré-synaptique (Fox et al., 2007). La différenciation du domaine pré-synaptique passe également par la

restructuration du cytosquelette et par l'assemblage de la machinerie d'exocytose/endocytose à proximité des zones actives (Fox and Umemori, 2006). Ce n'est qu'une fois cette machinerie mise en place près des zones actives que la terminaison nerveuse permettra une transmission efficace de l'information nerveuse vers le muscle *via* l'exocytose de l'acétylcholine dans l'espace synaptique. Récemment, il a été montré que l'acétylcholine aurait un effet négatif sur la différenciation pré-synaptique à la jonction neuromusculaire en agissant sur des RnACh pré-synaptiques tels que ceux présents sur l'axone. Pour permettre la différenciation de la terminaison nerveuse et l'accumulation des vésicules pré-synaptiques, cette inhibition semble être contrée par l'action rétrograde des FGFs musculaires (An et al., 2010).

2. La différenciation post-synaptique

a. Agrégation du récepteur nicotinique de l'acétylcholine

La différenciation de la membrane musculaire post-synaptique résulte d'un processus complexe. Suite à l'apposition préférentielle des axones au niveau des micro-agrégats de RnACh formant la « pré-empreinte » du muscle, le nerf va participer activement au développement des sites post-synaptiques en utilisant des messagers chimiques, notamment l'agrine et l'acétylcholine.

- Agrine :

Depuis longtemps, l'agrine sécrétée par le motoneurone a été étudiée dans le cadre de l'agrégation du RnACh, faisant d'elle le principal facteur dérivé du nerf organisant le domaine post-synaptique (McMahan, 1990). L'agrine est un protéoglycane à héparane sulfate d'environ 400 à 600 kDa pouvant interagir avec un grand nombre de molécules à la jonction neuromusculaire, comme par exemple les laminines *via* son domaine N-terminal ou les intégrines et le dystroglycan *via* son domaine C-terminal. Plusieurs expériences ont permis d'établir que le récepteur central responsable de l'effet de l'agrine et plus particulièrement de l'effet de son domaine C-terminal sur le nombre et la taille des agrégats de RnACh était le récepteur tyrosine kinase MuSK. Tout d'abord, en absence de MuSK tout comme en absence de l'agrine, la différenciation post-synaptique est absente des fibres musculaires et une croissance aberrante des motoneurones est observée, les axones s'étendant anormalement le long des fibres musculaires (DeChiara et al., 1996; Lin et al., 2001; Yang et al., 2001). Ces

résultats ont immédiatement suggéré que MuSK pouvait être le récepteur de l'agrine. Puis des données ont été collectées montrant que le traitement par l'agrine réalisé sur des myotubes en culture provoquait l'activation de MuSK et stimulait l'agrégation des RnACh alors que ce même traitement sur des myotubes déficients pour MuSK était sans effet sur l'agrégation des RnACh (Cohen et al., 1997; Zhou et al., 1999). Une dernière expérience a permis de montrer l'interaction de l'agrine et de MuSK, les deux molécules ayant été liées de façon covalente par un cross-linker à la surface de myotubes (Glass et al., 1996). Cette expérience n'indiquait cependant pas si l'agrine et MuSK interagissent directement ou par l'intermédiaire d'un co-récepteur. Ce n'est que très récemment que ce co-récepteur a été identifié comme étant LRP4 (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008).

Suite à la fixation de l'agrine sur LRP4/MuSK, MuSK est rapidement activé, cette activation nécessitant la présence de la protéine Dok-7 cytoplasmique qui interagit sous forme de dimère avec le domaine tyrosine kinase de MuSK provoquant sa phosphorylation (Yamanashi et al., 2008; Inoue et al., 2009; Bergamin et al., 2010). Dans cette cascade complexe, MuSK doit également interagir avec la protéine Tid1 (*Tumorous imaginal discs*), cette interaction étant nécessaire à la fixation de Dok-7 sur MuSK en réponse à l'agrine (Linnoila et al., 2008). La phosphorylation de MuSK, notamment au niveau du résidu tyrosine Y553 entraîne une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de la rapsyne, à la phosphorylation de la sous-unité $\beta 1$ du RnACh au niveau du résidu Y390 et à l'agrégation du RnACh selon un processus encore mal défini. L'agrine semble être capable d'induire la polymérisation de l'actine entraînant la coalescence de micro-domaines enrichis en cholestérol-sphingolipides, aussi appelés radeaux lipidiques, associés constitutivement à des RnACh (Stetzkowski-Marden et al., 2006a; Stetzkowski-Marden et al., 2006b). L'agrégation des RnACh qui en résulte nécessite l'ancrage des RnACh au cytosquelette grâce à la rapsyne par l'intermédiaire du complexe dystroglycan-utrophine interagissant avec l'actine F (Cartaud et al., 1998). Récemment, il a également été montré que la rapsyne interagit avec l' α -actinine, un cross-linker de l'actine mais également avec la β -caténine supposée réguler la polymérisation de l'actine *via* l' α -caténine (Zhang et al., 2007; Dobbins et al., 2008). L'agrégation du RnACh serait donc stimulée par le complexe agrine-LRP4/MuSK qui, agissant sur le cytosquelette, faciliterait les mouvements de micro-agrégats et leur assemblage pour former des agrégats de RnACh plus larges et stabiliserait ces agrégats au niveau du domaine post-synaptique. (Gervasio and Phillips, 2005; Strohlic et al., 2005; Zhu et al., 2006; Pato et al., 2008). Lors de son activation, MuSK est rapidement internalisé, un

mécanisme nécessaire à l'agrégation des RnACh ; cette endocytose ligand-dépendante étant régulée par une ATPase interagissant directement avec MuSK : *l'ATPase N-ethylmaleimide sensitive fusion protein* (Zhu et al., 2008). Les protéines MuSK endocytées sont ensuite probablement dégradées par le protéasome (Bromann et al., 2004; Lu et al., 2007). Ces données montrent ainsi que la signalisation agrine/MuSK est finement régulée à la jonction neuromusculaire (Figure 8).

Une question reste cependant en suspens : comment l'activation de la voie de signalisation agrine-LRP4/MuSK est-elle capable d'activer l'agrégation et la stabilisation du RnACh *via* la rapsyne ? Il semblerait qu'une fois activé, MuSK initierait une ou des cascades de signalisation de types tyrosine ou sérine/thréonine kinase. Certains régulateurs du cytosquelette d'actine tels que les guanosines triphosphatases : RhoGTPases, Rac ou Cdc42 et dishevelled (Dvl) semblent jouer un rôle central dans l'agrégation du RnACh *via* l'activation de la sérine/thréonine kinase *p21-activated kinase* (PAK1), leur inhibition pharmacologique ou leur perturbation inhibant cette agrégation (Luo, 2002; Ngo et al., 2007; d'Houtaud et al., 2009). Plus précisément, la voie de signalisation Rac/Cdc42 est plutôt nécessaire à la phase initiale de la formation des micro-agrégats de RnACh, alors que la RhoGTPase est importante dans la condensation des micro-agrégats en agrégats de RnACh de plus grande taille. Des tyrosines kinases incluant les kinases Src et Abelson (Abl) agissent également sur l'agrégation du RnACh en réponse à l'activation de MuSK par l'agrine. Ces deux kinases agiraient en aval de MuSK dans la stabilisation des agrégats de RnACh par l'induction du réseau post-synaptique d'actine. De plus, Abl est capable d'agir en amont de MuSK puisque cette kinase participe à la re-phosphorylation de MuSK et ainsi à l'amplification du phénomène d'agrégation du RnACh. Ces protéines constitueraient donc une sorte de modulateur du cytosquelette participant à l'augmentation de l'agrégation du RnACh (Smith et al., 2001; Finn et al., 2003). Pour finir, la caséine kinase-2, une sérine/thréonine kinase, apparaît comme interagissant avec le domaine intracellulaire de MuSK, phosphorylant des résidus sérine présents au niveau du domaine kinase de MuSK et permettant la régulation de l'agrégation du RnACh induite par l'agrine (Cheusova et al., 2006). D'autres protéines semblent participer à l'agrégation ou à la stabilisation des RnACh bien que leur mode d'action ne soit pas encore vraiment établi. C'est par exemple le cas de la geranylgeranyltransferase 1 qui agirait *via* la voie Rac/Cdc42 et de l'APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), un suppresseur de tumeur qui stabiliserait le RnACh au niveau du cytosquelette en interagissant directement avec la sous-unité β du RnACh (Figure 8) (Strochlic et al., 2005; Wu et al., 2010).

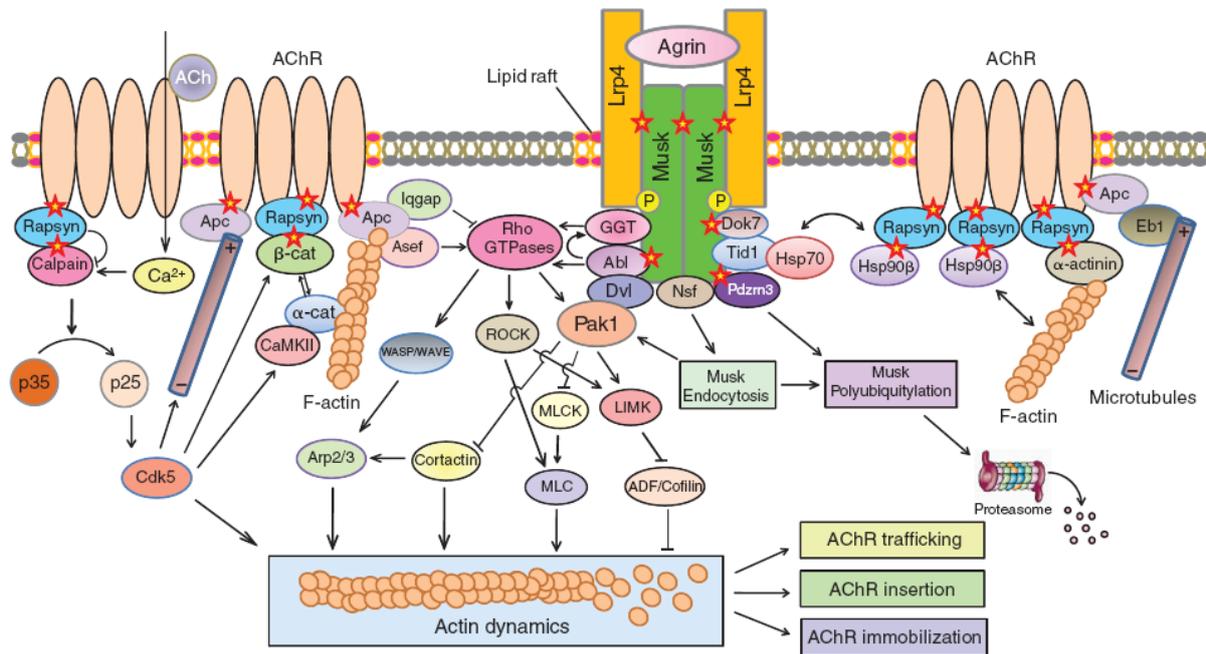


Figure 8. Agrégation du récepteur nicotinique de l'acétylcholine *via* l'activation par l'agrine de voies de signalisation intracellulaires

L'agrine interagit avec LRP4-MuSK entraînant l'activation du récepteur tyrosine kinase. Par la suite, les interactions de MuSK avec différentes protéines telles que Dok-7 augmentent. De façon concomitante, la tyrosine kinase Abelson (Abl) et la geranylgeranyltransférase 1 (GGT) sont activées. La GGT facilite l'activation de la RhoGTPase qui, *via* de multiples voies, régule la dynamique de l'actine impliquée dans le trafic, l'insertion à la membrane et l'immobilisation du RnACh. L'agrine stimule également l'association du RnACh avec la rapsyne et APC qui lie le RnACh directement ou indirectement au cytosquelette musculaire. La stabilité de la rapsyne à la synapse est favorisée par la chaperone Hsp90 β , la rapsyne interagit avec la calpaïne et l'inhibe, contrant ainsi l'effet dispersant de l'acétylcholine sur les agrégats de RnACh. La signalisation de l'agrine est régulée par l'endocytose de MuSK, les radeaux lipidiques et le calcium intracellulaire. Les étoiles indiquent les interactions protéines-protéines favorisées par la présence d'agrine. Les bicouches lipidiques présentées en rouge indiquent les radeaux lipidiques (D'après Wu et al., 2010).

- Acétylcholine :

L'observation des mutants de l'agrine neuronale a révélé la présence d'un deuxième messager chimique neuronal contrôlant l'agrégation des RnACh, ce messager ayant cette fois une action de dispersion des micro-agrégats de RnACh. En effet, chez les souris mutantes pour l'agrine, la « pré-empreinte » musculaire se forme correctement, mais suite à l'innervation, les micro-agrégats de RnACh sont très vite dispersés. Au départ, des facteurs neurotrophiques et l'activité synaptique ont été montrés comme étant impliqués dans la régulation de la différenciation post-synaptique *in vitro*. Par exemple, l'utilisation de neurégulines ou de carbamylcholine, un agoniste de l'acétylcholine, sur des myotubes en culture a permis d'observer une dispersion des agrégats de RnACh (Bloch, 1986; Trinidad and Cohen, 2004). De plus ces facteurs interviennent dans la régulation de l'expression du RnACh et favorisent son endocytose (Sanes and Lichtman, 1999; St John and Gordon, 2001). A l'inverse, il a été observé qu'en absence d'acétylcholine résultant de l'inactivation du gène codant pour la choline acétyltransférase permettant la synthèse du neurotransmetteur, les synapses formées sont beaucoup plus nombreuses et éparpillées le long des fibres musculaires que chez des souris normales. Ces résultats ont donc fait de l'acétylcholine le candidat potentiel agissant négativement sur la différenciation post-synaptique. Cette hypothèse a par la suite été confirmée par deux groupes de recherche. Tout d'abord, Misgeld et collaborateurs ont montré que dans un double mutant agrine/choline acétyltransférase, des agrégats de RnACh sont présents et stabilisés suite à l'innervation des fibres musculaires, supportant le rôle de facteur désagrégant de l'acétylcholine (Misgeld et al., 2005). Lin et collaborateurs ont poussé plus loin cette étude en montrant que l'effet de dispersion des RnACh passe par l'activation de la *cyclin-dependent kinase 5* (Cdk5) par l'acétylcholine. Ainsi, tout comme le blocage de la formation d'acétylcholine chez le mutant de la choline acétyltransférase, la délétion du gène CDK5 empêche la dispersion des agrégats de RnACh (Lin et al., 2005). Il est maintenant établi que l'effet négatif de l'acétylcholine sur l'agrégation du RnACh et la différenciation post-synaptique ne passe pas par les RnACh accumulés au niveau du domaine post-synaptique (An et al., 2010).

L'ensemble de ces données prouve que deux activités opposées participent à la différenciation post-synaptique : un signal positif qui stabilise les agrégats de RnACh innervés en position centrale du muscle, l'agrine et un signal négatif qui disperse les agrégats de RnACh non innervés, l'acétylcholine. Plus qu'un signal induisant l'agrégation des RnACh, l'agrine semble donc être présente pour contrer les effets de l'acétylcholine (Figure 9). Des

données récentes montrent d'ailleurs que l'agrine accroît l'agrégation de la rapsyne avec la calpaïne, une enzyme impliquée dans l'activation de Cdk5, inhibant ainsi l'activité de l'enzyme. En considérant la localisation synaptique de la rapsyne, ces résultats suggèrent qu'elle agit localement pour inhiber l'activité de Cdk5 afin de contrer la dispersion des agrégats de RnACh par l'acétylcholine (Figure 8) (Chen et al., 2007).

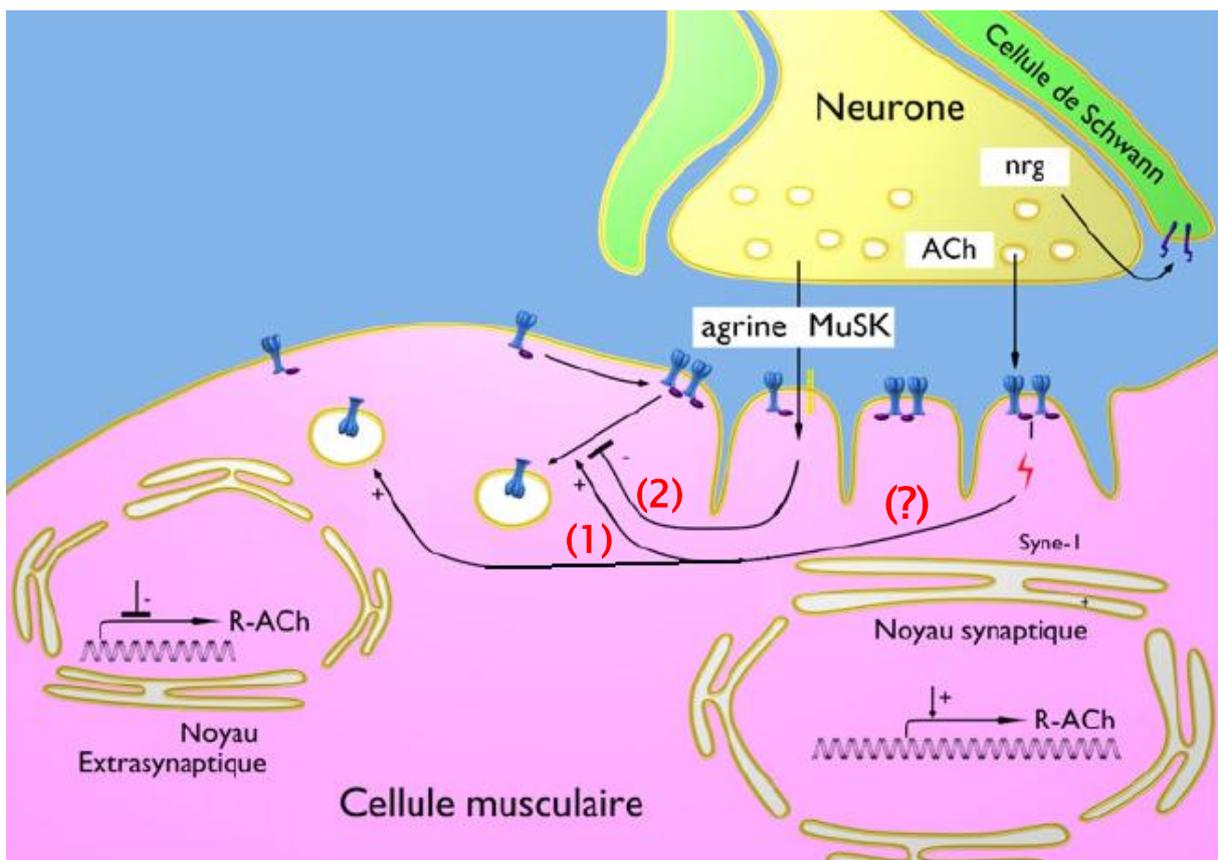


Figure 9. Action coordonnée de signaux positifs et négatifs dans l'assemblage de la jonction neuromusculaire

L'acétylcholine (ACh) libérée par la terminaison axonale favorise la dispersion des agrégats de RnACh (1). L'agrine, également libérée par la terminaison nerveuse, contre l'effet dispersant de l'acétylcholine à la jonction neuromusculaire (2). Il en résulte une stabilisation des agrégats de RnACh à la synapse et une dispersion des agrégats extra-synaptiques. L'effet négatif de l'acétylcholine sur l'agrégation des RnACh ne semble pas être médié par les RnACh accumulés à la synapse (?). (D'après d'Houtaud et al., 2009).

b. Mise en place d'un domaine transcriptionnel synaptique

La redistribution des protéines synaptiques provoquée par l'action des facteurs neuronaux n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la concentration de protéines spécifiques au niveau des synapses. Afin d'amplifier le gradient de ces protéines synaptiques présentes à la jonction neuromusculaire, une transcription préférentielle est mise en place. Ainsi, les noyaux sous-synaptiques vont sur-exprimer des protéines essentiellement accumulées à la synapse alors que les noyaux extra-synaptiques les exprimeront peu ou pas du tout, l'ensemble des noyaux des fibres musculaires exprimant les protéines générales du muscle. Par la dissection de régions synaptiques et extra-synaptiques suivie de l'analyse quantitative des ARNm présents dans les deux compartiments, il a par exemple été montré que les noyaux sous-synaptiques expriment localement de grandes quantités de sous-unités du RnACh (Brenner et al., 1990), MuSK (Bowen et al., 1998), la rapsyne (Moscoso et al., 1995), l'utrophine ou encore la laminine- β 2 (Patton et al., 1997).

- La voie de signalisation neuréguline/ErbB

La première voie de signalisation décrite comme contrôlant la transcription au niveau des noyaux sous-synaptiques a été la voie neuréguline/ErbB. L'agrégation à la membrane post-synaptique des récepteurs tyrosine kinase ErbB permet la mise en place de la voie de signalisation neuréguline, la neuréguline étant un facteur de croissance et de différenciation interagissant avec ErbB. Le récepteur ErbB est accumulé à la membrane sous forme d'hétérodimères ErbB2/ErbB4 ou d'homodimères ErbB4 alors qu'ErbB3 est particulièrement accumulé dans la cellule de Schwann (Zhu et al., 1995; Trinidad et al., 2000). En culture cellulaire, il a été montré que l'activation des récepteurs ErbB transduit les voies de signalisation Ras/Raf/ERK et Ras/JNK pouvant ainsi aboutir à l'activation du facteur de transcription GABP (*GA Binding Protein*), un membre de la famille des ETS (*E-Twenty Six*). GABP reconnaît des séquences spécifiques présentes au niveau des promoteurs de gènes synaptiques appelées boîtes-N (6 paires de bases : CCGGAA) et active l'expression préférentielle de protéines synaptiques à la jonction neuromusculaire (Figure 10) (Briguet and Ruegg, 2000; Schaeffer et al., 2001). Au contraire, l'injection d'un dominant négatif de GABP *in vivo* inhibe l'expression de la sous-unité ϵ du RnACh bloquant ainsi la formation de domaines post-synaptiques ectopiques induite par l'agraine (Briguet and Ruegg, 2000). Par ailleurs, un autre membre de la famille des facteurs de transcription ETS appelé Erm a été impliqué dans la régulation de l'expression des gènes synaptiques (Hippenmeyer et al., 2007).

Contrairement à GABP qui est exprimé tout le long de la fibre musculaire et faiblement accumulé à la synapse, le facteur de transcription Erm est accumulé dans la région centrale du muscle (Schaeffer et al., 1998; Hippenmeyer et al., 2002). La mutation de ce facteur chez la souris a révélé une diminution de l'expression des gènes préférentiellement exprimés à la synapse, faisant d'Erm un des facteurs impliqués dans la régulation du programme sélectif de transcription des noyaux sous-synaptiques à la jonction neuromusculaire (Hippenmeyer et al., 2007). Les rôles respectifs de ces facteurs régulateurs de la transcription synaptique restent à caractériser.

Même si la voie neuréguline/ErbB est activée de façon indépendante de MuSK, il a été montré que sous l'action de l'agrine, MuSK est capable d'induire le recrutement et l'agrégation à la membrane post-synaptique des récepteurs ErbB, stimulant ainsi l'expression des gènes synaptiques (Trinidad et al., 2000; Moore et al., 2001; Lacazette et al., 2003). A l'opposé, la protéine tyrosine phosphatase Shp2 et l'erbine sont deux molécules ayant un effet inhibiteur sur la voie de signalisation neuréguline/ErbB. Shp2 inactive le récepteur ErbB présent à la membrane post-synaptique suite à son activation par la neuréguline en le déphosphorylant. Ainsi, il a été montré que Shp2 est capable d'atténuer l'expression de la sous-unité ϵ du RnACh (Tanowitz et al., 1999). L'erbine, en s'associant avec le domaine C-terminal d'ErbB2 par l'intermédiaire de son domaine PDZ diminue la régulation de la cascade de signalisation MAPK en inactivant Ras normalement stimulé par la neuréguline (Huang et al., 2003).

- La voie de signalisation agrine/MuSK

Une autre voie de signalisation agissant sur la transcription au niveau des noyaux sous-synaptiques a été décrite. Cette voie de signalisation est dépendante de MuSK et indépendante de la voie neuréguline/ErbB. Sous l'action de l'agrine, MuSK est activé suite à la phosphorylation de sa tyrosine Y553 et est ainsi capable d'induire sa propre synthèse, la synthèse de sous-unités du RnACh mais aussi de l'utrophine. Pour cela, MuSK active la voie de signalisation JNK *via* Rac/Cdc42 et MKK7 aboutissant à l'activation du facteur de transcription GABP, induisant ainsi la transcription préférentielle des gènes synaptiques possédant une boîte-N au niveau de leur promoteur (Figure 10) (Lacazette et al., 2003; Strohlic et al., 2005). De plus, il a récemment été montré que le profil spécifique d'expression des gènes au niveau des noyaux sous-synaptiques est corrélé à un état particulier de la chromatine. Ainsi, la chromatine apparaît moins condensée dans les noyaux sous-

synaptiques que dans les noyaux extra-synaptiques du fait de son hyperacétylation. Cet état est notamment dû à l'activité de l'histone acétyltransférase p300, enzyme recrutée par GABP lorsqu'il est activé par la voie agrine/MuSK mais aussi par la voie neuréguline/ErbB. L'activité histone acétyltransférase étant nécessaire à l'expression du RnACh *in vivo*, GABP semble donc coupler l'hyperacétylation de la chromatine et l'activation de l'expression du RnACh dans les noyaux sous-synaptiques (Mejat et al., 2005; Ravel-Chapuis et al., 2007).

Dans la recherche de partenaires de MuSK, la protéine adaptatrice 14-3-3 γ a été co-immunoprécipitée avec MuSK. Cette protéine est accumulée à la jonction neuromusculaire et colocalise avec le RnACh. Les protéines 14-3-3 sont des régulateurs majeurs des voies de signalisation MAPK et PI3K agissant sur l'expression génique. Des expériences de surexpression de la 14-3-3 γ ont donc été réalisées afin de déterminer son rôle potentiel dans le contrôle de l'expression des gènes synaptiques. Il a ainsi été montré qu'en sur-exprimant la 14-3-3 γ , un certain nombre de gènes synaptiques voient leur expression réprimée, notamment les sous-unités α , δ et ϵ du RnACh, l'utrophine, la rapsyne et MuSK, la 14-3-3 γ modulant l'activité de Raf en aval de la voie neuréguline/ErbB et donc indépendamment de celle-ci. Dans la plupart des cas, l'interaction entre les protéines 14-3-3 et leurs partenaires est régulée par la phosphorylation de sérines dans des séquences consensus des protéines cibles. Deux séquences de ce type ayant été trouvées dans la région cytoplasmique de MuSK, il semblerait donc probable qu'une molécule de signalisation indépendante de l'agrine puisse réguler l'interaction MuSK/14-3-3 γ et ainsi réguler la transcription synaptique (Strochlic et al., 2004; Strochlic et al., 2005).

- La voie de signalisation privilégiée

Jusqu'alors, les expériences d'inactivation de gènes des récepteurs ErbB quels qu'ils soient entraînant la mort précoce des embryons chez la souris avant même la formation de la jonction neuromusculaire, l'analyse de l'effet réel de l'absence de ces récepteurs sur la synapse et sur la transcription des gènes synaptiques était impossible. Il a fallu attendre les expériences de Escher et collaborateurs pour avoir des données plus précises concernant l'implication des récepteurs ErbB à la jonction neuromusculaire, ce groupe ayant réalisé des souris déficientes pour ErbB2 et ErbB4 uniquement dans le muscle. Leur analyse a permis de mettre en évidence que les récepteurs ErbB accumulés au niveau de la membrane post-synaptique ne sont pas nécessaires à la formation ou à la maintenance de la jonction

neuromusculaire ni même au fonctionnement du muscle. En effet, des défauts très légers sont observés chez ces mutants présentant par exemple une faible diminution de leur poids. Chez ce mutant, la voie de signalisation agrine/MuSK indépendante des ErbB semble donc être suffisante pour activer la transcription préférentielle à la jonction neuromusculaire, la voie neuréguline/ErbB étant redondante de cette dernière. La voie de signalisation agrine/MuSK semble donc être la voie privilégiée de régulation de la transcription préférentielle des gènes synaptiques à la jonction neuromusculaire (Figure 10) (Escher et al., 2005).

Il est intéressant de noter que chez le mutant neuréguline- β 1, des défauts beaucoup plus importants que ceux observés dans des souris mutantes pour ErbB sont observés au niveau des synapses. Il semblerait cependant qu'ils soient dus à l'importance des neurégulines dans le développement des cellules de Schwann et dans la survie des motoneurones plus que dans leur rôle au niveau de la transcription post-synaptique (Garratt et al., 2000; Britsch et al., 2001).

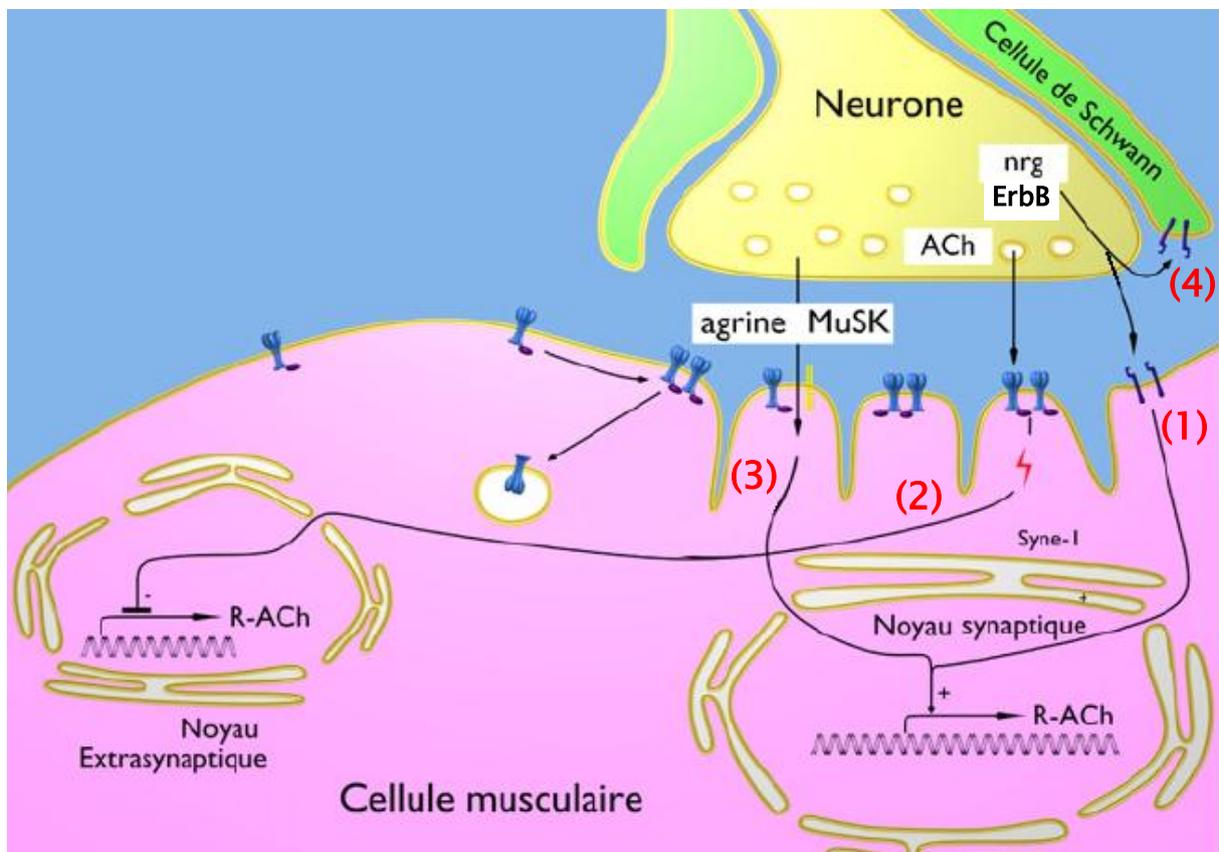


Figure 10. Les voies de signalisation impliquées dans la transcription des gènes synaptiques

Dans le schéma « classique », la neuréguline (nrg) induit la transcription des RnACh et autres ARNm spécifiques de la synapse *via* son interaction avec le récepteur ErbB de la membrane post-synaptique (1) et le potentiel d'action résultant de la libération d'acétylcholine (ACh) réprime la transcription extra-synaptique des mêmes gènes (2).

Dans le schéma révisé aux vues des récentes publications, la voie privilégiée de transcription des gènes synaptiques passe par l'agrine et MuSK (3) ; l'acétylcholine réprime la transcription extra-synaptique des mêmes gènes (2) et la neuréguline agit indirectement sur le muscle, essentiellement par interaction avec ses récepteurs ErbB schwanniens (4). (D'après d'Houtaud et al., 2009).

B. Maturation, stabilisation et fonctionnement de la jonction neuromusculaire

Les jonctions neuromusculaires sont fonctionnelles avant même la naissance, les nouveau-nés étant entièrement dépendants de la transmission synaptique pour survivre, notamment pour respirer et se nourrir. Par la suite, leur maturation va changer leurs propriétés afin d'obtenir des synapses adaptées tout d'abord aux demandes fonctionnelles grandissantes au cours de la croissance musculaire puis au fonctionnement de l'adulte.

1. Maturation des différents composants de la jonction neuromusculaire

a. Maturation pré-synaptique

- élimination de la poly-innervation

A la naissance, en moyenne deux à trois axones innervent chaque fibre musculaire chez les rongeurs. Puis, au cours de la période périnatale (P0-P7), la poly-innervation des fibres musculaires disparaît rapidement pour ne laisser place qu'à une seule jonction neuromusculaire par fibre. Ce processus n'est pas la conséquence d'une mort neuronale mais plutôt d'une restriction des axones moteurs vers les synapses les plus efficaces, à savoir celles dont la force d'adhésion est la plus grande. L'élimination de la poly-innervation fonctionne sur un modèle de compétition entre les synapses. L'activité synaptique et des facteurs trophiques sont probablement impliqués dans ce phénomène. Ainsi, un signal de maintenance serait produit au niveau des synapses actives afin de les protéger de l'élimination alors qu'un autre signal déstabiliserait les agrégats de RnACh présents sous les axones inactifs entraînant la perte structurale des synapses inactives puis leur retrait. La rétractation des axones se fait sans changement du nombre de motoneurones innervant le muscle, les cellules de Schwann participant activement au nettoyage des axones qui se fragmentent au cours de leur élimination (Bishop et al., 2004; Fuentes-Medel et al., 2009). Des facteurs trophiques neuronaux tels que le BDNF ou la neurotrophine-4 permettraient le développement des synapses les plus actives, en agissant sur le récepteur TrkB accumulé au niveau de la membrane post-synaptique et cela en favorisant la maintenance des agrégats de RnACh (Gonzalez et al., 1999; Wells et al., 1999). Les fibres musculaires engendreraient également une réponse rétrograde stabilisant ou déstabilisant la lame basale et les agrégats de RnACh. En effet, il a été montré que l'activation de facteurs tels que la PKC (*protein kinase C*)

(Lanuza et al., 2001; Lanuza et al., 2002), des tyrosines phosphatases (Dai and Peng, 1998) ou encore la libération de protéases musculaires (Nelson et al., 1993) clivant les liens entre les protéines de la terminaison nerveuse, de la lame basale et de la fibre musculaire, déstabilise les agrégats de RnACh alors que leur inhibition va avoir l'effet inverse. Afin de stabiliser les agrégats de RnACh et de maintenir l'intégrité de la lame basale, des inhibiteurs de protéases peuvent également être libérés par l'axone actif, montrant la complexité du processus régissant la régulation de l'élimination synaptique (Kim et al., 1998). L'adhésion synaptique produite entre l'axone et la fibre musculaire par l'intermédiaire de composants situés dans la lame basale aurait ainsi un rôle essentiel dans la régulation et la formation des synapses mais également dans leur élimination. Reste maintenant à savoir comment l'expression, la libération et l'action des candidats impliqués dans l'élimination synaptique sont modulées par l'activité synaptique (Lichtman and Colman, 2000; Wyatt and Balice-Gordon, 2003). Une fois la terminaison axonale sélectionnée, la machinerie d'exocytose/endocytose ainsi que les zones actives présentant un grand nombre de vésicules synaptiques, s'organisent au niveau de la membrane pré-synaptique en face des crêtes des replis post-synaptiques riches en RnACh.

- Cellules de Schwann myélinisantes et non-myélinisantes

Les influx électriques provenant de neurones afférents sont transmis au corps cellulaire du motoneurone par l'intermédiaire de ses dendrites. Ces informations sont ensuite centralisées au niveau de l'axone pour être transmises à une cellule cible. Afin que le signal électrique ne se disperse pas et afin de faciliter sa conduction jusqu'à la cellule cible, l'axone est isolé par des cellules de Schwann. Ces cellules se différencient à partir des progéniteurs des cellules de Schwann et s'enroulent un grand nombre de fois autour de l'axone formant ainsi une gaine de myéline. Elles laissent entre elles une zone où seul l'axone est présent, le nœud de Ranvier ; le signal électrique passe ainsi d'un nœud de Ranvier à un autre nœud de Ranvier, permettant une transmission rapide et précise de l'information, notamment grâce à la concentration de canaux ioniques au niveau de ces nœuds (Sherman and Brophy, 2005). La neuréguline-1 exprimée par les motoneurones est impliquée dans ce processus de myélinisation des axones puisqu'il a été montré qu'une diminution de l'expression de cette protéine entraîne une hypomyélinisation des axones et inversement, une augmentation de son expression est responsable d'une hypermyélinisation des axones. Cette neuréguline semble donc être un signal indiquant à la cellule de Schwann la taille de l'axone, l'épaisseur de la gaine de myéline étant proportionnelle au diamètre de l'axone (Michailov et al., 2004). La terminaison axonale est également enveloppée d'une cellule de Schwann. Les cellules de

Schwann dites péri-synaptiques ou terminales sont non-myélinisantes et recouvrent complètement la synapse entre la terminaison axonale du motoneurone et la fibre musculaire sans toutefois pénétrer dans l'espace synaptique.

b. Maturation post-synaptique

- Evolution de la forme des agrégats de RnACh

Durant la vie embryonnaire, la bordure des agrégats de RnACh est mal délimitée et les agrégats voient leur nombre augmenter de même que leur taille, cette dernière passant d'une centaine de μm^3 à $400 \mu\text{m}^3$ environ. Puis durant une phase de consolidation correspondant à la période située entre l'innervation des agrégats de RnACh et la naissance, les agrégats vont devenir plus petits, leur bordure devenant plus nette et leur densité augmentant. A la naissance, les agrégats de RnACh forment des plaques de forme ovale dont les bords sont bien délimités et dont la densité atteint environ 1000 RnACh par μm^2 . Dans une même fibre musculaire, plusieurs agrégats sont innervés, d'autres ne le sont pas. Suit alors l'élimination de la poly-innervation, la dispersion des agrégats de RnACh non innervés, puis la perforation de la seule plaque restant innervée aux alentours du cinquième jour après la naissance pour aboutir à la formation de jonctions en forme de « bretzel » à partir du dixième jour post-natal. A ce stade, la jonction neuromusculaire a atteint sa forme définitive, mais de nouveaux RnACh vont pouvoir s'insérer entre ceux formant les branches des « bretzels » pour que la jonction neuromusculaire puisse croître et grossir en parallèle de l'augmentation de la surface des fibres musculaires, pour aboutir chez l'adulte à une concentration de 10 000 à 20 000 RnACh par μm^2 (Figure 11A). L'évolution des jonctions neuromusculaires entre plaques ovales et « bretzels » coïncide également avec des changements de conformation tridimensionnelle des plaques motrices. Tout d'abord, les terminaisons nerveuses s'enfoncent dans des gouttières hémicylindriques se formant à la surface des fibres musculaires. Les gouttières vont ensuite s'invaginer pour former des replis synaptiques de $0.1 \mu\text{m}$ de large, $1 \mu\text{m}$ de profondeur et espacés de 1 à $3 \mu\text{m}$ (Figure 11B). Ces changements de conformation sont responsables de l'augmentation de la surface de contact entre le nerf et le muscle, les RnACh s'accumulant préférentiellement au niveau des crêtes des replis synaptiques alors que les canaux sodiques voltage-dépendants se trouvent accumulés au fond de ces mêmes replis. La transmission synaptique au niveau des jonctions neuromusculaires ainsi constituées, devient beaucoup plus efficace que la simple apposition du nerf sur des plaques planes de

RnACh, les zones actives pré-synaptiques se trouvant strictement en face des RnACh accumulés au niveau des crêtes des replis synaptiques (Sanes and Lichtman, 2001).

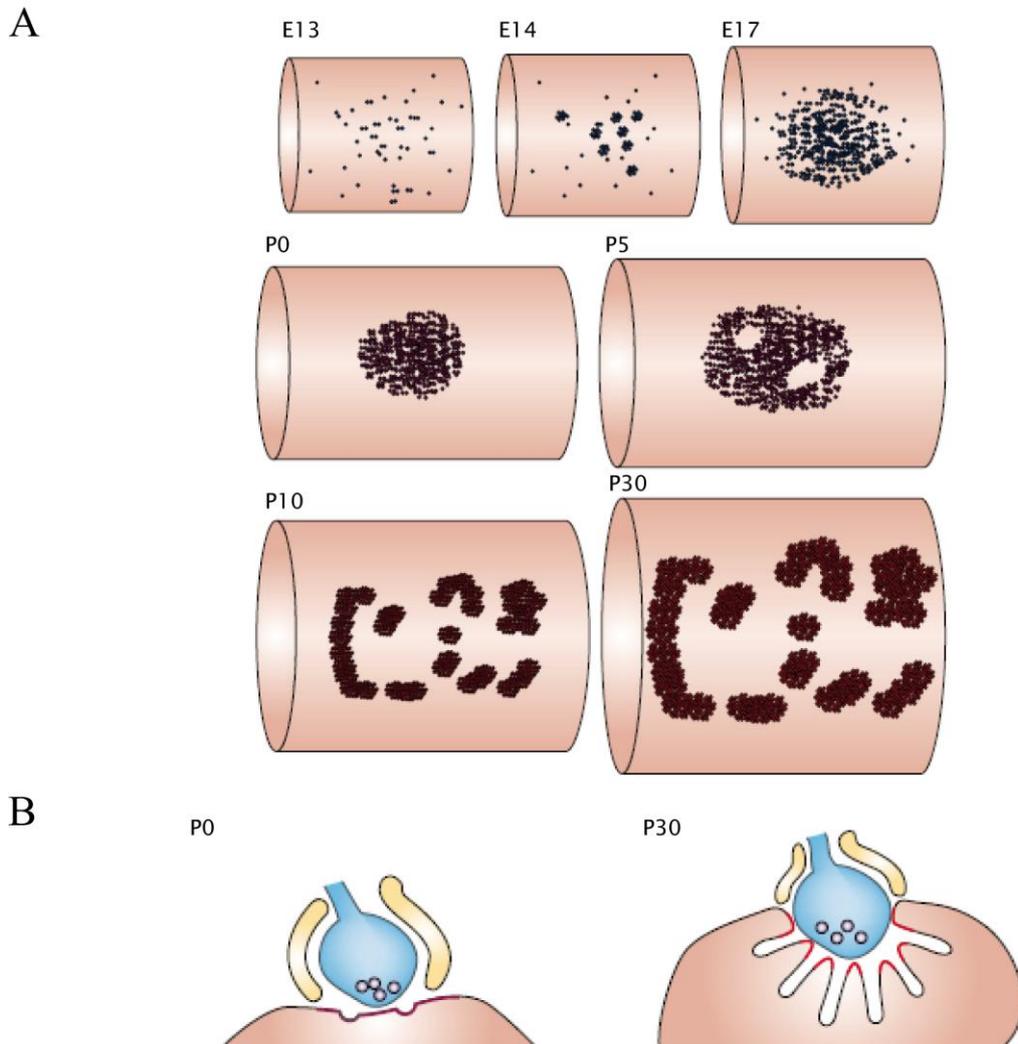


Figure 11. Maturation de l'appareil post-synaptique

A. Jusqu'au stade embryonnaire E17, les micro-agrégats de RnACh se rapprochent pour former un agrégat de RnACh peu compact. A la naissance (P0), l'agrégation se consolide pour aboutir à une plaque dont les bords sont nets, la taille diminue et la densité en RnACh augmente. La plaque va ensuite se perforer (P5) pour arriver à une organisation en forme de « bretzel » (P10) qui s'accroît grâce à l'addition de nouveaux RnACh au fur et à mesure que le muscle grossit (P30). Le changement de couleur des RnACh entre P5 et P10 indique le passage des RnACh de la forme embryonnaire, possédant la sous-unité γ , à la forme adulte, constituée de la sous-unité ϵ .

B. Entre P0 et P30, la plaque de RnACh forme une gouttière qui s'invagine pour former des replis, les RnACh se concentrant au niveau des crêtes des replis (D'après Sanes and Lichtman 2001).

La formation des replis synaptiques serait liée à la croissance des fibres musculaires qui produisent de la membrane alors même que les jonctions neuromusculaires sont déjà formées et que des sites d'attachement entre le nerf et le muscle sont déjà présents. Le candidat de la liaison entre les zones actives pré-synaptiques et les crêtes post-synaptiques est la laminine- $\alpha 4$ présente dans la lame basale synaptique sous forme d'un hétérotrimère $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ et qui semble s'associer avec les canaux calciques insérés au niveau des zones actives pré-synaptiques. Ainsi, la perte de la laminine- $\alpha 4$ ou des canaux calciques chez des souris mutantes provoque l'abolition de l'apposition entre zones actives et crêtes synaptiques. L'ajout de membrane au cours de la croissance de la fibre musculaire ne pouvant se faire au niveau des sites d'attachement entre les domaines pré- et post-synaptiques, les membranes nouvellement formées s'intercalent entre ces zones d'attachement produisant ainsi des replis. Il existe peu de données concernant les mécanismes moléculaires sous-jacents à la transition de plaque ovale à « bretzel » des agrégats de RnACh. Il semble que la stabilisation des RnACh au niveau des crêtes synaptiques au contact du nerf soit rendue possible par la présence d'un échafaudage de protéines associées au cytosquelette d'actine telles que l'utrophine et la rapsyne (Sanes and Lichtman, 2001). De plus, très récemment, l'ephexine-1, une protéine RhoGEF (*Rho guanine nucleotide exchange factor*) a été montrée comme étant un régulateur de la stabilité des agrégats de RnACh, son absence étant responsable d'un défaut de maturation du domaine post-synaptique (Shi et al., 2010). L'accumulation des RnACh au niveau des crêtes serait également favorisée par le processus d'ajout de membranes nouvellement formées au niveau du muscle, les membranes s'intercalant autour des zones définissant les crêtes synaptiques. Les canaux sodiques voltage-dépendants sont accumulés bien après les RnACh, se retrouvant associés à des protéines du cytosquelette différentes de celles accumulées au niveau des crêtes, les ankyrines, qui agrègent les canaux sodiques au fond des replis synaptiques. Ainsi, la répartition spécifique en deux zones des protéines impliquées dans la transmission synaptique semble être le résultat de liens particuliers avec différentes protéines du cytosquelette musculaire (Sanes and Lichtman, 2001).

- Des RnACh embryonnaires aux RnACh adultes

Chez les mammifères, les agrégats de RnACh changent non seulement d'un point de vue morphologique mais également d'un point de vue moléculaire et physiologique après la naissance. Ainsi, la sous-unité embryonnaire γ du RnACh se trouve remplacée par la sous-unité adulte ϵ . Ce changement se fait de façon graduelle et homogène au niveau de toutes les

synapses d'un muscle, mais ne se produit pas toujours au même moment selon le type de muscle. En effet, les muscles à contraction rapide verront cet échange s'opérer au cours de la première semaine suivant la naissance, alors que ce changement a lieu plus tardivement dans les muscles à contraction lente (Missias et al., 1996). Deux effets principaux sont produits par cet échange de sous-unités : la durée d'ouverture du canal est considérablement réduite alors que sa conductance et sa perméabilité au calcium se trouvent augmentées (Owens et al., 1993; Herlitze et al., 1996). Même si le changement de sous-unité se produit suite à des modifications au niveau transcriptionnel, le signal l'induisant reste à l'heure actuelle inconnu.

Contrairement aux RnACh embryonnaires, les RnACh adultes sont beaucoup plus stables, car moins susceptibles au désassemblage. Un RnACh adulte peut persister dans la membrane jusqu'à une semaine contre une journée pour un RnACh embryonnaire. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, cette stabilité n'est pas le résultat du remplacement de la sous-unité γ par la sous-unité ϵ du RnACh. Cette stabilité accrue semble être liée à la maturation du cytosquelette musculaire et de la lame basale synaptique, une perturbation du lien produit entre ces deux domaines par le complexe dystrophine entraînant une diminution du maintien des agrégats de RnACh (Jacobson et al., 2001). La quantité de RnACh à la membrane post-synaptique reste en général constante grâce à des mécanismes d'exocytose et d'endocytose fonctionnant en permanence. Ainsi, les nouveaux RnACh seraient ajoutés par exocytose et les anciens RnACh éliminés par endocytose dans la zone péri-synaptique, selon le modèle proposé par Sanes et Lichtman, les replis synaptiques pouvant également fournir un itinéraire par lequel les RnACh pourraient entrer ou sortir des zones denses (Figure 12) (Sanes and Lichtman, 2001; Marchand et al., 2002; Bruneau et al., 2005; Bruneau and Akaaboune, 2006).

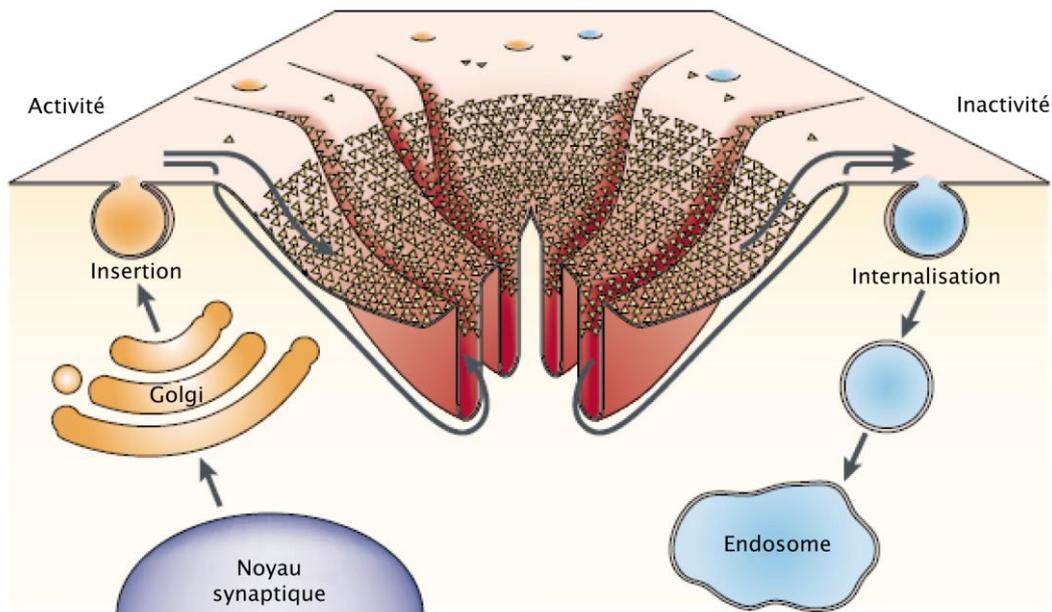


Figure 12. Maintien de l'appareil post-synaptique chez l'adulte

La vue tridimensionnelle du domaine post-synaptique montre que les RnACh sont accumulés au niveau des crêtes des replis synaptiques. Les nouveaux RnACh sont ajoutés par exocytose alors que d'autres sont éliminés par endocytose, les deux processus se déroulant dans la zone péri-synaptique. Ainsi, une quantité constante de RnACh est maintenue au niveau des domaines post-synaptiques adultes. Les replis synaptiques fournissent également un itinéraire par lequel les RnACh pourraient entrer ou sortir des zones denses. Les flèches indiquent les processus censés être affectés par l'activité au niveau de la jonction neuromusculaire adulte (D'après Sanes and Lichtman 2001).

2. Fonctionnement de la jonction neuromusculaire

Chez les vertébrés, il n'y a pas de contact « physique » entre les domaines pré- et post-synaptiques. La transmission synaptique passe donc par un messenger chimique, l'acétylcholine qui est libérée dans la fente synaptique. La neurotransmission implique à la fois un mécanisme régulant la libération d'acétylcholine au niveau pré-synaptique à partir d'un potentiel d'action neuronal et un mécanisme de génération du potentiel d'action musculaire au niveau post-synaptique résultant de l'activation des RnACh et des canaux sodiques voltage-dépendants de la fibre musculaire.

a. Genèse du potentiel d'action neuronal

En situation physiologique de repos, il existe une différence de potentiel négative de l'ordre de -60 mV à -90 mV entre la face intracellulaire de la membrane plasmique d'un motoneurone et sa face extracellulaire. Cette différence de potentiel appelée potentiel de repos résulte d'une différence de concentration en ions, l'intérieur de la cellule étant riche en ions potassium et l'extérieur riche en ions sodium. La membrane plasmique possède une certaine perméabilité aux ions qui diffusent passivement selon leur gradient à travers des canaux ioniques présents dans la membrane, ces courants ayant tendance à dissiper la différence de potentiel entre les compartiments intracellulaires et extracellulaires. Afin de maintenir constant le potentiel de repos, la cellule met alors en place des courants ioniques actifs transmembranaires, notamment par l'intermédiaire de la pompe sodium-potassium ATPasique. La genèse du potentiel d'action a lieu au niveau du cône d'émergence de l'axone se situant à la base du corps cellulaire du motoneurone qui fait la sommation des potentiels provenant des synapses situées le long des dendrites et sur le corps cellulaire. Si la somme des potentiels ne dépasse pas le seuil d'excitabilité du motoneurone, à savoir -55 mV environ, le message électrique n'est pas relayé par l'axone. Par contre, si ce seuil est atteint, il y a création d'un potentiel d'action neuronal qui obéit ainsi à la loi du « tout ou rien ». Le potentiel d'action est caractérisé par une modification instantanée et localisée de la perméabilité de la membrane du motoneurone. Tout d'abord, des ions sodium pénètrent dans la cellule en passant par des canaux sodiques. Le potentiel de membrane devient alors positif, environ +35 mV, correspondant à la dépolarisation. Puis, très rapidement des ions potassium sortent de la cellule en passant par des canaux potassiques. Le potentiel de membrane décroît, créant une repolarisation de la membrane puis son hyperpolarisation lorsque la valeur devient plus basse que la valeur du potentiel de repos (Figure 13A). Une période réfractaire absolue est ainsi créée, empêchant la formation d'un nouveau potentiel d'action au même endroit que le précédent. Puis vient la période réfractaire relative au cours de laquelle la polarisation de la membrane diminue avant de revenir à la normale grâce à l'action de la pompe sodium-potassium ATPasique qui fait ressortir le sodium et rentrer le potassium, la membrane retrouvant son potentiel de repos. Si pendant cette période, le potentiel du corps cellulaire reste supérieur au seuil d'excitabilité du motoneurone ou le redevient par action des synapses, un nouveau potentiel d'action est créé, et ce jusqu'à ce que le seuil d'excitabilité ne soit plus dépassé. La variation de potentiel de membrane locale et transitoire créée ne dure que quelques millisecondes et se propage de proche en proche le long de l'axone du motoneurone

ou d'un nœud de Ranvier à l'autre permettant une conduction saltatoire beaucoup plus rapide (Rigoard et al., 2009b).

b. Libération de l'acétylcholine

Le potentiel d'action généré au niveau du neurone se propage le long de l'axone jusqu'aux terminaisons nerveuses motrices. L'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison axonale va provoquer l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants présents en grande quantité dans cette extrémité du motoneurone. Le calcium extracellulaire entre alors massivement dans la terminaison nerveuse, provoquant la migration vers la membrane pré-synaptique des vésicules synaptiques remplies de neurotransmetteur : l'acétylcholine. Cette migration est rendue possible par la présence de synapsines à la surface des vésicules. Ces calmodulines calcium-dépendantes ancrent les vésicules sur le cytosquelette *via* la spectrine et les conduisent au contact de la membrane pré-synaptique. Les vésicules vont ensuite fusionner avec la membrane plasmique au niveau des zones actives, libérant l'acétylcholine dans la fente synaptique. Cette exocytose est assurée par un complexe appelé SNARE composé de trois protéines : les protéines VAMP ou synaptobrevines qui sont ancrées dans la membrane des vésicules synaptiques, la syntaxine qui est ancrée à la membrane plasmique de la terminaison nerveuse par SNAP25 qui est elle insérée dans cette même membrane. La brusque entrée de calcium et sa fixation sur la synaptotagmine entraînent la libération de la syntaxine permettant ainsi la fusion des VAMP avec les syntaxines et SNAP25, ce qui arrime les vésicules à la membrane plasmique (Figure 13B). La modification tridimensionnelle de ce complexe ternaire conduit à la fusion des bicouches lipidiques de la vésicule et de la membrane pré-synaptique et à la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique. Les paquets d'acétylcholine contenus dans les vésicules libérés suite à la fusion des membranes sont appelés quantum, un quanta correspondant à environ 10 000 molécules d'acétylcholine. Une fois dans la fente synaptique, l'acétylcholine va atteindre la membrane post-synaptique par simple diffusion. L'acétylcholine des vésicules synaptiques peut également être libérée indépendamment de l'arrivée d'un potentiel d'action, soit par fuite moléculaire, soit par la libération spontanée d'un quanta dépendant de la quantité de calcium intracellulaire (Galli and Haucke, 2001; Sudhof, 2004).

D'autre part, il est maintenant établi que les cellules de Schwann terminales modulent la libération des neurotransmetteurs au niveau de la plaque motrice. Pour cela, elles possèdent

des récepteurs sensibles à l'acétylcholine libérée par le motoneurone, les récepteurs muscariniques. L'activation de ces récepteurs gliaux déclenche une machinerie intra-cellulaire complexe aboutissant à l'augmentation du calcium intracellulaire et conduisant à la sécrétion d'une molécule qui traverse la membrane du motoneurone pour moduler la libération d'acétylcholine (Rochon et al., 2001). Trois mécanismes peuvent ensuite arrêter l'exocytose : l'ouverture de canaux potassiques ramenant le potentiel de membrane à un potentiel de repos inhibant ainsi les canaux voltage-dépendants tels que les canaux calciques, la diminution du calcium dans la terminaison nerveuse suite à son captage par les pompes calciques du réticulum et des mitochondries et enfin, l'épuisement des vésicules synaptiques.

c. Activation des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine de la membrane post-synaptique

Suite à leur diffusion dans la fente synaptique, les molécules d'acétylcholine vont se fixer sur leurs récepteurs nicotiques post-synaptiques. Deux acétylcholines se fixent à l'interface entre les sous-unités α - δ et α - ϵ du RnACh grâce à la présence de deux cystéines adjacentes, provoquant le changement de conformation du pentamère et ainsi l'ouverture du canal cationique. L'entrée de sodium et la sortie de potassium qui en résulte entraînent une dépolarisation locale du sarcolemme conduisant à un potentiel de plaque motrice miniature (ppmm) s'il s'agit de la libération d'un quanta d'acétylcholine ou d'un potentiel de plaque motrice (ppm) s'il s'agit de la libération de plusieurs quantum. Les ppmm ne suffisent pas à déclencher la contraction, par contre, lorsque le potentiel de plaque motrice est suffisant, il permet l'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants provoquant des mouvements d'ions plus importants dont l'entrée de sodium massive induisant un potentiel d'action musculaire qui se propage de proche en proche le long du sarcolemme et des tubules T. La dépolarisation membranaire des tubules T provoque le changement de conformation des récepteurs dihydropyridine de la membrane du tubule T et entraîne l'ouverture des récepteurs à la ryanodine responsables de la libération massive du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique dans l'espace intracellulaire de la fibre musculaire (Figure 13C). La contraction se produit ensuite comme cela a été décrit précédemment dans la partie IA3 de l'introduction.

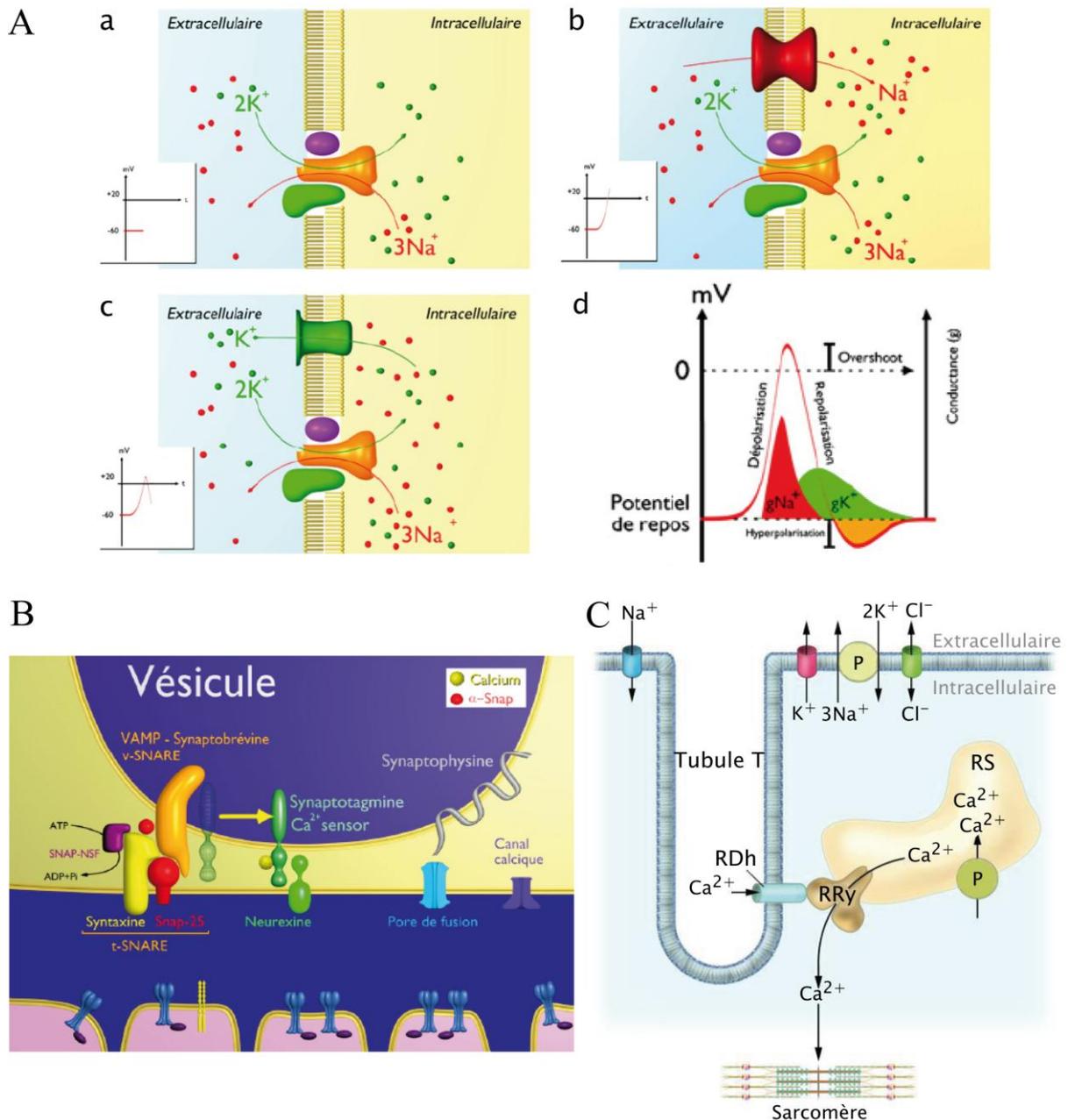


Figure 13. Fonctionnement de la jonction neuromusculaire

A. Le potentiel d'action neuronal est caractérisé par un potentiel de repos lorsque le potassium est accumulé à l'intérieur de la cellule et le sodium à l'extérieur (a). L'entrée soudaine de sodium provoque une dépolarisation de la membrane (b), puis la sortie de potassium entraîne la repolarisation de la membrane (c) suivie de son hyperpolarisation, avant un retour au potentiel de repos (d). Le potentiel d'action est transmis le long de l'axone jusqu'à sa cible.

B. La fusion des vésicules synaptiques au niveau des zones actives de la membrane pré-synaptique nécessite le placement des protéines de la membrane de la vésicule (v-SNARE) en face de leurs partenaires t-SNARE de la membrane plasmique pour former un complexe. La synaptotagmine, activée par le calcium, accélère le rapprochement de la vésicule synaptique à la membrane plasmique aboutissant à la fusion des bicouches lipidiques et à la libération du neurotransmetteur.

C. L'activation des RnACh par l'acétylcholine entraîne des échanges d'ions aboutissant à l'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants. L'entrée massive de sodium provoque la formation d'un potentiel d'action musculaire qui se propage jusqu'aux tubules T. Le changement de conformation des récepteurs dihydropyridine (RDh) entraîne l'ouverture des récepteurs de la ryanodine (RRy) et la libération massive du calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) vers l'intérieur de la cellule musculaire aboutissant à la contraction. P, Pompe (D'après Rigoard et al., 2009).

d. Fin de la transmission synaptique : dégradation de l'acétylcholine

La transmission synaptique se termine lorsque le neurotransmetteur est dégradé, le RnACh étant inactivé. Ce processus dépend de la présence de l'acétylcholinestérase (AChE) ancrée dans la lame basale par un collagène spécifique appelé ColQ. Cette enzyme est une sérine hydrolase qui hydrolyse l'acétylcholine en quelques millisecondes, ce qui est très rapide comparé à l'efficacité d'une autre cholinestérase, la butyrylcholinestérase. L'acétylcholine est hydrolysée en choline et acétate, la choline étant recyclée, c'est-à-dire recapturée par la terminaison nerveuse alors que l'acétate est éliminé par la circulation sanguine. Les cellules de Schwann peuvent également participer à l'élimination du neurotransmetteur présent dans la fente synaptique. Ceci est indispensable pour que la transmission synaptique ait lieu normalement, tout excès de neurotransmetteur dans l'espace synaptique étant délétère pour la synapse, tant d'un point de vue fonctionnel que structural. Ces cellules gliales participent donc activement au « nettoyage » de la fente synaptique, en concert avec les processus de dégradation enzymatique extracellulaire et de recapture de la choline par la terminaison nerveuse (Legay, 2000).

Des vésicules synaptiques se reforment par endocytose de la membrane pré-synaptique puis ces vésicules sont remplies de nouvelles molécules d'acétylcholine grâce à un transporteur vésiculaire d'acétylcholine contre un gradient de protons. La synthèse de l'acétylcholine se produit grâce à la choline acétyltransférase. Cette enzyme est synthétisée dans le corps cellulaire du motoneurone et suit le transport antérograde rapide jusqu'au bout de l'axone, lieu de synthèse du neurotransmetteur à partir de choline et d'acétylCoenzyme A provenant du métabolisme du glucose dans les mitochondries. La choline a une origine alimentaire et est captée dans le milieu extracellulaire par un transporteur actif utilisant les ions sodium ou recaptée de la fente synaptique (Naguib et al., 2002).

C. La matrice extracellulaire

Au moment de la gastrulation, le premier composant de la matrice extracellulaire à être sécrété par l'endoderme primitif est la laminine qui s'associe par la suite en une matrice extracellulaire embryonnaire formant une région de matériel non cellulaire dans les interstices situés entre les cellules. La matrice va ensuite voir sa complexité s'accroître après la gastrulation et tout au long du développement grâce à la diversification des isoformes des protéines de base que sont les laminines et grâce à l'incorporation de nouvelles protéines structurales dont notamment le collagène de type IV. Cette diversification de composition réside dans le fait que selon le type de cellule qu'elle entoure, la matrice extracellulaire va se voir attribuer des fonctions différentes, que ce soit pendant ou après le développement de l'organisme. Cependant, quel que soit le type de matrice, l'assemblage de ces composants nécessite à la fois des interactions entre les protéines extracellulaires et des interactions de ces protéines extracellulaires avec des récepteurs situés à la surface des cellules qu'elle entoure, le but étant de former un réseau capable de résister aux contraintes mécaniques liées aux mouvements des cellules mais également de permettre la communication entre les cellules (Yurchenco et al., 2004).

1. Les composants de la matrice extracellulaire musculaire

La matrice extracellulaire recouvrant l'ensemble des fibres musculaires comprend une lame réticulaire externe constituée principalement de fibres de collagènes ancrées à une lame basale interne se trouvant directement associée au sarcolemme et dont les constituants principaux sont la laminine et le collagène de type IV. La laminine est un hétérotrimère résultant de l'association de trois sous-unités α , β et γ ; la sous-unité α possédant cinq variants et les sous-unités β et γ possédant quatre variants chacune. Le collagène de type IV quant à lui est un protomère constitué de trois sous-unités α associées en une triple-hélice par des interactions covalentes ou non. A l'heure actuelle, six sous-unités α différentes ont pu être identifiées, allant de $\alpha 1$ à $\alpha 6$. Quelles que soient les combinaisons de sous-unités ou isoformes formées, ces deux composants sont capables de polymériser indépendamment l'un de l'autre afin de former des réseaux finement branchés. Puis la sécrétion du nidogène-1 ou entactine, une glycoprotéine sulfatée, permet la formation d'un complexe ternaire avec le collagène de type IV et la laminine. Le nidogène-1 permet également la formation d'un

complexe ternaire avec le protéoglycane à héparane sulfate appelé perlecan et la fibuline. Le nidogène-1 semble donc avoir un rôle central dans la constitution de la lame basale, d'une part en formant un lien critique dans la stabilisation des réseaux de collagènes et de laminines, d'autre part en servant d'attache à d'autres composants de la lame basale. D'autres éléments sont capables de s'associer au collagène, comme par exemple la fibronectine. Ce grand protéoglycane associé en dimère est capable non seulement d'interagir avec des collagènes ou autres protéoglycans mais aussi de s'auto-associer afin d'aligner correctement les cellules et leurs lames basales. L'agrine musculaire est également une protéine stabilisatrice de la lame basale, celle-ci pouvant interagir avec la laminine (Yurchenco et al., 2004).

A la jonction neuromusculaire, la lame basale passe entre la terminaison nerveuse et la membrane de la fibre musculaire et s'étend au niveau des replis sous-synaptiques, ce qui n'est pas le cas de la lame réticulaire. La lame basale forme ainsi une partie importante du matériel présent au niveau de la fente synaptique, favorisant une adhésion forte entre les domaines pré- et post-synaptiques qui se trouvent séparés d'environ 50 nm. Les constituants de la lame basale divergent selon qu'ils soient dans la partie extra-synaptique ou au contraire dans la zone synaptique de la lame basale. Ainsi, la lame basale présente au niveau de la jonction neuromusculaire possède un certain nombre de protéines qui ne sont pas présentes dans la région extra-synaptique ou en quantité beaucoup moins importante. Cette différence est directement liée à la fonction du domaine synaptique nécessitant l'accumulation de protéines spécifiques de la transmission synaptique. Alors que la fibronectine, le perlecan, le nidogène-1 et les laminines- $\alpha 2$ et $\gamma 1$ sont présentes tout le long du muscle, les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type IV et la laminine- $\beta 1$ ne sont présentes que dans les régions extra-synaptiques. Les protéines essentiellement synaptiques sont notamment l'acétylcholinestérase, ColQ, l'agrine quelle soit musculaire, neuronale ou provenant des cellules de Schwann terminales, le nidogène-2 et la neuréguline mais aussi certaines sous-unités de la laminine ou du collagène de type IV (Tableau 1) (Sanes, 2003; Yurchenco et al., 2004; Fox et al., 2008).

Lame basale Extrasynaptique	Lame basale Synaptique	Lame basale Synaptique et Extrasynaptique
Collagène 4- α 1	Acétylcholinestérase	Fibronectine
Collagène 4- α 2	ColQ	Perlecan
Laminine- β 1	Agrine	Nidogène-1
	Nidogène-2	Laminine- α 2
	Neuréguline	Laminine- γ 1
	Laminine- α 4	
	Laminine- α 5	
	Laminine- β 2	
	Collagène 4- α 3	
	Collagène 4- α 4	
	Collagène 4- α 5	
	GalNAc-X ⁽¹⁾	

Tableau 1. Les différents composants de la lame basale de la matrice extracellulaire et leur localisation

⁽¹⁾ GalNAc : *N*-Acetylgalactosamine.

2. Les récepteurs de la lame basale musculaire

Un aspect important dans l'assemblage de la lame basale musculaire concerne l'adhésion de ses composants structuraux à la surface des fibres musculaires. Il existe plusieurs récepteurs des molécules de la lame basale dont les principaux sont les intégrines et le dystroglycan. Tous ces récepteurs sont des molécules transmembranaires faisant le lien entre la lame basale et le cytosquelette et permettant la transmission d'information entre les deux compartiments, allant même jusqu'à une communication avec le noyau aboutissant à la régulation de la transcription. Les récepteurs des composants de la lame basale sont ainsi des transducteurs de signal. Les intégrines sont des hétérodimères formés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β , chacune d'entre elles possédant respectivement 18 variants et 9 variants, formant 24 dimères fonctionnels décrits à ce jour. Les isoformes α 1 β 1 et α 2 β 1 des intégrines sont capables d'interagir avec le collagène de type IV et des laminines alors que le nidogène, le perlecan et l'agrine interagissent avec les intégrines α (1 à 18) β 1. Les laminines peuvent

également interagir avec les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$. Le dystroglycan est un protéoglycane constitué d'une sous-unité α extracellulaire associée à une sous-unité β transmembranaire formant le composant de base du complexe dystrophine. L' α -dystroglycan possède des chaînes carbohydate O liées qui semblent être impliquées dans les interactions de haute affinité avec les laminines, le perlecan et l'agrine. La région cytoplasmique du β -dystroglycan interagit avec la dystrophine ou l'utrophine qui interagit à son tour avec les filaments d'actine des fibres musculaires formant un lien fort entre les régions extra- et intracellulaires. Par ailleurs, la dystrophine interagit avec les syntrophines et la dystrobrevine. Même si les intégrines et le dystroglycan sont indispensables à l'organisation et à la stabilisation de la lame basale et donc à la survie des embryons, ces deux récepteurs ne semblent pas indispensables à l'assemblage des composants de la matrice. Quelques études montrent l'implication directe de chaînes héparanes sulfates de protéines membranaires telles que le syndecan ou le glypican dans l'assemblage de la lame basale. Cependant, de nouvelles études restent nécessaires pour déterminer quelles peuvent être les molécules indispensables à l'assemblage des réseaux de laminines et collagènes dans la matrice extracellulaire (Yurchenco et al., 2004; Yurchenco and Patton, 2009).

A la jonction neuromusculaire, certaines intégrines telles que l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ sont accumulées en plus grande quantité qu'ailleurs le long de la fibre musculaire. De la même façon, le dystroglycan s'y trouve préférentiellement accumulé en association avec la protéine intracellulaire appelée utrophine, la dystrophine étant présente dans les régions extrasynaptiques. Hormis les protéines décrites précédemment, la membrane post-synaptique de la jonction neuromusculaire possède également un récepteur très important dans la transmission synaptique, MuSK. On a déjà vu que l'accumulation de MuSK et son activation à la synapse sont impliquées dans la régulation de la transcription post-synaptique ainsi que dans l'agrégation du RnACh *via* l'agrine (Partie Introduction, II A2). Mais MuSK est également un ligand du collagène spécifique ColQ, ce dernier correspondant à la queue collagénique permettant l'ancrage et l'accumulation de l'AChE dans la lame basale. ColQ interagit également avec le perlecan, lui-même lié au dystroglycan. Ainsi, l'enzyme indispensable pour terminer la transmission synaptique est accumulée dans la matrice extracellulaire *via* de multiples interactions qui semblent toutes être nécessaires à sa localisation (Figure 14) (Peng et al., 1999; Arikawa-Hirasawa et al., 2002; Cartaud et al., 2004).

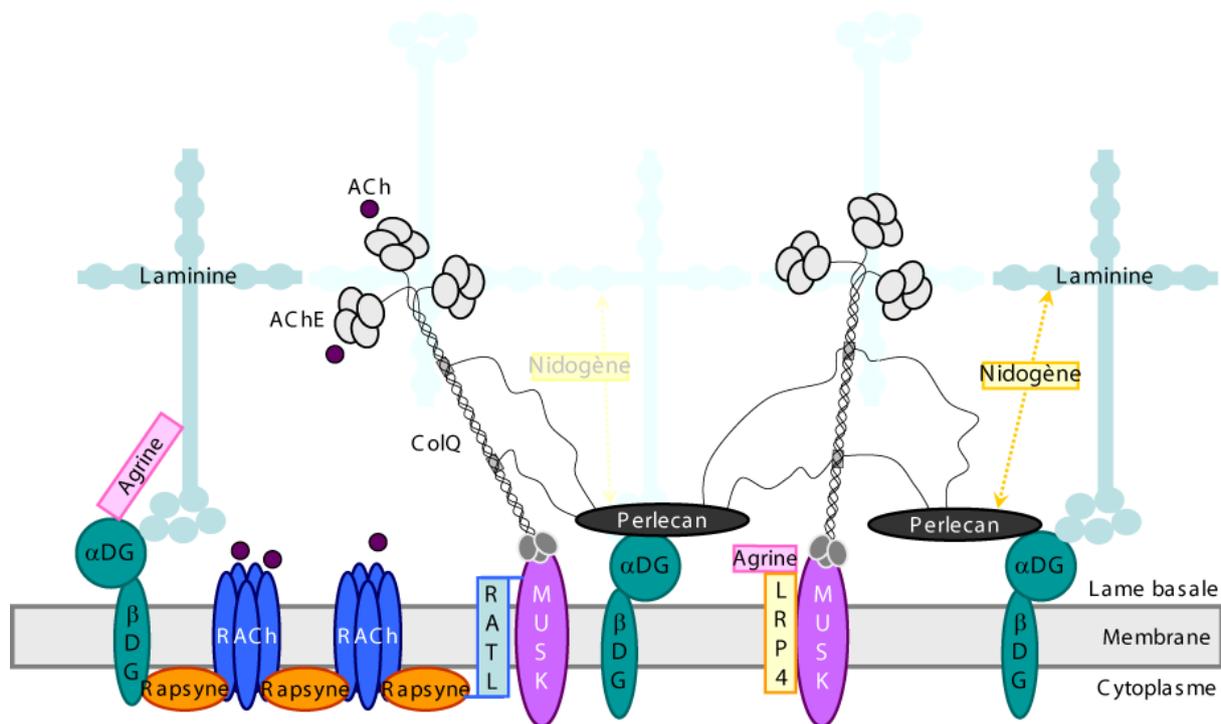


Figure 14. Les partenaires de ColQ à la jonction neuromusculaire

A la jonction neuromusculaire, ColQ ancre et accumule l'acétylcholinestérase (AChE) grâce à ses partenaires MuSK et perlecan. ACh, acétylcholine ; DG, dystroglycan ; LRP4, low density lipoprotein receptor-related protein 4 ; RATL, rapsyn-associated transmembrane linker (D'après Cartaud et al., 2004 ; Kim et al., 2008 ; Zhang et al., 2008 ; Yurchenco and Patton, 2009).

Dans le muscle squelettique, la matrice extracellulaire est impliquée dans les processus du développement tels que la myogenèse et la synaptogenèse grâce à son rôle dans la présentation de facteurs morphogènes, mitogènes et trophiques. La matrice extracellulaire possède également un rôle critique dans la maintenance de l'intégrité musculaire, cette intégrité dépendant à la fois des propriétés structurales des différents composants de la lame basale et de leurs propriétés de signalisation à travers leurs récepteurs membranaires. Enfin, la lame basale est fortement impliquée dans la régénération des fibres musculaires endommagées suite à un traumatisme. En effet, en contraignant la croissance et la migration des cellules satellites activées pour réparer le muscle, la lame basale permet d'orienter correctement la régénération des nouvelles fibres musculaires (Sanes, 2003).

III. LES SYNDROMES MYASTHENIQUES CONGENITAUX, PATHOLOGIES DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

Les syndromes myasthéniques congénitaux (SMC) sont des maladies musculaires héréditaires rares affectant la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire. Ces syndromes sont génétiquement et phénotypiquement très hétérogènes puisqu'ils peuvent résulter de mutations touchant une dizaine de gènes différents. La classification actuelle de ces syndromes est faite selon la localisation des protéines affectées à la jonction neuromusculaire, les trois grands groupes comprenant ainsi les gènes codant pour des protéines pré-synaptiques, synaptiques ou post-synaptiques. L'ensemble des mutations conduit en général à des modifications des voies de transduction du signal cholinergique et/ou à des modifications de la structure de la plaque motrice. Ces défauts entraînent des symptômes reconnaissables dès la naissance ou tôt au cours de l'enfance, même si ces syndromes arrivent parfois de façon sporadique ou apparaissent plus tardivement au cours de la vie. L'évolution et la gravité des SMC sont très variables selon les patients.

Les caractéristiques cliniques des SMC incluent des faiblesses musculaires qui augmentent au cours de l'effort, les muscles étant très fatigables. Les acquisitions motrices sont parfois retardées. Des symptômes oculaires, bulbaires et respiratoires sont évocateurs. Ainsi, il est très fréquent d'observer un ptosis (chute de la paupière supérieure) pouvant s'accompagner d'une diplopie (vision double) du fait de l'atteinte de la musculature oculo-palpébrale. Le cri chez le nouveau-né, la phonation, la déglutition et la mastication sont perturbés par l'atteinte des muscles d'innervation bulbaire. L'atteinte des muscles proximaux ou distaux des membres peut s'étendre aux muscles respiratoires pouvant conduire à une décompensation ventilatoire rapide. Une partie de ces caractéristiques est également observée chez des patients atteints de myasthénies auto-immunes provoquées par la formation d'auto-anticorps dirigés le plus fréquemment contre le RnACh ou MuSK. Cette pathologie touchant la transmission à la jonction neuromusculaire étant la plus commune, le diagnostic définitif des SMC se fera par la recherche de l'absence d'auto-anticorps chez les patients. La recherche d'antécédents familiaux ainsi que la réalisation d'un électromyogramme (EMG) permettent de confirmer le syndrome myasthénique, l'EMG révélant notamment un décrétement dans la réponse musculaire (diminution des potentiels musculaires évoqués) suite à des stimulations répétées à basses fréquences. Le profil de l'EMG étant typique d'un défaut de transmission synaptique, une biopsie permet enfin de constater les anomalies morphologiques des jonctions

neuromusculaires ainsi qu'une prédominance des fibres lentes de type 1 et une atrophie des fibres rapides de type 2, changements myopathiques non-spécifiques (Hantai et al., 2004).

La classification moléculaire précise de ces syndromes est d'une importance capitale que ce soit pour le diagnostic, le conseil ou la thérapie à appliquer aux patients, certains traitements pouvant avoir des effets bénéfiques pour certains des syndromes et des effets nuisibles pour d'autres (Muller et al., 2007a; Engel, 2008; Engel et al., 2008).

A. Les différentes mutations à l'origine des syndromes myasthéniques congénitaux

1. Mutation dans des gènes codant pour des protéines pré-synaptiques

La fonction principale du domaine pré-synaptique est la synthèse de l'acétylcholine et la transmission de l'information en provenance de la moelle épinière vers le muscle grâce à la libération de ce neurotransmetteur par exocytose des vésicules synaptiques. Tout défaut de production ou de stockage de l'acétylcholine aboutit aux syndromes myasthéniques congénitaux pré-synaptiques, qui restent assez rares puisqu'ils représentent seulement 7% de l'ensemble de ces syndromes (Tableau 2).

Chez de nombreux patients, des défauts de transmission synaptique ont été détectés, sans qu'aucune modification de la structure du domaine post-synaptique ou de la densité en RnACh ne soit montrée. Cependant, les vésicules pré-synaptiques présentant une taille réduite par rapport à la normale, les analyses se sont focalisées sur la terminaison axonale. Aucune perturbation du potentiel de plaque motrice n'a été détectée sur des muscles au repos, en revanche, l'amplitude de ces potentiels diminue au cours de l'effort, montrant que le défaut se situe soit au niveau de la re-synthèse de l'acétylcholine par la choline acétyltransférase (ChAT), soit au niveau du pompage du neurotransmetteur dans les vésicules synaptiques grâce au transporteur vésiculaire de l'acétylcholine, VACHT. A l'heure actuelle, seules des mutations récessives faux-sens du gène codant pour la choline acétyltransférase ont été identifiées entre les exons 6 et 15, le gène codant pour VACHT se trouvant dans l'intron 1 du gène CHAT. Ces mutations sont responsables d'une déficience de l'enzyme conduisant à la réduction de son activité catalytique couplée à une réduction de son expression. Ainsi, la forte diminution de la synthèse de l'acétylcholine provoque des perturbations au niveau de la

transmission synaptique. Chez les patients présentant une mutation de la ChAT, le traitement par inhibiteurs d'estérase est dans la plupart des cas bénéfique.

D'autres syndromes pré-synaptiques ont été décrits sans que le gène de la choline acétyltransférase ne soit muté. Les patients présentent une perturbation de la réponse synaptique due à une libération quantique évoquée diminuée ne dépassant pas 25% de la libération normale. Les mutations engendrant ces défauts n'ont pour l'instant pas été déterminées, même s'il semblerait qu'elles touchent plus particulièrement les gènes impliqués dans le transport de la choline, dans le transport de l'acétylcholine dans les vésicules synaptiques ou encore dans le transport de protons se faisant au moyen de la pompe à protons vésiculaire (Muller et al., 2007a; Engel et al., 2008).

2. Mutation dans des gènes codant pour des protéines synaptiques

La lame basale synaptique est impliquée à la fois dans l'organisation d'une région de liaison forte entre le nerf et le muscle et dans la transmission synaptique. Le message électrique nerveux est transmis au muscle par l'intermédiaire d'un messager chimique, l'acétylcholine qui est reconnue par ses récepteurs dans cette zone particulière mais y est également dégradée par l'AChE afin de terminer la transmission synaptique. Trois gènes présentant des mutations sont impliqués dans des syndromes myasthéniques congénitaux synaptiques : le collagène spécifique ColQ, la laminine- β 2 et l'agrine, des protéines essentiellement accumulées à la synapse et responsables de 13% des syndromes myasthéniques (Tableau 2).

a. Mutations dans le gène codant pour ColQ, queue collagénique de l'acétylcholinestérase

La forme asymétrique de l'AChE présente à la jonction neuromusculaire est composée d'un, deux ou trois tétramères de sous-unités catalytiques de type AChE_T attachés à une triple-hélice de collagène ColQ, chaque sous-unité de ColQ pouvant lier un tétramère d'AChE. La protéine ColQ est composée d'un domaine N-terminal comprenant une région d'attachement de l'AChE_T riche en proline (PRAD), d'un domaine collagénique central et d'une région C-terminale enrichie en résidus chargés et en cystéines (Bon et al., 1997; Krejci et al., 1997; Deprez et al., 2003). Les deux sites de liaison à l'héparine présents dans la partie

collagénique de la triple-hélice de ColQ ainsi que son domaine C-terminal, permettent l'ancrage de l'enzyme dans la fente synaptique (Figure 14 et 15A) (Peng et al., 1999; Arikawa-Hirasawa et al., 2002; Cartaud et al., 2004). La déficience en AChE à la jonction neuromusculaire n'est pas causée par des mutations dans le gène codant pour l'AChE mais par des mutations récessives dans le gène COLQ codant pour la queue collagénique de l'enzyme. Plus d'une trentaine de mutations de COLQ ont été identifiées jusqu'à présent, la majorité d'entre elles étant des mutations non-sens ou décalant le cadre de lecture à l'origine de protéines tronquées ou non, présentant des défauts d'interaction avec ses partenaires (Figure 15A). Ainsi, les mutations du domaine PRAD empêchent l'association des sous-unités catalytiques d'AChE_T au niveau de la triple-hélice de ColQ. Les mutations tronquantes du domaine collagénique génèrent de courtes sous-unités de ColQ associées à un tétramère d'AChE_T ne pouvant pas être insérés dans la lame basale synaptique. Enfin, les mutations affectant le domaine C-terminal produisent soit des sous-unités de ColQ-AChE_T, soit des triple-hélices de ColQ liant jusqu'à trois tétramères d'AChE_T qui ne peuvent, ni les unes ni les autres être insérées dans la fente synaptique (Figure 15B) (Donger et al., 1998; Ohno et al., 1998; Schreiner et al., 2007; Engel et al., 2008).

Chez les patients atteints du syndrome myasthénique congénital avec déficience en AChE (SMC de type 1c), un stimulus nerveux unique entraîne la formation de potentiels d'action musculaires répétés et déclinant provenant de la liaison répétée de l'acétylcholine sur ses RnACh et qui prolonge ainsi la réponse synaptique au-delà de la période réfractaire des fibres musculaires. L'analyse des ppmm révèle un déclin plus lent que la normale du fait de l'activation prolongée des RnACh par l'acétylcholine, avant que le neurotransmetteur ne quitte la fente synaptique par diffusion. L'amplitude des ppmm est également modifiée, celle-ci étant réduite du fait des perturbations synaptiques. Chez ces patients, les domaines pré-synaptiques sont de taille réduite et enveloppés de façon anormale par les cellules de Schwann terminales qui envahissent parfois la fente synaptique, diminuant ainsi le nombre de quantum libérés. Il semblerait que ce phénomène puisse protéger le domaine post-synaptique d'une trop grande désensibilisation que provoquerait une exposition trop longue au neurotransmetteur. Malgré le fait que la libération quantique soit limitée, la surcharge cationique provoquée par la sur-activation des RnACh entraîne la dégénérescence des replis synaptiques ainsi que la perte des RnACh. La transmission synaptique semble ainsi perturbée par la diminution de la libération quantique d'acétylcholine, la désensibilisation des RnACh et la surcharge cationique au niveau du domaine post-synaptique. Bien que la plupart des perturbations décrites soient présentes chez l'ensemble des patients atteints de SMC-1c, il

existe une certaine hétérogénéité de phénotype que l'on retrouve parfois même chez des patients ayant les mêmes mutations. Ces observations révèlent que des facteurs environnementaux, le polymorphisme ou la modification d'autres gènes peuvent atténuer ou empirer les conséquences de l'absence d'AChE à la jonction neuromusculaire chez les différents patients. Chez les patients présentant une mutation de COLQ, le traitement par inhibiteurs d'estérase est dans la plupart des cas sans effet et empire parfois la maladie (Engel et al., 2003; Engel, 2008; Mihaylova et al., 2008).

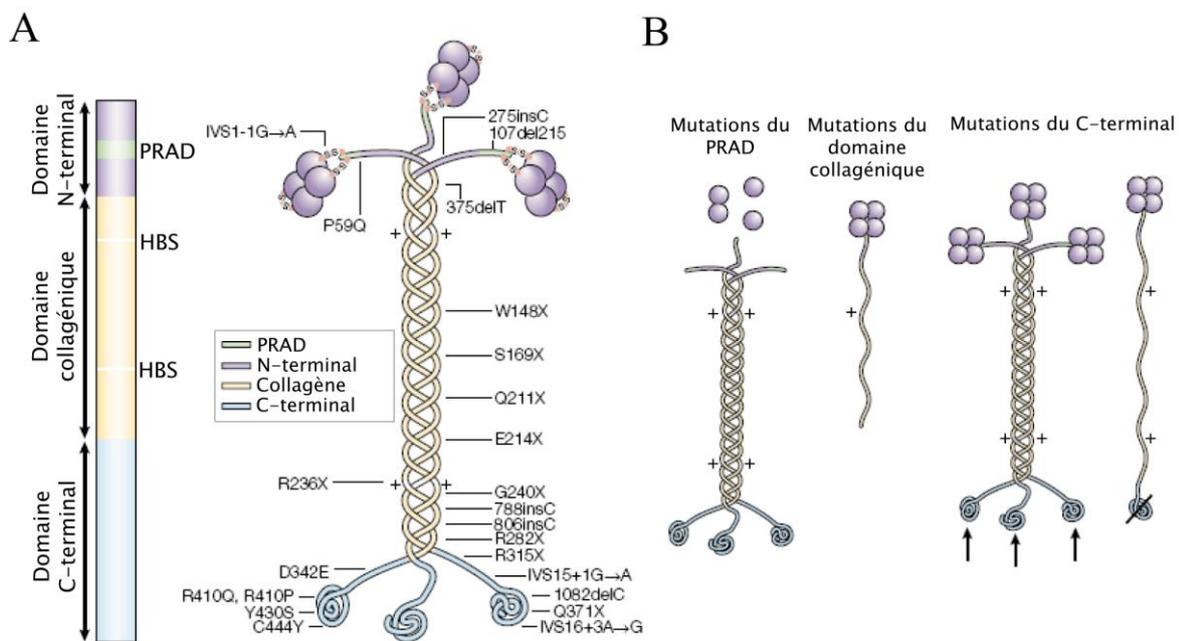


Figure 15. Structure et mutations de ColQ

A. Schéma des différents domaines d'un brin de ColQ ainsi que d'une triple-hélice de ColQ associée à trois tétramères d'AChE avec certaines des mutations identifiées à ce jour.

B. Les mutations du domaine PRAD empêchent l'association de l'AChE avec la triple-hélice de ColQ. Les mutations tronquantes du domaine collagénique empêchent la formation de la triple-hélice de collagène mais aussi la liaison à la membrane du brin de ColQ liant un tétramère d'AChE. Les mutations du domaine C-terminal produisent soit des simples brins de ColQ-AChE, soit des triples-hélices de ColQ-AChE ne pouvant pas se lier à la membrane. HBS, *Heparin Binding Site* ; PRAD, *Proline-Rich Attachment Domain* (D'après Engel et al., 2003).

b. Mutations dans le gène codant pour la laminine-β2

Deux mutations tronquantes hétéroalléliques récessives du gène codant pour la laminine-β2 et provoquant un décalage du cadre de lecture ont été récemment décrites et associées à un syndrome myasthénique congénital. Ces mutations sont responsables de l'absence de laminine-β2 entraînant une profonde déformation architecturale de la jonction neuromusculaire associée à des défauts fonctionnels. On note une réduction prononcée de la taille de la terminaison axonale recouverte anormalement par la cellule de Schwann terminale, cette dernière envahissant une partie de la fente synaptique. Les vésicules synaptiques voient leur contenu quantique diminuer, ce qui perturbe très faiblement la fréquence et l'amplitude des potentiels de plaque motrice miniatures, la phase de déclin des ppm étant normale. Les replis post-synaptiques sont légèrement simplifiés et aucune modification de l'expression de l'AChE au niveau des plaques motrices n'a pu être révélée. Ces données montrent donc l'implication de la laminine-β2 dans le développement de la jonction neuromusculaire. Comme cela a été montré précédemment, la laminine-β2 est un signal stop indiquant à la terminaison axonale sa position finale au niveau de la fibre musculaire mais également une protéine participant à la maintenance des zones actives pré-synaptiques. En général, la laminine-β1 peut compenser l'absence de laminine-β2 mais son incapacité à fournir un signal stop est probablement responsable des défauts observés au niveau des synapses déficientes en laminine-β2. Ainsi, des bifurcations des terminaisons nerveuses ainsi que des terminaisons nerveuses divisées en plusieurs petites terminaisons sont parfois observées, montrant les défauts de croissance axonale provoqués par la perte du signal stop (Maselli et al., 2009).

c. Mutations dans le gène codant pour l'agrine

Un cas de syndrome myasthénique congénital dû à une mutation dans le gène codant pour l'agrine a récemment été décrit. La mutation faux-sens est présente chez le patient à l'état homozygote entraînant une désorganisation importante de la jonction neuromusculaire. Ainsi, des perturbations du cytosquelette des terminaisons nerveuses et une fragmentation des gouttières synaptiques sont observées pour la majorité des jonctions neuromusculaires. De plus, ces jonctions présentent parfois une absence de terminaison nerveuse remplacée par la cellule de Schwann, caractéristique de synapses dénervées. Il est également noté une forte proportion de synapses en remodelage, c'est-à-dire qu'elles ont un profil partiel de dénervation ou de réinnervation. Quelques jonctions neuromusculaires néoformées sont

également observées chez le patient, des axones fins contactant de petites régions post-synaptiques. Très peu de synapses ayant un profil normal ont été révélées. En général, les anomalies post-synaptiques sont plus légères que les anomalies pré-synaptiques avec un faible élargissement des replis sous-synaptiques, l'agrine et MuSK étant accumulés correctement au niveau des synapses. Les défauts observés sont responsables de faiblesses musculaires fluctuantes, le patient présentant un faible ptosis et ne pouvant pas courir. De plus, l'analyse électrophysiologique a révélé un déclin progressif des potentiels de plaque motrice évoqués suite à des stimulations répétées, ce déclin étant typique de problèmes de transmission synaptique. L'étude de la mutation de l'agrine réalisée en culture cellulaire a permis de montrer que MuSK reste bien activé par l'agrine mutée et que l'agrégation du RnACh qui en résulte se produit normalement. La mutation n'affecte pas non plus la liaison de l'agrine sur l' α -dystroglycan. Cependant, l'injection d'agrine mutée dans des muscles de rat a révélé une déstabilisation des jonctions neuromusculaires endogènes, celles-ci présentant les mêmes défauts que ceux observés au niveau des synapses du patient. Ainsi, chez ce patient, la mutation de l'agrine ne modifie pas sa fonction d'induction de l'agrégation des RnACh *via* MuSK mais elle entraîne une perturbation de la maintenance des jonctions neuromusculaires. Ce patient a révélé un nouveau rôle de l'agrine qui ne semble pas être uniquement nécessaire à l'induction de la formation des structures post-synaptiques. Chez le patient présentant une mutation de l'agrine, le traitement par inhibiteurs d'estérase reste sans effet alors qu'une amélioration des symptômes est observée suite au traitement par éphédrine (Huze et al., 2009).

3. Mutation dans des gènes codant pour des protéines post-synaptiques

Une des étapes cruciales lors de la formation de la jonction neuromusculaire correspond à l'accumulation du RnACh au niveau de la membrane post-synaptique. On a vu précédemment l'importance de MuSK, de Dok-7 et de la rapsyne dans l'initiation de la formation des agrégats de RnACh (Partie Introduction, I A3). Ainsi, les syndromes myasthéniques congénitaux post-synaptiques résultent de mutations touchant les gènes codant pour les sous-unités du RnACh mais aussi de mutations touchant les composants de la voie impliquée dans la formation des agrégats de RnACh. Les syndromes myasthéniques congénitaux post-synaptiques sont les plus communs puisqu'ils représentent 80% de l'ensemble de ces syndromes (Tableau 2).

a. Mutations dans les gènes codant pour les sous-unités du récepteur nicotinique de l'acétylcholine

Les mutations touchant les sous-unités du RnACh sont réparties en deux grandes classes : les mutations aboutissant à des anomalies de cinétique du RnACh avec ou sans déficience en RnACh et les mutations provoquant une déficience en RnACh avec anomalies mineurs ou sans anomalies de cinétique (Engel et al., 2003; Muller et al., 2007a; Engel et al., 2008).

- Anomalies de cinétique du RnACh

Deux catégories de mutations aboutissent à des anomalies de cinétique du RnACh, les mutations canaux lents et les mutations canaux rapides. Les mutations canaux lents sont le résultat d'une augmentation de la réponse à l'acétylcholine aboutissant à l'ouverture prolongée des canaux de RnACh et donc à un déclin très lent du courant au niveau de la plaque motrice. Ces mutations peuvent toucher toutes les sous-unités du RnACh même si des mutations de la sous-unité α sont plus fréquentes. Les mutations canaux lents connues à l'heure actuelle sont des mutations dominantes avec gain de fonction. Elles touchent soit le domaine M2 des sous-unités qui tapisse le pore du canal du RnACh, ralentissant ainsi sa fermeture, soit le domaine d'interaction de l'acétylcholine, augmentant l'affinité du ligand pour son récepteur et permettant la réouverture du canal tant que l'acétylcholine interagit avec le RnACh allant jusqu'à sa désensibilisation. D'autres mutations détectées au niveau des domaines M1 ou M2 possèdent les caractéristiques des deux précédentes mutations. Au final, on assiste à une modification des plaques motrices due à la perte des RnACh au niveau des replis sous-synaptiques qui dégénèrent.

Les mutations canaux rapides sont le résultat d'une diminution de la réponse à l'acétylcholine aboutissant à une ouverture brève des canaux du RnACh et donc à une diminution très rapide de la réponse synaptique. Les mutations canaux rapides sont des mutations récessives avec perte de fonction et sont beaucoup moins fréquentes que les mutations canaux lents. Elles touchent plutôt les sous-unités α ou ϵ sans pour autant perturber l'agrégation du RnACh puisque le nombre de récepteur est normal au niveau des plaques motrices. Dans ce cas, l'acétylcholine a beaucoup moins d'affinité pour son récepteur diminuant grandement les épisodes d'activation du RnACh et n'entraînant pas de désensibilisation de celui-ci.

- Déficience en RnACh

La perte de RnACh au niveau de la membrane post-synaptique peut être le résultat de différents types de mutations récessives des sous-unités du RnACh qui sont le plus souvent hétérozygotes mais parfois homozygotes. Ainsi, on retrouve à la fois des mutations non-sens, des mutations responsables de décalages du cadre de lecture comme des micro-délétions ou encore des mutations au niveau des promoteurs des gènes. Même si toutes les sous-unités du RnACh peuvent être touchées, la plupart des mutations sont concentrées au niveau de la sous-unité ϵ . Deux raisons peuvent expliquer pourquoi cette sous-unité est plus touchée que les autres. Tout d'abord, le gène codant pour la sous-unité ϵ et plus particulièrement les exons codant pour la longue boucle cytoplasmique, sont riches en GC, ce qui semble prédisposer à des réarrangements d'ADN. Deuxièmement, la perte de la sous-unité ϵ adulte peut être compensée par la sous-unité γ fœtale même si cette dernière n'est présente qu'en faible quantité. Des études morphologiques réalisées chez les différents mutants de la sous-unité ϵ ont montré une augmentation du nombre d'agrégats de RnACh répartis sur une bande synaptique plus étendue au centre du muscle. L'intégrité des replis post-synaptiques est en général conservée même si parfois les jonctions neuromusculaires sont simplifiées, plus petites que la normale et que la répartition des RnACh est inégale au niveau des crêtes des replis. Il en résulte une diminution des potentiels et des courants de plaque avec de fréquentes augmentations de libération de quantum d'acétylcholine. Chez les patients présentant une mutation de la sous-unité ϵ du RnACh, le traitement par inhibiteurs d'estérase est dans la plupart des cas bénéfique.

Des mutations de la sous-unité γ fœtale du RnACh ont également été découvertes. Elles sont responsables de défauts d'agrégation du RnACh au niveau fœtal qui disparaissent dès l'apparition de la sous-unité ϵ adulte. Ainsi, après la naissance, aucun syndrome myasthénique congénital n'est présent chez ces patients. Cependant, l'absence ou la faible accumulation du RnACh chez le fœtus provoque l'apparition du syndrome d'Escobar hérité d'un syndrome myasthénique fœtal, avec de graves anomalies cranio-faciales et orthopédiques.

b. Mutations dans le gène codant pour la rapsyne

La rapsyne est constituée en N-terminal de sept domaines TPRs pour *tetratricopeptides repeats* permettant son auto-association. Le domaine super-hélice qui suit ces sept

TPRs lie la longue boucle cytoplasmique du RnACh, puis le domaine RingH2 situé en C-terminal de la protéine permet l'interaction avec le β -dystroglycan. Un grand nombre de mutations faux-sens récessives du gène codant pour la rapsyne sont impliquées dans des syndromes myasthéniques congénitaux. Ces mutations sont responsables de la déficience en rapsyne à la jonction neuromusculaire. Cette déficience entraîne une perturbation du développement synaptique caractérisée par une simplification de la région post-synaptique avec une diminution de l'agrégation du RnACh, une diminution de la surface des jonctions neuromusculaires qui sont également fragmentées et dispersées plus largement dans la partie centrale du muscle. Pour une partie des patients, la rapsyne mutée peut s'auto-associer, montrant que la diminution ou l'inhibition de la co-agrégation du RnACh et de la rapsyne réside, soit dans un défaut de conformation de la rapsyne au niveau de son domaine d'interaction avec le RnACh, soit d'un problème de co-transport du complexe RnACh-rapsyne jusqu'au sarcolemme. D'autres mutations faux-sens présentes au niveau des domaines TPRs aboutissent à l'inhibition de l'auto-association de la rapsyne ou à la diminution de la stabilité de cette auto-association. Enfin, des mutations touchent le promoteur de la rapsyne et plus précisément son domaine boîte-E, entraînant une forte atténuation de l'expression de la rapsyne. Chez les patients présentant une mutation de la rapsyne, le traitement par inhibiteurs d'estérase est dans la plupart des cas bénéfique (Engel et al., 2003; Muller et al., 2007a; Engel et al., 2008).

c. Mutations dans le gène codant pour Dok-7

Dok-7 est une protéine cytoplasmique post-synaptique appartenant à la famille Dok (*Downstream of Kinase*). Elle possède un domaine N-terminal PH pour *pleckstrin homology*, un domaine central PTB pour *phosphotyrosine binding domain* et un large domaine C-terminal riche en résidus tyrosines. Dok-7 interagit avec MuSK *via* son domaine PTB et induit sa phosphorylation aboutissant à la phosphorylation de la sous-unité β du RnACh et à l'agrégation du RnACh. Dok-7 est donc indispensable à la synaptogenèse puisque son absence empêche la formation des micro-agrégats de RnACh lors de la formation de la « pré-empainte » musculaire, mais également la formation des jonctions neuromusculaires, tout comme l'absence de MuSK ou LRP4. La majorité des mutations décrites sont récessives et sont centralisées au niveau de l'exon 7 formant le domaine C-terminal de la protéine Dok-7. Malgré le fait que Dok-7 interagisse avec MuSK et le phosphoryle chez ces patients, la taille des agrégats de RnACh est parfois diminuée avec une simplification des jonctions

neuromusculaires caractérisées notamment par la réduction de la profondeur des replis post-synaptiques. Il semble donc que le domaine C-terminal de Dok-7 soit impliqué dans la maturation de la synapse. Des mutations faux-sens présentes au niveau des domaines PH et PTB ont également été décrites et sont généralement associées à des mutations du domaine C-terminal sur le deuxième allèle des patients. L'analyse des jonctions neuromusculaires de l'ensemble des patients a permis de décrire plus précisément les défauts provoqués par les mutations de Dok-7 au niveau des compartiments pré- et post-synaptiques. Ainsi, trois types de jonctions neuromusculaires sont observés. Les premières correspondent à des synapses dénervées reconnaissables par leur aspect en « pseudo-bretzel » et leur largeur importante. Les deuxièmes correspondent à des jonctions réinnervées, de petit diamètre mais dont les bords sont bien définis, indiquant la restructuration des replis sous-synaptiques. Enfin, les dernières sont caractérisées par des terminaisons axonales présentant des défauts de branchement, ceux-ci diminuant fortement et étant à l'origine de terminaisons axonales uniques établissant des contacts « en passant » avec de petits agrégats de RnACh post-synaptiques dispersés. En plus des nombreux problèmes morphologiques des synapses, il a également été montré que l'activité de l'AChE est diminuée de quatre à cinq fois chez la plupart des patients par rapport à la normale. Chez les patients présentant une mutation de Dok-7, le traitement par inhibiteurs d'estérase est dans la plupart des cas sans effet ou alors à court terme avec parfois aggravation de la maladie (Beeson et al., 2006; Engel et al., 2008; Ben Ammar et al., 2010).

d. Mutations dans le gène codant pour MuSK

Deux patients myasthéniques ont actuellement été rapportés comme possédant des mutations récessives au niveau du gène MUSK. Un des patients possède une mutation faux-sens sur chaque allèle alors que l'autre possède une mutation provoquant un décalage du cadre de lecture sur un allèle et une mutation faux-sens sur l'autre. Dans les deux cas, les mutations touchent le domaine tyrosine kinase de la protéine entraînant une forte diminution de l'expression et de la stabilité de MuSK aboutissant à une diminution de l'agrégation des RnACh induite par l'agrine. Ces défauts sont responsables de la diminution du potentiel des plaques motrices, ces dernières étant plus petites et leur structure simplifiée avec des replis post-synaptiques réduits. Il semble que ces mutations conduisent à l'inhibition de l'interaction entre MuSK et Dok-7 indiquant le rôle fondamental de cette interaction dans les SMC associés à MuSK (Chevessier et al., 2004; Maselli et al., 2010).

e. Mutation dans le gène codant pour le canal sodique Nav1.4

Dans de très rares cas, les mutations responsables de syndromes myasthéniques touchent des gènes qui ne jouent aucun rôle dans l'agrégation du RnACh. Ainsi, chez un patient ayant de nombreux symptômes d'un SMC, des analyses n'ont montré ni défaut de libération quantique d'acétylcholine, ni anomalie de cinétique du RnACh ou de la structure des plaques motrices, ni perturbation du potentiel de plaque motrice. Par contre, il a été montré que la dépolarisation des fibres musculaires résultant des potentiels de plaque motrice ne parvient pas à former de potentiel d'action musculaire. Les analyses génétiques se sont donc focalisées sur les canaux sodiques voltage-dépendants accumulés au fond des replis post-synaptiques, ceux-ci étant responsables de la formation des potentiels d'action musculaires. Ainsi, deux mutations hétéroalléliques du gène SCN4A codant pour le canal sodium Nav1.4 post-synaptique ont été détectées, enrichissant les connaissances sur les gènes pouvant être impliqués dans les SMC. Chez les patients présentant une mutation de ce canal, le traitement par inhibiteurs d'estérase est dans la plupart des cas sans effet avec parfois aggravation de la maladie (Tsujino et al., 2003; Muller et al., 2007a).

	Nombre de cas
Défauts Pré-synaptiques (~7%)	
Déficience en Choline acétyltransférase	15
Réduction du nombre de vésicules synaptiques et réduction de libération quantique	1
Syndrome similaire au syndrome de Lambert-Eaton ⁽¹⁾	2
Autres défauts pré-synaptiques	2
Défauts associés à la Lame Basale Synaptique (~13%)	
Déficience en Acétylcholinestérase	37
Déficience en Laminine-β2	1
Myasthénie liée à l'Agrine	1
Défauts Post-synaptiques (~80%)	
Anomalies de cinétique du RnACh avec ou sans déficience en RnACh (Syndromes canal lent et rapide)	52
Déficience en RnACh avec anomalies mineurs ou sans anomalies de cinétique	107
Déficience en Rapsyne	40
Myasthénies liées à Dok-7	33
Déficience en MuSK	2
Myasthénie liée au Canal Sodique Nav1.4	1
Déficience en Plectine ⁽²⁾	1
Total (100%)	295

Tableau 2. Tableau récapitulatif des différentes mutations responsables de syndromes myasthéniques congénitaux

⁽¹⁾Le syndrome de Lambert-Eaton est un syndrome auto-immun acquis, provoqué par des anticorps dirigés contre les canaux calciques voltage-dépendants de la terminaison nerveuse. Le résultat est une diminution de la libération des quanta d'acétylcholine dans la fente synaptique. ⁽²⁾La plectine est une protéine liant les filaments intermédiaires normalement associée au sarcolemme, à la membrane nucléaire et au réseau présent entre les myofibrilles. Elle a été montrée comme étant essentielle à l'intégrité structurale du muscle et à la formation de la jonction neuromusculaire (Banwell et al., 1999). (D'après Engel 2008).

B. ColQ et les modèles d'étude du syndrome myasthénique congénital avec déficience en acétylcholinestérase

1. L'histoire de ColQ

a. Découverte de ColQ et de ses différentes formes

Les premières analyses ayant révélé la présence d'une queue associée à l'AChE remontent à l'étude des formes moléculaires de l'AChE dans l'organe électrique de gymnote réalisée par microscopie électronique. A cette époque, trois formes nommées A, C et D ont été montrées comme ayant des structures en grappe formant des sortes de têtes globulaires fixées à une queue en bâtonnets d'une longueur de 50 nm environ et d'une largeur de 2 à 3 nm. Ces formes moléculaires dites asymétriques sont constituées de globules d'AChE, la forme A comprenant en général quatre globules formant un tétramère d'AChE, la forme C comprenant huit globules formant deux tétramères d'AChE et la forme D comprenant douze globules formant trois tétramères d'AChE liés à une « queue » (Bon et al., 1973; Rieger et al., 1973). Plus tard, il a été montré que la partie distale de la queue présente au niveau des formes asymétriques de l'AChE était sensible à la collagénase, les globules restant associés en tétramères. Ainsi a été décrite pour la première fois l'association de tétramères d'AChE à une queue collagénique (AChE_T) (McMahan et al., 1978; Duval et al., 1992). Le clonage a révélé que cette queue collagénique est formée de trois sous-unités de ColQ d'environ 35 kDa chacune, associées en une triple-hélice, chacune des sous-unités pouvant s'associer à un tétramère d'AChE. L'analyse des formes asymétriques par une méthode biochimique, le gradient de sucrose, a ensuite permis de renommer les formes A, C et D respectivement formes A4, A8 et A12 représentant divers degrés de saturation de ColQ par les sous-unités catalytiques. Les formes A4, A8 et A12 correspondent respectivement à un trimère de collagène associé à un, deux ou trois tétramères d'AChE (forme G4 en gradient de sucrose), leur sédimentation respective dans le gradient de sucrose étant modifiée selon leur taille. Ces formes asymétriques d'AChE_T sont les hétéro-oligomères extracellulaires constituant la forme prédominante d'AChE accumulée à la jonction neuromusculaire. (Krejci et al., 1991; Duval et al., 1992; Krejci et al., 1997). Au niveau du cerveau, des tétramères d'AChE sont également accumulés afin de réguler la transmission synaptique cholinergique mais dans ce tissu, ils sont associés à des ancrs transmembranaires de 20 kDa appelées PRiMA pour *Proline-Rich Membrane Anchor* (Perrier et al., 2002; Perrier et al., 2003).

D'autres formes d'AChE sont obtenues par épissage alternatif des pré-ARNm codant pour l'AChE. Ainsi, il existe trois transcrits d'AChE, l'AChE_T vu précédemment, l'AChE_H et l'AChE_R. Le transcrit AChE_H est exprimé au niveau du système hématopoïétique, l'association de l'AChE_H avec une ancre glycoposphatidylinositol (GPI) permettant son attachement en dimère d'AChE au niveau de la membrane (forme G2 en gradient de sucrose). Le transcrit AChE_R code pour une forme soluble monomérique de l'AChE pouvant être sécrétée (forme G1 en gradient de sucrose). Il est intéressant de constater qu'il existe une balance entre les transcrits AChE_T et AChE_R pouvant être modifiée dans certaines conditions telles que le stress ou différentes pathologies musculaires ou non musculaires (Legay, 2000; Guerra et al., 2008).

ColQ est également capable de produire des formes asymétriques de butyrylcholinestérase (BChE), une deuxième cholinestérase différant de l'AChE par sa spécificité : la BChE hydrolyse à la fois la butyrylcholine et l'acétylcholine, alors que l'AChE n'hydrolyse que l'acétylcholine. Cependant, la BChE est exprimée par le muscle à un niveau beaucoup moins important que l'AChE et est présente surtout à des stades de développement précoces. Il a même été montré que des formes asymétriques hybrides constituées à la fois d'AChE et de BChE sont présentes chez le poulet nouveau-né, cette forme disparaissant chez l'adulte mais persistant chez des animaux dystrophiques. En plus des formes asymétriques, la BChE est également produite sous forme de monomères et d'oligomères solubles ou associés à des ancres GPI ou encore à PRiMA, l'enzyme pouvant être produite dans le foie, le système nerveux central et sécrétée dans le sang. Le rôle réel de la BChE reste mal connu, même s'il semble que cette enzyme soit impliquée dans la détoxification de composés naturels dans l'organisme (Massoulie et al., 1993). La BChE étant largement exprimée dans le système nerveux et ayant été observée dans les cônes de croissance des axones ou dans les terminaisons nerveuses, elle pourrait également participer à la croissance des neurites (Dubovy and Haninec, 1990). Il semblerait qu'à la jonction neuromusculaire, la BChE soit ancrée à la membrane de la cellule de Schwann terminale, lui permettant probablement de protéger la terminaison nerveuse d'un excès d'acétylcholine. De plus, cette localisation semble compenser partiellement l'absence d'AChE chez des souris mutantes AChE^{-/-} (Feng et al., 1999; Girard et al., 2007).

b. Séquence et structure de ColQ

Le gène COLQ a été cloné pour la première fois à partir de l'organe électrique de la torpille (Krejci et al., 1991) puis plus tard chez le rat (Krejci et al., 1997) et chez l'homme (Ohno et al., 1998). Ce collagène non fibrillaire est constitué de trois domaines structuraux distincts, un domaine N-terminal de 117 résidus, un domaine collagénique de 188 résidus et un domaine C-terminal de 166 résidus (Figure 15A). Par comparaison de la séquence de ColQ avec les séquences présentes dans des bases de données, la partie collagénique possède des homologies avec les collagènes, mais pour le reste de la protéine, aucune homologie significative n'a pu être trouvée avec d'autres protéines connues. ColQ est un collagène spécifique puisque contrairement à la majorité des collagènes, les domaines N- et C-terminaux non-collagéniques ne sont pas clivés. De plus, les motifs présents au niveau de ces deux domaines sont relativement bien conservés entre les différentes espèces.

- Le domaine N-terminal de ColQ a été analysé par séquençage, ce qui a permis de mettre en évidence un motif riche en proline (3Pro-Met-Phe-5Pro) appelé PRAD pour *Proline-Rich Attachment Domain*. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que ce domaine joue un rôle crucial dans l'association de ColQ avec les sous-unités catalytiques d'AChE. Le domaine PRAD est précédé de deux cystéines pouvant former des ponts disulfures avec les sous-unités d'AChE et suivi de deux phénylalanines participant également à l'interaction (Bon et al., 1997).

- La région centrale collagénique contient des répétitions de triplets de GXY riches en hydroxyprolines et hydroxylysines (Lwebuga-Mukasa et al., 1976). Les deux paires de cystéines encadrant ce domaine sont probablement impliquées dans la stabilisation de la structure collagénique en triple-hélice grâce à la formation de ponts disulfures entre les différents brins. De plus, la région collagénique possède deux sites de liaison à l'héparine ou au sulfate d'héparane (HBS) permettant l'ancrage de ColQ dans la lame basale synaptique (Deprez and Inestrosa, 1995; Krejci et al., 1997; Deprez et al., 2003).

- La partie C-terminale contient un motif riche en proline impliqué dans la trimérisation des sous-unités de ColQ, en amont d'une région riche en cystéines (Bon et al., 2003). Le domaine C-terminal participe également à l'insertion de ColQ dans la lame basale synaptique.

La localisation fonctionnelle des formes asymétriques de l'AChE dans la lame basale synaptique dépend ainsi à la fois de son interaction avec ColQ mais également des sites de liaison à l'héparine et du C-terminal de ColQ, tous deux indispensables à l'ancrage et/ou à l'accumulation de l'AChE à la jonction neuromusculaire.

c. Localisation de ColQ

Au niveau du muscle, ColQ possède deux transcrits différant l'un de l'autre uniquement au niveau de l'exon 1 du fait de l'existence de deux sites distincts d'initiation de la transcription. Les exons alternatifs 1 et 1a sont suivis de 17 exons constitutifs. Le transcrit ColQ1 est exprimé dans les muscles lents grâce à la présence de l'élément SURE pour *Slow Upstream Regulatory Element* au niveau d'un des sites d'initiation. Au contraire, ColQ1a est exprimé dans les muscles rapides grâce à la présence de l'élément FIRE pour *Fast Ionotropic Regulatory Element* au niveau du deuxième site d'initiation de transcription de ColQ (Lee et al., 2004). Même si une boîte-N permettant l'expression préférentielle de ColQ à la synapse est présente au niveau des deux promoteurs, le variant ColQ1 n'est pas restreint à la jonction neuromusculaire alors que le variant ColQ1a est strictement accumulé à la synapse. Sachant que le transcrit ColQ1 code pour une protéine qui semble moins efficace dans l'assemblage de l'AChE_T, on trouvera plutôt des formes asymétriques non saturées de type A4 et A8 dans les muscles lents où ces formes asymétriques seront également présentes dans les régions extra-synaptiques. A l'inverse, on trouvera essentiellement des formes A12 au niveau des synapses des muscles rapides exprimant le transcrit ColQ1a (Krejci et al., 1999; Lee et al., 2004). Même si les muscles lents expriment ColQ ailleurs qu'à la synapse, ce collagène est essentiellement étudié à la jonction neuromusculaire.

L'analyse de la distribution de ColQ ne pouvant se faire au niveau de la protéine du fait de l'absence d'anticorps spécifiques, le transcrit de ColQ a été révélé chez le rat par Northern blot. En plus d'être présent dans le muscle, ColQ est également exprimé dans le cœur et le cerveau, deux autres tissus cholinergiques. ColQ étant exprimé en beaucoup plus grande quantité dans le cœur que dans le muscle, des extraits de ventricule de cœur de rat ont été réalisés et ont révélé que seule une faible proportion de ColQ-AChE_T est présente dans ce tissu. De plus, ColQ est exprimé dans un certain nombre de tissus non cholinergiques tels que le poumon, la rate et les testicules mais pas dans le foie. En revanche, dans certains de ces tissus, il semblerait que divers variants soient exprimés avec des transcrits de ColQ soit

délétés de la partie 5', soit délétés de la partie 3'. Les transcrits courts 3' ne possédant pas la région codant pour le domaine PRAD ni le début du domaine collagénique, la liaison à l'AChE est impossible tout comme l'association en une structure collagénique. Quant aux transcrits courts 5', ils codent pour le domaine PRAD mais pas pour le domaine collagénique (Krejci et al., 1997). L'ensemble de ces données suggère donc que ColQ n'est pas exclusivement associé à l'AChE mais peut également exister en tant que composant indépendant de matrices extracellulaires. Plusieurs questions se posent alors : ColQ possède-t-il d'autres partenaires que ceux déjà connus ? D'autres protéines peuvent-elles interagir avec le domaine PRAD dans le cœur ou dans la partie extra-synaptique des muscles lents ?

d. Les partenaires de ColQ

Les trois partenaires connus de ColQ sont l'AChE, le perlecan et MuSK, chacun d'entre eux interagissant avec un domaine particulier de ColQ (Figure 14).

- En N-terminal : l'acétylcholinestérase

Le motif PRAD du domaine N-terminal de ColQ est responsable de l'interaction avec les sous-unités d'AChE_T (Bon et al., 1997). En effet, le domaine PRAD de ColQ interagit avec la partie C-terminale des sous-unités d'AChE_T au niveau d'une région appelée domaine WAT pour « *Tryptophan (W) Amphiphilic Tetramerization* » domain, l'association PRAD/WAT s'effectuant selon la stœchiométrie d'un domaine PRAD pour quatre domaines WAT (Simon et al., 1998; Dvir et al., 2004). Dans ce complexe, le domaine PRAD est organisé en hélice de type polyproline II entourée de quatre régions WAT organisées en hélices alpha. Le domaine PRAD de la sous-unité collagénique ColQ possède de multiples propriétés. Tout d'abord, ce domaine est responsable des interactions de type non covalentes des sous-unités catalytiques de l'AChE avec ColQ, permettant la localisation de l'activité enzymatique à l'endroit où le trimère de collagène est ancré. Ensuite, les domaines PRAD de la triple-hélice de collagène permettant d'accumuler jusqu'à douze sous-unités catalytiques d'AChE formant un dodécamère d'AChE_T, concentrent donc localement l'activité enzymatique. Pour finir, des expériences d'oligomérisation, de sécrétion et de dégradation suggèrent que les formes hétéro-oligomériques d'AChE_T sont moins susceptibles à la dégradation que l'AChE_T seule (Morel et al., 2001; Belbeoc'h et al., 2003). Ainsi, grâce à son domaine PRAD, ColQ a un triple rôle : l'ancrage, l'accumulation et la stabilisation de l'AChE_T dans la fente synaptique de la jonction neuromusculaire. L'importance fonctionnelle

du complexe ColQ-AChE_T a d'ailleurs pu être mise en évidence chez l'homme puisque son absence au niveau des plaques motrices liée à des mutations du gène COLQ est responsable du syndrome myasthénique congénital de type 1c.

Le domaine PRAD n'étant pas à l'extrémité du domaine N-terminal de ColQ, il est envisageable qu'une autre protéine puisse interagir avec ColQ dans cette région, même si les tétramères d'AChE_T sont à l'origine d'un fort encombrement stérique dans cette zone.

- Dans sa partie collagénique : le perlecan

Les deux sites de liaison à l'héparine situés dans la région collagénique de ColQ permettent son ancrage dans la matrice extracellulaire synaptique, notamment grâce aux interactions avec les protéoglycanes à sulfate d'héparane (HSPG). Parmi eux, le perlecan, le protéoglycane le plus abondant de la lame basale synaptique a été montré comme étant nécessaire à l'ancrage de ColQ à la jonction neuromusculaire, puisque son absence entraîne l'absence complète d'AChE dans cette région (Peng et al., 1999; Arikawa-Hirasawa et al., 2002). Le perlecan est une protéine à multiples domaines dont le corps fait 470 kDa. Elle possède des chaînes glycosaminoglycanes à sulfate d'héparane d'environ 380 kDa chacune et faisant 90 nm de long fixées au niveau de trois sites de glycosylation présents dans sa partie N-terminale. Ces chaînes sont supposées interagir avec un ou deux des sites HBS de ColQ. Cependant, bien que très similaires dans leur composition en résidus basiques, les deux sites HBS ont une affinité pour l'héparine différente ; cette différence dépend principalement de la structure locale de la triple-hélice de ColQ (Deprez et al., 2003). Les sites HBS n'ayant pas les mêmes propriétés, ils pourraient avoir des fonctions non redondantes. On peut donc se demander quelle peut être la spécificité des chaînes glycosaminoglycanes à sulfate d'héparane du perlecan pour chacun des sites HBS.

Même si la liaison du perlecan sur ColQ est envisagée par l'intermédiaire d'un ou des deux sites de liaison à l'héparine, il n'est pas à exclure que ColQ puisse interagir avec d'autres protéines à sulfates d'héparanes.

Les mutations faux-sens ou tronquantes du gène HSPG2 codant pour le perlecan sont responsables du syndrome de Schwartz-Jampel avec déficience quasi-totale en AChE. Les symptômes observés chez les patients sont des raideurs musculaires permanentes et généralisées dues à la diminution de la quantité de perlecan à la jonction neuromusculaire. L'analyse de l'électromyogramme révèle des décharges répétitives au repos caractérisant une activité spontanée, celle-ci ayant plutôt une origine pré-synaptique. A la différence des SMC-1c, la stimulation nerveuse n'entraîne pas de formation de potentiels d'action musculaires

répétés et déclinant, la perte d'AChE ne semblant donc pas être responsable de l'activité spontanée observée au repos. Par contre, l'absence d'AChE semble participer au syndrome en potentialisant la force musculaire (Nicole et al., 2000; Stum et al., 2008).

- En C-terminal : MuSK

Une mutation ponctuelle dans le domaine C-terminal de ColQ (Y431S) a été observée chez un patient myasthénique ne présentant pas d'accumulation d'AChE à la jonction neuromusculaire (Donger et al., 1998). Ce patient a donc révélé que ColQ pourrait interagir avec une protéine *via* son domaine C-terminal pour ancrer ou accumuler l'AChE dans la fente synaptique. La nécessité du domaine C-terminal dans l'accumulation de ColQ-AChE à la synapse a ensuite été confirmée *in vitro* par la réalisation de constructions plasmidiques codant pour la protéine ColQ possédant la mutation ponctuelle du patient (ColQ-Y431S) ou délétée de son domaine C-terminal (ColQ- Δ Ct). Contrairement à une construction codant pour la protéine ColQ entière, aucun agrégat d'AChE n'est produit par les variants ColQ-Y431S et ColQ- Δ Ct lorsqu'ils sont transfectés dans des cellules musculaires n'exprimant pas ColQ. En parallèle, la recherche des partenaires du récepteur tyrosine kinase MuSK a permis de mettre en évidence l'interaction ColQ-MuSK, cette interaction nécessitant la présence du C-terminal de ColQ ainsi que d'une tyrosine en position 431 (Cartaud et al., 2004). Ainsi, comme le perlecan, MuSK est indispensable à l'insertion de ColQ-AChE dans la lame basale synaptique.

- Absence d'interactions spécifiques :

Suite aux études réalisées à la jonction neuromusculaire et à la découverte de certaines protéines de la lame basale telles que des collagènes, la laminine ou encore la fibronectine, Grassi et collaborateurs ont étudié les interactions possibles de ces protéines avec ColQ-AChE dans le but d'expliquer la localisation de l'AChE. Pour cela, ils ont réalisé des expériences de liaison et de sédimentation avec des protéines de la lame basale radioactives ou non et des formes asymétriques d'AChE_T. Aucune interaction n'a pu être démontrée entre ColQ-AChE et les collagènes IV et V, ni même avec la laminine ou la fibronectine. De plus, leur étude d'immuno-réactivité entre ColQ et des anticorps spécifiques de différents collagènes n'a révélée aucune réaction croisée prouvant la particularité du collagène ColQ et expliquant probablement pourquoi ColQ n'interagit pas avec les constituants principaux de la lame basale synaptique (Grassi et al., 1983)

2. La souris modèle du syndrome myasthénique congénital avec déficience en acétylcholinestérase

a. Génération de la souris déficiente pour ColQ

Des ADNc codant pour ColQ ont été isolés par criblage d'une bibliothèque génomique de souris de souche 129sv avec le cDNA codant pour le ColQ de rat. Ces clones ont été utilisés pour générer un vecteur cible délété du domaine PRAD, site de liaison de l'AChE, grâce à son remplacement par insertion d'une cassette néomycine suivie de plusieurs codons stop réalisée par recombinaison homologue. La construction a ensuite été transfectée dans des cellules souches embryonnaires de souris (cellules R1 ES) et les recombinants homologues sélectionnés grâce à la néomycine. Les clones de cellules souches ainsi produits ont été introduits dans des blastocystes avant leur implantation dans l'utérus de mères porteuses. Après croisement successifs et sélection des souris, des souris hétérozygotes ColQ^{+/-} ont été obtenues et croisées pour obtenir des souris mutantes homozygotes (Feng et al., 1999).

b. Phénotype de la souris déficiente pour ColQ

Afin d'obtenir des souris ColQ^{-/-}, des souris mâles et femelles hétérozygotes ColQ^{+/-} sont croisées. A la naissance, les souriceaux ColQ^{-/-} sont impossibles à distinguer des souriceaux ColQ^{+/-} ou sauvages. A partir de cinq jours après la naissance, les souriceaux ColQ^{-/-} se mettent à trembler lors de leurs déplacements, phénomène qui persiste tout au long de la vie de l'animal et qui pourrait vraisemblablement être dû à des problèmes de contraction musculaire ou à des problèmes métaboliques. Les souris ColQ^{-/-} restent actives et sont capables de se nourrir mais ne parviennent pas à se développer comme les souris hétérozygotes ou sauvages de la même portée, leur croissance se faisant beaucoup plus lentement. Seulement 50% des souris ColQ^{-/-} vont atteindre le sevrage aux alentours de 21 jours après la naissance. Sur les 50% de souris restantes, les deux tiers vont mourir au cours des semaines suivantes, les autres atteignent le stade adulte mais seulement 10 à 20% de ces dernières dépasseront les trois mois.

L'absence de ColQ chez les souris mutantes entraîne la perte totale d'AChE fonctionnelle à la jonction neuromusculaire. Il en résulte des défauts de transmission synaptique et notamment un déclin plus lent des potentiels de plaque motrice du fait de l'activation répétée des RnACh par l'acétylcholine, la fin de la transmission se produisant suite à la diffusion de l'acétylcholine en dehors de la fente synaptique. A partir de 20 jours

après leur naissance, les souris ColQ^{-/-} présentent une grande variabilité au niveau de leurs jonctions neuromusculaires, avec 40% des jonctions dont la structure globale apparaît normale mais sont plus petites, 40% des synapses qui sont fragmentées et les 20% restant qui sont immatures avec l'apparence de jonctions neuromusculaires d'une souris sauvage d'une semaine. Une analyse par microscopie électronique a montré des défauts au niveau de la cellule de Schwann terminale qui a parfois tendance à recouvrir anormalement la terminaison nerveuse, entrant alors dans la fente synaptique. Ce processus pourrait ainsi limiter la libération d'acétylcholine pour éviter la sur-activation du RnACh suivie en général de sa désensibilisation. De plus, des « trous » sont parfois présents dans le cytoplasme sous la membrane post-synaptique et plus rarement dans des régions non synaptiques indiquant une possible dégénérescence des fibres musculaires. Ce phénomène pourrait être lié à l'entrée excessive de calcium au travers des canaux de RnACh plus longuement activés par l'acétylcholine (Feng et al., 1999). Tous les défauts observés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris ColQ^{-/-} ont ainsi été directement attribués à l'absence d'AChE dans la fente synaptique.

3. La lignée cellulaire déficiente pour ColQ

Les études réalisées sur les lignées cellulaires ont permis de répondre à un certain nombre de questions biologiques importantes, notamment d'un point de vue mécanistique. Ainsi, afin d'étudier les défauts moléculaires résultant de l'absence de ColQ à la fois dans des myoblastes et dans des myotubes à différents stades de leur différenciation, deux lignées cellulaires ont été créées : une lignée MLCL sauvage (wt) et une lignée MLCL déficiente pour ColQ (ColQ^{-/-}).

La génération de lignées cellulaires est facilitée par l'introduction d'oncogènes dans les cellules d'intérêt afin de les rendre immortelles, les cellules exprimant l'oncogène se multipliant quasiment indéfiniment dans des conditions déterminées. Un certain nombre de type de cellules en culture a été immortalisé grâce au gène codant pour l'antigène de tumeur (antigène T ou TAg) du virus simien 40 (SV40). Afin de contourner l'insertion de gènes parfois délicate lorsqu'elle est réalisée *in vitro* dans le but de créer des lignées cellulaires, une souris transgénique portant l'antigène T du virus SV40 a été générée. L'expression de l'antigène T dans les souris transgéniques ayant pour résultat un développement aberrant des souris et la présence de nombreuses tumeurs, un antigène T thermolabile provenant de la souche thermosensible tsA58 du virus simien a été utilisée pour la transformation des souris,

ce qui permet de réduire fortement la quantité d'antigène T fonctionnel chez la souris. Afin de diriger l'expression de l'antigène T au plus large éventail de tissus, son gène a été fusionné au promoteur du complexe majeur d'histocompatibilité $H-2K^b$ qui est à la fois largement actif et en plus inductible par les interférons. Ainsi, l'ARNm tsA58-Tag est exprimé dans tous les tissus des souris portant la construction. Une lignée de souris H-2K^btsA58 ou souris « ImmortoMouse[®] » a ainsi été créée après plusieurs générations afin d'obtenir des souris homozygotes transmettant une copie fonctionnelle du transgène (Jat et al., 1991).

Les lignées cellulaires wt et ColQ^{-/-} ont été obtenues à partir de souris de trois jours wt et ColQ^{-/-}:H-2K^btsA58 nées respectivement des croisements de souris H-2K^btsA58 ou de souris ColQ^{-/-} avec des souris H-2K^btsA58. Les muscles des pattes des souris de trois jours ont ensuite été dissociés par traitement avec 0.2% de trypsine et 0.01% de DNase et les cellules suspendues dans du milieu de croissance puis déposées sur boîtes de culture. Les cellules non adhérentes ont ensuite été transférées sur boîtes de culture contenant une matrice spécifique et les clones de cellules multipliés en conditions permissives (Herbst and Burden 2000). Ces cellules ont la particularité de proliférer à une température permissive pour l'expression du transgène (33°C) en présence d'interféron γ et de se différencier à 37°C en absence d'interféron γ (Cartaud et al., 2004; Guerra et al., 2005).

LES OBJECTIFS DE LA THESE

A. Le rôle de ColQ dans la formation de la jonction neuromusculaire

La connaissance des rôles fonctionnels du collagène spécifique ColQ présente un intérêt fondamental dans la caractérisation du syndrome myasthénique congénital avec déficience en AChE provoqué par des mutations du gène codant pour ce collagène. Ce syndrome est particulièrement difficile à diagnostiquer mais aussi à traiter, indiquant la nécessité d'identifier l'ensemble des perturbations provoquées par les mutations de COLQ. En dehors d'une diminution ou d'un défaut d'ancrage de l'AChE dans la lame basale synaptique, fonction structurale de ColQ aujourd'hui bien établie, les patients atteints de SMC-1c ont probablement d'autres défauts liés aux mutations de ColQ. Cette hypothèse réside notamment dans le fait qu'un autre syndrome avec déficience en AChE ne possède pas le même phénotype, le syndrome de Schwartz-Jampel, pour lequel le perlecan est muté (Nicole et al., 2000). De plus, les phénotypes des souris déficientes soit pour l'AChE soit pour ColQ sont relativement différents (Feng et al., 1999; Xie et al., 2000). Le fait que ColQ interagisse directement ou indirectement avec des récepteurs ayant des rôles importants dans la formation et l'organisation du domaine post-synaptique mais aussi de la lame basale synaptique, laisse donc penser que ColQ n'est pas uniquement une protéine de structure.

Dans une première partie de l'étude des rôles de ColQ, je me suis focalisée sur le domaine post-synaptique, ColQ interagissant avec le récepteur tyrosine kinase MuSK ou le dystroglycan, *via* le perlecan, tous deux impliqués dans le contrôle de l'agrégation et/ou de l'expression du RnACh, un composant post-synaptique indispensable à la transmission synaptique. Ainsi, en plus de problèmes de terminaison de la transmission synaptique du fait du défaut de l'enzyme nécessaire à la dégradation du neurotransmetteur, les patients mutants pour COLQ pourraient également présenter des défauts au niveau post-synaptique, l'ensemble des perturbations participant au syndrome. L'analyse des défauts moléculaires post-synaptiques a été réalisée par comparaison de l'expression et de l'agrégation des RnACh, de MuSK et de la rapsyne, à la fois en culture cellulaire et sur des muscles de souris sauvages et déficientes pour ColQ. En parallèle de l'analyse des défauts post-synaptiques, j'ai également étudié la possibilité qu'un système de compensation de l'absence d'AChE_T ancrée dans la fente synaptique, puisse être mis en place suite à l'absence de ColQ. Pour cela, les ARNm

codant pour la forme soluble AChE_R et pour la BChE ont été analysés à la fois *in vitro* et *in vivo*. De plus, une petite quantité de PRiMA étant exprimée au niveau du muscle, la possibilité d'une compensation de l'absence de ColQ-AChE_T par du PRiMA-AChE_T a été envisagée.

Dans une deuxième partie de l'étude des rôles de ColQ, une fonction plus conventionnelle du collagène a été envisagée, à savoir son implication dans la structuration de la lame basale musculaire. Afin d'étudier les effets de l'absence de ColQ de manière générale, des analyses par puces à ADN et des études d'ARN par RT-PCR à haut débit ont été réalisées *in vitro* et *in vivo*. Ces études ont révélé que les gènes sous-exprimés en absence de ColQ appartiennent principalement à la matrice extracellulaire. Dans la lame basale, ColQ interagit avec le perlecan qui lui permet de créer un lien indirect avec le dystroglycan, composant indispensable à la formation du complexe dystrophine et dont la perturbation entraîne des dystrophies. Il a ainsi été envisagé que l'absence de ColQ puisse perturber ce complexe et donc le lien entre la lame basale et le cytosquelette musculaire, provoquant ainsi une dystrophie/myopathie qui serait associée à la myasthénie. Des études morphologiques de muscles de souris sauvages et déficientes pour ColQ à différents stades de développement post-nataux ont donc été réalisées.

B. La Doublecortine dans le muscle (travaux collaboratifs)

Lors de la formation de la jonction neuromusculaire, une étape importante réside dans la navigation du cône de croissance jusqu'à sa cible musculaire, afin d'établir un contact synaptique. Suite à ce contact, la différenciation de la terminaison axonale ainsi que du domaine post-synaptique va se produire. Dans ces différents processus, le cytosquelette joue un rôle crucial, même si de nombreuses questions restent encore sans réponses. En effet, il existe peu d'informations concernant les changements dynamiques du cytosquelette permettant la croissance de l'axone puis la différenciation des domaines pré- et post-synaptiques, mais aussi concernant les signaux ou cascades moléculaires faisant le lien entre les protéines synaptiques et les protéines du cytosquelette.

Parmi les ARN dont l'expression a été détectée dans les cellules musculaires en culture, notre attention s'est focalisée sur l'ARN codant pour la Doublecortine (DCX). La DCX étant une protéine d'assemblage des microtubules exprimée principalement dans les neurones en migration, la retrouver exprimée dans des cellules musculaires a éveillé notre curiosité concernant son rôle dans le muscle. Nous avons donc cherché à déterminer le rôle de

la DCX dans le muscle mais aussi dans l'innervation de celui-ci. Pour cela, des cellules musculaires sauvages ainsi que des souris déficientes pour la DCX ont été analysées, notamment par des techniques d'immunofluorescence.

C. Wnt et le guidage axonal à la jonction neuromusculaire (travaux collaboratifs)

La formation des synapses s'effectue en trois étapes successives comprenant la reconnaissance de la cible finale, la différenciation synaptique et la maturation de la synapse, *via* des processus de stabilisation/déstabilisation. A la jonction neuromusculaire, lorsque l'une de ces étapes est perturbée au cours du développement, on observe des défauts fonctionnels au niveau du contact synaptique, responsables de certains SMC. Ces défauts peuvent également apparaître suite à des traumatismes et de manière fréquente au cours de sections du nerf périphérique lors d'actes chirurgicaux. La régénération nerveuse est alors lente et parfois incomplète ce qui met en évidence la nécessité de trouver des traitements appropriés à ces pathologies. Afin de stimuler la formation ou la régénération de la synapse, il est nécessaire de comprendre les bases moléculaires et cellulaires de l'établissement d'un tel contact spécialisé comprenant l'apposition précise des cellules pré- et post-synaptiques ainsi que leur différenciation. Certains signaux organisateurs ont été identifiés, ceux-ci étant notamment impliqués dans la différenciation et la maturation synaptique. Cependant, l'étape précoce correspondant à la reconnaissance de la cible musculaire par le nerf reste toujours une « énigme ».

Le but de ce projet a été d'étudier les signaux musculaires précoces qui vont instruire et guider le cône de croissance vers son site d'attachement final sur le muscle. L'analyse du microarray réalisé au laboratoire sur des cellules musculaires en culture a orienté nos recherches vers des candidats de la famille des Wnts déjà montrées comme des molécules de guidage axonal dans le système nerveux central. Ainsi, par des approches de biologie cellulaire *in vitro* et *in vivo* en utilisant la souris comme modèle d'étude, les événements qui se déroulent au milieu du muscle, là où la terminaison nerveuse contacte le muscle, ont été étudiés en présence ou en absence de Wnt4.

RESULTATS

I. QUEL EST LE ROLE DE COLQ DANS L'AGREGATION ET L'EXPRESSION DU RECEPTEUR DE L'ACETYLCHOLINE ?

A. Introduction

A la jonction neuromusculaire, la transmission synaptique implique la libération de l'acétylcholine par le domaine pré-synaptique, la diffusion du neurotransmetteur dans la fente synaptique jusqu'à son récepteur (RnACh) accumulé au niveau de la membrane post-synaptique puis sa dégradation rapide par l'AChE ancrée dans la fente synaptique par le collagène spécifique ColQ (Legay, 2000). Des mutations du gène codant pour ColQ sont responsables du syndrome myasthénique congénital avec déficience en AChE, la déficience de l'enzyme étant considérée comme seule responsable des défauts observés au niveau des synapses (Donger et al., 1998; Ohno et al., 1998; Schreiner et al., 2007; Mihaylova et al., 2008). En revanche, le rôle que ColQ pourrait jouer à la jonction neuromusculaire n'avait jamais été approfondi, ColQ ayant toujours été considéré comme une simple « ancre » pour l'AChE. Sachant que ColQ interagit avec des récepteurs impliqués dans le contrôle de la transcription, de l'agrégation et de la stabilisation des RnACh, tels que MuSK ou le dystroglycan par l'intermédiaire du perlecan (Peng et al., 1999; Jacobson et al., 2001; Arikawa-Hirasawa et al., 2002; Cartaud et al., 2004), l'idée a donc été que ColQ pourrait participer à la formation du domaine post-synaptique. ColQ interagissant directement avec MuSK, je me suis focalisée sur cette interaction et sur son effet sur la transcription de gènes synaptiques, mais également sur l'agrégation des protéines aboutissant à la formation des agrégats de RnACh.

B. Principaux résultats obtenus

Afin d'étudier la ou les fonctions de ColQ dans la différenciation post-synaptique, le phénotype des agrégats de RnACh a été analysé dans des lignées de cellules musculaires (MLCL) et dans des muscles de souris sauvages et déficientes pour ColQ. Que ce soit en culture cellulaire ou chez la souris, les agrégats de RnACh voient leur taille diminuée de plus de 35% en absence de ColQ avec une augmentation de plus de 20% de la densité en RnACh dans ces agrégats. Afin de savoir si ces modifications sont dues à l'absence de ColQ ou à l'absence de l'AChE résultant d'une déficience en ColQ, des expériences de restauration de

ColQ ont été réalisées *in vitro* dans des cellules ColQ^{-/-} grâce à une construction de ColQ permettant de s'affranchir de la présence de l'AChE. Cette construction a été obtenue par insertion du tag GFP à proximité du domaine PRAD de ColQ empêchant ainsi l'interaction avec l'AChE. La restauration de GFP-ColQ dans des cellules ColQ^{-/-} permet d'inverser les effets observés sur les agrégats de RnACh puisque ceux-ci retrouvent une taille plus importante et une densité en RnACh moindre. De plus, les domaines collagénique et/ou C-terminal de ColQ sont impliqués dans le contrôle de l'agrégation des RnACh, puisque la restauration d'une construction GFP-ColQ délétée de ces deux domaines ne permet pas d'inverser le phénotype des agrégats de RnACh. Ces résultats montrent donc que ColQ, indépendamment de l'AChE, peut affecter l'agrégation des RnACh au travers des interactions mises en jeu au niveau du domaine collagénique et/ou de la région C-terminale.

Dans le but d'expliquer l'origine des modifications de l'agrégation des RnACh liées à l'absence de ColQ, l'expression des principaux participants de cette agrégation a été analysée, à savoir les sous-unités du RnACh, la rapsyne et MuSK ; MuSK participant à l'activation d'une cascade de signalisation aboutissant à l'agrégation des RnACh *via* la rapsyne. Il a ainsi pu être montré que les quantités d'ARNm de la plupart des sous-unités du RnACh et de la rapsyne sont augmentées à la fois en culture cellulaire et chez la souris déficiente pour ColQ. En ce qui concerne MuSK, le niveau des ARNm augmente en culture cellulaire mais pas *in vivo* lorsque ColQ est absent. Cependant, la quantité de protéines ne reflétant pas toujours la quantité d'ARNm présente dans les cellules, le niveau des différentes protéines a été déterminé à la fois *in vitro* et *in vivo*. En culture, les augmentations des ARNm codants pour le RnACh, MuSK et la rapsyne se traduisent bien par une augmentation de la quantité de protéines. Par contre, une diminution de 35% de la quantité de MuSK est observée à la surface des myotubes alors que la quantité de RnACh augmente fortement. Au niveau des jonctions neuromusculaires des souris ColQ^{-/-}, la quantité de RnACh et de rapsyne augmente alors que la quantité de MuSK diminue d'environ 20%. Ainsi, ColQ semble réguler non seulement l'expression de gènes synaptiques mais aussi l'insertion ou la stabilisation de MuSK à la membrane. La perturbation de l'expression de MuSK au niveau des agrégats de RnACh est probablement responsable d'une partie du phénotype de ces agrégats, notamment le fait qu'ils soient plus petits, puisqu'il a déjà été montré qu'une augmentation de MuSK entraîne l'augmentation de la taille des agrégats de RnACh (Fu et al., 2001). Pour ce qui est de l'augmentation de la densité en RnACh au niveau des agrégats, il semblerait que ce soit

l'augmentation de la rapsyne qui en soit directement responsable (Moransard et al., 2003; Gervasio et al., 2007; Brockhausen et al., 2008).

La perturbation de la quantité de MuSK au niveau des agrégats de RnACh provoquée par l'absence de ColQ, engendre l'altération de la voie de signalisation agrine/MuSK. En effet, l'agrine, activateur de l'agrégation des RnACh au travers de MuSK, est trois à quatre fois moins efficace sur la phosphorylation de la sous-unité β du RnACh ainsi que sur l'agrégation du RnACh en culture. De plus, des expériences de restauration de différents variants de ColQ en culture ont également permis de montrer que les sous-unités α et β du RnACh sont régulées par ColQ au travers de MuSK. En effet, l'absence de ColQ entraîne une augmentation de la quantité d'ARNm des sous unités α et β du RnACh alors que la restauration de GFP-ColQ dans les cellules ColQ^{-/-} a l'effet inverse. Par contre, aucune réversion n'est observée lors de la restauration de GFP-ColQ délété de son domaine d'interaction avec MuSK. L'interaction ColQ-MuSK serait donc impliquée à la fois dans la stabilisation ou l'intégration de MuSK dans la membrane, mais aussi dans le contrôle de l'expression du RnACh, ColQ semblant agir au travers de MuSK comme un inhibiteur de l'expression des sous-unités du RnACh.

C. Conclusion et Perspectives

L'ensemble des résultats obtenus a permis de démontrer que ColQ est non seulement une protéine de structure ayant un rôle dans l'ancrage de l'AChE, mais aussi une protéine ayant des fonctions régulatrices sur l'agrégation et l'expression des RnACh impliquant son interaction avec MuSK. Plus précisément, ColQ semble réguler négativement l'expression et l'agrégation du RnACh à la jonction neuromusculaire. Il est ainsi intéressant de noter les rôles antagonistes de ColQ et de l'agrine, cette dernière stabilisant les agrégats de RnACh et favorisant leur expression à la synapse, en contrant les effets de l'acétylcholine. Sans pour autant avoir un rôle comparable à celui de l'acétylcholine, ColQ pourrait participer à une régulation négative fine de l'agrégation et de l'expression du RnACh à la jonction neuromusculaire. La détermination du site d'interaction de ColQ sur MuSK et sa comparaison au site d'interaction de l'agrine-LRP4 sur le récepteur tyrosine kinase permettrait de préciser comment ColQ peut agir sur MuSK pour produire son effet à la synapse.

Dans l'étude que j'ai réalisée, deux points principaux restent à éclaircir : premièrement, par quel mécanisme ColQ régule-t-il l'expression des sous-unités du RnACh et deuxièmement, ColQ participe-t-il à la stabilisation ou à l'insertion de MuSK dans la membrane plasmique des cellules musculaires.

1. Mécanismes de régulation des ARNm

Afin de répondre à la première question, il faut rappeler que la quantité des ARNm d'une cellule dépend de deux mécanismes : la régulation transcriptionnelle et la régulation post-transcriptionnelle.

a. Régulation transcriptionnelle

ColQ agissant sur les niveaux d'ARNm du RnACh à travers MuSK, la première idée a donc été de faire l'hypothèse que ColQ module la transcription du RnACh, seul mécanisme de régulation des ARNm du RnACh décrit à ce jour à la jonction neuromusculaire. Cependant, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire par Julie Bruyère, ont permis de montrer que la régulation transcriptionnelle n'est pas impliquée dans la modification d'expression observée pour une des sous-unités du RnACh en absence de ColQ. Pour montrer cela, l'activité transcriptionnelle a été testée grâce à l'utilisation d'une construction plasmidique comprenant la partie codante de la luciférase placée sous le contrôle du promoteur du gène de la sous-unité δ du RnACh ($\delta luci$), cette sous-unité étant régulée au niveau des noyaux sous-synaptiques grâce à la présence d'une boîte-N (Koike et al., 1995). La construction a été co-transfectée dans des myotubes sauvages et déficients pour ColQ avec le gène de la β -galactosidase permettant d'évaluer l'efficacité de transfection et de normaliser l'activité luciférase enregistrée, l'activité luciférase traduisant l'activité transcriptionnelle du gène de la sous-unité δ du RnACh. Les expériences ont montré que l'activité transcriptionnelle du gène de la sous-unité δ n'est pas significativement différente entre les myotubes sauvages et ColQ^{-/-} montrant que la transcription ne serait pas la cause de l'augmentation de la quantité d'ARNm de la sous-unité δ du RnACh en absence de ColQ. Afin de tester la fonctionnalité de la construction, des cellules sauvages et ColQ^{-/-} transfectées avec le plasmide $\delta luci$, ont été traitées avec de la neuréguline, cette dernière stimulant la fixation des facteurs de transcriptions sur les boîtes-N. Une augmentation de l'expression de la luciférase du même ordre de grandeur est observée dans les deux types de cellules, un effet qui se trouve aboli lorsque la boîte-N est délétée (construction $\delta luci\Delta N$) (Figure 16). Ces résultats montrent d'une

part que ColQ ne régulerait pas l'expression des RnACh par une voie transcriptionnelle et d'autre part que l'absence de ColQ n'affecte pas la voie de signalisation neuréguline/ErbB. Il semble donc que ColQ régule l'expression des sous-unités du RnACh par un mécanisme post-transcriptionnel.

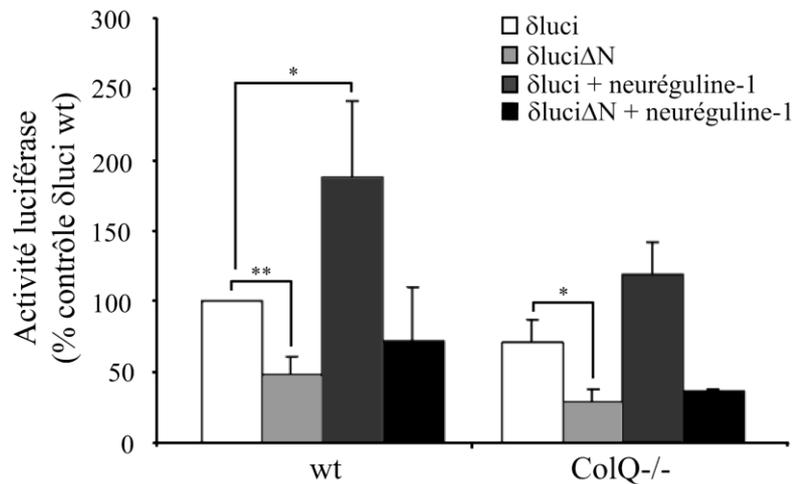


Figure 16. Activité transcriptionnelle de la sous-unité δ du récepteur nicotinique de l'acétylcholine dans des myotubes wt et ColQ^{-/-} à T2

Les cellules wt et ColQ^{-/-} ont été transfectées avec le plasmide pSV- β -galactosidase control vector et les constructions $\delta luciferase$ (gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur de la sous-unité δ du RnACh) ou $\delta luciferase \Delta N$ (gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur de la sous-unité δ du RnACh délété de sa boîte-N). Les cellules ont été traitées avec 5 nM de neuréguline-1 pendant 16h. L'activité luciférase a été normalisée par l'activité β -galactosidase reflétant l'efficacité de transfection ($n \geq 3$).

b. Régulation post-transcriptionnelle

L'hypothèse actuellement envisagée au laboratoire est que ColQ agirait sur la stabilité des ARNm codant pour les sous-unités du RnACh. Afin de déterminer la stabilité de ces ARNm, l'étude de leur demi-vie sera réalisée par RT-PCR en temps réel dans les cellules musculaires sauvages et déficientes pour ColQ. Pour cela, des myotubes wt et ColQ^{-/-} au stade T2 seront traités avec de la 5,6-dichloro-1- β -D-ribofluranosylbenzimidazole (DRB), un inhibiteur de l'ARN polymérase II. Suite à un tel traitement, une stabilité accrue des ARNm en absence de ColQ est supposée entraîner un déclin moins rapide de leur quantité, augmentant ainsi leur demi-vie. La stabilité des ARN est contrôlée par des facteurs de trans-activation liant des éléments cis spécifiques présents au niveau des ARNm cibles. Ces

facteurs incluent les microARN, déstabilisant les ARN sur lesquels ils se fixent et les protéines de liaison à l'ARN, stabilisant ou déstabilisant les ARN avec lesquels elles interagissent. Parmi les microARN, miR1, miR133 et miR206 sont spécifiques du muscle squelettique (Chen et al., 2006; Kim et al., 2006). Cependant, aucune séquence spécifique de liaison de ces microARN n'a pu être détectée au niveau de la région 3'UTR des ARN codant pour les sous-unités du RnACh, les microARN n'interviennent donc probablement pas dans leur régulation à la synapse. Parmi les protéines de liaison à l'ARN, la protéine ubiquitaire HuR, appartenant à la famille des protéines Hu, lie spécifiquement les ARNm possédant des éléments riches en AU (ARE) dans leur 3'UTR entraînant ainsi leur stabilisation. HuR est exprimée dans les cellules musculaires en différenciation et est directement responsable de l'augmentation de l'expression des transcrits codants pour MyoD et la myogénine, deux régulateurs clés de la différenciation musculaire. De plus, HuR est impliqué dans la régulation de l'expression de l'AChE au cours de la myogenèse (Deschenes-Furry et al., 2005). L'élément ARE reconnu par HuR a donc été recherché au niveau de l'ensemble des ARNm codant pour les sous-unités du RnACh. Tous les ARN des sous-unités du RnACh, à l'exception de la sous-unité ϵ , possèdent un site ARE faisant de HuR un candidat potentiel de la régulation de l'expression du RnACh à la jonction neuromusculaire. ColQ pourrait ainsi agir négativement sur cette protéine afin de contrôler la quantité d'ARNm du RnACh produite. Des résultats obtenus par Jennifer Karmouch montrent d'ailleurs qu'en absence de ColQ, la quantité de HuR est doublée à la fois en ARNm et en protéines (Figure 17). Il reste maintenant à déterminer si HuR se lie aux ARN codant pour les sous-unités du RnACh par immuno-précipitation de la protéine HuR et analyse des ARNm qui y sont liés.

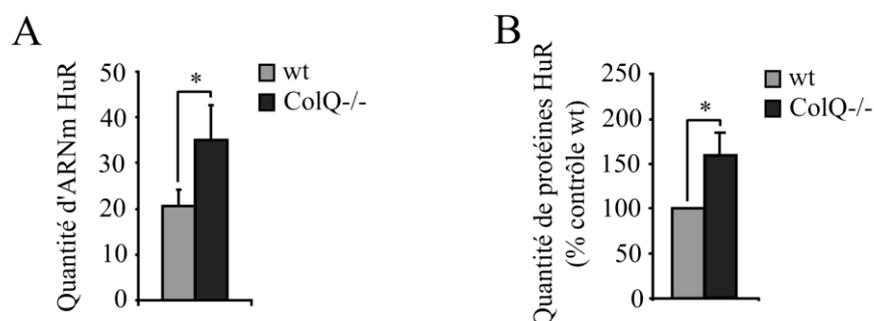


Figure 17. Quantité d'ARNm et de protéines HuR dans des myotubes wt et ColQ^{-/-} à T2

A. Quantité d'ARNm codant pour HuR déterminée par microarray (n=3).

B. Quantité de protéines HuR déterminée par western blot (normalisation par GAPDH ; n=5).

2. Contrôle de l'expression de MuSK à la membrane post-synaptique

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer que ColQ favorise l'insertion de MuSK dans la membrane plasmique. Soit ColQ facilite l'adressage de MuSK à la membrane plasmique, soit ColQ participe à la stabilisation de MuSK dans cette même membrane.

a. Adressage de MuSK à la membrane

Pour que ColQ facilite l'adressage de MuSK à la membrane, cela implique que ColQ soit associé à MuSK au niveau des voies sécrétoires et qu'une fois le complexe assemblé, il soit inséré « en bloc » dans la membrane. Des résultats antérieurs vont dans le sens de cette idée puisqu'il a déjà été montré que non seulement ColQ et MuSK co-localisent dans les mêmes vésicules lorsqu'ils sont co-transfectés dans les mêmes cellules COS-7, mais qu'en plus, le complexe ColQ-MuSK est fortement accumulé à la surface de ces cellules par rapport à des cellules transfectées avec ColQ ou MuSK n'exprimant que très peu de l'une ou l'autre de ces protéines à leur surface (Cartaud et al., 2004). Il reste donc à déterminer dans quels compartiments pourraient être associés ColQ et MuSK. Pour cela, le même type d'expériences de transfection puis d'immunofluorescence peut être réalisé en ajoutant en plus de la détection de ColQ et de MuSK, un marqueur spécifique de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique. L'utilisation de la construction de ColQ délétée de son domaine C-terminal servira de témoin négatif pour cette expérience, ce mutant ne s'associant pas avec MuSK. De plus, afin de déterminer si les protéines ColQ et MuSK interagissent bien ensemble dans les vésicules sécrétoires, un fractionnement vésiculaire pourrait être réalisé afin d'extraire les protéines uniquement présentes dans ces vésicules. Puis, une immunoprécipitation de MuSK, suivie de l'analyse par western blot de ColQ et de MuSK, permettrait de savoir si ces deux protéines interagissent bien ensemble au niveau du système sécrétoire.

b. Stabilisation de MuSK à la membrane

Un échafaudage extracellulaire comprenant ColQ pourrait stabiliser MuSK à la membrane en réduisant son endocytose. Afin d'analyser l'implication de ColQ dans l'endocytose de MuSK, deux expériences sont envisagées. Tout d'abord, il est prévu de comparer l'internalisation de MuSK dans des cellules musculaires sauvages et déficientes pour ColQ au temps T2. Pour cela, les myotubes seront traités avec de la biotine clivable afin de marquer les protéines de surface. Après élimination de la biotine non fixée par lavage des cellules, les myotubes seront incubés à 33°C et 8% de CO₂ pour permettre à l'endocytose de

se produire. Puis la biotine présente à la surface des cellules sera clivée grâce à l'utilisation d'un tampon de clivage contenant du glutathion. Les protéines biotinylées correspondant aux protéines internalisées extraites des différentes cultures pourront ensuite être purifiées par des billes de streptavidine-agarose et analysées par western blot. Si ColQ favorise bien la stabilisation de MuSK à la membrane, une moins grande quantité de protéines MuSK biotinylées devrait être observée dans les cellules sauvages comparées aux cellules ColQ^{-/-}.

Dans un deuxième temps, il est prévu d'étudier les conséquences de l'expression de K44A, un mutant dominant-négatif de la dynamine dans des cellules déficientes pour ColQ. La dynamine est une protéine GTPase qui libère des puits néoformés recouverts de clathrine lors de l'endocytose (Danino and Hinshaw, 2001). Des études ont déjà montré que l'expression de dynamine K44A inhibe l'endocytose de MuSK induite par l'agrine (Zhu et al., 2008). A partir de ces données, il serait donc intéressant de transfecter des cellules déficientes pour ColQ avec la dynamine sauvage ou la dynamine K44A, puis d'analyser les protéines de surface que l'on peut biotinyler facilement et isoler grâce à de la streptavidine-agarose. Une analyse de ces protéines par western blot permettrait ensuite de quantifier MuSK à la surface des myotubes ColQ^{-/-} ; si l'absence de ColQ est responsable de la déstabilisation de MuSK entraînant son endocytose, le blocage de l'endocytose par la dynamine K44A devrait révéler une plus grande quantité de MuSK à la membrane comparé à des myotubes ColQ^{-/-} non transfectés et transfectés avec la dynamine sauvage favorisant l'endocytose. Ces analyses permettraient ainsi de discriminer l'implication de ColQ dans la stabilisation ou dans l'adressage de MuSK à la membrane plasmique des myotubes.

D. Article

ColQ Controls Postsynaptic Differentiation at the Neuromuscular Junction

Séverine M. Sigoillot, Francine Bourgeois, Monique Lambergeon, Laure Strohlic, and Claire Legay

Laboratoire de biologie des jonctions neuromusculaires normales et pathologiques, Université Paris Descartes, Inserm U686, 75270 Paris, France

CollagenQ (ColQ) plays an important structural role at vertebrate neuromuscular junctions (NMJs) by anchoring and accumulating acetylcholinesterase (AChE) in the extracellular matrix (ECM). Moreover, ColQ interacts with perlecan/dystroglycan and the muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK), key molecules in the NMJ formation. MuSK promotes acetylcholine receptor (AChR) clustering in a process mediated by rapsyn, a cytoplasmic protein that stimulates AChR packing in clusters and regulates synaptic gene transcription. Here, we investigated a regulatory role for ColQ by comparing the clustering and expression of synaptic proteins in wild type and ColQ-deficient muscle cells in culture and at NMJ. We show first that AChR clusters are smaller and more densely packed in the absence of ColQ both *in vitro* and *in vivo*. Second, we find that like AChRs and rapsyn, MuSK mRNA levels are increased in cultured cells but not in muscles lacking ColQ. However, membrane-bound MuSK is decreased both *in vitro* and *in vivo* suggesting that ColQ controls MuSK sorting or stabilization in the muscle membrane. In line with this, our data show that activation of the MuSK signaling pathway is altered in the absence of ColQ leading to (1) perturbation of AChR clustering and/or β -AChR subunit phosphorylation and (2) modifications of AChR mRNA level due to the lack of ColQ-MuSK interaction. Together, our results demonstrate that ColQ, in addition to its structural role, has important regulatory functions at the synapse by controlling AChR clustering and synaptic gene expression through its interaction with MuSK.

Introduction

Depolarization of the motoneuron at vertebrate neuromuscular junctions (NMJs) evokes release of acetylcholine (ACh) into the synaptic cleft, which activates acetylcholine receptors (AChRs) on the postsynaptic membrane. Once released in the synaptic space, ACh level is largely controlled by acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) (Legay, 2000). The most abundant AChE form accumulated at the NMJ is the AChE_T variant bound to a specific collagen, CollagenQ (ColQ) (Krejci et al., 1991, 1997). The physiological importance of the AChE-ColQ complex has been highlighted by identification of >30 COLQ mutations in the human gene (Donger et al., 1998; Ohno et al., 1998; Schreiner et al., 2007; Mihaylova et al., 2008). Patients bearing COLQ mutations and mice deficient for COLQ present a congenital myasthenic syndrome with AChE deficiency (CMS-1c) (Ohno et al., 1998; Feng et al., 1999; Mihaylova et al., 2008). To date, most observed defects have been assigned to the complete absence or reduced level of AChE at NMJs (Feng et al., 1999; Hantai et al., 2004).

Received Sept. 4, 2009; revised Oct. 2, 2009; accepted Nov. 5, 2009.

This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Association Française contre les Myopathies (grants to C.L.), the Agence Nationale de la Recherche, and Université Paris Descartes. S.M.S. is the recipient of a PhD grant from the French Ministry of Research. We thank E. Girard for providing wt and ColQ-deficient mice, O. Bignolais for help with TLDA experiment, and M. Ruegg, J. Lindstrom, and P. Taylor for the gifts of antibodies.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Claire Legay, Laboratoire de biologie des jonctions neuromusculaires normales et pathologiques, Université Paris Descartes, Inserm U686, 45, rue des Saints Pères, 75270 Paris, France. E-mail: claire.legay@univ-paris5.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4374-09.2010

Copyright   2010 the authors 0270-6474/10/300013-11\$15.00/0

ColQ is a nonfibrillar collagen composed of a central collagenous domain flanked by noncollagenous N terminus and C terminus regions (Krejci et al., 1997). Through its three domains, ColQ is able to interact with elements of the extracellular matrix (ECM) and postsynaptic membrane of vertebrate NMJs. ColQ N terminus is responsible for AChE association (Bon et al., 1997; Dvir et al., 2004). The collagen domain interacts with perlecan, which itself binds dystroglycan (Peng et al., 1999; Jacobson et al., 2001; Arikawa-Hirasawa et al., 2002). The ColQ C terminus binds the muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK), an interaction that is thought to be largely responsible for the synaptic localization of AChE-ColQ complex (Cartaud et al., 2004).

MuSK is indispensable to NMJ formation and triggers AChR clustering even before the nerve contacts the muscle (DeChiara et al., 1996; Lin et al., 2001; Yang et al., 2001). Innervation provides a factor called agrin that binds the low density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4) in the MuSK-LRP4 complex and stimulates MuSK phosphorylation (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008). Once phosphorylated, MuSK recruits rapsyn, a membrane associated cytoplasmic protein via complex pathways. Rapsyn then interacts with AChR cytoplasmic loops and β -AChR subunits are phosphorylated leading to AChR clustering (Sanes and Lichtman, 2001). MuSK is also a signaling platform that either stimulates or represses synaptic gene transcription (Moore et al., 2001; Lacazette et al., 2003; Strohlic et al., 2004). Given the essential role of MuSK in AChR clustering and in the regulation of synaptic gene transcription, we hypothesized that in addition to its structural role, ColQ could control postsynaptic differentiation through this partner. This hypothesis is consistent with the fact that collagens have been previously shown to participate in

signal transduction mechanisms, mostly through interaction with integrins (Barczyk et al., 2010) and tyrosine kinase receptors (Schlessinger, 1997).

To explore the function of ColQ in postsynaptic differentiation, we compared the phenotypes of AChR clusters in wild type and ColQ-deficient muscle cell lines and mouse muscles. We demonstrate that ColQ, in addition to its structural role in anchoring AChE, exerts regulatory functions in AChR clustering and expression involving its interaction with MuSK.

Materials and Methods

Antibodies and reagents. α -Bungarotoxin (α -BTX) Alexa Fluor 488 or 594 conjugate, rabbit monoclonal or polyclonal anti-GFP, Alexa Fluor 488- or 594-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse and mouse monoclonal anti-transferrin receptor (TfR) were purchased from Invitrogen. Cy3-conjugated goat anti-rabbit were from Interchim. Mouse monoclonal anti- α -AChR subunit was purchased from Transduction Laboratories (BD Biosciences). Antibody to the β -AChR subunit (mAb124) was a gift from J. Lindstrom, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA (Gullick and Lindstrom, 1983). Rabbit anti-pAChR β 1 (Y390) antiserum (sc-17087R) was obtained from Santa Cruz Biotechnology. Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (clone 6C5) and rabbit anti-MuSK antiserum for Western blot were purchased from Abcam. Rabbit antiserum to MuSK (194T) for immunofluorescence was a gift from M. Ruegg, University of Basel, Basel, Switzerland (Scotton et al., 2006). The mouse monoclonal anti-rapsyn (clone 1234) and anti-Flag M2 were obtained from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal anti-AChE antibody was a gift from P. Taylor, University of California, San Diego, San Diego, CA (Jennings et al., 2003). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG and sheep anti-mouse IgG antiserum were obtained from GE Healthcare.

Constructs. The rat AChE and ColQ1a cDNA clones have been previously described (Krejci et al., 1999). The GFP-ColQ construct previously used in Cartaud et al. (2004) was generated by introduction of a GFP tag sequence after the triplet coding for amino acid 20 (numbering from the first methionine) in the ColQ1a rat cDNA that contains the sequence coding for the peptide signal. The GFP-ColQ-Y431S cDNA clone has been previously described by Cartaud et al. (2004). The GFP-ColQ- Δ Ct and GFP-ColQ- Δ Col cDNA clones were generated from Δ Ct and Δ Col constructs described by Deprez et al. (2003) in which the GFP tag sequence was introduced at the same position as for GFP-ColQ construct. The GFP-ColQ- Δ Col Δ Ct cDNA clone was generated by inserting four stop codons in the GFP-ColQ- Δ Col construct after the ColQ trimerization domain (amino acid 370). The Flag-ColQ cDNA clone was generated by the introduction of a sequence encoding the Flag epitope (GAC TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG) after the triplet coding for amino acid 26 in the ColQ1a coding sequence.

Animals. Generation of ColQ knock-out mice was described by Feng et al. (1999). The use of animals is in compliance with the Society for Neuroscience Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research. Standard breeding methods were used to generate double mutants.

Muscle cell culture and transfection. The two muscle cell lines, wild type (wt) and ColQ-deficient (ColQ^{-/-}) were generated as described by Cartaud et al. (2004). The MuSK-deficient (MK^{-/-}) muscle cell line has been described previously by Herbst and Burden (2000). Myoblasts were cultured on plates coated with collagen type I (Iwaki) maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 20% horse serum, 2 mM glutamine, 2% penicillin/streptomycin (5000 U) and 20 U/ml γ -interferon (Roche Diagnostics) at 33°C in 8% CO₂. All reagents for the culture medium were purchased from Invitrogen. Cells were differentiated into myotubes in the same medium with 5% horse serum and without γ -interferon (differentiation medium). Treatment of myotubes with agrin was made with 0.4 μ g/ml Recombinant Rat Sf21-derived C-terminal agrin (R&D Systems).

Myoblasts were transfected using ExGen 500 (Euromedex) 1 d after fusion was induced by addition of differentiation medium. Transfections

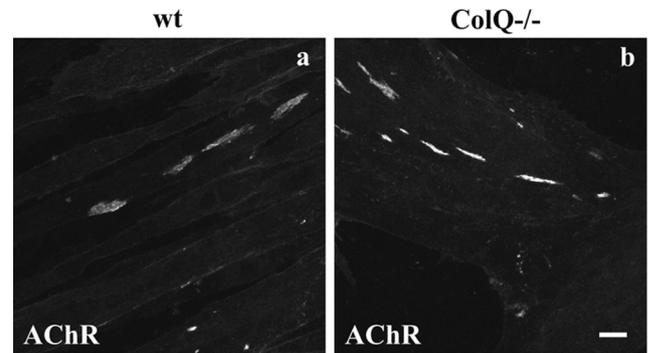


Figure 1. AChR clustering in wt and ColQ-deficient muscle cells. AChR clusters in wt (**a**) and ColQ^{-/-} (**b**) myotubes (2 d old) labeled with Alexa 488 α -BTX. Projections of confocal stacks. Scale bar, 20 μ m.

were performed according to the manufacturer's instructions and resulted in 50–70% of cells expressing the transfected cDNAs.

COS-7 cell culture, transfection, and immunoprecipitation. COS-7 cells (purchased from American Type Culture Collection) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, and 2% penicillin/streptomycin (5000 U) at 37°C in 5% CO₂. Cells were grown to 70% confluence on coverslips and transfected using ExGen 500. Protein extraction and immunoprecipitation analyses were performed 48 h later. GFP and Flag immunoprecipitations were performed on total cell lysates incubated with 4 μ g of anti-GFP or anti-Flag antibodies. GFP-ColQ and Flag-ColQ proteins were precipitated with protein G Sepharose (3 h at 4°C), according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). Immunoprecipitates were then washed in lysis buffer (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Sodium orthovanadate 2 mM and TritonX100 1%), suspended in 1 \times SDS sample buffer, resolved by 7% NuPAGE Novex Tris-Acetate Gels and analyzed by Western blot using anti-GFP or anti-Flag antibodies.

Immunofluorescence. Immunostaining was performed on myotubes after fixation in 2% paraformaldehyde (PFA)-phosphate buffer (PBS). Before incubation with antibodies, nonspecific binding was blocked using DakoCytomation Protein block for 5 min. Cells were first incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature, then washed in Glycine-BSA (0.15%:0.5%) buffer and incubated with a fluorochrome-conjugated secondary antibody for 30 min. Slides were mounted in Vectashield Hard Set Mounting Medium for fluorescence (Vector Laboratories).

Immunohistochemistry was performed on two different muscles: the sternomastoid (STM), a fast-type muscle and the soleus (Sol), a slow-type muscle from postnatal day 7 (P7) wt and ColQ^{-/-} mice. Muscles were fixed in 3% PFA-PBS buffer, followed by successive incubations in 5%, 10% and 25% sucrose-PBS buffer at 4°C and frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen. 14 μ m cryostat cross-sections were incubated with DakoCytomation Protein block, then with the primary antibody for 1 h at room temperature, washed in Glycine-BSA (0.15%:0.5%) buffer and incubated with a fluorochrome-conjugated secondary antibody for 1 h.

Images were collected using a microscope (Olympus BX61) equipped with a Fast 1394 Digital CCD FireWire camera (model Retiga 2000R; Qimaging) and a 40 \times oil objective (numerical aperture: 1.0; Olympus). Images were captured using ImageProPlus software (version 5.1). For quantitative analysis, images were collected on a confocal microscope (Zeiss) equipped with 40 \times (*in vitro*) or 63 \times (*in vivo*) oil objectives (numerical aperture: 1.3 and 1.4, respectively; Zeiss). Collected confocal image stacks and image capture were made using an LSM Image Browser, with exposure time kept constant and below grayscale pixel saturation. All confocal images presented are single-projected images derived from overlaying each set of stacks taken at 0.47 μ m (*in vitro*) or 0.9 μ m (*in vivo*) intervals.

For quantification of area and fluorescence intensity, the perimeters of individual clusters were delimited. The LSM Image Browser software calculated the area in μ m² and the fluorescence intensity

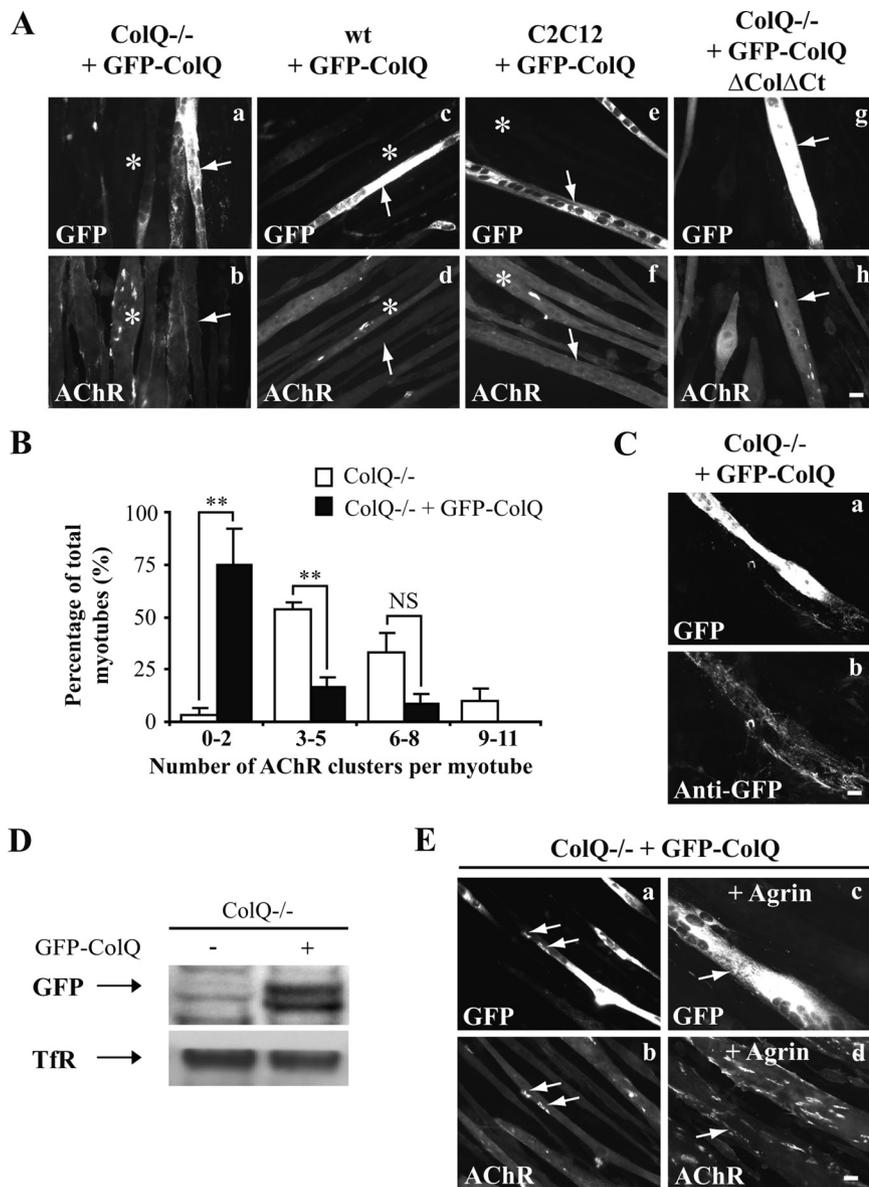


Figure 2. Restoring ColQ reverses the effects of ColQ deficiency on AChR clustering. **A**, AChR clusters labeled with Alexa 594 α -BTX in ColQ^{-/-}, wt, and C2C12 myotubes overexpressing GFP-ColQ or GFP-ColQ- Δ Col Δ Ct. ColQ^{-/-} cells (**a, b**) as well as wt (**c, d**) and C2C12 cells (**e, f**) overexpressing GFP-ColQ (white arrows) were nearly devoid of AChR clusters, whereas clusters were observed in adjacent untransfected myotubes (white stars). ColQ^{-/-} myotubes overexpressing GFP-ColQ- Δ Col Δ Ct (**g, h**; white arrows) had similar number of AChR clusters compared to ColQ^{-/-} myotubes. **B**, Relative frequency distribution for the number of AChR clusters per myotube (expressed as bins) observed in ColQ^{-/-} (white bars) and ColQ^{-/-} cells transfected with GFP-ColQ (black bars). A significant decrease in AChR cluster number was observed in cells transfected with GFP-ColQ. **C**, Non permeabilized ColQ^{-/-} cells overexpressing GFP-ColQ (**a**) and stained with anti-GFP antibody (**b**), indicating that GFP-ColQ was secreted. **D**, Western blot of cell surface GFP from ColQ^{-/-} cells transfected with GFP-ColQ showing that the GFP tagged ColQ was secreted. Cell surface TfR was used as a loading control. **E**, AChR clusters labeled with Alexa 594 α -BTX in ColQ^{-/-} myotubes transfected with GFP-ColQ. In transfected ColQ^{-/-} cells overexpressing GFP-ColQ, remaining AChR clusters colocalized with GFP-ColQ (**a, b** and white arrows). In ColQ^{-/-} myotubes overexpressing GFP-ColQ (white arrows), agrin treatment was able to stimulate AChR clustering (**c, d**). Data are presented as means \pm SEM from three independent experiments ($n \geq 36$ myotubes). ****** $p < 0.01$; **NS**, not significant; unpaired Mann–Whitney's U test. Scale bars, 20 μ m.

within the cluster, giving a measurement of pixel intensity. The cluster outline was then placed in an adjacent area devoid of clusters to record the background fluorescence intensity. This reading was subtracted from the cluster reading, yielding the background-corrected intensity.

Western blot analysis. Proteins were extracted from cells using lysis buffer (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Sodium orthovanadate 2 mM and TritonX100 1%) and lysates were precleared by centrifugation. Equal amounts of proteins (10–30 μ g/sample) were first

separated by 7% NuPAGE Novex Tris-Acetate Gels according to Invitrogen protocols, then electrotransferred to nitrocellulose membranes (TransBlot Transfer Medium, Bio-Rad) (Towbin et al., 1979). Membranes were blocked in PBS supplemented with Tween 0.1% (PBST) and 5% nonfat dry milk or 3% BSA for phosphorylated protein analysis and incubated with various primary antibodies in PBST-milk 5% or BSA 1.5%. After washing in PBST, membranes were incubated with Horseradish Peroxidase-conjugated secondary antibodies in PBST-milk 5% or BSA 1.5%. Bound antibodies were revealed using ECL plus detection reagents (GE Healthcare) and visualized with a Storm fluorescence scanner (Storm 860, Molecular Dynamics; GE Healthcare) or with hyperfilm ECL. Protein loading was assessed by probing with anti-GAPDH or anti-TfR antibodies. Results obtained with the Storm scanner were quantified with ImageQuant (version 5.2, Molecular Dynamics), and results obtained on hyperfilms were scanned and quantified using UnScanIt gel Automated Digitizing System (version 4.1).

Biotinylation of surface proteins. Myotubes were treated or not with agrin for 1 h, then washed with PBS supplemented with 0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ (PBS-Ca-Mg) and incubated with 0.5 mg/ml EZ-link sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce) in PBS-Ca-Mg at room temperature for 30 min, according to Herbst and Burden (2000). Cells were rinsed twice with PBS-Ca-Mg and incubated with DMEM at 33°C and 8% CO₂. After 30 min, the cells were washed with ice-cold PBS and proteins were extracted from cells using lysis buffer. Lysates were precleared by centrifugation, and biotin-labeled proteins were recovered by incubating with streptavidin-agarose for 4 h at 4°C, followed by four washes with lysis buffer. Bound and unbound (2% of supernatant) proteins were resolved by a 7% NuPAGE Novex Tris-Acetate Gel and detected by Western blot.

RNA preparation. Total RNAs from wt and ColQ^{-/-} muscle cells were extracted by using the RNeasy Protect Mini-Kit (Qiagen) and by performing DNA digestion according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by polyacrylamide-gel microelectrophoresis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies) and by RT-PCR. Lack of genomic DNA contamination was verified by PCR. Total gastrocnemius fast- and slow-muscle RNAs from wt and ColQ^{-/-} P7 mice were extracted by using Lysing Matrix D (MP Biomedicals), proteinase K treatment, and RNeasy Fibrous Tissue Mini-Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

TaqMan real-time RT-PCR. The TaqMan Low Density Array (TLDA, Applied Biosystems) was used in a two-step RT-PCR process (Marionneau et al., 2005). First-strand cDNA was synthesized from 220 ng of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). PCRs were then performed on TLDA with the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each card were preloaded with predesigned fluorogenic TaqMan probes and primers corresponding mainly to synaptic genes, and five of these genes were selected for normalization (*HPRT1*, *MTA1*, *REXO1*, *RPL39*, and

SEC63). Data were collected with Applied Biosystems SDS 2.1 software, and then analyzed with the threshold cycle (C_t) relative-quantification method (Livak and Schmittgen, 2001). Since SEC63 is the most uniformly distributed gene between the different conditions, we selected it for data normalization. The relative expression of each gene versus SEC63 ($2^{-\Delta C_t}$, ΔC_t indicating normalized data: $\Delta C_t = \text{target gene } C_t - \text{SEC63 } C_t$) was calculated and then averaged for each condition. TLDA technique was used in a large screen experiment performed *in vitro*. From the results obtained by TLDA, we focused on a few genes of interest that have subsequently been analyzed *in vivo* and in *in vitro* transfection experiments using SyBR Green technique.

SyBR Green RT-PCR. The QuantiTect SyBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) was used in a one-step RT-PCR protocol for mouse mRNA analysis, for β -AChR subunit analysis *in vitro* and for transfection experiments. α -AChR, β -AChR, ε -AChR, MUSK, RAPSIN, GAPDH, and SEC63 QuantiTect primers were also purchased from Qiagen. Data were normalized to values for SEC63 (RNAs from cell culture) or GAPDH (RNAs from mice muscles). RT-PCRs were then performed in triplicates on a 384-well plate with the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The wells were loaded with RT-PCR Master Mix, QuantiTect RT Mix, QuantiTect Primer Assay and 9 ng of total RNAs for each sample. The relative expression of each gene versus SEC63 or GAPDH ($2^{-\Delta C_t}$) was calculated and then averaged for each condition.

Statistical analysis. Data are expressed as means \pm SEM or were normalized against the control groups to allow for comparisons between experiments and are presented as percentage of control \pm SEM. Statistical analyses were done by pairwise comparisons between two conditions using Student's unpaired *t* tests for $n \geq 30$ and Mann-Whitney *U* test for $n < 30$ ($p < 0.05$ considered significant).

Results

ColQ regulates AChR clustering and packing *in vitro*

ColQ expression in myoblasts is first upregulated during their fusion into myotubes and before AChR cluster formation (Guerra et al., 2005). A second dramatic increase in ColQ level is observed concomitantly with AChE upregulation as muscle cells further differentiate and leads to AChE cluster formation (Guerra et al., 2005). Given that ColQ is expressed early during postsynaptic differentiation, we investigated its role in AChR clustering by comparing wt and ColQ^{-/-} muscle cell lines 2 d after myotube formation. At this time-point, AChR clusters were observed in both cell lines (Fig. 1) and were in greater number in cells lacking ColQ (+125%, $p < 0.001$, $n \geq 80$ myotubes: wt, 4.1 ± 0.3 clusters per myotube; ColQ^{-/-}, 8.7 ± 0.7 clusters per myotube) (Fig. 1). Similar to the C2C12 muscle cell line, only a subset of wt and ColQ^{-/-} myotubes bore AChR clusters and the percentage of myotubes presenting AChR clusters was similar in wt and ColQ-deficient cell lines (data not shown). However, quantitative fluorescence analysis of α -BTX labeling (see Materials and Methods) revealed that AChR clusters were smaller in the absence of ColQ (-49%, $p < 0.001$, $n \geq 160$ AChR clusters: wt clusters, $132 \pm 9.06 \mu\text{m}^2$; ColQ^{-/-} clusters, $67 \pm 4.35 \mu\text{m}^2$) (Fig. 1). These results prompted us to examine whether ColQ deficiency modifies the number of AChR molecules per cluster. The fluorescence intensity per AChR cluster and per μm^2 that reflects AChR density within a cluster were both higher in ColQ^{-/-} myotubes than in wt myotubes (+49% and +125% respectively, $p < 0.001$, $n \geq 160$ AChR clusters) (Fig. 1). These data indicate that AChR clusters in ColQ-deficient myotubes are smaller but more densely packed with AChRs than wt myotubes.

Restoring ColQ reverses the effects of ColQ deficiency on AChR clustering

We next tested whether restoring ColQ levels would reverse the effects of ColQ deficiency on AChR clustering. To assess the ef-

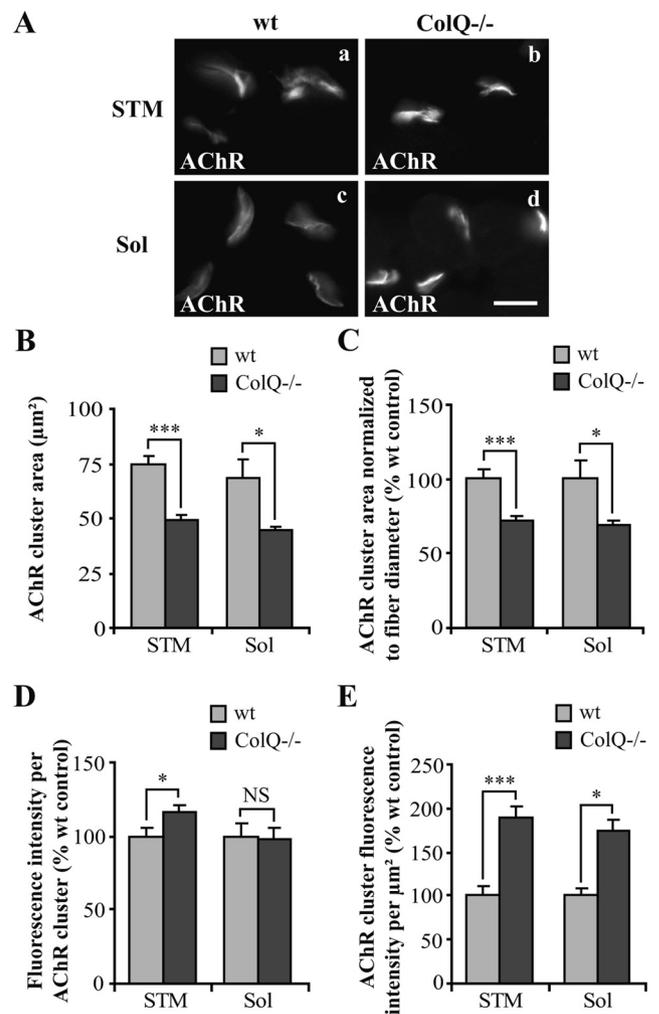


Figure 3. ColQ deficiency decreases cluster size and increases AChR packing *in vivo*. **A**, AChR clusters labeled with Alexa 488 α -BTX on cross-sections of STM (**a, b**) and Sol (**c, d**) muscles from wt (**a, c**) and ColQ^{-/-} (**b, d**) P7 mice. **B–E**, Area and fluorescence intensity of individual NMJs measured from projection of confocal stacks. AChR cluster area (**B**) and AChR cluster area normalized to fiber diameter (**C**) were decreased in ColQ-deficient STM and Sol muscles. AChR cluster fluorescence intensity was increased in STM muscle but not in Sol muscle from ColQ^{-/-} mice (**D**). The fluorescence intensity per μm^2 was significantly increased both in STM and Sol muscles from ColQ^{-/-} mice (**E**). Data are presented as means \pm SEM or percentage of wt control \pm SEM ($n \geq 32$ NMJs from 3 mice per group). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; NS, not significant; unpaired Student's *t* test. Scale bar, 20 μm .

fects of ColQ independently of AChE, ColQ^{-/-} cells were transfected with a ColQ construct in which the GFP tag position did not modify ColQ interaction with MuSK and perlecan both required for ColQ-AChE anchoring in the ECM (Cartaud et al., 2004), but severely limits its association with AChE. This last result was obtained by comparing ColQ binding to GFP-ColQ and Flag-ColQ, a construct in which the Flag was inserted in the ColQ cDNA at about the same position as the GFP tag (see Materials and Methods). Coimmunoprecipitations were performed after cotransfection of COS-7 cells with GFP-ColQ or Flag-ColQ together with AChE and analyzed by Western blot (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Western blot quantification showed that GFP-ColQ is less efficient in AChE binding than Flag-ColQ (-88%, $p < 0.05$, $n = 3$). Moreover, no collagen-tailed form of AChE were detected by velocity sedimentation analysis when GFP-ColQ and AChE were cotransfected in *Xenopus* oocytes (E. Krejci, personal communi-

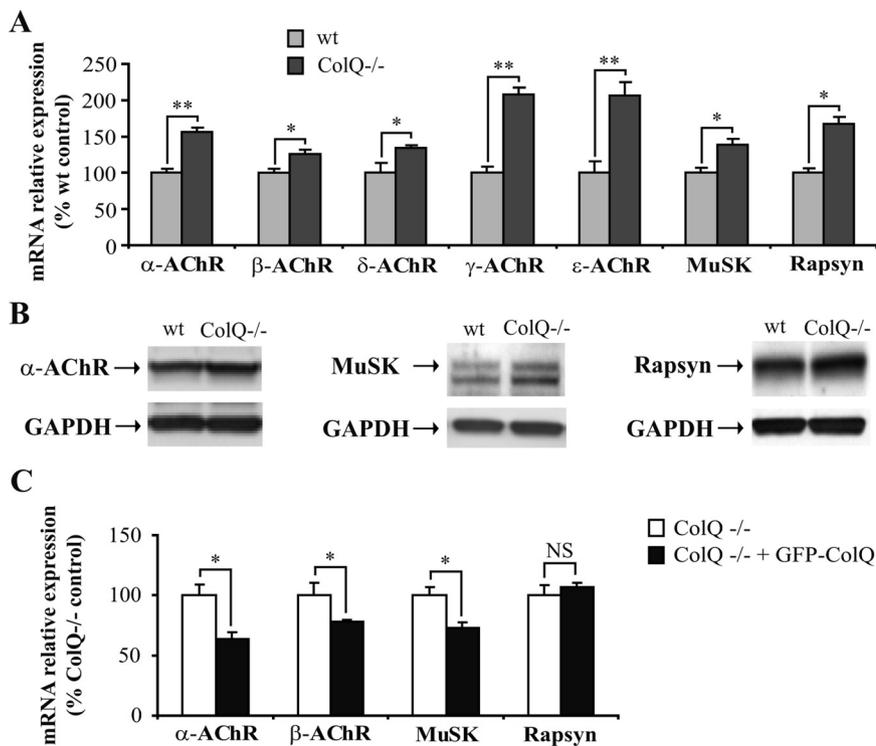


Figure 4. AChR, MuSK and rapsyn mRNA and protein levels are upregulated in the absence of ColQ *in vitro*. **A**, Quantification of AChR subunits, MuSK and rapsyn mRNAs in wt and ColQ^{-/-} myotubes by real-time RT-PCR. AChR subunits, MuSK and rapsyn mRNA levels relative to Sec63 mRNAs were higher in ColQ^{-/-} cells compared to wt cells. **B**, Western blot of total α-AChR subunit, MuSK and rapsyn proteins in ColQ^{-/-} cells compared to wt cells. GAPDH was used as a loading control. Loss of ColQ led to significant increases in α-AChR subunit, MuSK, and rapsyn protein levels relative to GAPDH. **C**, Quantification of α- and β-AChR subunits, MuSK and rapsyn mRNAs in ColQ^{-/-} cells transfected with GFP-ColQ by real-time RT-PCR. A decrease of α- and β-AChR subunits and MuSK mRNAs was observed in ColQ^{-/-} cells overexpressing GFP-ColQ, whereas mRNA levels of rapsyn remained unchanged. Levels of mRNAs are represented as relative expression ($2^{-\Delta Ct}$ vs reference gene $\times 100$). Data are presented as percentage of control \pm SEM from three to five independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; NS, not significant; unpaired Mann–Whitney's *U* test.

cation), suggesting that the GFP sterically hinders the binding of AChE to GFP-ColQ.

The effects of GFP-ColQ on AChR clustering were analyzed by fluorescence analysis of α-BTX labeling and revealed that ColQ^{-/-} cells overexpressing GFP-ColQ had fewer AChR clusters than untransfected myotubes (Fig. 2*Aa,b*). Indeed, 75% of cells transfected had zero to two AChR clusters (1.5 ± 0.3) (Fig. 2*B*, black bars), whereas 53% of untransfected myotubes had three to five clusters (4.4 ± 0.5) (Fig. 2*B*, white bars). This decrease of AChR clustering was not specific to the ColQ^{-/-} cell line since wt and C2C12 myotubes transfected with GFP-ColQ were also nearly devoid of AChR clusters (Fig. 2*Ac–f*). In addition, the areas of the remaining clusters were higher in transfected cells than in untransfected ColQ^{-/-} cells (+84%, $p < 0.01$, $n \geq 30$ AChR clusters). The fluorescence intensity per AChR cluster was decreased in ColQ-deficient transfected myotubes (–26%, $p < 0.01$, $n \geq 30$ AChR clusters) as well as AChR density in clusters (–60%, $p < 0.001$, $n \geq 30$ AChR clusters). In contrast to the full-length construct, a similar number of AChR clusters was observed in ColQ^{-/-} myotubes and ColQ^{-/-} myotubes transfected with a GFP-ColQ construct lacking the collagenous and C terminus domains (GFP-ColQ-ΔColΔCt) (Fig. 2*Ag,h*). Thus, restoring the full-length ColQ in ColQ-deficient cells reversed the loss of function with regard to AChR cluster number, size variations and packing of AChRs in clusters. Moreover, these data revealed that GFP-ColQ effects on AChR clustering was not due

to GFP per se and suggest that the collagenous domain and/or the C terminus domain of ColQ are implicated in the control of AChR clustering, whereas interaction of ColQ with AChE is not necessary to regulate clustering.

A series of control experiments were performed on ColQ^{-/-} cells transfected with GFP-ColQ. First, we showed that the chimeric GFP-ColQ protein, like endogenous ColQ, was secreted. Thus, the GFP tag could be readily visualized by immunofluorescence with anti-GFP antibodies on nonpermeabilized cells (Fig. 2*Ca,b*). Moreover, when cell surface proteins were labeled with a membrane-impermeable biotinylated *N*-hydroxysuccinimide ester (NHS-biotin) and isolated with streptavidin after protein extraction (Herbst and Burden, 2000), GFP-ColQ was precipitated by streptavidin (Fig. 2*D*). Second, surface expressed GFP-ColQ colocalized with AChR clusters consistent with its effect on clustering (Fig. 2*Ea,b*). To address the possibility that a steric bulk caused by the GFP tag inserted in ColQ could perturb the process of AChR cluster formation, myotubes overexpressing GFP-ColQ were treated with the C terminus of agrin, known to stimulate AChR cluster formation and stabilization through a cascade of intracellular events (Sanes and Lichtman, 2001). Agrin was able to stimulate AChR clustering in myotubes overexpressing GFP-ColQ, showing that GFP inserted in ColQ did not block the process of AChR clustering (Fig. 2*Ec,d*).

Decreased AChR cluster size and increased AChR packing in ColQ^{-/-} mice

We then wondered whether the modifications of AChR clustering detected in ColQ^{-/-} myotubes were also observed in muscle from ColQ^{-/-} mice. To address this issue, AChR clusters were visualized in sternomastoid (STM) and soleus (Sol) muscle cross-sections from P7 wt and ColQ^{-/-} mice (Fig. 3*A*). Quantitative analysis of α-BTX labeling performed on confocal stacks revealed that AChR cluster areas were smaller in both muscle types lacking ColQ (–35% in both muscles) (Fig. 3*B*). However, the muscle fibers have smaller diameters in the ColQ-deficient mice and NMJ size is correlated with fiber diameter (Kuno et al., 1971). When AChR cluster areas were normalized to fiber diameters they still revealed a decrease in the absence of ColQ (–30% in both muscles) (Fig. 3*C*). Consistent with these observations, smaller AChR cluster area and fiber diameter were previously observed in the adult ColQ^{-/-} mice and there is a tendency for this to worsen with age (Nguyen-Huu et al., 2005). On the basis of these results, we examined whether ColQ deficiency modifies the number of AChRs per synapse. The fluorescence intensity per AChR cluster was increased in ColQ^{-/-} STM muscle (+16%) and remained unchanged in ColQ^{-/-} Sol muscle (Fig. 3*D*). The AChR density in clusters was higher in ColQ^{-/-} STM and Sol muscles than in wt muscles (+88% and +73%, respectively) (Fig.

3E). Therefore, both *in vitro* and *in vivo*, ColQ deficiency leads to smaller AChR clusters in which AChRs are more densely packed.

Upregulation of synaptic gene expression in the absence of ColQ both *in vitro* and *in vivo*

To get insights into the mechanisms leading to ColQ^{-/-} AChR cluster phenotypes, we wondered whether ColQ might control AChR expression as well as MuSK and rapsyn expression, both critical components for AChR clustering and packing. In cultures of myotubes, quantification of the mRNAs coding for these genes relative to Sec63 mRNAs revealed that the lack of ColQ induced an increase in mRNA levels for the five AChR subunits, MuSK and rapsyn (α -AChR, +57%; β -AChR, +26%; δ -AChR, +39%; γ -AChR, +111%; ϵ -AChR, +211%; MuSK, +40% and rapsyn, +69%) (Fig. 4A). In addition, quantitative Western blot analysis revealed that ColQ deficiency resulted in an increase in total protein amounts for α -AChR subunit (+25%, $p < 0.05$, $n = 4$), MuSK (+107%, $p < 0.05$, $n = 4$) and rapsyn (+40%, $p < 0.05$, $n = 4$) (Fig. 4B). Therefore, increased α -AChR subunit, MuSK and rapsyn protein levels in ColQ-deficient myotubes reflected the increased levels of corresponding mRNAs.

We next tested whether ColQ restoration in ColQ^{-/-} myotubes would reverse the mRNA level modifications observed for synaptic gene. GFP-ColQ overexpression in ColQ^{-/-} myotubes led to a down-regulation of mRNAs coding for α -AChR subunit (-36%), β -AChR subunit (-22%) and MuSK (-26%), but unexpectedly did not significantly change rapsyn relative expression (Fig. 4C). This result might be explained by the high rapsyn mRNA level detected before fusion of myoblasts into myotubes, at the time of GFP-ColQ transfection (data not shown). The same results were obtained in ColQ^{-/-} cells overexpressing a nontagged ColQ construct allowing ColQ-AChE association (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Together, these results confirmed the regulatory role of ColQ on synaptic gene expression *in vitro*.

We then turned to *in vivo* experiments to see if the absence of ColQ would lead to similar regulation of synaptic genes in muscles from P7 mice. Higher levels of mRNAs coding for α -, β -, ϵ -AChR subunits and rapsyn relative to GAPDH mRNAs were observed in gastrocnemius muscle from ColQ^{-/-} mice although this upregulation was only significant for β -AChR subunit and rapsyn (+63% and +106%, respectively) (Fig. 5A). In contrast to

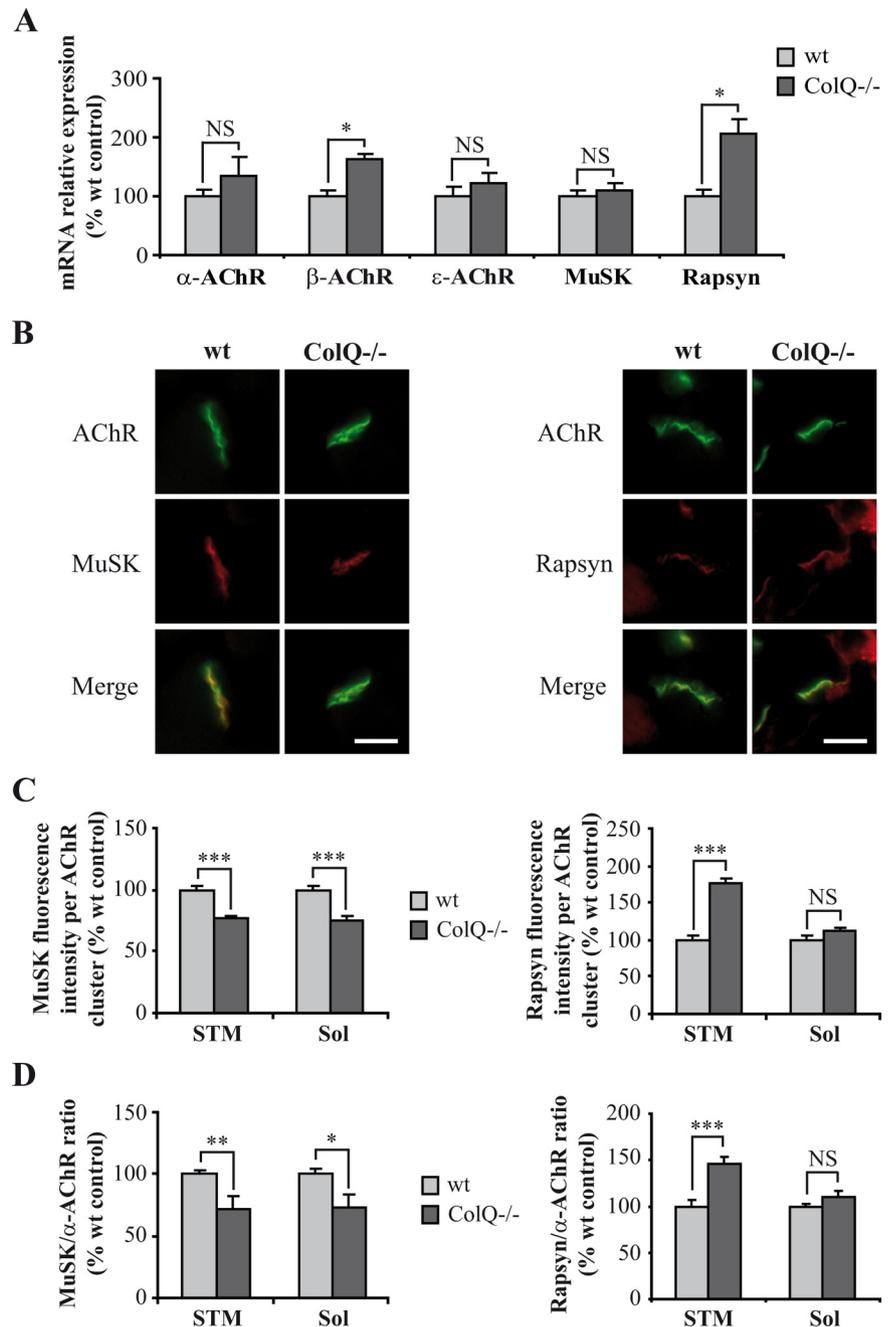


Figure 5. ColQ regulates AChR and rapsyn mRNA levels and MuSK membrane insertion at neonatal NMJs. **A**, Quantification of AChR subunits, MuSK, and rapsyn mRNAs on wt and ColQ^{-/-} P7 gastrocnemius muscles by real-time RT-PCR. Levels of mRNAs are represented as relative expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ versus reference gene $\times 100$). β -AChR subunit and rapsyn mRNA levels relative to GAPDH mRNAs were higher in ColQ^{-/-} mice compared to wt mice whereas other AChR subunits and MuSK mRNAs were not significantly increased. **B**, AChR, MuSK and rapsyn clusters labeled respectively with Alexa 488 α -BTX, MuSK and rapsyn antibodies on cross-sections of STM muscle from wt and ColQ^{-/-} P7 mice. **C, D**, Quantification of MuSK and rapsyn fluorescence intensities from projection of confocal stacks. MuSK fluorescence intensity per AChR cluster was decreased in the absence of ColQ whereas rapsyn was increased (**C**). STM and Sol synapses from ColQ^{-/-} mice displayed lower MuSK-to- α -AChR fluorescence ratio but higher rapsyn-to- α -AChR ratio compared to wt synapses (**D**). Data are presented as percentage of wt control \pm SEM from five mice for mRNA analysis (**A**) and from three mice for immunofluorescence analysis ($n \geq 32$ NMJs for **C, D**). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, not significant; unpaired Mann-Whitney's *U* test for mRNA analyses and unpaired Student's *t* test for immunofluorescence analyses. Scale bars, 20 μ m.

our *in vitro* result (Fig. 4A), MuSK mRNA level remained unchanged in ColQ^{-/-} muscle compared to wt muscle (Fig. 5A).

In addition, to determine MuSK and rapsyn protein levels at the NMJ, fluorescence intensities were analyzed in STM (Fig. 5B) and Sol (data not shown) muscles from wt and ColQ^{-/-} mice.

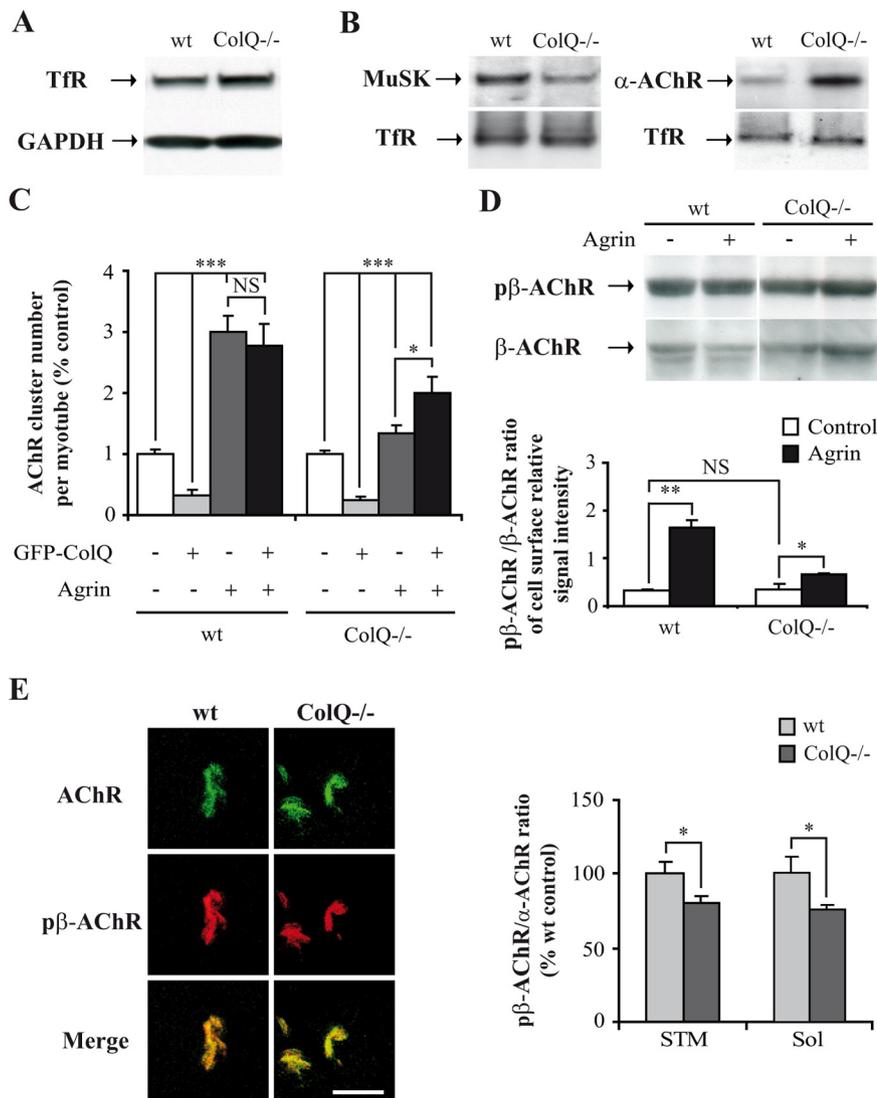


Figure 6. ColQ deficiency decreases membrane-bound MuSK *in vitro* and alters the activity of MuSK signaling pathway. **A**, Western blot of total transferrin receptor proteins (TFR) in wt and ColQ^{-/-} myotubes. GAPDH was used as a loading control. Total TFR protein level relative to GAPDH was not significantly different between wt and ColQ^{-/-} myotubes. **B**, Western blot of membrane-bound MuSK and α -AChR subunit in wt and ColQ^{-/-} myotubes. Membrane-bound proteins were labeled with NHS-biotin and isolated with streptavidin. TFR was used as a loading control. MuSK surface protein level relative to TFR was decreased by 35% in the absence of ColQ. Conversely, loss of ColQ resulted in a 178% increase of α -AChR subunit surface protein level relative to TFR. **C**, Fluorescence analyses of AChR cluster number in wt and ColQ^{-/-} myotubes treated with agrin and/or transfected with GFP-ColQ. Compared to untransfected cells (white bars), AChR cluster number was drastically decreased both in wt and ColQ^{-/-} cells overexpressing GFP-ColQ (light gray bars). Agrin treatment had less effect on the number of AChR clusters in ColQ^{-/-} cells compared to wt cells (dark gray bars), whereas GFP-ColQ transfection restored agrin capacity to induce normal AChR clustering (black bars). **D**, Western blot (up panel) and quantification (bottom panel) of membrane-bound β -AChR subunit and β -AChR subunit phosphorylated on Y390 residue ($p\beta$ -AChR). Agrin treatment increased β -AChR subunit phosphorylation in both cell lines but was threefold less efficient in ColQ^{-/-} cells as shown by the $p\beta$ -AChR-to- β -AChR ratio. **E**, AChR clusters labeled with Alexa 488 α -BTX and pAChR β 1 antibody on cross-sections of STM muscle from wt and ColQ^{-/-} P7 mice (left panel). Quantification of $p\beta$ -AChR fluorescence intensity from projection of confocal stacks showed that STM and Sol synapses from ColQ^{-/-} mice displayed lower $p\beta$ -AChR-to- α -AChR fluorescence ratio than muscles from wt mice (right panel). Data are presented as means \pm SEM or percentage of wt or ColQ^{-/-} control \pm SEM from three to five independent experiments ($n \geq 35$ NMJs for **E**). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, not significant; unpaired Mann–Whitney’s *U* test for Western blot analysis, unpaired Student’s *t* test for immunofluorescence analyses. Scale bar, 20 μ m.

MuSK fluorescence intensity per AChR cluster was decreased in STM and Sol NMJs from ColQ-deficient mice (-23% in both muscles) (Fig. 5C) whereas rapsyn fluorescence intensity per AChR cluster was increased (STM: $+75\%$ and Sol: $+12\%$ not significant) (Fig. 5C). Moreover, STM and Sol ColQ-deficient synapses displayed lower MuSK-to- α -AChR fluorescence inten-

sity ratio (-28% in both muscles) (Fig. 5D) but higher rapsyn-to- α -AChR fluorescence intensity ratio than wt synapses (STM: $+46\%$ and Sol: $+11\%$ not significant) (Fig. 5D). Together, our data show that ColQ regulates synaptic gene mRNA and protein levels both *in vitro* and *in vivo* and suggest that ColQ may control MuSK incorporation or stabilization in the muscle membrane.

ColQ deficiency leads to a decrease in membrane-bound MuSK level and alters the activity of the MuSK signaling pathway

Given that our *in vivo* results showed a decrease in membrane-bound MuSK in ColQ-deficient NMJ (Fig. 5C), we decided to further quantify the amount of MuSK at the membrane of myotubes. For this purpose, wt and ColQ^{-/-} cell surface proteins were labeled with a membrane-impermeable biotinylated *N*-hydroxysuccinimide ester (NHS-biotin) and isolated with streptavidin after protein extraction (Herbst and Burden, 2000). The membrane protein transferrin receptor (TFR) was used as a loading control as the total level of this protein was not affected by ColQ deficiency ($p = 0.62$ not significant, $n = 3$) (Fig. 6A). Quantitative analysis of the amount of MuSK associated to the membrane of ColQ^{-/-} myotubes revealed a 35% decrease compared to cell surface MuSK in wt myotubes ($p < 0.05$, $n = 4$) (Fig. 6B). Consistent with our *in vivo* result (Fig. 3D,E), we found in these same samples higher levels of α -AChR subunit on the membrane of ColQ-deficient cells compared to wt cells ($+178\%$, $p < 0.05$, $n = 4$) (Fig. 6B), indicating that MuSK is not efficiently localized at the membrane unlike α -AChR subunit.

Could the observed decrease in membrane-bound MuSK affect agrin/MuSK signaling? AChR cluster number was analyzed in wt and ColQ^{-/-} myotubes treated with the C terminus of agrin. Agrin treatment was fourfold less efficient on AChR clustering in ColQ^{-/-} cells compared to wt cells ($+54\%$ and $+222\%$, respectively) (Fig. 6C, white and dark gray bars), a defect that was compensated by GFP-ColQ restoration (Fig. 6C, black bars). We also analyzed cell surface β -AChR subunit phosphorylation on Y390 residue, a process known to increase AChR-rapsyn interactions and AChR clustering in presence of agrin (Borges et al., 2008). The $p\beta$ -AChR-to- β -AChR ratio was two to threefold less important in ColQ^{-/-} cells treated with agrin compared to wt cells (Fig. 6D).

We then wondered whether reduced levels of MuSK *in vivo* in ColQ-deficient AChR clusters would also affect the phosphory-

lation of β -AChR subunit by neural agrin. Immunofluorescence analysis performed on STM and Sol muscles revealed that the $p\beta$ -AChR-to- α -AChR ratio was decreased in ColQ^{-/-} AChR clusters compared to wt clusters (STM: -19% and Sol: -24%) (Fig. 6E). Altogether, our results suggest that the activity of the agrin/MuSK signaling pathway is altered in the absence of ColQ, probably due to the decrease in membrane-bound MuSK.

ColQ-MuSK interaction regulates AChR mRNA levels

Since ColQ binds MuSK, which is involved in the control of gene expression at the synapse, we asked whether the effects of ColQ on synaptic mRNA levels are mediated by ColQ-MuSK interaction. For this purpose, we compared the mRNA levels of α - and β -AChR subunits in untransfected ColQ^{-/-} cells and cells transfected with GFP-ColQ or a GFP-ColQ construct lacking the C terminus domain (GFP-ColQ Δ Ct) or point mutated in the C terminus (GFP-ColQ-Y431S), both of which impair ColQ-MuSK association (Cartaud et al., 2004). As previously shown in Figure 4C, GFP-ColQ restoration in ColQ^{-/-} cells led to a significant decrease in α - and β -AChR mRNA levels compared to untransfected cells (Fig. 7A, white and black bars). Importantly, impairing ColQ interaction with MuSK abolished the effect of ColQ on α - and β -AChR mRNA levels (Fig. 7A, light and dark gray bars). In addition, when GFP-ColQ was overexpressed in MuSK-deficient (MK^{-/-}) myotubes, the levels of α - and β -AChR mRNAs remained unchanged compared to untransfected MK^{-/-} cells (Fig. 7B). We conclude that at least part of the ColQ-dependent regulation of AChR mRNA levels is mediated by ColQ-MuSK interaction.

Discussion

Here, we demonstrate that ColQ has regulatory functions on AChR clustering both in muscle cell culture and in neonatal mouse muscles. In the absence of ColQ, AChR clusters are smaller and AChRs are more densely packed in these clusters both *in vitro* and *in vivo*. These complex effects generated by ColQ on AChR clustering result from regulation of both synaptic gene expression and MuSK membrane trafficking: (1) ColQ downregulates the expression of AChR subunits, a process that seems to be mediated by ColQ-MuSK interaction; (2) ColQ controls AChR packing, presumably through rapsyn; and (3) ColQ increases membrane-bound MuSK and thus could regulate the size of AChR clusters.

ColQ regulates the expression of AChRs and synaptically associated proteins

Our results show that the absence of ColQ leads to an upregulation of the mRNA levels encoding most of AChR subunits *in vitro* and *in vivo* while, in contrast, overexpression of ColQ downregulates AChR mRNA levels. Regulation of mRNA levels could result from transcriptional or posttranscriptional mechanisms. At NMJs, MuSK is essential for synaptic transcription and activates downstream pathways either directly through a JNK pathway (Moore et al., 2001; Lacazette et al., 2003) or indirectly via neuregulins and their receptors Erb (Sanes and Lichtman, 2001).

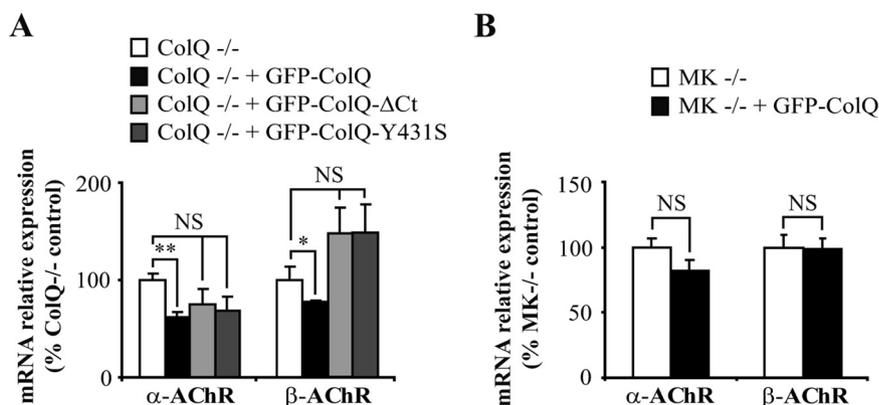


Figure 7. ColQ-dependent regulation of AChR mRNA levels is mediated by ColQ-MuSK interaction. **A, B.** Quantification of α - and β -AChR mRNA levels by real-time RT-PCR. Levels of mRNAs are represented as relative expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ versus reference gene $\times 100$). **A.** α - and β -AChR mRNA levels were decreased in ColQ^{-/-} transfected with GFP-ColQ but not in cells transfected with GFP-ColQ- Δ Ct or GFP-ColQ-Y431S. **B.** α - and β -AChR mRNA levels were not modified by GFP-ColQ overexpression in MuSK-deficient myotubes (MK^{-/-}). Data are presented as percentage of control \pm SEM from three to five independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; NS, not significant; unpaired Mann-Whitney's *U* test.

According to our data, ColQ inhibitory effect on AChR mRNA levels is mediated by MuSK. So far, two molecules have been reported to negatively regulate transcription at the NMJ, 14-3-3 γ and erbin. The adaptor protein 14-3-3 γ binds MuSK and is a transcriptional repressor of synaptic genes (Strochlic et al., 2004). Erbin has been shown to interact with Erb2 and suppress neuregulin-induced Erk activation mediated by Erb (Huang et al., 2001, 2003). Thus, in the transcriptional hypothesis, it will remain to investigate the possibility that ColQ by interacting with MuSK recruits one of these molecules.

Alternatively, ColQ could regulate the stability of synapse specific mRNAs. In line with this hypothesis, members of the Hu family of RNA-binding proteins have been found to stabilize AChE mRNAs in muscle cells (Deschênes-Furry et al., 2005). Moreover, the canonical binding sequence for Hu proteins is present in the 3'UTR of most of AChR subunit coding transcripts. Together, these observations suggest an alternative mechanism to ColQ-induced transcriptional regulation in which ColQ would control AChR subunit expression through a posttranscriptional mechanism mediated by MuSK.

ColQ controls AChR packing in postsynaptic aggregates

Our results demonstrate that the density of AChR molecules is increased in the absence of ColQ, an observation that can be correlated to higher expression of rapsyn and an increased ratio of rapsyn-to-AChR. Indeed, data suggest that rapsyn is involved in AChR packing. Rapsyn interacts with AChR cytoplasmic loops and is indispensable for the formation of AChR clusters at the synapse (Froehner et al., 1990; Gautam et al., 1995). This AChR-associated protein not only triggers AChR aggregation but also stimulates cytoskeletal anchoring of AChRs (Moransard et al., 2003). Rapsyn was originally found to occur in a 1:1 stoichiometry with AChRs (LaRochelle and Froehner, 1986). However, several studies suggest that this ratio is modulated and is correlated with AChR degree of packing. First, developmental regulation induces changes in rapsyn-to-AChR ratio linked to higher packing and stability of AChRs in the postsynaptic membrane (Frail et al., 1989; Schaeffer et al., 2001; Gervásio et al., 2007). Second, agrin stimulates rapsyn-AChR interactions *in vitro* and *in vivo*, a process that is also correlated with tighter AChR packing in clusters (Moransard et al., 2003; Gervásio et al., 2007; Brockhausen et al., 2008). Our observation that clusters of AChRs are more

densely packed in ColQ-deficient clusters could thus be related to higher expression of rapsyn with an increased ratio of rapsyn-to-AChR *in vivo*.

Interestingly, the regulatory effect of ColQ is more pronounced in STM muscle compared to Sol muscle regarding AChR density in clusters and rapsyn-to-AChR ratio. At neonatal stage, two ColQ transcripts, ColQ1 and ColQ1A are expressed in muscles whereas only ColQ1A remains expressed in adult STM and is restricted to synaptic domains in this muscle (Krejci et al., 1999). It is therefore difficult to correlate ColQ effects with a specific variant in our studies. One explanation could be that ColQ transcripts are expressed at higher levels in NMJs of STM muscle compared to Sol muscle at P7 and therefore drive stronger effects.

Increased packing of AChRs and rapsyn-AChR binding have been reported to correlate with higher phosphorylation of tyrosine Y390 in the β -AChR subunit loop in response to agrin (Borges et al., 2008). In our *in vitro* experiments and in the absence of agrin treatment, AChR packing at cell surface is increased but the ratio of the basal level of phosphorylated β -AChR subunits over total β -AChR subunits is unchanged which seems at odds with the above data. However, Borges et al. (2008) recently suggested that AChR and rapsyn could interact in a regulated manner dependent on β -AChR subunit tyrosine phosphorylation and in a constitutive manner independent of phosphorylation. It is therefore possible that the absence of ColQ stimulates interactions between rapsyn and AChR mostly through increased phosphorylation-independent binding of rapsyn to AChR.

Reduced levels of MuSK at the muscle cell surface in the absence of ColQ

Although the level of MuSK mRNAs and proteins are increased in ColQ-deficient cells, level of MuSK at the plasma membrane is severely reduced in culture and *in vivo*. Since this is observed in both systems and that ColQ has been found to interact with MuSK, reduced membrane-bound MuSK could be directly related to the absence of ColQ in the MuSK complex. A possibility is that ColQ stimulates MuSK sorting at the membrane. We previously showed that ColQ and MuSK codistribute in the same vesicles in cotransfected COS cells (Cartaud et al., 2004). These two molecules could be already associated in these vesicles and the lack of one of them would reduce the delivery of the complex to the membrane. In this context and conversely, the absence of MuSK leads to reduced levels of ColQ at the cell surface (Cartaud et al., 2004). Another possibility would be that ColQ promotes MuSK stability at the membrane through interactions of MuSK extracellular domain with the ECM.

In the absence of ColQ, we observed a reduction in AChR cluster area *in vitro* and in neonatal mice even when the area was normalized to the muscle fiber diameter, a phenotype that has been observed in adult mice (Feng et al., 1999; Nguyen-Huu et al., 2005). AChR cluster size has previously been correlated to the level of MuSK expression as the overexpression of MuSK leads to an increase in AChR cluster size (Fu et al., 2001). Therefore, the decrease in AChR cluster area observed in the absence of ColQ could be correlated to the decrease in membrane-bound MuSK. In addition, reduced levels of membrane MuSK probably explain the lower effect of agrin on AChR clustering and the reduced levels of agrin-induced β -AChR subunit phosphorylation *in vitro*. The levels of β -AChR subunit phosphorylation were also found to be reduced in STM and Sol muscles of neonatal mice, which can also be correlated to a weaker activity of the agrin/MuSK pathway.

CMS-1c patients share some common syndromes with CMS patients bearing mutations in *MUSK* and *DOK7*, a gene coding for a cytoplasmic adaptor of MuSK (Chevessier et al., 2004, 2008; Mihaylova et al., 2008). Dok-7 and MuSK are both essential to NMJ formation (Okada et al., 2006). Animal models for these myasthenic syndromes associated to mutations in *COLQ*, *MUSK* or *DOK7* have been generated (Feng et al., 1999; Okada et al., 2006; Chevessier et al., 2008). For the three mutants, the size of AChR clusters, the levels of membrane-bound MuSK and MuSK activation are reduced (Chevessier et al., 2004, 2008; Anderson et al., 2008; Hamuro et al., 2008). Similar to our results in ColQ-deficient P7 mice, an increased AChR density is also detected in P5 MuSK mutant mice (Chevessier et al., 2008). It is therefore tempting to speculate that some of the mutations in *COLQ* and *DOK7* result in reduced activity of the Dok-7/MuSK pathway that would explain similar phenotypes at least in young patients. The fact that a majority of the CMS-1c patients present an onset of the disease at birth argues in favor of a role of ColQ in initial synapse formation, in agreement with our results.

Comparison of NMJ phenotypes between cholinesterase mutants

Specificity of ColQ effects on postsynaptic differentiation is reinforced by the comparison with other mutants in which cholinesterase activity is affected. In the absence of ColQ as in the absence of AChE, AChR clusters are smaller and fragmented, but in contrast to ColQ mutant mice, the density of AChRs is decreased in adult AChE mutant mice (Xie et al., 2000; Adler et al., 2004). This last phenotype was only evident in mature synapses as neonatal AChE mutant NMJs were normal. Thus, the phenotypes of ColQ- and AChE-deficient NMJs are clearly different. In addition to AChE, butyrylcholinesterase (BChE) is expressed during early postnatal development and can also associate with ColQ (Krejci et al., 1997; Feng et al., 1999). However, BChE-deficient mice have normal NMJs (Li et al., 2006, 2008). More interesting will be to compare the double AChE-BChE mutant with ColQ mutant.

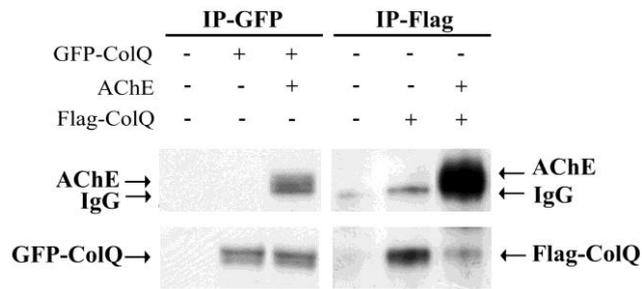
In summary, our results reveal that ColQ is not only a structural molecule but also fulfills a specific regulatory function in postsynaptic differentiation or maintenance. They bring new insights into the comprehension of myasthenic syndromes.

References

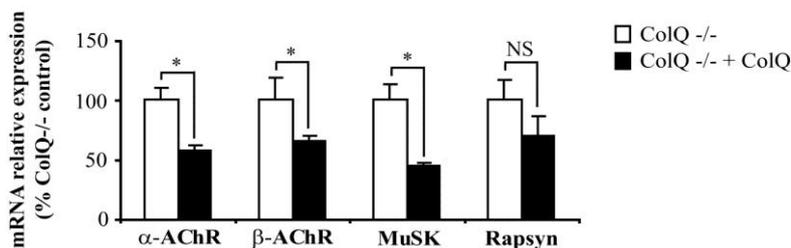
- Adler M, Manley HA, Purcell AL, Deshpande SS, Hamilton TA, Kan RK, Oyler G, Lockridge O, Duysen EG, Sheridan RE (2004) Reduced acetylcholine receptor density, morphological remodeling, and butyrylcholinesterase activity can sustain muscle function in acetylcholinesterase knockout mice. *Muscle Nerve* 30:317–327.
- Anderson JA, Ng JJ, Bowe C, McDonald C, Richman DP, Wollmann RL, Maselli RA (2008) Variable phenotypes associated with mutations in *DOK7*. *Muscle Nerve* 37:448–456.
- Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, Yamada Y (2002) Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci* 5:119–123.
- Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D (2010) Integrins. *Cell Tissue Res* 339:269–280.
- Bon S, Coussen F, Massoulié J (1997) Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. *J Biol Chem* 272:3016–3021.
- Borges LS, Yechikhov S, Lee YI, Rudell JB, Friese MB, Burden SJ, Ferns MJ (2008) Identification of a motif in the acetylcholine receptor beta subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization. *J Neurosci* 28:11468–11476.
- Brockhausen J, Cole RN, Gervásio OL, Ngo ST, Noakes PG, Phillips WD (2008) Neural agrin increases postsynaptic ACh receptor packing by elevating rapsyn protein at the mouse neuromuscular synapse. *Dev Neurobiol* 68:1153–1169.

- Cartaud A, Strohlic L, Guerra M, Blanchard B, Lambergeon M, Krejci E, Cartaud J, Legay C (2004) MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 165:505–515.
- Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, Richard P, Gaudon K, Bauché S, Prioleau C, Herbst R, Goillot E, Toos C, Azulay JP, Attarian S, Leroy JP, Fournier E, Legay C, Schaeffer L, Koenig J, Fardeau M, Eymard B, Pouget J, Hantaï D (2004) MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 13:3229–3240.
- Chevessier F, Girard E, Molgó J, Bartling S, Koenig J, Hantaï D, Witzemann V (2008) A mouse model for congenital myasthenic syndrome due to MuSK mutations reveals defects in structure and function of neuromuscular junctions. *Hum Mol Genet* 17:3577–3595.
- DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85:501–512.
- Deprez P, Inestrosa NC, Krejci E (2003) Two different heparin-binding domains in the triple-helical domain of ColQ, the collagen tail subunit of synaptic acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 278:23233–23242.
- Deschênes-Furry J, Bélanger G, Mwanjewe J, Lunde JA, Parks RJ, Perrone-Bizzozero N, Jasmin BJ (2005) The RNA-binding protein HuR binds to acetylcholinesterase transcripts and regulates their expression in differentiating skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 280:25361–25368.
- Donger C, Krejci E, Serradell AP, Eymard B, Bon S, Nicole S, Chateau D, Gary F, Fardeau M, Massoulié J, Guicheney P (1998) Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am J Hum Genet* 63:967–975.
- Dvir H, Harel M, Bon S, Liu WQ, Vidal M, Garbay C, Sussman JL, Massoulié J, Silman I (2004) The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. *EMBO J* 23:4394–4405.
- Feng G, Krejci E, Molgó J, Cunningham JM, Massoulié J, Sanes JR (1999) Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol* 144:1349–1360.
- Frail DE, Musil LS, Buonanno A, Merlie JP (1989) Expression of RAPSyn (43K protein) and nicotinic acetylcholine receptor genes is not coordinately regulated in mouse muscle. *Neuron* 2:1077–1086.
- Froehner SC, Luetje CW, Scotland PB, Patrick J (1990) The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 5:403–410.
- Fu AK, Cheung J, Smith FD, Ip FC, Ip NY (2001) Overexpression of muscle specific kinase increases the transcription and aggregation of acetylcholine receptors in *Xenopus* embryos. *Brain Res Mol Brain Res* 96:21–29.
- Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, Sanes JR, Merlie JP (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377:232–236.
- Gervásio OL, Armson PF, Phillips WD (2007) Developmental increase in the amount of rapsyn per acetylcholine receptor promotes postsynaptic receptor packing and stability. *Dev Biol* 305:262–275.
- Guerra M, Cartaud A, Cartaud J, Legay C (2005) Acetylcholinesterase and molecular interactions at the neuromuscular junction. *Chem Biol Interact* 157–158:57–61.
- Gullick WJ, Lindstrom JM (1983) Comparison of the subunit structure of acetylcholine receptors from muscle and electric organ of *Electrophorus electricus*. *Biochemistry* 22:3801–3807.
- Hamuro J, Higuchi O, Okada K, Ueno M, Iemura S, Natsume T, Spearman H, Beeson D, Yamanashi Y (2008) Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J Biol Chem* 283:5518–5524.
- Hantaï D, Richard P, Koenig J, Eymard B (2004) Congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Neurol* 17:539–551.
- Herbst R, Burden SJ (2000) The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling. *EMBO J* 19:67–77.
- Huang YZ, Wang Q, Xiong WC, Mei L (2001) Erbin is a protein concentrated at postsynaptic membranes that interacts with PSD-95. *J Biol Chem* 276:19318–19326.
- Huang YZ, Zang MZ, Xiong WC, Luo Z, Mei L (2003) Erbin suppresses the MAP kinase pathway. *J Biol Chem* 278:1108–1114.
- Jacobson C, Côté PD, Rossi SG, Rotundo RL, Carbonetto S (2001) The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J Cell Biol* 152:435–450.
- Jennings LL, Malecki M, Komives EA, Taylor P (2003) Direct analysis of the kinetic profiles of organophosphate-acetylcholinesterase adducts by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochemistry* 42:11083–11091.
- Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH, Hubbard SR, Dustin ML, Burden SJ (2008) Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 135:334–342.
- Krejci E, Coussen F, Duval N, Chatel JM, Legay C, Puype M, Vandekerckhove J, Cartaud J, Bon S, Massoulié J (1991) Primary structure of a collagenic tail peptide of Torpedo acetylcholinesterase: co-expression with catalytic subunit induces the production of collagen-tailed forms in transfected cells. *EMBO J* 10:1285–1293.
- Krejci E, Thomine S, Boschetti N, Legay C, Sketelj J, Massoulié J (1997) The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J Biol Chem* 272:22840–22847.
- Krejci E, Legay C, Thomine S, Sketelj J, Massoulié J (1999) Differences in expression of acetylcholinesterase and collagen Q control the distribution and oligomerization of the collagen-tailed forms in fast and slow muscles. *J Neurosci* 19:10672–10679.
- Kuno M, Turkkanis SA, Weakly JN (1971) Correlation between nerve terminal size and transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 213:545–556.
- Lacazette E, Le Calvez S, Gajendran N, Brenner HR (2003) A novel pathway for MuSK to induce key genes in neuromuscular synapse formation. *J Cell Biol* 161:727–736.
- LaRoche WJ, Froehner SC (1986) Determination of the tissue distributions and relative concentrations of the postsynaptic 43-kDa protein and the acetylcholine receptor in Torpedo. *J Biol Chem* 261:5270–5274.
- Legay C (2000) Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microsc Res Tech* 49:56–72.
- Li B, Duysen EG, Saunders TL, Lockridge O (2006) Production of the butyrylcholinesterase knockout mouse. *J Mol Neurosci* 30:193–195.
- Li B, Duysen EG, Lockridge O (2008) The butyrylcholinesterase knockout mouse is obese on a high-fat diet. *Chem Biol Interact* 175:88–91.
- Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, Sanes JR, Lee KF (2001) Distinct role of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410:1057–1064.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402–408.
- Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S (2005) Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 562:223–234.
- Mihaylova V, Müller JS, Vilchez JJ, Salih MA, Kabiraj MM, D'Amico A, Bertini E, Wölfe J, Schreiner F, Kurlemann G, Rasic VM, Siskova D, Colomer J, Herczegfalvi A, Fabriciova K, Weschke B, Scola R, Hoellen F, Schara U, Abicht A, Lochmüller H (2008) Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes. *Brain* 131:747–759.
- Moore C, Leu M, Müller U, Brenner HR (2001) Induction of multiple signaling loops by MuSK during neuromuscular synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14655–14660.
- Moransard M, Borges LS, Willmann R, Marangi PA, Brenner HR, Ferns MJ, Fuhrer C (2003) Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering. *J Biol Chem* 278:7350–7359.
- Nguyen-Huu T, Dobbertin A, Barbier J, Minic J, Krejci E, Duvaldestin P, Molgó J (2005) Cholinesterases and the resistance of the mouse diaphragm to the effect of tubocurarine. *Anesthesiology* 103:788–795.
- Ohno K, Brengman J, Tsujino A, Engel AG (1998) Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9654–9659.
- Okada K, Inoue A, Okada M, Murata Y, Kakuta S, Jigami T, Kubo S, Shiraishi H, Eguchi K, Motomura M, Akiyama T, Iwakura Y, Higuchi O, Yamanashi Y (2006) The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 312:1802–1805.
- Peng HB, Xie H, Rossi SG, Rotundo RL (1999) Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J Cell Biol* 145:911–921.

- Sanes JR, Lichtman JW (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2:791–805.
- Schaeffer L, de Kerchove d'Exaerde A, Changeux JP (2001) Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron* 31:15–22.
- Schlessinger J (1997) Direct binding and activation of receptor tyrosine kinases by collagen. *Cell* 91:869–872.
- Schreiner F, Hoppenz M, Klaeren R, Reimann J, Woelfle J (2007) Novel COLQ mutation 950delC in synaptic congenital myasthenic syndrome and symptomatic heterozygous relatives. *Neuromuscul Disord* 17:262–265.
- Scotton P, Bleckmann D, Stebler M, Sciandra F, Brancaccio A, Meier T, Stetefeld J, Ruegg MA (2006) Activation of muscle-specific receptor tyrosine kinase and binding to dystroglycan are regulated by alternative mRNA splicing of agrin. *J Biol Chem* 281:36835–36845.
- Strohlic L, Cartaud A, Mejat A, Grailhe R, Schaeffer L, Changeux JP, Cartaud J (2004) 14-3-3 gamma associates with muscle specific kinase and regulates synaptic gene transcription at vertebrate neuromuscular synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18189–18194.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350–4354.
- Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, Taylor P, Hinrichs SH, Lockridge O (2000) Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 293:896–902.
- Yang X, Arber S, William C, Li L, Tanabe Y, Jessell TM, Birchmeier C, Burden SJ (2001) Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* 30:399–410.
- Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L (2008) LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 60:285–297.



Supplemental Figure 1. GFP-ColQ and Flag-ColQ binding to AChE. Western blot of AChE/GFP-ColQ or AChE/Flag-ColQ co-immunoprecipitated with anti-GFP (IP-GFP) or anti-Flag (IP-Flag) antibodies respectively after co-transfection in COS-7 cells. AChE-to-ColQ ratio showed that GFP-ColQ is less efficient in AChE binding than Flag-ColQ.



Supplemental Figure 2. ColQ restoration in ColQ^{-/-} cells reversed mRNA level modifications due to ColQ deficiency. Quantification of α - and β -AChR subunits, MuSK and rapsyn mRNA levels in ColQ^{-/-} cells transfected with non-tagged ColQ by real-time RT-PCR. A decrease of α - and β -AChR -subunits and MuSK mRNA levels was observed in ColQ^{-/-} cells overexpressing ColQ, whereas the decrease in rapsyn mRNAs was not significant. Levels of mRNAs are represented as relative expression ($2^{-\Delta Ct}$ versus reference gene x 100). Data are presented as percentage of ColQ^{-/-} control \pm SEM from four independent experiments. * $P < 0.05$; NS: not significant; unpaired Mann Whitney's U test.

II. L'ABSENCE DE COLQ-ACHE PEUT-ELLE ETRE COMPENSEE ?

A. Introduction

Une activité physiologique normale de la jonction neuromusculaire requiert l'accumulation d'un certain nombre de protéines à la synapse. Parmi ces protéines, on retrouve l'AChE qui régule la quantité d'acétylcholine présente dans la fente synaptique et donc la réponse musculaire provoquée par l'activation des RnACh par le neurotransmetteur (Legay, 2000). L'enzyme existe sous plusieurs formes résultant de différents promoteurs ou du processus d'épissage alternatif du 3' pré-ARNm de l'AChE (Guerra et al., 2008). Très peu d'AChE soluble (variant AChE_R) est produite par le muscle, la forme majoritaire étant le variant AChE_T lié au collagène spécifique ColQ qui ancre et accumule l'enzyme dans la lame basale de la jonction neuromusculaire (Krejci et al., 1991). Des mutations de ColQ sont à l'origine de la diminution voire même de l'absence d'activité de l'AChE à la jonction neuromusculaire, provoquant un SMC de type 1c chez les patients atteints (Donger et al., 1998; Ohno et al., 1998; Schreiner et al., 2007; Mihaylova et al., 2008). Bien que cela n'ait jamais vraiment été étudié, il est envisageable que dans le but de limiter les effets de la perte de la forme AChE_T-ColQ à la jonction neuromusculaire, le muscle mette en place un système de compensation qui pourrait se traduire par une augmentation de l'expression de la forme soluble de l'AChE. La butyrylcholinestérase (BChE) pourrait également participer à ce processus même si cette enzyme est moins efficace pour la dégradation de l'acétylcholine. Enfin, PRiMA, bien qu'ancrant l'AChE_T au niveau du système nerveux central et peu exprimé à la jonction neuromusculaire, pourrait compenser la perte de ColQ.

B. Principaux résultats obtenus

Afin d'étudier les processus potentiellement mis en jeu par le muscle dans le but de compenser une perte du complexe AChE_T-ColQ, il a d'abord fallu étudier les différentes étapes aboutissant à la formation des agrégats d'AChE. Pour cela, l'étude de la différenciation musculaire a été réalisée sur des myotubes sauvages en culture cellulaire, ce système permettant de décomposer la formation des principaux éléments impliqués dans la transmission synaptique, à savoir l'agrégation des RnACh (temps T2) et de l'AChE (temps T3). Cette analyse serait quasiment impossible à réaliser *in vivo* du fait que la fusion des myoblastes et la différenciation post-synaptique se déroule dans un temps très restreint au

cours de l'embryogenèse, à savoir en quelques heures. *In vitro*, la différenciation post-synaptique est accompagnée d'une augmentation de l'expression du RnACh, notamment des sous-unités γ embryonnaire et α , suivie quelques jours plus tard de l'apparition des premiers agrégats de RnACh. Par la suite, la sous-unité ε adulte du RnACh voit son niveau d'expression augmenter, comme cela se produit également *in vivo* directement après la naissance des souriceaux, la sous-unité ε adulte remplaçant progressivement la sous-unité γ embryonnaire du RnACh. En parallèle de l'augmentation de l'expression de la sous-unité ε du RnACh se produit une augmentation de l'expression de l'AChE et de ColQ coïncidant avec l'apparition d'agrégats d'AChE. L'utilisation de myotubes sauvages au temps T2, bien avant l'apparition d'agrégats d'AChE, a permis de déterminer que l'AChE est limitante dans sa propre accumulation dans la matrice extracellulaire, puisque la surexpression de celle-ci permet la formation d'agrégats précoces d'AChE alors que la surexpression de ColQ n'engendre pas l'apparition de tels agrégats au temps T2.

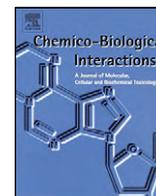
L'analyse comparée de l'expression de l'AChE totale et de ses variants AChE_R ou AChE_T entre les lignées cellulaires sauvage et déficiente pour ColQ, a permis de montrer une forte augmentation de la quantité de l'ensemble des ARNm en absence de ColQ et cela uniquement au temps T3. Ces résultats suggérant une surexpression de l'enzyme dans le but de compenser l'absence de ColQ-AChE_T, nous avons déterminé l'activité enzymatique, reflet de la quantité de protéines. Cette activité a été mesurée dans le milieu de culture afin de voir si la surexpression potentielle des différentes formes de l'AChE pouvait aboutir à une sécrétion accrue de l'enzyme. L'analyse a révélé une diminution de l'activité de l'AChE dans le milieu de culture de cellules ColQ^{-/-}. Il est donc envisageable que l'enzyme ne soit pas sécrétée en absence de ColQ, en accord avec le fait que l'AChE soit retenue dans le réticulum endoplasmique en absence de PRiMA dans les neurones (Dobbertin et al., 2009). Les mêmes augmentations d'ARNm des différents variants de l'AChE ont été obtenues sur des muscles de souris de un mois, mais le problème de sécrétion dû à l'absence de ColQ est certainement tout aussi présent que dans les cultures cellulaires. Une autre cholinestérase, la BChE, pourrait compenser l'absence d'AChE en dégradant l'acétylcholine. Cependant, il est probable que sa sécrétion ne puisse pas non plus se faire en absence de ColQ. Pour finir, la compensation pourrait venir de PRiMA qui ancre une très faible proportion d'AChE_T à la jonction neuromusculaire. Malheureusement, PRiMA est fortement sous-exprimé dans les cellules

musculaires en culture ou *in vivo*. Il semble donc qu'aucune compensation musculaire de l'absence d'AChE agrégée dans la lame basale ne soit possible en absence de ColQ.

C. Conclusion et Perspectives

Jusqu'à présent, les résultats décrits dans la littérature ont montré l'importance de ColQ dans la transmission synaptique puisque son absence entraîne la perte de l'AChE normalement ancrée à la jonction neuromusculaire. Les syndromes myasthéniques qui en résultent sont soit le résultat d'une perte partielle de l'activité AChE, soit le résultat d'une perte totale de son activité. Les résultats présentés dans ce papier montrent qu'aucune compensation musculaire pour la perte d'AChE_T n'est possible, démontrant pourquoi même une perte partielle d'AChE peut avoir des effets dramatiques. Cependant, il reste à déterminer les effets qui seraient directement liés à l'absence de l'AChE de ceux directement liés à l'absence ou à la mutation de ColQ. Sachant que chez la souris déficiente pour l'AChE, il a été montré que la BChE peut se lier à ColQ et compenser les effets dus à l'absence d'AChE, il serait intéressant de comparer les phénotypes des jonctions neuromusculaires des mutants ColQ et des doubles mutants AChE/BChE générés par le groupe d'Oksana Lockridge (Université du Nebraska). ColQ étant normalement sécrété en absence d'AChE (Sigoillot et al., 2010b), les défauts liés uniquement à l'absence des cholinestérases pourront être observés chez les doubles mutants AChE/BChE. Une analyse comparée des phénotypes des souris ColQ^{-/-} et des doubles mutants AChE/BChE sera ensuite nécessaire pour discriminer les effets liés à ColQ de ceux liés aux cholinestérases. Les doubles mutants n'étant pas viables, contrairement aux simples mutants AChE ou BChE, l'analyse de la jonction neuromusculaire se fera à E18.5, par comparaison d'embryons AChE^{-/-}BChE^{-/-}, AChE^{+/+}BChE^{-/-}, ColQ^{-/-} et ColQ^{+/+}.

D. Article



Cholinesterases regulation in the absence of ColQ

S everine M. Sigoillot, Francine Bourgeois, Claire Legay*

Laboratoire de biologie des jonctions neuromusculaires normales et pathologiques, Université Paris Descartes, INSERM U686, 45, rue des Saints Pères, 75270 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 11 February 2010

Keywords:

Neuromuscular junction
ColQ
Cholinesterases
Nicotinic acetylcholine receptor
PRiMA
MLCL

ABSTRACT

Normal physiological activity of the neuromuscular junction (NMJ) requires that key molecules are clustered at the synapse. One of these molecules is acetylcholinesterase (AChE) that regulates acetylcholine levels. This enzyme exists under different isoforms but the predominant form at the NMJ is a collagen-tailed enzyme. The collagen associated to AChE (ColQ) fulfills two functions. It anchors and accumulates AChE in the extracellular matrix. Mutations in *ColQ* lead to faint or no activity of AChE in the synaptic cleft. As a consequence, normal NMJ functioning is impaired and myasthenic syndromes are observed in patients bearing these mutations. Here, we investigated the effects of ColQ deficiency on cholinesterases mRNA levels and cluster formation. We show that overexpression of AChE but not ColQ in muscle cells is sufficient to drive the formation of AChE clusters. The absence of ColQ in muscle cells *in vitro* and *in vivo* leads to an increase in AChE_R and AChE_T mRNAs, corresponding to two isoforms of AChE. However, AChE activity is decreased in the medium of ColQ-deficient cells suggesting that AChE secretion is impaired. Butyrylcholinesterase (BChE) mRNAs are also upregulated *in vivo*. Since AChE and BChE can associate with PRiMA, a membrane anchor, we explored the pattern of expression of PRiMA *in vitro* and *in vivo*. The level of PRiMA transcripts is downregulated in the absence of ColQ. Therefore, AChE, BChE and PRiMA mRNA level modifications found in the absence of ColQ cannot compensate for the physiological defects observed at the ColQ-deficient NMJs.

  2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

At the vertebrate neuromuscular junctions (NMJs), depolarization of the motoneuron induces acetylcholine (ACh) release into the synaptic cleft. ACh then activates acetylcholine receptors (AChRs) on the postsynaptic membrane. Once released in the synaptic space, the level of ACh is controlled in time and space by acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), a serine hydrolase that degrades ACh within a few milliseconds. The main functional parameters in synapse activity are the amount of ACh release, AChE enzymatic activity and densities of both AChE and AChR that are clustered at the synapse. AChE occurs in multiple isoforms generated by alternative promoters and alternative splicing of the 3'pre-mRNA. Although traces of the AChE_R variant (a soluble form of AChE) are produced by muscle, the major form expressed at the NMJ is the variant AChE_T [1,2]. In muscle, most of AChE_T is attached to ColQ

[3,4], a specific collagen that anchors the enzyme within the extracellular matrix (ECM). ColQ forms a triple helix and each strand of the ColQ tail can interact with a tetramer of AChE_T *via* the association between a proline-rich attachment domain (PRAD) contained in ColQ N-terminus and a tryptophan amphiphilic tetramerization (WAT) domain present in AChE C-terminus [5–7]. The hetero-oligomer AChE–ColQ is accumulated at the synapse by at least two mechanisms. First, mRNA levels of AChE and ColQ are higher in synaptic regions compared with extra-synaptic regions [2]. Second, ColQ is clustered at the synapse through its interaction with MuSK (muscle specific kinase) and perlecan which is itself bound to dystroglycan [8–11].

In the present study, we have compared the mRNA levels of total AChE, AChE_R and AChE_T variants, BChE and PRiMA between wt and ColQ-deficient muscle cells in culture and *in vivo*. We show that AChE is the limiting factor in the formation of the AChE–ColQ complex in muscle cell culture. We also found that the absence of ColQ induces a large increase in AChE and BChE mRNA levels both *in vitro* and *in vivo*. In addition, both transcripts AChE_T and AChE_R were equally upregulated but AChE activity measured in the medium of ColQ-deficient cells was decreased. PRiMA mRNA levels were downregulated in the absence of ColQ in muscle cells *in vitro* and *in vivo*. Therefore, soluble or PRiMA forms of AChE and BChE seems not to be involved in a compensatory process for ColQ deficiency.

Abbreviations: α -BTX, α -bungarotoxin; ACh, acetylcholine; AChE, acetylcholinesterase; AChE_R, acetylcholinesterase soluble form; AChE_T, acetylcholinesterase T variant; AChR, acetylcholine receptor; ColQ, collagen Q; ColQ^{−/−}, MLCL ColQ-deficient; Ct, threshold cycle; ECM, extracellular matrix; MLCL, mouse muscle cell line; MuSK, muscle-specific kinase; NMJ, neuromuscular junction; wt, MLCL wild type.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 42 86 20 68; fax: +33 1 42 86 33 99.

E-mail address: claire.legay@univ-paris5.fr (C. Legay).

2. Materials and methods

2.1. Antibodies and reagents

α -Bungarotoxin (α -BTX) Alexa Fluor[®] 594 conjugate and Alexa Fluor[®] 488 conjugated goat anti-rabbit were purchased from Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR). A63 is a rabbit polyclonal anti-AChE raised against rat AChE [12].

2.2. Constructs

The rat ColQ1A and AChE clones have been previously described [13].

2.3. Animals

Generation of ColQ knock-out mice was described in Feng et al. [14]. The use of animals in procedures was performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines. Standard breeding methods were used to generate mutants.

2.4. Muscle cell culture and transfection

The two muscle cell lines, MLCL (wild type, wt) and MLCL ColQ-deficient (ColQ^{-/-}) were generated from wt and ColQ knock-out mice as described in Cartaud et al. [11]. There are respectively called MLCL and MLCL ColQ-deficient muscle cell lines. Myoblasts were cultured on plates coated with collagen Type I (Iwaki, Japan) maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 20% horse serum, 2 mM glutamine, 2% penicillin/streptomycin (5000 U) and 20 U/ml of γ -interferon (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany) at 33 °C in 8% CO₂. All the culture medium reagents were purchased from Invitrogen. Cells were differentiated into myotubes in the same medium with 5% horse serum and without γ -interferon (differentiation medium). Three stages of muscle cell differentiation were selected for analysis: T1 (day 0), T2 (day 2) and T3 (day 5). These stages represent key steps that are landmarks in progressive muscle differentiation with first the formation of myotubes (T1), then the AChR clustering (T2) and finally the AChE clustering (T3).

Myoblasts were transfected using ExGen 500 (Euromedex; Souffelweyersheim, France) 1 day after fusion was induced by addition of differentiation medium. Transfections were performed according to the manufacturer's instructions and resulted in 50–70% of cells expressing the transfected cDNA.

2.5. Immunofluorescence

Immunostaining was performed on myotubes after fixation in 2% paraformaldehyde-phosphate buffer (PFA-PBS). Before incubation with antibodies, non-specific binding was blocked using DakoCytomation Protein block (Glostrup, Denmark) for 5 min. Cells were first incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature, then washed in Glycine-BSA (0.15%:0.5%) buffer and incubated with a fluorochrome-conjugated secondary antibody for 30 min. Slides were mounted in Vectashield Hard Set Mounting Medium for fluorescence (Vector Laboratories; Burlingame, CA).

All images were collected on a microscope (model BX61; Olympus) equipped with a Fast 1394 Digital CCD FireWire camera (model Retiga 2000R; Qimaging) and a 40 \times oil objective (numerical aperture: 1.0; Olympus). Image capture was made using ImageProPlus software (version 5.1).

2.6. AChE activity

AChE enzymatic activity was determined according to the colorimetric method of Ellman et al. [15] using the ability of cholinesterases to cleave acetylthiocholine (ATC) in acetate and thiocholine that react with 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to form a yellow product, the 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid. Total AChE activity in cell culture medium was assayed using 0.7 mM ATC and 0.5 mM DTNB in the presence of 50 μ M of the BChE inhibitor tetra(monoisopropyl)pyrophosphotetramide (iso-OMPA) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). The medium was first incubated in the absence of acetylthiocholine for at least 20 min to block BChE and saturate the free sulfhydryl groups that interact with DTNB. The changes in optical density between wt and ColQ^{-/-} extracts and medium were measured at 414 nm after 1 h incubation in the dark.

2.7. RNA purification

Total RNAs from wt and ColQ^{-/-} muscle cells were extracted using the RNeasy Protect Mini-Kit (Qiagen; Germantown, MD) and DNA was digested in these extracts using RNase free DNase set (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by polyacrylamide-gel microelectrophoresis (Bio-analyser 2100, Agilent Technologies; Massy, France). Absence of genomic DNA contamination was tested by PCR. Total gastrocnemius fast- and slow-muscle RNAs from wt and ColQ^{-/-} P30 mice were extracted using Lysing Matrix D (MP Biomedicals; Illkirch, France), proteinase K treatment and RNeasy Fibrous Tissue Mini-Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

2.8. SyBR Green RT-PCR

The QuantiTect SyBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) was used in a one-step RT-PCR protocol. AChE, BChE, PRiMA and Sec63 QuantiTect primers were also purchased from Qiagen. AChE_R and AChE_T amplifications were performed using the forward primer (5' gagaggatctttgctcagcgac 3') and the reverse primer (5' gtg-gagaagagaggattacc 3') for AChE_R or the reverse primer (5' gctccgctcgtccagag 3') for AChE_T. The wells of 384-well plates were loaded with RT-PCR Master mix, QuantiTect RT mix, QuantiTect Primer Assay and 9 ng of total RNA for each sample. RT-PCR reactions were then performed with the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Data were collected with Applied Biosystems SDS 2.1 software, and then analyzed with the threshold cycle (Ct) relative-quantification method [16]. Since SEC63 was not modified in the different conditions, we selected it for data normalization. The relative expression of each gene versus SEC63 ($2^{-\Delta Ct}$, ΔCt indicating normalized data: $\Delta Ct = \text{target gene Ct} - \text{SEC63 Ct}$) was calculated and then averaged for each condition.

2.9. Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were done by pair-wise comparisons between wt and ColQ^{-/-} using Mann-Whitney U-test ($P < 0.05$ considered significant).

3. Results and discussion

3.1. Is ColQ or AChE limiting in AChE cluster formation during muscle cell differentiation?

Muscle cell differentiation is accompanied by the regulation of crucial synaptic proteins. After myotube fusion, the levels of several synaptic proteins are drastically upregulated although in a specific temporal pattern. Levels of α -AChR and γ -AChR subunit mRNAs

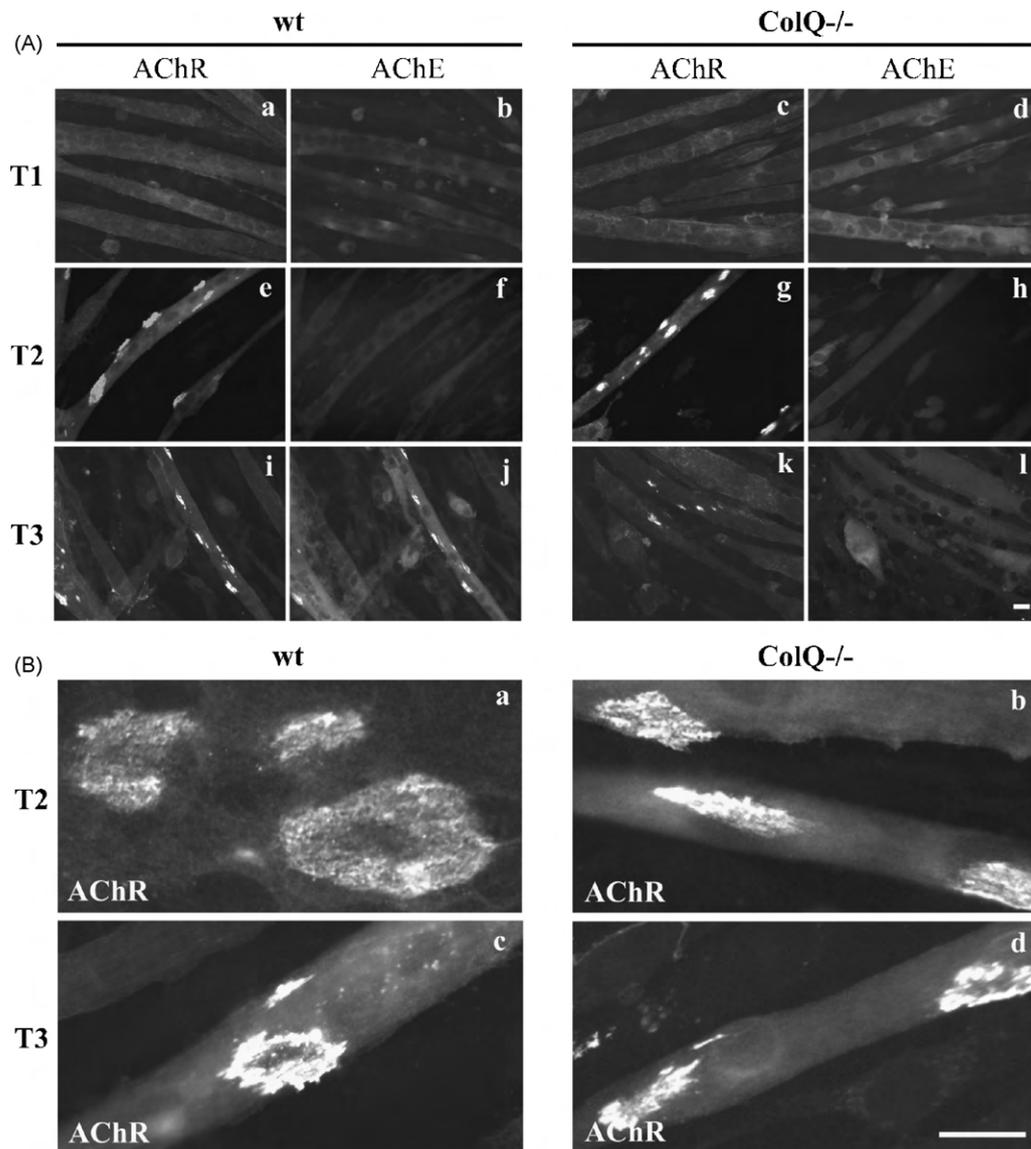


Fig. 1. AChR and AChE cluster formation in wt and ColQ-deficient muscle cell lines. AChR and AChE clusters were visualized using Alexa 594 α -BTX and A63 antibody, respectively. (A) *In vitro*, AChR and AChE clusters were observed at different stages of muscle cell differentiation. At stage T1, newly fused myotubes did not present any AChR or AChE clusters in wt (a and b) and ColQ^{-/-} cells (c and d). At stage T2, AChR but not AChE clusters were detected in wt (e and f) and ColQ^{-/-} cells (g and h). At stage T3, both AChR and AChE clusters were detected in wt cells (i and j) but AChE clusters were not detected in ColQ^{-/-} cells (k and l). (B) between T2 and T3, AChR clusters ranged from an immature “pretzel” shape (a and b) to a mature “pretzel” shape (c and d) in both cell lines. Scale bars, 20 μ m.

increase first and AChR clusters become detectable in 2 days-old myotubes [17]. ϵ -AChR subunit, ColQ and AChE mRNA levels then progressively increase and for a threshold of expression, AChE clusters appear. These clusters colocalize with AChR clusters 3 days after AChR clusters are detected in muscle cell cultures [17]. At this time-point of late muscle cell differentiation, spontaneous contractions are observed. Membrane depolarization has been reported to increase the levels of AChE–ColQ forms [18–20] which is consistent with the concomitant upregulation of AChE and ColQ mRNA levels [17,19,21]. A more direct evidence of a link between muscle activity and ColQ mRNA levels has been shown recently by ACh treatment of C2C12 myotubes that induces an increase in ColQ mRNA levels [22]. It seems that not only AChE must be associated to ColQ in a hetero-complex [14] but also that both AChE and ColQ levels are critical for the formation of AChE clusters. The time lag between AChR and AChE clustering observed *in vitro* raises the question whether AChE level or ColQ level is limiting in AChE–ColQ clustering in mammalian muscle cells.

To answer this question, wt and ColQ-deficient muscle cell lines were used as they allow the study of complete muscle differentiation [11,17,23]. The wt and the ColQ-deficient muscle cell lines were generated in our laboratory and are called MLCL (wt) and MLCL ColQ-deficient (ColQ^{-/-}) cells respectively. Three stages of muscle cell differentiation were defined: T1, T2 and T3 time points (see Section 2.4), each one corresponding to a precise phenotype. At stage T1, newly fused myotubes did not present any AChR or AChE clusters (Fig. 1A, a–d). At stage T2, AChR but not AChE clusters were detected in both muscle cell lines (Fig. 1A, e–h). At stage T3, AChR and AChE clusters were detected in wt myotubes but AChE was not present in ColQ^{-/-} cells (Fig. 1A, i–l) in agreement with previous data showing that ColQ is involved in AChE cluster formation [14]. In addition, spontaneous contractions occur in wt and ColQ^{-/-} myotubes at T3. In both cell lines, AChR clusters ranged from an immature shape in early-differentiated cells (Fig. 1B, a and b) to a mixture of immature and more mature “pretzel” shapes in late-differentiated cells (Fig. 1B, c and d) [24].

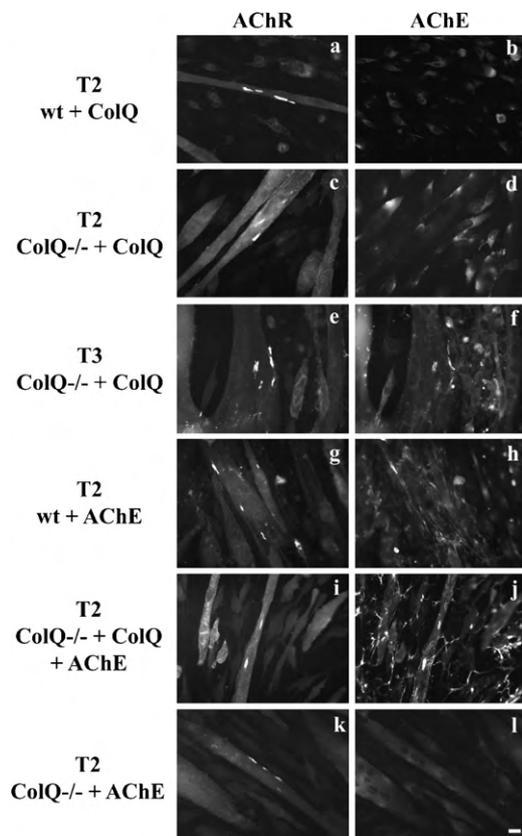


Fig. 2. AChE level is limiting in AChE cluster formation. AChR and AChE clusters were visualized using Alexa 594 α -BTX and A63 antibody, respectively. AChR (a) but not AChE (b) clusters were detected in T2 wt myotubes transfected with ColQ. Similarly, T2 ColQ^{-/-} myotubes transfected with ColQ presented AChR (c) but no AChE (d) clusters. ColQ restoration allowed formation of AChE clusters in T3 ColQ^{-/-} myotubes (f) colocalized with AChR clusters (e). AChR (g) and AChE (h) clusters were detected in T2 wt myotubes transfected with AChE. Similarly, T2 ColQ^{-/-} myotubes cotransfected with ColQ and AChE presented AChR (i) and AChE (j) clusters. T2 ColQ^{-/-} myotubes transfected with AChE presented AChR (k) but no AChE (l) clusters. Scale bar, 20 μ m.

Since AChR clusters are detected before the formation of AChE clusters, we tested whether ColQ or AChE overexpression in T2 myotubes would lead to earlier AChE cluster formation. Immunofluorescence analysis revealed that AChE clusters could neither be detected in T2 wt myotubes nor in T2 ColQ^{-/-} myotubes transfected with ColQ (Fig. 2a–d) whereas ColQ restoration allowed the formation of AChE clusters in ColQ^{-/-} cells at T3 (Fig. 2e and f). Wt and ColQ^{-/-} myotubes were next transfected with AChE and AChE/ColQ respectively. Immunofluorescence analysis revealed the presence of AChE clusters in both cell lines at T2 (Fig. 2g–j). In order to ensure that these AChE clusters were ColQ-associated, ColQ^{-/-} cells were transfected with AChE. The immunofluorescence analysis showed that no AChE clusters could be detected in ColQ^{-/-} cells overexpressing AChE (Fig. 2k and l). Collectively, these results indicate that AChE level is limiting in the detection of AChE–ColQ clusters at the muscle membrane.

Different ratios of AChE/ColQ generate more or less saturated form of collagen-tailed AChE [13]. Since the form of AChE that is incorporated in synaptic clusters corresponds mostly to the saturated form (A12), it suggests that a high ratio of AChE/ColQ is necessary to generate clustering of AChE–ColQ form. This ratio can be obtained either by overexpressing AChE mRNAs or/and by controlling posttranslationally AChE–ColQ assembly. This last process has been previously documented [25,26]. Our above data support the idea that overexpression of AChE is able to induce AChE clusters. This can be achieved *in vivo* either by increased

transcription of AChE or stability of mRNAs. Transcriptional and post-transcriptional regulations of AChE have been previously described [27–31]. Overexpression of ColQ in a quail myoblast cell line increases AChE–ColQ expression indicating that in this species the amount of ColQ stimulates the formation of the molecular complex and presumably cluster formation although this last parameter was not investigated [26]. However, in quail muscle cells, a large amount of ColQ is not associated with AChE and rapidly degraded supporting the idea that ColQ is not limiting in the AChE–ColQ complex [26].

3.2. AChE is upregulated both *in vitro* and *in vivo* in the absence of ColQ

Since our data show that AChE is the limiting factor in AChE cluster formation, we then wondered whether AChE mRNA levels were modified in the absence of ColQ. To answer this question, we analyzed AChE mRNA levels during muscle cell differentiation in wt and ColQ^{-/-} myotubes. AChE mRNA levels relative to Sec63 mRNAs showed a progressive increase with muscle differentiation until they reach a threshold allowing the detection of AChE clusters (Fig. 3A). Interestingly, the absence of ColQ is responsible for a significant increase in AChE mRNA levels in T3 late-differentiated cells (+117%; Fig. 3A). This data suggests that in the absence of ColQ, AChE could be overexpressed to compensate for the absence of collagen-tailed AChE accumulated in the ECM. To further characterize which type of AChE was upregulated at T3, mRNA levels of two variants, AChE_R coding for soluble AChE and AChE_T coding for associated forms were determined. Both AChE_R and AChE_T mRNAs were upregulated in the absence of ColQ (+53% and +109%, respectively; Fig. 3B). However, unlike AChE_T, AChE_R mRNAs are weakly expressed in muscle cells [2]. In the hypothesis that levels of AChE_R proteins and activity reflect the levels of AChE_R transcripts, soluble AChE thus would not efficiently compensate for the lack of AChE accumulation in the ECM due to ColQ deficiency. Moreover, although the levels of both AChE mRNA variants were upregulated in the absence of ColQ, we found that AChE activity determined in the T3 medium of ColQ^{-/-} cells was decreased compared to wt cells (–41%; Fig. 3C). One explanation is that the absence of ColQ would limit the secretion of AChE_T. Indeed, it has been shown that the absence of PRiMA in neurons leads to a retention of AChE in the endoplasmic reticulum [32]. Thus similarly, non-associated form of AChE_T could be partially retained in muscle intracellular compartments.

We next asked whether *in vivo* AChE mRNA levels were also upregulated in muscle lacking ColQ. Like *in vitro*, we found that AChE mRNAs were increased in P30 mice (+137%; Fig. 3D), as well as AChE_R and AChE_T (+111% and +137%, respectively; Fig. 3E). However, as discussed above, it is not certain that the pool of AChE_T is active in ACh hydrolysis since it might not be secreted in the absence of ColQ.

3.3. Can butyrylcholinesterase or PRiMA associated forms of cholinesterases compensate for defective accumulation of AChE in the absence of ColQ?

Since butyrylcholinesterase (BChE) activity can also control ACh levels at the NMJ and has been shown to partially compensate for AChE deficiency in mice [14], we next analyzed BChE expression in T3 wt and ColQ-deficient myotubes and in P30 mice. In T3 myotubes, BChE mRNA levels were undetectable. In P30 muscles of ColQ-deficient mice, BChE mRNA levels were increased in the absence of ColQ (+182%; Fig. 4A). However, BChE may not efficiently compensate for AChE_T accumulation default in the absence of ColQ as its secretion is probably impaired.

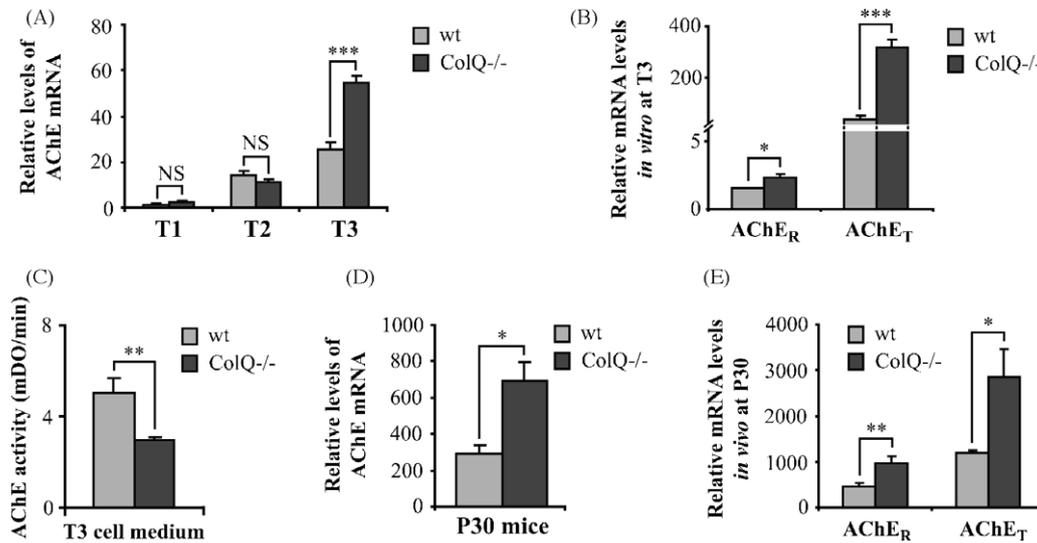


Fig. 3. AChE is upregulated *in vitro* and *in vivo* in the absence of ColQ. (A and B) Quantification of AChE, AChE_R and AChE_T mRNAs in wt and ColQ^{-/-} myotubes by real-time RT-PCR. AChE mRNA level relative to Sec63 mRNAs is progressively increased during muscle cell differentiation between T1 and T3 (A). At T3, AChE, AChE_R and AChE_T mRNA levels relative to Sec63 mRNAs were higher in ColQ^{-/-} cells compared to wt cells (B). (C) AChE activity analyzed in T3 cell medium from wt and ColQ^{-/-} culture was decreased in the absence of ColQ. (D and E) Quantification of AChE, AChE_R and AChE_T mRNAs in P30 wt and ColQ^{-/-} mice by real-time RT-PCR. AChE, AChE_R and AChE_T mRNA levels relative to Sec63 mRNAs were higher in ColQ^{-/-} muscles compared to wt muscles. Levels of mRNAs are represented as relative expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ versus reference gene $\times 100$). Data are presented as mean \pm SEM from three to five independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS: not significant; unpaired Mann–Whitney's *U*-test.

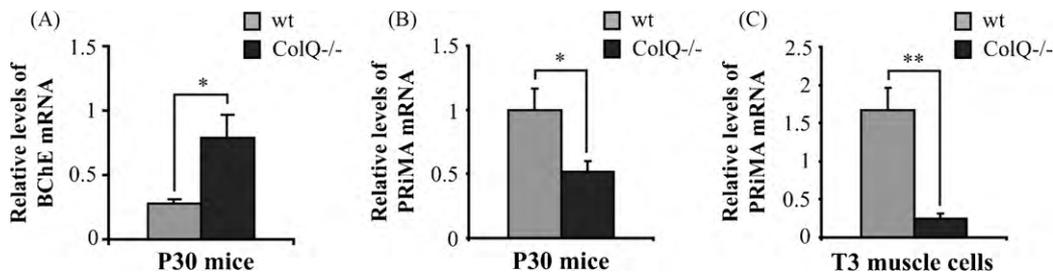


Fig. 4. BChE and PriMA expression *in vitro* and *in vivo*. (A and B) Quantification of BChE and PriMA mRNAs in P30 wt and ColQ^{-/-} mice by real-time RT-PCR. BChE mRNA levels relative to Sec63 mRNAs was higher in ColQ^{-/-} muscles compared to wt muscles (A). PriMA mRNA levels relative to Sec63 mRNAs was lower in ColQ^{-/-} muscles compared to wt muscles (B). (C) Quantification of PriMA mRNAs in T3 wt and ColQ^{-/-} myotubes by real-time RT-PCR. PriMA mRNA levels relative to Sec63 mRNAs was drastically decreased in ColQ^{-/-} cells compared to wt cells. Levels of mRNAs are represented as relative expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ versus reference gene $\times 100$). Data are presented as mean \pm SEM from three to five independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; unpaired Mann–Whitney's *U*-test.

AChE_T and BChE can also be associated to PriMA, a proline-rich membrane anchor [33]. Cholinesterases associated to PriMA represent a minor form of the enzyme expressed at the NMJs. A small fraction of AChE linked to PriMA is produced by the muscle and this form is downregulated *in vitro* and *in vivo* as muscle cell differentiation proceeds [34,35]. However, in a physiopathological context, we wondered whether PriMA could be upregulated to compensate for the absence of AChE–ColQ accumulation in the ECM. Analysis of PriMA mRNA levels in P30 muscle and in T3 myotubes revealed that PriMA is downregulated in the absence of ColQ (–48% and –85%, respectively; Fig. 4B and C). These findings indicate that PriMA is probably not involved in a compensatory process to regulate ACh level at NMJ from ColQ-deficient mice.

4. Conclusion

All together, our data show that AChE is the limiting factor in AChE cluster formation during muscle differentiation. In addition, we found that the absence of ColQ leads to an upregulation of cholinesterases. However, as AChE is not efficiently secreted,

this regulation has no beneficial consequences on the physiology of ColQ-deficient NMJs.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interests.

Acknowledgments

The authors wish to thank E. Girard and E. Krejci for providing wt and ColQ-deficient mice and A. Dobbertin for help with RT-PCR and AChE activity experiments.

This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Association Française contre les Myopathies (AFM, Grants to C.L.), the Agence National de la Recherche and Université Paris Descartes. S.M.S. is the recipient of a PhD grant from the French Ministry of Research.

References

- [1] Y. Li, S. Camp, T.L. Rachinsky, D. Getman, P. Taylor, Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 23083–23090.

- [2] C. Legay, M. Huchet, J. Massoulié, J.P. Changeux, Developmental regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization, *Eur. J. Neurosci.* 7 (1995) 1803–1809.
- [3] E. Krejci, F. Coussen, N. Duval, J.M. Chatel, C. Legay, M. Puype, J. Vandekerckhove, J. Cartaud, S. Bon, J. Massoulié, Primary structure of a collagenic tail peptide of Torpedo acetylcholinesterase: co-expression with catalytic subunit induces the production of collagen-tailed forms in transfected cells, *EMBO J.* 10 (1991) 1285–1293.
- [4] E. Krejci, S. Thomine, N. Boschetti, C. Legay, J. Sketelj, J. Massoulié, The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 22840–22847.
- [5] S. Bon, F. Coussen, J. Massoulié, Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 3016–3021.
- [6] S. Simon, E. Krejci, J. Massoulié, A four-to-one association between peptide motifs: four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway, *EMBO J.* 17 (1998) 6178–6187.
- [7] H. Dvir, M. Harel, S. Bon, W.Q. Liu, M. Vidal, C. Garbay, J.L. Sussman, J. Massoulié, I. Silman, The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix, *EMBO J.* 23 (2004) 4394–4405.
- [8] H.B. Peng, H. Xie, S.G. Rossi, R.L. Rotundo, Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 911–921.
- [9] C. Jacobson, P.D. Cote, S.G. Rossi, R.L. Rotundo, S. Carbonetto, The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane, *J. Cell Biol.* 152 (2001) 435–450.
- [10] E. Arikawa-Hirasawa, S.G. Rossi, R.L. Rotundo, Y. Yamada, Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice, *Nat. Neurosci.* 5 (2002) 119–123.
- [11] A. Cartaud, L. Stochlic, M. Guerra, B. Blanchard, M. Lambergeon, E. Krejci, J. Cartaud, C. Legay, MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction, *J. Cell Biol.* 165 (2004) 505–515.
- [12] D. Marsh, J. Grassi, M. Vigny, J. Massoulié, An immunological study of rat acetylcholinesterase: comparison with acetylcholinesterases from other vertebrates, *J. Neurochem.* 43 (1984) 204–213.
- [13] E. Krejci, C. Legay, S. Thomine, J. Sketelj, J. Massoulié, Differences in expression of acetylcholinesterase and collagen Q control the distribution and oligomerization of the collagen-tailed forms in fast and slow muscles, *J. Neurosci.* 19 (1999) 10672–10679.
- [14] G. Feng, E. Krejci, J. Molgo, J.M. Cunningham, J. Massoulié, J.R. Sanes, Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function, *J. Cell Biol.* 144 (1999) 1349–1360.
- [15] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr., R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.
- [16] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(-ΔΔC_T) Method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [17] M. Guerra, A. Cartaud, J. Cartaud, C. Legay, Acetylcholinesterase and molecular interactions at the neuromuscular junction, *Chem. Biol. Interact.* 157–158 (2005) 57–61.
- [18] S.K. Brockman, L.H. Younkin, S.G. Younkin, The effect of spontaneous electromechanical activity on the metabolism of acetylcholinesterase in cultured embryonic rat myotubes, *J. Neurosci.* 4 (1984) 131–140.
- [19] S. De La Porte, M. Vigny, J. Massoulié, J. Koenig, Action of veratridine on acetylcholinesterase in cultures of rat muscle cells, *Dev. Biol.* 106 (1984) 450–456.
- [20] F. Rieger, J. Koenig, M. Vigny, Spontaneous contractile activity and the presence of the 16 S form of acetylcholinesterase in rat muscle cells in culture: reversible suppressive action of tetrodotoxin, *Dev. Biol.* 76 (1980) 358–365.
- [21] C. Fernandez-Valle, R.L. Rotundo, Regulation of acetylcholinesterase synthesis and assembly by muscle activity. Effects of tetrodotoxin, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 14043–14049.
- [22] F.T. Lau, R.C. Choi, H.Q. Xie, K.W. Leung, V.P. Chen, J.T. Zhu, C.W. Bi, G.K. Chu, K.W. Tsim, Myocyte enhancer factor 2 mediates acetylcholine-induced expression of acetylcholinesterase-associated collagen ColQ in cultured myotubes, *Mol. Cell. Neurosci.* 39 (2008) 429–438.
- [23] S.M. Sigoillot, F. Bourgeois, M. Lambergeon, L. Stochlic, C. Legay, ColQ controls postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction, *J. Neurosci.* 30 (2010) 13–23.
- [24] T.T. Kummer, T. Misgeld, J.W. Lichtman, J.R. Sanes, Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus, *J. Cell Biol.* 164 (2004) 1077–1087.
- [25] R.L. Rotundo, C.A. Ruiz, E. Marrero, L.M. Kimbell, S.G. Rossi, T. Rosenberry, A. Darr, P. Tsoufas, Assembly and regulation of acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction, *Chem. Biol. Interact.* 175 (2008) 26–29.
- [26] C.A. Ruiz, R.L. Rotundo, Dissociation of transcription, translation, and assembly of collagen-tailed acetylcholinesterase in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 21488–21495.
- [27] M.E. Fuentes, P. Taylor, Control of acetylcholinesterase gene expression during myogenesis, *Neuron* 10 (1993) 679–687.
- [28] A. Mutero, S. Camp, P. Taylor, Promoter elements of the mouse acetylcholinesterase gene. Transcriptional regulation during muscle differentiation, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 1866–1872.
- [29] L.M. Angus, R.Y. Chan, B.J. Jasmin, Role of intronic E- and N-box motifs in the transcriptional induction of the acetylcholinesterase gene during myogenic differentiation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 17603–17609.
- [30] A. De Jaco, S. Camp, P. Taylor, Influence of the 5' intron in the control of acetylcholinesterase gene expression during myogenesis, *Chem. Biol. Interact.* 157–158 (2005) 372–373.
- [31] J. Deschenes-Furry, G. Belanger, J. Mwanjewe, J.A. Lunde, R.J. Parks, N. Perrone-Bizzozero, B.J. Jasmin, The RNA-binding protein HuR binds to acetylcholinesterase transcripts and regulates their expression in differentiating skeletal muscle cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 25361–25368.
- [32] A. Dobbertin, A. Hrabovska, K. Dembele, S. Camp, P. Taylor, E. Krejci, V. Bernard, Targeting of acetylcholinesterase in neurons in vivo: a dual processing function for the proline-rich membrane anchor subunit and the attachment domain on the catalytic subunit, *J. Neurosci.* 29 (2009) 4519–4530.
- [33] A.L. Perrier, J. Massoulié, E. Krejci, PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain, *Neuron* 33 (2002) 275–285.
- [34] H.Q. Xie, R.C. Choi, K.W. Leung, N.L. Siow, L.W. Kong, F.T. Lau, H.B. Peng, K.W. Tsim, Regulation of a transcript encoding the proline-rich membrane anchor of globular muscle acetylcholinesterase. The suppressive roles of myogenesis and innervating nerves, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 11765–11775.
- [35] K.W. Tsim, K.W. Leung, K.W. Mok, V.P. Chen, K.Y. Zhu, J.T. Zhu, A.J. Guo, C.W. Bi, K.Y. Zheng, D.T. Lau, H.Q. Xie, R.C. Choi, Expression and localization of PRiMA-linked globular form acetylcholinesterase in vertebrate neuromuscular junctions, *J. Mol. Neurosci.* 40 (2010) 40–46.

III. QUEL EST LE ROLE DE COLQ DANS L'ORGANISATION DE LA LAME BASALE ?

A. Introduction

ColQ est un collagène spécifique constitué d'un domaine collagénique flanqué de domaines N- et C-terminaux. Ces trois domaines lui permettent d'interagir avec des éléments variés de la lame basale et du domaine post-synaptique à la jonction neuromusculaire. Ainsi, ColQ interagit avec l'AChE *via* son domaine N-terminal, avec MuSK *via* son domaine C-terminal et avec le perlecan, probablement par l'intermédiaire des sites de liaison à l'héparine situés dans sa partie collagénique. En plus d'ancrer et d'accumuler l'AChE à la jonction neuromusculaire, ColQ participe à la différenciation du domaine post-synaptique, en contrôlant notamment l'expression du RnACh. Dans le but de déterminer si ColQ régule l'expression d'autres gènes, une analyse du transcriptome des cellules musculaires sauvages et déficientes pour ColQ a été réalisée. Un groupe de gènes correspondant à la matrice extracellulaire s'est avéré être largement sous-exprimé *in vitro* mais sur-exprimé *in vivo* en absence de ColQ. Nous avons donc fait l'hypothèse que ColQ pourrait avoir un rôle dans l'organisation de la matrice extracellulaire musculaire. Les perturbations de la matrice extracellulaire aboutissant souvent à des dystrophies/myopathies liées aux modifications du lien matrice/cytosquelette *via* le complexe dystrophine, l'étude s'est orientée sur la recherche d'une dystrophie potentiellement provoquée par l'absence de ColQ.

B. Principaux résultats obtenus

Afin de déterminer les gènes potentiellement régulés par ColQ au cours de la différenciation musculaire, une analyse du transcriptome des lignées cellulaires MLCL sauvage et déficiente pour ColQ a été réalisée (puces pangénomiques de souris Applied Biosystems). Les résultats obtenus montrent que l'absence de ColQ provoque la perturbation de l'expression d'un grand nombre de gènes, parfois uniquement au début ou à la fin de la différenciation musculaire, parfois à tous les stades de différenciation. Deux catégories de gènes ressortent cependant de cette étude : les gènes de la matrice extracellulaire qui sont fortement sous-exprimés en absence de ColQ (cluster 7) et des gènes de la mitochondrie qui sont sur-exprimés tardivement au cours de la différenciation musculaire dans les myotubes ColQ^{-/-} (cluster 9).

ColQ étant une protéine appartenant à la matrice extracellulaire, la question a donc été de savoir si son absence entraîne une perturbation de celle-ci ainsi que de son lien avec le cytosquelette musculaire. Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés au cluster 7. Ce cluster est caractérisé par deux types de gènes, les gènes codant pour des composants architecturaux de la matrice extracellulaire et des gènes codant pour des enzymes et modulateurs de cette matrice. ColQ semblant participer à la régulation de la structure de la matrice extracellulaire en contrôlant l'expression de ses constituants, l'étude s'est orientée vers le dystroglycan, partenaire indirect de ColQ *via* le perlecan, nécessaire à la formation de la matrice extracellulaire et faisant le lien entre celle-ci et le cytosquelette musculaire. Les résultats obtenus *in vitro* montrent que ColQ régulerait l'expression du dystroglycan ainsi que sa localisation, suggérant son rôle dans le contrôle des cascades de signalisation sous-jacentes.

Les perturbations de la matrice extracellulaire ainsi que du lien existant entre elle et le cytosquelette *via* le complexe dystrophine étant souvent liées à des pathologies de type dystrophie/myopathie, l'étude s'est poursuivie *in vivo* chez des souris sauvages et déficientes pour ColQ. L'analyse par RT-PCR de l'expression de gènes codant pour des protéines de structure ou de régulation de la matrice extracellulaire et du complexe dystrophine chez des souris de 7 et 30 jours n'a révélé que très peu de variations significatives. Toutefois, un certain nombre de gènes sont sur-exprimés, à l'inverse de ce qui est observé *in vitro*, favorisant l'idée que des compensations et une dynamique moléculaire se mettent en place après la naissance. Par ailleurs, les variations des ARNm ne reflètent pas toujours la quantité de protéines biologiquement actives. Nous avons donc réalisé une étude des caractéristiques dystrophiques sur différents muscles de souris déficientes pour ColQ à 7, 30 et 90 jours après la naissance. Les souris ColQ^{-/-} sont plus petites que les souris sauvages de la même portée. De plus, leurs muscles ainsi que les fibres musculaires les constituant ont un diamètre moyen plus petit, les muscles possédant également moins de fibres. Une faible variabilité du diamètre des fibres a été observée chez les souris ColQ^{-/-} de 7 jours. L'ensemble des défauts laissent entrevoir une légère dystrophie chez le jeune animal mutant. D'autres signes de dystrophie ont également été analysés comme la présence accrue de fibres lentes, de fibres nécrosées ou en régénération, c'est-à-dire à noyaux centraux. Cependant, l'analyse des fibres n'a révélé aucune augmentation de la quantité de fibres de type lent et seulement de faibles augmentations de la quantité de fibres nécrosées ou en régénération. La souris ColQ^{-/-} semble donc être très faiblement affectée par des phénomènes dystrophiques. Cependant, le deuxième résultat majeur de cette étude est qu'un groupe de gènes synaptiques est surexprimé à la fois

in vitro et *in vivo*, ces signes moléculaires ainsi que des signes phénotypiques indiquant la présence d'une atrophie musculaire.

C. Conclusion et Perspectives

L'absence de ColQ chez la souris est responsable d'un phénotype anormal à la jonction neuromusculaire, une désorganisation de certains de ses constituants étant flagrante (Feng et al., 1999). Par contre, il ne semble pas y avoir de phénotype particulier concernant le muscle en général, la souris ColQ^{-/-} n'étant probablement affectée que par une légère dystrophie. Cependant, les modèles de souris dystrophiques se sont souvent révélés peu convainquant en comparaison des phénotypes observés chez des patients dystrophiques humains. Il est d'ailleurs envisagé que chez la souris, des systèmes de compensation puissent se mettre en place beaucoup plus facilement que chez l'homme. L'étude de caractéristiques dystrophiques chez les patients myasthéniques humains présentant des mutations du gène COLQ ne serait donc pas à négliger. Par ailleurs, la présence de signes moléculaires et histologiques d'atrophie musculaire décelables chez la souris modèle pour le SMC-1c suggère une nouvelle piste dans l'analyse fonctionnelle de la jonction neuromusculaire. Cette atrophie pourrait être liée à la déconnexion des éléments pré- et post-synaptiques qui provoquerait une dénervation partielle du muscle.

Les résultats obtenus par puces à ADN ont révélé une perturbation de l'expression de gènes de la matrice extracellulaire, suggérant une désorganisation de celle-ci. Ce résultat est d'ailleurs cohérent avec l'intrusion des cellules de Schwann dans la fente synaptique des jonctions neuromusculaires précédemment observée (Feng et al., 1999). Il reste donc maintenant à savoir si cette désorganisation peut être le résultat de la perte d'interaction de ColQ avec MuSK ou le perlecan ou bien si d'autres partenaires de ColQ encore inconnus aujourd'hui sont impliqués. Pour cela, une étude des partenaires de ColQ a été initiée. Une construction plasmidique ColQ-Flag a été produite, aucun anticorps anti-ColQ spécifiques n'ayant été produits jusqu'à aujourd'hui. Cette construction sera électroporée conjointement à une construction GFP dans le muscle tibial antérieur de souris sauvages. Une construction possédant uniquement le Flag sera utilisée comme témoin et électroporée avec la construction GFP chez une autre souris. Afin d'identifier les partenaires synaptiques de ColQ, le muscle sera préalablement traité avec de l'agrine, l'injection d'agrine recombinante dans le muscle entraînant la formation d'un grand nombre de pseudo-synapses ectopiques dans la région

extra-synaptique du muscle en une vingtaine de jours (Ruegg and Bixby, 1998; Huze et al., 2009). Deux semaines après l'électroporation et l'injection d'agrine recombinante, les fibres musculaires positives pour la GFP seront disséquées et les protéines musculaires extraites (Collaboration avec Laurent Schaeffer, ENS Lyon). Une immunoprécipitation de ColQ-Flag sera réalisée grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-Flag et les protéines interagissant avec ColQ-Flag seront analysées sur gel d'acrylamide dénaturant. Après coloration des protéines du gel à l'argent, chaque bande présente dans l'immunoprécipitat ColQ-Flag mais pas dans celui du Flag seul sera analysée par spectrométrie de masse afin d'identifier les partenaires de ColQ. Les partenaires potentiels de ColQ seront ensuite confirmés *in vitro* par des études complémentaires. Cette étude devrait ainsi permettre de compléter le schéma général des interactions protéiques nécessaires à l'organisation de la matrice extracellulaire.

D'autres expériences sont en cours pour mieux caractériser le potentiel atrophique des muscles. Si un tableau plus complet émerge de cette étude, nous chercherons à analyser les conséquences physiologiques et les voies de signalisation à l'origine de cette atrophie. Enfin, l'analyse moléculaire ne rendant pas compte du niveau d'expression des protéines synaptiques et de leur adressage, nous chercherons à déterminer la structure des RnACh présents à la jonction neuromusculaire. Cette étude sera essentielle pour comprendre la physiologie de la synapse en absence de ColQ.

D. Article en préparation

Title: Molecular and phenotypical analysis of ColQ-deficient muscles in a model of myasthenic syndrome

Short Title: Gene expression of ColQ-deficient muscles

Authors and Affiliations: Séverine M. Sigoillot,^{1,2,4} Francine Bourgeois,^{1,2,4} Eric Krejci,^{1,3,4} Catherine Chevalier,⁵ Rémi Houlgatte,⁵ Jean Léger,⁵ and Claire Legay^{1,2,4*}

¹Centre d'étude de la Sensorimotricité, Université Paris Descartes, CNRS UMR 8194, Paris, France.

²Equipe Matrice extra-cellulaire et formation de la jonction neuromusculaire.

³Equipe Contrôle du regard et de la posture.

⁴INSERM U686, Paris, France

⁵IRT – UN, Plateforme Puces à ADN, Nantes, France.

Present address

CeSeM - Equipe Matrice extra-cellulaire et formation de la jonction neuromusculaire,
Université Paris Descartes, CNRS UMR 8194, 45, rue des Saints Pères, 75270 Paris, France.

Corresponding author: Claire Legay

E-mail: claire.legay@univ-paris5.fr

Telephone: +33 1 42 86 20 68

Fax: +33 1 42 86 33 99

* **Correspondance:** claire.legay@univ-paris5.fr

Key Words: Gene profiling, Muscle atrophy, MuSK, Dystroglycan.

INTRODUCTION

Congenital myasthenic syndromes (CMS) correspond to a class of human pathologies resulting from mutations in genes expressed at the neuromuscular junction (NMJ). These disorders are inherited in an autosomal recessive fashion. They are characterized by a dysfunction of the NMJ leading to muscle weakness and excess fatigability together with additional specific symptoms related to the mutated gene and its function (1, 2). CMS are usually classified according to the normal location of the gene product. The three types of CMS cover the functional domains of the synapse with presynaptic, synaptic and postsynaptic CMS. One of the synaptic CMS is caused by the absence or the poor expression of acetylcholinesterase (AChE) in the synaptic basal lamina. The first symptoms are detected in the neonatal period or the childhood and most of the patients are severely disabled. For the majority of the patients, the clinical picture includes muscle hypotonia, ptosis, respiratory insufficiency and delayed motor development (3). The diagnosis is based on the presence of repetitive compound muscle action potential (CMAP) after single stimulation, slow response of the pupil to light and absence of AChE visualization. The syndrome is not due to mutations in the AChE gene but to mutations in COLQ, a gene that encodes a specific collagen and anchors AChE in NMJ basal lamina (4). About 30 mutations have been identified in this gene to date and are spread all along the gene in different functional domains (5). The major form of AChE expressed at the NMJ is a heteromeric-complex containing a variant of AChE (AChE_T) linked to ColQ. In this form so-called asymmetric form in the past, a triple helix of ColQ binds one to three tetramers of AChE, the most saturated form of ColQ being present at the NMJ. ColQ is strictly expressed at the NMJ in fast muscles but is also present although in lower amount in extrasynaptic domains in a slow muscle such as the soleus (6). ColQ contains four functional domains including the N-terminus that binds AChE tetramer, the collagen domain, the proximal C-terminus domain responsible for the formation of the triple helix and the distal C-terminus domain involved in interaction with MuSK, a muscle-specific tyrosine kinase receptor (7-9). The collagen domain contains two heparin binding sites that are presumed to be responsible for the interaction between perlecan, a heparan sulfate proteoglycan and ColQ (10, 11). Moreover, perlecan binds dystroglycan (DG), a transmembrane protein that plays a major role in linking the extracellular matrix to the cytoskeleton (12). Therefore, as in ColQ mutant, AChE is absent from NMJs of perlecan and DG deficient mice.

A mouse model of CMS-1c has been generated by invalidation of the COLQ gene (13). As expected, the NMJ of these mice are devoid of AChE and mice exhibit myasthenic syndromes. Interestingly, although perlecan mutant mice also lack AChE, these mice exhibit a

clearly different phenotype. Patients with mutations in perlecan present a Schwartz-Jampel syndrome characterized by myotonia (14-16). The clinical heterogeneity of the patients bearing COLQ mutations and the different clinical picture compared to Schwartz-Jampel patients suggest that the molecular basis for these pathologies is probably complex and takes roots beyond the absence of AChE. As recently shown, besides anchoring AChE, ColQ participates in postsynaptic differentiation by regulating the density of AChR and the size of the synaptic clusters (17). Here, we have conducted a large genetic screen to identify the molecular targets of ColQ and revealed molecular defects that could explain the observed phenotype in the mice model of CMS-1c. The results point to two main consequences of the deficit in ColQ, a synaptic atrophy that could be linked to the MuSK pathway and an upregulation of a subset of synaptic genes.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

α -bungarotoxin (α -BTX) Alexa Fluor[®] 594 conjugate, Alexa Fluor[®] 488 or 594 conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse were purchased from Invitrogen Molecular Probes. Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (clone 6C5) was purchased from Abcam. I1H6C4 (western blot) and VIA4 (immunofluorescence) monoclonal antibodies to α -DG were purchased from Upstate. Myosin Heavy Chain (MHC) Slow (NCL-MHCs) was obtained from Novocastra. Lectin-FITC was purchased from Sigma-Aldrich. DAPI was purchased from Euromedex. Horseradish Peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG polyclonal antibody was obtained from GE Healthcare-Amersham.

Animals

Generation of ColQ knock-out mice was described in Feng et al. (13). The use of animals is in accordance with the protocol approved by local ethics committees. Standard breeding methods were used to generate double mutants.

Muscle cell culture

The two muscle cell lines, MLCL wild type (wt) and MLCL ColQ-deficient (ColQ^{-/-}) were generated as previously described (9). Myoblasts were cultured on plates coated with collagen Type I (Iwaki, Japan) maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 20% horse serum, 2 mM glutamine, 2% penicillin/streptomycin (5,000 U) and 20 U/ml of γ -interferon (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany) at 33°C in 8% CO₂. All reagents for the culture medium were purchased from Invitrogen. Cells were differentiated into myotubes in the same medium with 5% horse serum and without γ -interferon (differentiation medium). The commercial collagen-coated plates provide a minimal matrix for the cell culture and allow reproducibility between experiments.

Three stages of muscle cell differentiation were selected for analysis: T1 when cells are mostly myotubes (day 0), T2 when AChR clusters are visualized (day 2) and T3 when both AChR and acetylcholinesterase (AChE) clusters are observed in wt but not in ColQ^{-/-} myotubes (day 5) (18).

Western blot analysis

Proteins were extracted from cells using lysis buffer (TrisHCl 50mM, NaCl 150mM, EDTA 2mM, Sodium orthovanadate 2mM and TritonX100 1%). Equal amounts of proteins (30 µg/sample) were first separated by a 7% NuPAGE Novex Tris-Acetate Gels according to Invitrogen protocols, then electrotransferred to nitrocellulose membranes (TransBlot® Transfer Medium, Bio-Rad) (19). Membranes were blocked in PBS supplemented with Tween 0.1% (PBST) and non-fat milk 5% and incubated with various antibodies in PBST-milk 5%. After washing in PBST, membranes were incubated with Horseradish Peroxidase-conjugated secondary antibodies in PBST-milk 5%. Bound antibodies were revealed using ECL plus detection reagents (GE Healthcare-Amersham) and visualized with hyperfilm ECL. Protein loading was controlled by probing with anti-GAPDH antibody. Results obtained were quantified using ImageJ (version 1.37c) software.

Immunofluorescence

Myotubes immunostaining was performed after fixation in 2% PFA-phosphate buffer (PBS). Before incubation with antibodies, non-specific binding was blocked using DakoCytomation Protein block (Glostrup, Denmark) for 5 min. Cells were first incubated with the primary antibody for 1 h at RT, then washed in Glycine-BSA (0.15%:0.5%) buffer and incubated with a fluorochrome-conjugated secondary antibody for 30 min. Slides were mounted in Vectashield Hard Set Mounting Medium for fluorescence (Vector Laboratories).

For sections analyses, dissected sternomastoid fast-type muscles from seven or thirty days postnatal (P7 and P30) wt or ColQ^{-/-} mice were fixed in 3% PFA-PBS buffer for 1 hour at 4°C, rinsed twice at 4°C in PBS, cryoprotected by successive incubations in 5%, 10% and 25% sucrose-PBS buffer at 4°C, and embedded in TissueTek (Sakura) before freezing in isopentane cooled with liquid nitrogen. 14 µm cryostat cross sections were labelled as same as for myotubes immunostaining.

All images were collected on a microscope (model BX61; Olympus) equipped with a Fast 1394 Digital CCD FireWire camera (model Retiga 2000R; Qimaging) and a 20X objective or a 40X oil objective (numerical apertures: 0.50 and 1.0, respectively; Olympus). Image capture was made using ImageProPlus software (version 5.1). The diameters of muscles or muscle fibers were measured using ImageProPlus software. Quantifications of the number of fibers per muscle or with central nuclei were realised using ImageJ (version 1.37c) software.

RNA preparation

Total RNA from MLCL wt and ColQ^{-/-} muscle cells were extracted at T1, T2 and T3 time points by using the RNeasy Protect Mini-Kit (Qiagen; Germantown, MD) and by performing DNA digestion according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by polyacrylamide-gel microelectrophoresis (Bioanalyser 2100, Agilent Technologies; Massy, France) and RNA concentration was measured by spectrophotometry (Nanodrop). Lack of genomic DNA contamination was verified by PCR. Total gastrocnemius fast- and slow-muscle RNAs from wt and ColQ^{-/-} P7 and P30 mice were extracted by using Lysing Matrix D (MP Biomedicals; Illkirch, France), proteinase K treatment and RNeasy Fibrous Tissue Mini-Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was determined using Experion RNA StdSens Chips, samples with RQI (RNA quality indicator) <5 were not used.

Applied Biosystems Microarrays

Microarray analysis was run as three independent triplicates per time point (T1, T2 and T3) and per cell line (wt and ColQ^{-/-} cells) using Applied Biosystems Mouse Genome Survey Microarrays, containing probes representing approximately 32.000 mouse genes from the public and Celera databases. Digoxigenin-UTP labeled cRNA was generated from 500 ng of total RNA using Applied Biosystems Chemiluminescent RT-IVT labeling kit and was purified according to the manufacturer's instructions. Each microarray was prehybridized at 55°C for 1 h in hybridization buffer with blocking reagent. 10 µg of labeled cRNA was then hybridized to each array in a 500 µl volume at 55°C for 16 h. After hybridization, the arrays were washed with hybridization wash buffer and chemiluminescence rinse buffer. Chemiluminescence detection, image acquisition and analysis were performed using Applied Biosystems Chemiluminescence Detection Kit and Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer following the manufacturer's protocol. Single-color chemiluminescent signals were quantified, corrected for background and spatially normalized. Applied Biosystems Expression System software was used to extract assay signal, and assay signal to noise ratio values from the micro-array images. The raw data were normalized using Lowess. The set of probes differentially expressed between wt and ColQ^{-/-} cells as well as between T1, T2 and T3 time points were determined by Student's test.

Gene Ontology (GO)

The evaluation of which gene ontology classes were differentially expressed between wt and ColQ^{-/-} samples was performed using a functional class scoring analysis as previously described (20). For each gene in a GO class, the *P* value for comparing wt *versus* ColQ^{-/-} samples was computed. The set of *P* values for a class was summarized by two summary statistics: 1) the LS summary is the average log *P* values for the genes in that class and 2) the KS summary is the Kolmogorov-Smirnov statistic computed on the *P* values for the genes in that class. The statistical significance of the GO class containing *n* genes represented on the array was evaluated by computing the empirical distribution of these summary statistics in random samples of *n* genes. We considered a GO category differentially regulated if the significance level of either one of the KS or LS statistics was <0.01 (BRB ArrayTools, Class comparison).

TaqMan real-time RT-PCR

The TaqMan Low Density Array (TLDA, Applied Biosystems) was used in a two-step RT-PCR process (Marionneau et al., 2005). First-strand cDNA was synthesized from 220 ng of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). PCR reactions were then performed on TLDA with the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each card were preloaded with pre-designed fluorogenic TaqMan probes and primers. Probes were labeled with the fluorescent reporter 6-carboxyfluorescein (FAM[®], Applied Biosystems) at the 5'-end and with non-fluorescent quencher on the 3'-end. Three genes were selected for normalization (*HPRT1*, *GAPDH* and *SEC63*). Data were collected with Applied Biosystems SDS 2.1 software, and then analyzed with the threshold cycle (*Ct*) relative-quantification method (Livak and Schmittgen, 2001). Since *GAPDH* is the most uniformly distributed gene between the different conditions, we selected it for data normalization. The relative expression of each gene versus *GAPDH* ($2^{-\Delta Ct}$, ΔCt indicating normalized data: $\Delta Ct = \text{target gene } Ct - \text{GAPDH } Ct$) was calculated and then averaged for each condition.

Statistical Analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were done by pair-wise comparisons between two conditions using Student's unpaired *t* tests for $n \geq 30$ and Mann-Whitney *U* test for $n < 30$ ($P < 0.05$ considered significant).

RESULTS

1. Transcriptional profiling of ColQ-deficient cells *in vitro*

To define the network of genes under the control of ColQ during muscle cell differentiation, we aimed to compare the transcriptome of wt and ColQ-deficient cell lines at the three time points of muscle cell differentiation T1, T2 and T3. Cell lines and stages of differentiation have both been previously described (17, 18). Briefly, T1 corresponds to early fused myotubes, T2 corresponds to myotubes expressing AChR clusters and T3 corresponds to myotubes undergoing spontaneous contractions as well as expressing AChE clusters in wt cells but not in ColQ^{-/-} cells. The transition T1 to T2 can be correlated to the beginning of muscle innervation occurring between embryonic days E13.5 and E14 in mice. Contrariwise, the transition T2 to T3 corresponding to further maturation of muscle cells in the absence of nerve has no equivalent during mice development. mRNAs were prepared from three independent wt or ColQ^{-/-} cell cultures and for each time point, and then hybridized on mouse pangenomic microarrays (Applied Biosystems). After normalization of the microarray data and median filter application, the 17.035 remaining genes over 32.000 genes were classified using model-based clustering in the context of detecting differentially expressed genes between wt and ColQ^{-/-} cells or between T1 and T3. Thereby, nine clusters of genes were obtained (Figure 1A), revealing that 28% of the genes are upregulated in the absence of ColQ, 10% of the genes are downregulated when ColQ is absent and thus 62% of the genes are equally expressed between wt and ColQ^{-/-} cells (Figure 1B). Interestingly, some clusters represent genes that are differentially regulated during entire muscle cell differentiation whereas other clusters correspond to genes that are differentially expressed early or late during differentiation in the absence of ColQ. These data suggest that ColQ regulates various categories of genes including genes involved in specific stages but also genes that are expressed at all stages of muscle differentiation.

2. Putative functions perturbed in the absence of ColQ *in vitro*

To determine if specific functions could be attributed to the nine clusters obtained from microarray analysis, genes within each cluster were classified depending of their Gene Ontology (GO) identity. No significant functions were drawn from clusters 2 and 6. Genes of olfactory receptor activity (GO: 4984) and sensory perception (GO: 7600) classes were well represented in cluster 1 without corresponding to a particular muscle function. Clusters 3, 4 and 5 represented the proliferation and cell motility functions with genes implicated in the cell

cycle (GO: 7049), DNA replication (GO: 6260), cytoskeleton (GO: 5856) and microtubule organization (GO 226). The upregulation of these genes at T1 in the absence of ColQ suggests that wt and ColQ^{-/-} myoblasts could proliferate and/or fuse differently. However, no obvious variations were observed in the timing of cell division or fusion between the two cell lines (data not shown). Cluster 7 represented a group of downregulated genes encoding mostly for extracellular proteins (GO: 5576) and in particular for extracellular matrix proteins (GO: 31012). The most important function represented in cluster 8 was linked to muscle contraction (GO: 6936) and more precisely to myofibril (GO: 30016), contractile fiber (GO: 43292) and sarcomere (GO: 30017). Since this cluster corresponds to genes that were upregulated during muscle cell differentiation but that were not differentially expressed between wt and ColQ^{-/-} cells, proteins implicated in contraction and muscle organization are likely not affected by ColQ deficiency. This result is in agreement with spontaneous contractions observed both in wt and ColQ^{-/-} cells and occurring at the same time in both cell lines, *ie* at T3. Finally, cluster 9 corresponded to mitochondrion genes (GO: 5739) with well represented ion transport genes (GO: 6811) and ATPase activity genes (GO: 16887). Together, these results show that the expression of two different classes of genes is perturbed in the absence of ColQ. First, ECM genes are downregulated in ColQ-deficient cells compared to wt cells and second, mitochondrion genes are upregulated tardily in the absence of ColQ. Genes that were differentially expressed between wt and ColQ^{-/-} cells were also classified according to ingenuity functions. This classification revealed an evolution among the top functions. At T1, *cellular growth* or *skeletal and muscular system development and function* were top functions. Then, between T1 and T2, and between T2 and T3, *skeletal and muscular disorders* and *cell death* went progressively up in the top functions (Figure 2). These data show that ColQ deficiency affects muscle development first and is then responsible for muscle disorders during further muscle differentiation.

3. ColQ and the extracellular matrix *in vitro*

Two reasons prompted us to focus our study on genes from cluster 7, (1) downregulated genes could provide insight into defects linked to the absence of ColQ, (2) ECM genes could reveal new partners of ColQ in the ECM. The two main classes of extracellular matrix proteins identified in this cluster were (1) components of the ECM architecture, (2) ECM enzymes and modulators. The first category was essentially composed of laminins, collagens, proteoglycans and glycoproteins. The second class included metalloproteases, growth factors and other proteins (Table1). To validate the results obtained by microarrays, a subset of 95

various genes from microarrays including ECM genes was also quantified by Taqman Low Density Array (TLDA). In this experiment, data were normalized to Sec63 mRNAs since this specific mRNA was similarly expressed whatever the conditions. For more than 91% of the genes analyzed in microarrays and TLDA, the same variations in gene expression and magnitude of the changes were observed between wt and ColQ^{-/-} cells. Together, these data highlight the reliability of microarray and TLDA techniques and show that ColQ deficiency is responsible for perturbation of gene expression of both structural and regulator components of the ECM.

Given that ColQ seems to participate to the regulation of ECM gene expression, we explored whether the absence of ColQ also perturbed dystroglycan expression, one of the main ECM receptor and an indirect partner of ColQ (21). Although normal differentiation of muscle cells is characterized by an increase in DG level *in vivo* and in our wt muscle cell line, this upregulation does not occur in the absence of ColQ (22) (Figure 3A). In addition, since the functional form of DG is glycosylated to allow the organization of the ECM (23), DG glycosylated forms were quantified by western blot in wt and ColQ^{-/-} cells. ColQ deficiency was found to induce a 20% decrease of glycosylated DG level at T2 and T3 compared to control condition (Figure 3B). Finally, as DG is expressed all along the muscle fibers but is preferentially accumulated at the NMJ with AChRs, we also analyzed the localization of active form of DG in myotubes forming AChR clusters. Immunofluorescence experiments performed at T2 revealed that DG co-clustered with AChRs in wt cells whereas in ColQ^{-/-} cells some AChRs were devoid of glycosylated DG (Figure 3C). Together, these results suggest that ColQ might regulate DG functional expression and localization, thus potentially controlling the molecular cascades linking ECM to cytoskeleton.

Importantly, to build the ECM, DG binds perlecan as well as laminin and agrin when normally glycosylated (22). Our mRNA analysis showed that laminin- β 1 was present in the microarray cluster 7 and was downregulated during muscle cell differentiation (Table1). Perlecan, which bind both DG and ColQ, was significantly downregulated in the absence of ColQ at T2, with a 55% decrease (Figure 3D). Collectively, our data suggest that the absence of ColQ could lead to disorganization of the ECM and of its linkage to the muscle membrane.

4. ECM gene expression in ColQ-deficient mice

We thus wondered whether the modifications of ECM gene expression detected in ColQ^{-/-} cells were also observed in muscle from ColQ^{-/-} mice. Thereby, a disorganization of the ECM *in vivo* could lead to signs of dystrophy in these mice, in addition to the myasthenic

syndrome. To address this issue, mRNAs from P7 and P30 gastrocnemius muscle of wt and ColQ^{-/-} mice were analyzed by TLDA for previously selected ECM genes. However, no significant decreases were observed in the absence of ColQ for the genes tested (Supplemental data1), except for the four modulators of ECM: BMP1, Mmp9, Wnt4 and myostatin (Table2). BMP1 was decreased by 66% in P7 muscles deficient for ColQ whereas Mmp9 and Wnt4 were decreased in P30 muscles by more than 50% in the absence of ColQ. Myostatin was decreased by 45% and 60% in P7 and P30 ColQ^{-/-} muscles respectively. Some genes coding for ECM architecture proteins or ECM regulators were upregulated in the absence of ColQ. Thereby, laminine $\alpha 4$, collagen 4 $\alpha 1$, glypican-1, BDNF and LTBP4 mRNA levels were increased in ColQ-deficient P7 muscles compared to wt muscles. In addition, collagen 4 $\alpha 2$, perlecan, biglycan and TGF β 1 were upregulated in P30 muscles in the absence of ColQ whereas agrin was upregulated both in ColQ-deficient P7 and P30 muscles.

5. Analysis of the muscle phenotype in the absence of ColQ

Genetic defects affecting ECM structure or ECM gene expression are the causes of many cases of muscular dystrophies. More, previous *in vivo* analysis showed intrusion of Schwann cells in the synaptic cleft (13) suggesting that ColQ-deficient NMJ could behave partially like a denervated synapse. This process could induce muscle atrophy. We therefore analyzed dystrophic and atrophic events that could occur in muscles of the ColQ-deficient mice. First, dystrophic/atrophic patients generally have decreased body weight and muscle mass compared to normal patients due to muscle defects. At birth, no difference was observed in body weight between wt and ColQ^{-/-} mice (13). However, after birth, ColQ^{-/-} mice grew slowly compared to wt littermates. At P7, the body weight of ColQ^{-/-} mice was 30% lower than wt mice and 50% lower at P30, consistent with what has been previously observed (13) (P7: wt, 4.06g \pm 0.13; ColQ^{-/-}, 2.70g \pm 0.25; P30: wt, 16.92g \pm 1.01; ColQ^{-/-}, 8.86g \pm 1.12; n=4 mice per group; Figure 4A). In patients with dystrophy, fast-muscles are generally more affected than slow-muscles, we thus focused on sternomastoid fast-muscle (STM). Analysis of the STM muscle revealed significant decreases of 14% and 26% of the average muscle diameter in ColQ^{-/-} P7 and P30 muscles, respectively (P7: wt, 446 μ m \pm 19.2; ColQ^{-/-}, 381 μ m \pm 6.95; P30: wt, 1539 μ m \pm 25.13; ColQ^{-/-}, 1138 μ m \pm 62.52; n=4 STM muscle per group; Figure 4B). STM muscles from ColQ^{-/-} mice had also less fibers than wt muscles (P7: -22%, $p < 0.05$; P30: -30%, $p < 0.05$; n=4 STM muscles per group; Figure 4C). In addition to being less numerous, the fibers had smaller diameters both in ColQ^{-/-} P7 and P30 STM muscles (P7: wt, 5.67 μ m \pm 0.16; ColQ^{-/-}, 4.86 μ m \pm 0.16; P30: wt, 30.06 μ m \pm 0.16; ColQ^{-/-},

21.23 $\mu\text{m} \pm 0.15$; $n \geq 2000$ STM muscle fibers per group; Figure 4D). As showed by the repartition of fiber diameters in wt and ColQ^{-/-} STM muscles, an increase in fiber diameter variability was observed in P7 but not in P30 ColQ^{-/-} STM muscles (Figure 4E). Together, these data are in agreement with muscle mass and body weight decreases in the absence of ColQ and suggest a mild-dystrophy or atrophy in ColQ^{-/-} P7 mice.

To investigate the potentially dystrophic phenotype of ColQ^{-/-} muscles, more specific dystrophic histological features were explored. In dystrophic muscles, slow fibers are relatively spared by the dystrophic process whereas fast fibers are the most affected fiber type. On the contrary, atrophy is characterized by a switch from slow to fast fibers. A widely used index of fiber type distribution is the distribution of MHC isoforms. Thereby, fast fibers expressing MHC-2B generally shift toward the expression of slower MHC isoforms (MHC-1) in dystrophic muscles. We thus analyzed the percentage of slow fibers in wt and ColQ^{-/-} STM muscle cross-sections. No difference was observed in the number of slow fiber type in the absence of ColQ, both at P7 and P30 STM muscles (Figure 5A). Moreover, dystrophic muscles often have a high concentration of degenerating fibers. We studied fibers for which membrane became porous and thus are permeable to IgG from the bloodstream, an indicator for muscle fiber that begins to become necrotic. In P7 STM muscles, the percentage of necrotic fibers rose from 0.25% \pm 0.05 in wt to 0.34% \pm 0.11 in ColQ^{-/-} whereas in P30 STM muscles, the percentage of necrotic fibers rose from 0.49% \pm 0.08 in wt to 1.67% \pm 0.41 in ColQ^{-/-} (P7: +39%, non significant; P30: +239%, $p < 0.05$; $n \geq 3000$ STM muscle fibers; Figure 5B). Similarly, dystrophic muscles generally present high levels of regenerating fibers characterized by central nuclei. We thereby analyzed the number of fibers with central nuclei in P7 and P30 STM muscles from wt and ColQ^{-/-} mice. In P7 STM muscles, the percentage of centrally nucleated fibers rose from 3.78% \pm 0.55 in wt to 5.78% \pm 0.39 in ColQ^{-/-}, whereas in P30 STM muscles, this percentage rose from 3.47% \pm 0.44 in wt to 5.22% \pm 0.57 in ColQ^{-/-} (P7: +53%, $p < 0.01$; P30: +50%, $p < 0.05$; $n \geq 3000$ STM muscle fibers; Figure 5C). Even if there were increases in necrotic fibers and centrally nucleated fibers in the absence of ColQ, both categories of fibers were rather poorly represented in wt as well as in ColQ^{-/-} mice considering the total number of fibers. Lastly, no signs of fibrosis were observed at P7 and P30. Together, these data reveal that STM does not seem to be affected by dystrophic signs.

To further explore whether ColQ deficiency induces some signs of dystrophy in mice, we analyzed diaphragm from ColQ^{-/-} mice as this muscle is generally the most affected by dystrophic disorders. P90 diaphragm muscles from wt and ColQ^{-/-} mice were analyzed in the

same way as the previous muscles. Thereby, we first determined the percentage of slow fibers in the P90 diaphragms which was significantly decreased in ColQ^{-/-} muscles compared to wt muscle (wt, 11% ± 1.1; ColQ^{-/-} 7.2% ± 1.0; Figure 6A). We then analyzed necrotic fibers in diaphragms from wt and ColQ-deficient mice but no significant variation were observed between the percentage of necrotic fibers in wt and ColQ^{-/-} muscles (wt, 0.22% ± 0.14; ColQ^{-/-}, 0.18% ± 0.03; Figure 6A). The percentage of centrally nucleated fibers was next determined in wt and ColQ-deficient P90 diaphragm without revealing any difference between the two groups of mice (wt, 1.03% ± 0.22; ColQ^{-/-}, 1.22% ± 0.24; Figure 6A). Therefore, a switch from slow to fast fibers was observed and no signs of degeneration/regeneration were present in diaphragms from ColQ-deficient mice. Since previous analyses have demonstrated a decrease of MHC-1 concomitant to an increase in MHC-2 in atrophy (24), a more detailed analysis of MHC forms is in progress (Table3). As the progressive inability of dystrophic muscles to properly regenerate is responsible for appearance of fibrosis and fat between fibers, we finally analyzed fiber morphology using lectin-FITC which stains muscle fiber periphery as well as connective tissue. Except for the decreased diameter of the diaphragm muscle fibers (wt, 30.8 ± 0.2; ColQ^{-/-}, 28.9 ± 0.2; Figure 6B), no other changes of the muscle morphology were observed in the absence of ColQ (Figure 6C). Collectively, our data show that ColQ^{-/-} mice have no obvious dystrophic phenotype but rather exhibit signs of atrophy. Whether this abnormal phenotype is specific to the diaphragm or is related to age remain to be clarified.

6. ColQ deficiency and synaptic gene expression

Besides genes mentioned above, synaptic genes are well represented in differentially expressed genes between wt and ColQ^{-/-} muscle cells and mice muscles. Interestingly, most obvious variations were upregulation of genes observed *in vitro* and in P30 muscles (Table 4 and 5). The most striking observation concerned the genes involved in the MuSK axis: AChE, AChR subunits, MuSK and LRP4. Because myogenic transcription factors are known to stimulate AChR and MuSK expression, the levels of their mRNA were analyzed. None of these genes were upregulated *in vivo* and *in vitro* suggesting that other factors are involved in this regulation (table6).

DISCUSSION

Lessons from the mRNA analysis

Here, we present the first study using microarrays and high output technique for gene profiling in an animal model of myasthenic syndrome and in a myogenic cell line deficient for ColQ. Two techniques, microarrays and TLDA were used to analyze the transcriptome of wt and ColQ-deficient muscles and cells in culture. Therefore an accurate comparison of the results based on these methods was possible. These techniques give similar results in terms of modifications and amplitudes of the changes in mRNA levels demonstrating the reliability of both methods. 95 mRNAs were selected for TLDA analysis *in vitro* and *in vivo*. The rationale for selecting these specific mRNAs was their relevance to the NMJ. The quantification by TLDA of 95 specific mRNAs expressed *in vitro* and *in vivo* reveals that the absence of ColQ induces rather modest differences in gene expression. Interestingly, mRNA levels were frequently oppositely regulated *in vitro* compared to *in vivo*. Most of the 95 genes analyzed *in vitro* were downregulated whereas *in vivo*, most of the same genes were upregulated. More, when regulation of mRNA levels was observed *in vitro*, changes were observed for the three time points analyzed. In contrast, *in vivo*, a percentage of changes were observed for only one of the two ages tested. All together, it suggests (1) that compensatory mechanisms occur *in vivo* that could be dictated by the nerve or/and the Schwann cell (2) that a dynamic process controls mRNA levels *in vivo*. mRNAs can be classified in three categories, those which are not differentially expressed, those which are upregulated and those which are downregulated in the absence of ColQ. Levels of mRNAs which are not modified are those coding for proteins involved in the structure of the muscle and its contractile properties. This seems to fit with the absence of defects in contractile properties of muscle-deficient for ColQ. *In vitro*, clusters downregulated mostly correspond to ECM and ECM receptors coding genes. Most of the mRNAs affected by the absence of ColQ are associated to functions relevant for the muscle or the NMJ or to muscle disorders associated with atrophy, dystrophy, myopathy or stress (mitochondrial metabolism).

Molecular profiling and phenotypic analysis of ColQ-deficient muscle

The expression of a number of genes coding for ECM, ECM modulator and ECM receptor proteins are modified *in vitro* and *in vivo*. It is worth noticing that ECM genes which are regulated *in vivo* are genes mostly expressed at the synapse. These results suggest that dystrophic signs such as necrosis, a switch from fast to slow fiber-types, fibrosis, regeneration

events, inflammation and increased mitochondrial metabolism could be detected. Some of these signs were indeed observed in muscles but were more or less pronounced according to the age and the identity of the muscle. In fact, muscles also exhibit several molecular or phenotypic hallmarks of atrophy. The variability observed in the severity of the signs is in agreement with previous data showing that the degree of muscle atrophy after denervation depends on muscle type (25). Atrophy is one of the features associated with a general syndrome called sarcopenia that is characterized by a loss of muscle mass and strength. This feature is associated with aging, muscle disuse, neurodegenerative diseases such as spinal muscular atrophy (SMA), amyotrophic lateral sclerosis (ALS) or denervation. In the ColQ-deficient mice, the frequently observed intrusion of Schwann cell in the synaptic space could be associated to a modification of the ECM and create a disconnection of the nerve and muscle similar to a denervation process. Our results support this hypothesis and explain the presence of atrophic signs. In this context, the beneficial effect of ephedrine on myasthenic patients with CMS-1c becomes more understandable (3, 26, 27). Ephedrine is a ligand of β 2-adrenergic receptor that has been shown to promote muscle growth and strength. The pathway used by this compound is still questionable but would stimulate the IGF-1/TGF- β system. We propose that ephedrine counteracts the myopathy associated to ColQ deficiency and strengthens the synapse connectivity. In this line, it is interesting that ephedrine treatment is also efficient in DOK-7 associated CMS, a pathology that is also characterized by myopathic defects (28). ColQ and Dok-7 CMS-1c share a common signaling pathway relying on MuSK. An intriguing question would be to explore the role of MuSK and the signaling cascade associated in the control of muscle mass. On the other hand, muscle atrophy has been associated to motoneuron loss in neurodegenerative diseases. This process could also be an issue in CMS-1c. In our *in vivo* study, the drastic upregulation of BDNF, a retrograde factor for motoneuron that potentiates neurotransmission might be meaningful in this context.

A set of synaptic mRNAs is upregulated *in vitro* and *in vivo*

One of the most striking effects revealed by this molecular study is the co-regulation of mRNAs accumulated at the muscle postsynaptic domain. These synaptic mRNAs are upregulated *in vitro* and whatever the age *in vivo*. All these mRNAs encode proteins that are expressed in the agrin/MuSK pathway. How could these mRNAs be co-regulated? The pathways that control synaptic mRNA expression involve neural secreted factors such as neuregulins and neural agrin (29). However these factors are not expressed *in vitro* in cell cultures except for a muscle form of agrin which is not significantly affected by the absence

of ColQ. Transcriptional activation of synaptic genes is mediated by an N-box, a cis element that binds transcriptional activators of the Ets family and that is present in all synaptic genes (30). However utrophin that also contains this element was not differentially expressed in the absence of ColQ raising the possibility that these genes are either not regulated by a transcriptional mechanism involving the N-box or some of these genes for unknown reason escape this common regulatory process. It has been shown that a number of synaptic genes are upregulated in denervated muscle and in some respect ColQ-deficient muscle share some phenotypic characteristics with denervated muscle. First, the Schwann cell that enwrapped the nerve terminal in the ColQ-deficient mice partially isolates the nerve from the muscle. Second, muscle atrophy is observed in the mutant mice. In denervated muscle, gene upregulation involves the activity of E-box, a cis element found in most of the synaptic genes. A class of transcription factors belonging to the MyoD family can regulate the expression of synaptic genes through the activation of E-box. These factors include MyoD, myogenin, myf5 and myf6 (also called MRF4). Among these factors, a molecular cascade leading to modifications of gene expression in denervated muscle has been deciphered. Denervation induces the expression of the myogenin gene through the inactivation of histone deacetylase 9 (HDAC9). In turn, myogenin binds E-box contained in muscle-specific genes and stimulates the expression of these genes (31). MEF2 transcription factors potentiate the activity of myogenic proteins and are necessary to activate muscle specific differentiation genes (32). Myogenic and MEF transcription factors crossregulate each others. Myogenin binds E-box in cooperation with MEF2c and the expression of MEF2c is stimulated by myogenin (33). Therefore myogenic factors can regulate the expression of synaptic genes. In our study and *in vitro*, myogenin and MEF2c are both upregulated consistent with the previously described pathway. However, *in vivo* at P7, the expression of myogenin and MEF2c was not significantly changed and MEF2c but not myogenin mRNA levels were significantly downregulated at P30. In conclusion, none of the myogenic mRNAs were upregulated both *in vitro* and *in vivo* which suggests that increased levels of synaptic mRNAs do not result from the activation of a myogenic pathway. Considering that ColQ is a ligand of MuSK, an attractive hypothesis would be that ColQ regulates the expression of synaptic mRNAs through this receptor. Recent data from our group supports this hypothesis (17). Two factors, 14-3-3 and erbin have been identified to bind MuSK and downregulate the levels of synaptic mRNAs (34-36). Whether one of these factors is involved and use a transcriptional mechanism or a regulation of mRNA stability remain to be investigated.

Comparative analysis with other myasthenic syndromes

Very recently, a comparative study of the transcriptome was performed on wt and AChE knock-out mice using affymetrix chips. The values of more than 28 000 transcripts were analyzed. Interestingly, the top functions of the most enriched clusters are related to fatty acid and lipid metabolism and to muscle contraction (37). This is not the case in our study in the absence of ColQ. AChE absence induces more stringent effect on mRNA levels compared to ColQ deficiency. Among the genes analyzed, only Syndecan-4, an ECM receptor was significantly differentially expressed in both mutant mice. More, PRiMA and ColQ mRNA levels were not significantly different in wt and AChE-deficient mice whereas AChE mRNA levels were highly upregulated in the absence of ColQ and PRiMA was downregulated at P30. Among the molecular partners of perlecan, sparse data have been obtained in a mouse model deficient in muscle perlecan. The study focus on the molecular events that underlie the muscle hypertrophy observed in these mutant mice. The authors show that fast muscles present an hypertrophy and a decreased expression of myostatin (38). Myostatin controls negatively the muscle mass and is expressed at higher levels in fast fibers (39) and loss of myostatin induces a switch from slow to fast phenotype. In ColQ-deficient mice, myostatin is downregulated *in vivo* at P7 but not significantly at P30 and upregulated *in vitro* at T1. Since myostatin is a negative regulator of muscle mass, it seems in contradiction with the loss of muscle mass (due to reduced number of fibers and the diameters of these fibers) observed in the ColQ-deficient mice.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank E. Girard for providing wt and ColQ-deficient mice and O. Bignolais and Audrey Donnart for help with TLDA experiments.

This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Association Française contre les Myopathies (AFM, Grants to C. L.), the Agence Nationale de la Recherche and Université Paris Descartes. S.M.S. is the recipient of a PhD grant from the French Ministry of Research and AFM. The authors declare that they have no competing financial interests.

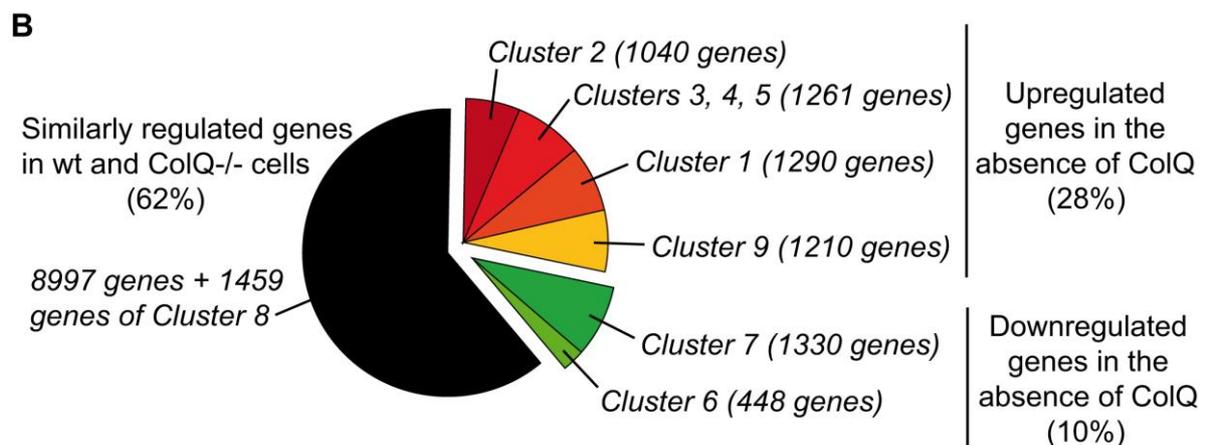
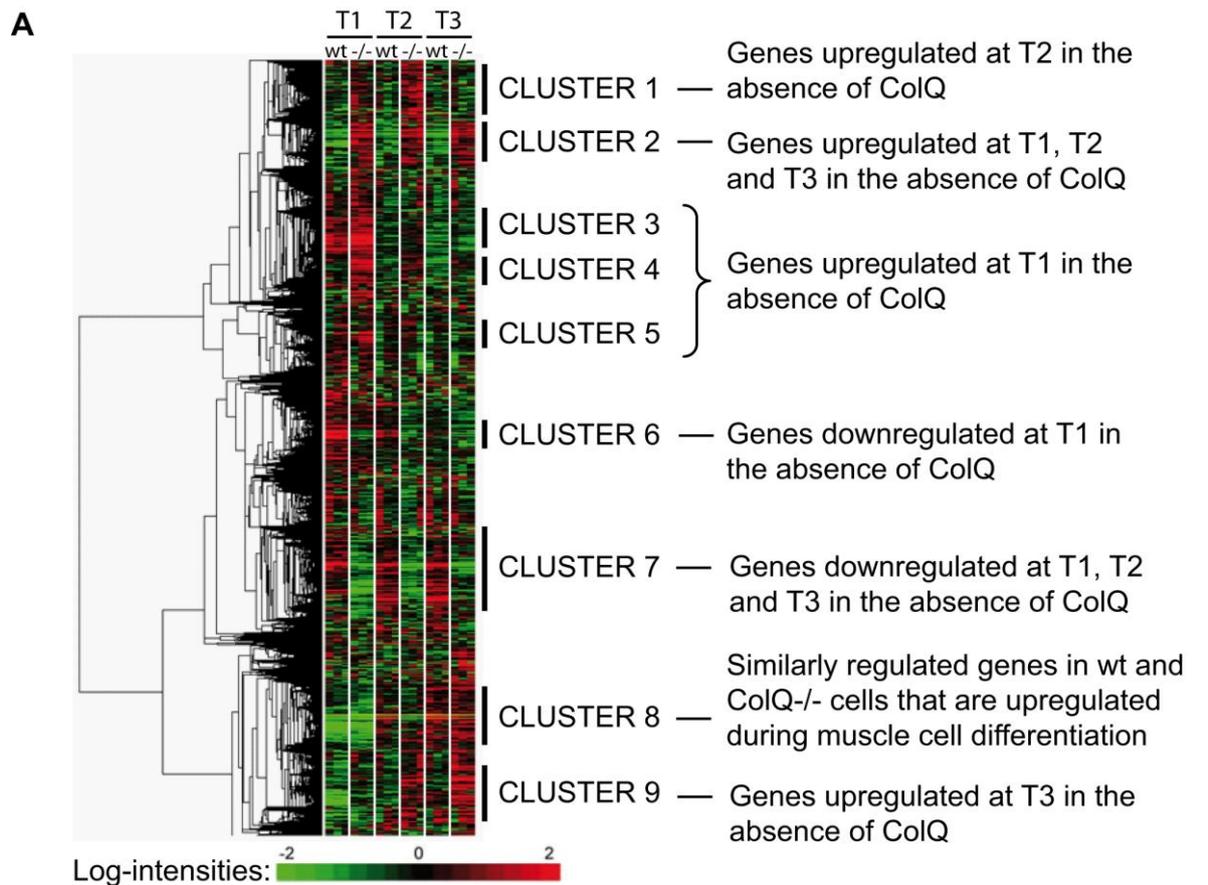


Figure1. Gene expression profile in wt and ColQ^{-/-} muscle cells at T1, T2 and T3

(A). Gene tree for the 32.000 genes analyzed in the mouse microarrays. The 6.579 genes differentially expressed between wt and ColQ^{-/-} (-/-) cells were classified in 8 clusters depending of there profile of expression (cluster 1-7 and 9). Cluster 8 represented genes that were similarly regulated between wt and ColQ^{-/-} cells and upregulated during muscle cell differentiation. (B). Classification of genes revealed that 62% of the genes were similarly regulated between wt and ColQ^{-/-} cells whereas 28% of the genes were upregulated and 10% downregulated in the absence of ColQ.

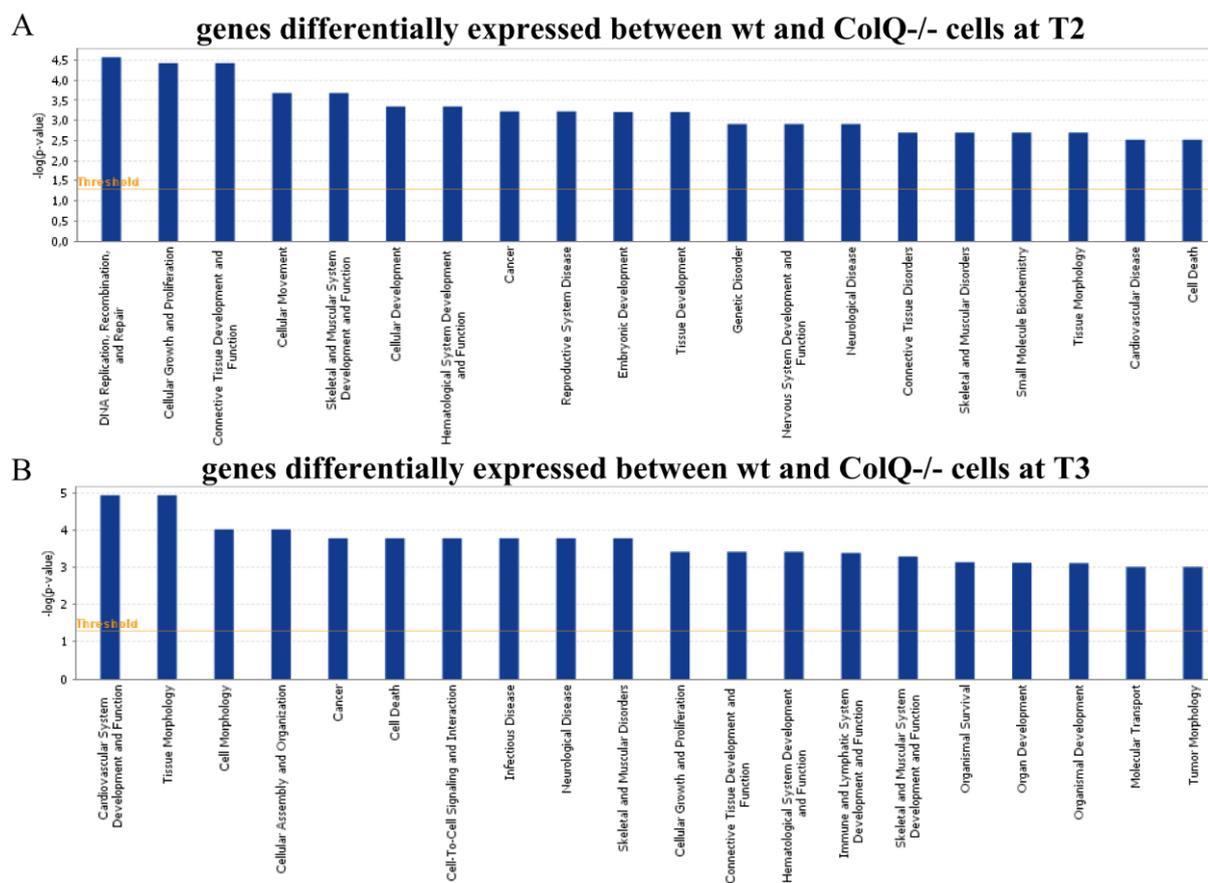


Figure2. Ingenuity top functions at T2 and T3 *in vitro*

(A). Genes differentially expressed between wt and ColQ^{-/-} cells at T2. (B). Genes differentially expressed between wt and ColQ^{-/-} cells at T3.

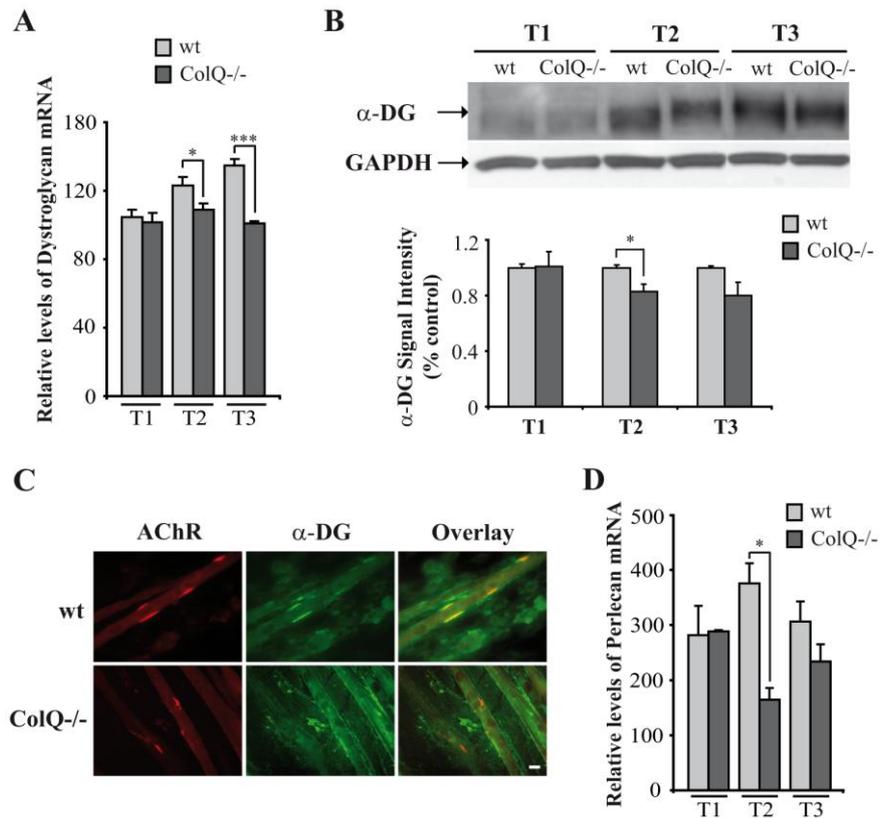


Figure3. Expression and activation of dystroglycan is controlled by ColQ

(A) Quantification of DG mRNAs in wt and ColQ^{-/-} cells at T1, T2 and T3 by real-time RT-PCR. Levels of mRNAs are represented as relative expression ($2^{-\Delta Ct}$ versus *SEC63* gene x 100). Unlike in wt myotubes, DG mRNA levels relative to Sec63 mRNAs was not upregulated during ColQ^{-/-} muscle cell differentiation. (B) Western blot (up panel) and quantification (bottom panel) of α-DG glycosylated form on wt and ColQ^{-/-} cells during muscle cell differentiation. GAPDH was used as a loading control. A 20% significant decrease of glycosylated α-DG was observed at T2 in the absence of ColQ. (C) AChR and DG clusters labeled respectively with Alexa-594 α-BTX and VIA4 antibody on T2 myotubes from wt and ColQ^{-/-} cells. α-DG and AChR clusters co-localization was less important in ColQ^{-/-} cells than in wt cells. (D) Quantification of perlecan mRNAs in wt and ColQ^{-/-} cells at T1, T2 and T3 by real-time RT-PCR. Levels of mRNAs are represented as relative expression ($2^{-\Delta Ct}$ versus *SEC63* gene x 100). A significant decrease of perlecan mRNAs was observed only at T2. Error bars show means ± SEM from four to five independent experiments. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; Mann Whitney's *U* test. Scale bar, 20 μm.

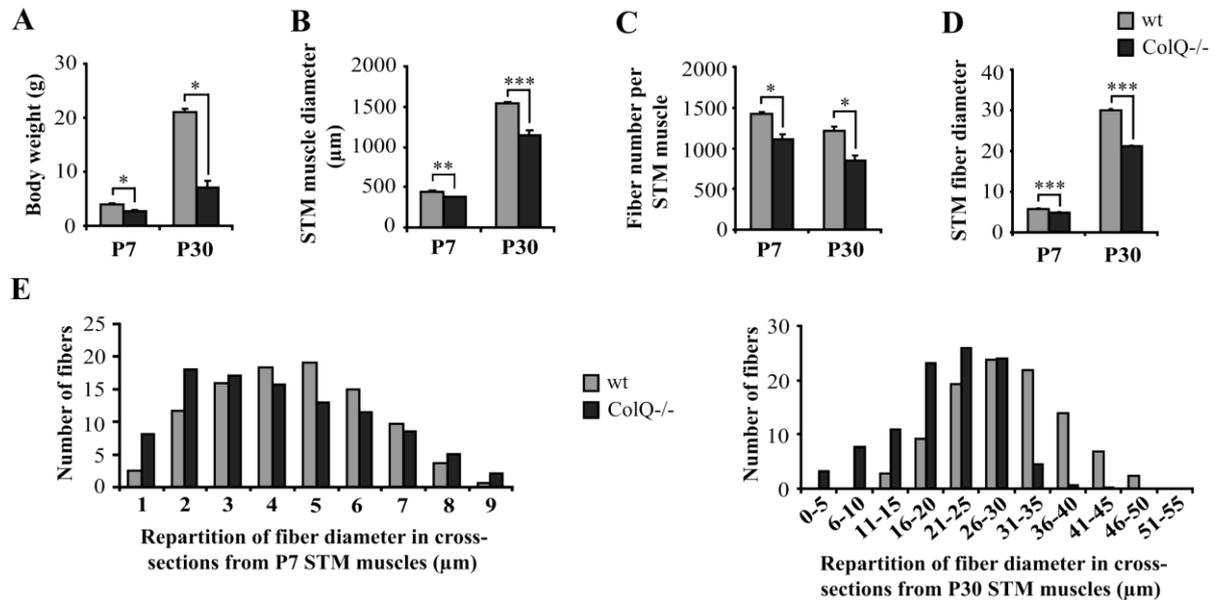


Figure 4. wt and ColQ^{-/-} mice phenotype and muscle morphology

(A) Weight of wt and ColQ^{-/-} mice at P7 and P30. ColQ-deficient mice were 30% smaller than wt littermates at P7 and 50% smaller at P30 (n=4 mice per group). (B) Representation of cross-sectional diameters of wt and ColQ^{-/-} STM muscles from P7 and P30 mice. (n=4 STM muscles per group). (C) Representation of the number of fibers per STM muscle in P7 and P30 wt and ColQ^{-/-} mice. ColQ-deficient STM muscles had less fibers than wt STM muscles both at P7 (-22%, $p < 0.05$) and P30 (-30%, $p < 0.05$), (n=4 STM muscles per group). (D) Representation of the mean of fiber diameter in STM muscles of P7 and P30 wt and ColQ^{-/-} mice. ColQ-deficient fibers were smaller than wt fibers both at P7 (-14%, $p < 0.001$) and P30 (-29%, $p < 0.001$), (n \geq 2000 STM muscle fibers per group). (E) Distribution of cross-sectional diameters of wt and ColQ^{-/-} fibers in P7 and P30 STM muscles. A small increase in fiber diameter variability was observed in ColQ^{-/-} STM muscles at P7 but not at P30 compared to wt STM muscles (n \geq 2000 STM muscle fibers per group). For quantifications (B-D), muscle and fiber contours were labeled with lectin-FITC antibody.

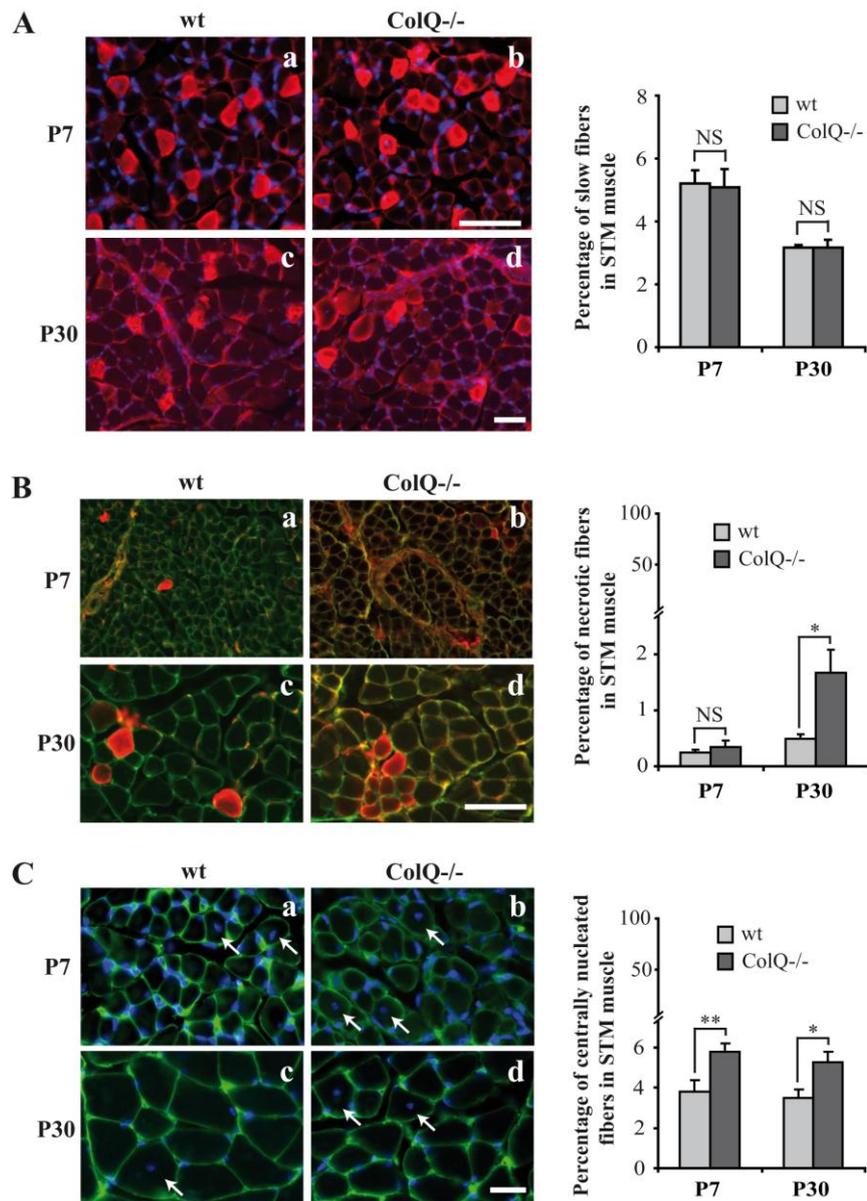


Figure 5. Dystrophic histological features in ColQ-deficient STM muscles

(A-C) Representative cross-sections of STM muscle from wt (a, c) and ColQ^{-/-} (b, d) mice at P7 (a, b) and P30 (c, d). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; Student's t test; $n \geq 3000$ muscle fibers per condition. (A) Slow fibers and nuclei were labeled respectively with MHC slow antibody and DAPI. Quantification of the percentage of slow fibers per STM muscle revealed no significant variation between wt and ColQ^{-/-} mice both in P7 and P30 muscles. Scale bar in b for a and b and scale bar in d for c and d, 50 μm . (B) Necrotic fibers and fiber contours were labeled respectively with Alexa 594 goat anti-mouse IgG antibody and lectin-FITC antibody. Quantification of the percentage of necrotic fibers per STM muscle showed no significant increase in P7 STM muscles but a 239% significant increase in P30 STM muscle in the absence of ColQ. Scale bar in d for a-d, 50 μm . (C) Nuclei and fiber contours were labeled respectively with DAPI and lectin-FITC antibody. Quantification of the percentage of centrally nucleated fibers revealed increases of approximately 50% both in P7 and P30 ColQ^{-/-} STM muscles. Arrows indicate fibers with central nuclei. Scale bar in d for a-d, 25 μm .

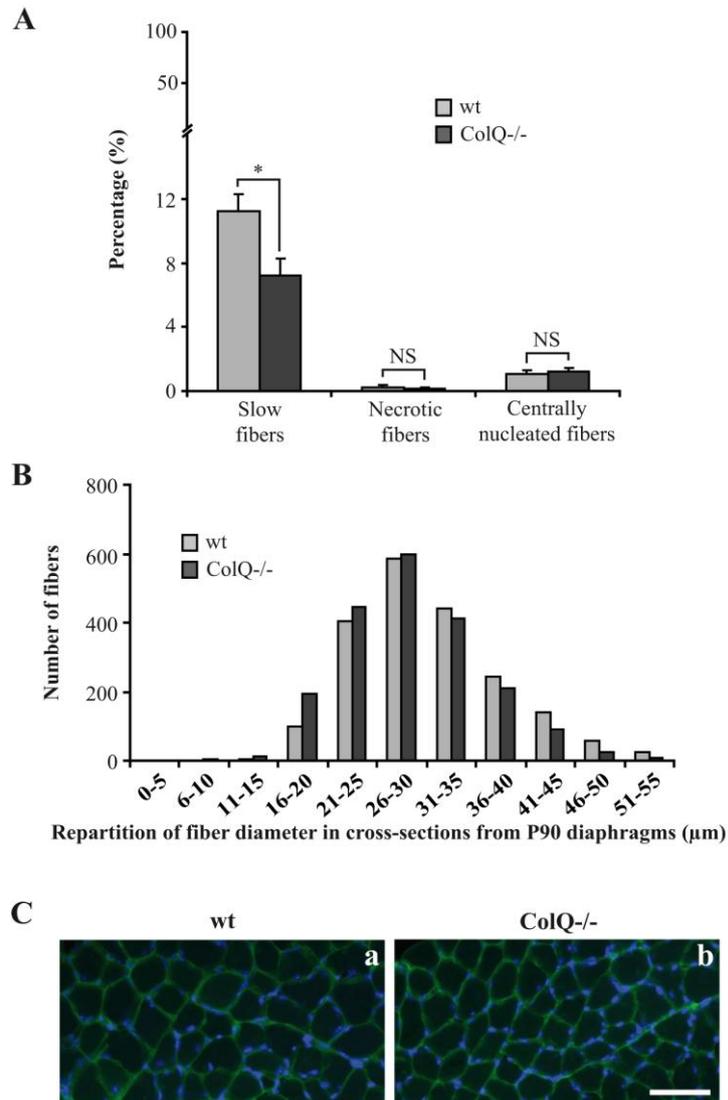


Figure6. Dystrophic histological features in ColQ-deficient P90 diaphragm

(A) Quantification of the percentage of slow fibers in P90 diaphragm muscles revealed a significant decrease of 35% between wt and ColQ^{-/-} mice. Quantification of the percentage of necrotic fibers in P90 diaphragm showed no significant variation in the absence of ColQ. Quantification of the percentage of centrally nucleated fibers revealed no difference in P90 diaphragm muscles that were deficient for ColQ (* $P < 0.05$). (B) Distribution of cross-sectional diameters of wt and ColQ^{-/-} fibers in P90 diaphragms. A 35% decrease in fiber diameter was observed in the absence of ColQ but no variation in fiber diameter variability was detected. For quantifications (A-B), slow fibers were labeled with MHC slow antibody, necrotic fibers were detected using goat anti-mouse antibody and nuclei were stained with DAPI. Muscle and fiber contours were labeled with lectin-FITC antibody ($n \geq 2000$ fibers per group). (C) Nuclei and fiber contours were labeled respectively with DAPI and lectin-FITC antibody. No visual disorder of the fiber membrane and connective tissue could be detected in ColQ^{-/-} diaphragm (b) compared to wt diaphragm (a). Scale bar in b for a and b, 50μm.

Table1. ECM genes downregulated in the absence of ColQ *in vitro* (Cluster 7)

Gene (Symbol)	Accession Number	Fold Change and Significance		
		RefSeq	T1	T2
1. ECM architecture components				
- Laminin				
Laminin β 1 (Lamb1) [#]	NM_008482.1	-1.40 **	-2.21 ***	-1.98 ***
- Collagens				
Collagen 2 α 1 (Col2a1) [#]	NM_031163.1	-3.32 **	-1.58 *	-1.75 *
Collagen 4 α 2 (Col4a2)	NM_009932.2	-1.39 *	-1.42 **	-1.68 *
Collagen 5 α 2 (Col5a2) [#]	NM_007737.1	-2.41 ***	-1.73 **	-1.53 **
Collagen 6 α 3 (Col6a3)		-11.4 ***	-2.18 ***	-1.47 ***
Collagen 7 α 1 (Col7a1) [#]	NM_007738.1	-1.61 *	-2.35 *	-4.13 ***
Collagen 8 α 1 (Col8a1)	NM_007739.1			
- Proteoglycans				
Glypican 4 (Gpc4)	NM_008150.1	-3.65 ***	-1.78 *	-1.14 *
Versican (Vcan)	NM_001081249.1	-3.77 ***	-2.52 ***	-2.48 ***
Decorin (Dcn) [#]	NM_007833.1	-60.4 ***	-31.0 ***	-23.3 ***
Asporin (Aspn)	NM_025711.2	-7.94 ***	-1.74 **	-1.79 **
Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein (Prelp) [#]	NM_054077.2	-16.2 ***	-7.10 **	-3.95 **
- Glycoproteins				
Microfibrillar-associated protein 2 (Mfap2)	NM_008546.2	-28.1 ***	-14.7 ***	-13.2 ***
Extracellular matrix protein 1 (Ecm1)	NM_007899.1	-3.36 **	-2.19 *	-1.5 *
Fibuline 5 (Fbln5)	NM_011812.2	-5.36 *	-2.76 *	-2.00 *
- Other				
Fraser syndrome 1 homolog (Fras1)	NM_175473.2	-2.60 **	-3.50 *	-1.16 *
2. ECM enzymes and modulators				
- Metalloproteases				
Matrix metalloproteinase 16 (Mmp16)	NM_019724.2	-7.74 **	-5.39 *	-2.86 *
Matrix metalloproteinase 19 (Mmp19)	NM_021412.1	-3.50 *	-1.19 *	-1.60 *
A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type1 motif, 2 (Adamts2)	NM_175643.1	-8.97 **	-2.34 *	-1.96 *
A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type1 motif, 5 (Adamts5)	NM_011782.1	-6.46 ***	-3.52 ***	-1.20 *
- Growth Factors and associated proteins				
Bone morphogenetic protein 4 (Bmp4) [#]	NM_007554.1	-23.7 ***	-4.29 ***	-3.20 ***
Fibroblast growth factor 7 (Fgf7) [#]	NM_008008.3	-5.19 ***	-7.96 ***	-6.36 ***
Brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) [#]	NM_007540.3	-3.05 ***	-4.36 ***	-4.75 ***
Latent transforming factor beta binding protein 1 (Ltbp1)	NM_206958.1	-1.14 *	-1.58 *	-1.79 **
Latent transforming factor beta binding protein 3 (Ltbp3)	NM_008520.1	-1.04 *	-1.27 *	-1.22 *
Latent transforming factor beta binding protein 4 (Ltbp4)	NM_175641.1	-6.19 *	-4.98 *	-6.10 *
Other				
Exostoses 1(Ext1)	NM_010162.1	-1.83 ***	-1.44 *	-1.12 *
Calsyntenin 1 (Clstn1)	NM_023051.1	-1.72 **	-1.41 **	-1.34 ***

gene expression variation confirmed by TLDA. Significance: *($P < 0.05$); **($P < 0.01$); ***($P < 0.001$).

Table2. Fold changes of ECM genes and Atrogenes in ColQ-deficient muscle

Gene (Symbol)	Accession Number RefSeq	Fold Change and Significance	
		P7	P30
1. ECM architecture components			
- Collagens			
Collagen 4 α 1 (Col4a1)	NM_009931.1	+1.54 *	+1.73
Collagen 4 α 2 (Col4a2)	NM_009932.2	+1.11	+1.68 *
- Proteoglycans			
Agrin (Agrn)	NM_021604.2	+1.35 *	+1.96 *
Biglycan (Bgn)	NM_007542.4	+1.04	+1.85 *
Glypican 1 (Gpc1)	NM_016696.1	+1.35 **	-1.40
- Glycoproteins			
Nidogen 1 (Nid1)	NM_010917.2	+1.35 **	+1.50 *
Fibronectin 1(Fn1)	NM_010233.1	+1.50 *	+1.04
2. ECM enzymes and modulators			
- Metalloproteases			
Matrix metalloproteinase 9 (Mmp9)	NM_013599.2	-1.08	-2.28 *
- Growth Factors and associated proteins			
Bone morphogenetic protein 1 (Bmp1)	NM_009755.2	-3.00 *	-1.38
Brain-derived neurotrophic factor (Bdnf)	NM_007540.3	+3.30 *	-1.04
Latent transforming factor beta binding protein 4 (Ltbp4)	NM_175641.1	+1.70 *	+1.31
Transforming growth factor beta 1 (Tgfb1)	NM_011577.1	+1.19	+2.70 *
Other			
Wingless-type MMTV integration site family, member 4 (Wnt4)	NM_009523.1	-1.16	-2.07 *
Like-glycosyltransferase (Large)	NM_010687.1	+1.53 *	+1.33
4. Atrogenes			
Myostatin (Mstn)		-1.81 **	-2.51 **

Significance: *($P < 0.05$); **($P < 0.01$).

Table3. Myosin Heavy Chain gene expression *in vivo* (In progress)

Gene (Symbol)	Accession Number RefSeq	Fold Change and Significance	
		P7	P30
MHC 2A (Myh2)			
MHC 2B (Myh4)			
MHC 2X (Myh1)			
MHC 1 (Myh7)			

Significance: *($P < 0.05$); **($P < 0.01$); ***($P < 0.001$).

Table4. Fold changes of synaptic genes in ColQ-deficient muscle cells *in vitro*

Gene (Symbol)	Accession Number	Fold Change and Significance			
		RefSeq	T1	T2	T3
1. Membrane receptors					
Acetylcholine receptor α 1 subunit (Chrna1)	NM_007389.2		+2.42 ***	+1.57 **	+1.02
Acetylcholine receptor β 1 subunit (Chrnbl)	NM_009601.3		+1.59 ***	+1.25 *	-1.25 *
Acetylcholine receptor δ subunit (Chrnd)	NM_021600.2		+2.67 ***	+1.34 *	+1.23
Acetylcholine receptor γ subunit (Chrng)	NM_009604.2		+3.28 ***	+2.08 ***	+1.52 ***
Acetylcholine receptor ϵ subunit (Chrne)	NM_009603.1		+6.04 *	+2.06 **	+2.61 ***
Low density lipoprotein receptor-related protein 4 (Lrp4)	NM_172668.2		+1.38 *	+1.19	+1.22 *
Muscle specific kinase (MuSK)	NM_010944.1		+2.45 ***	+1.39 *	+1.03
Proline rich membrane anchor 1 (Prima1)			+1.08	+1.11	-6.71 **
2. ECM components					
Acetylcholinesterase (AChE)	NM_009599.3		+2.04	-1.24	+2.17 ***
Collagen 4 α 1 (Col4a1)	NM_009931.1		-1.39	-1.30	-1.13
Collagen 4 α 2 (Col4a2)	NM_009932.2		-1.39	-1.42 **	-1.68 *
Laminin α 4 (Lama4)	NM_010681.1		+1.17	+1.50 *	+1.28
Laminin β 2 (Lamb2)	NM_008483.2		+1.18 *	+1.30 **	1.06
Nidogen 2 (Nid2)	NM_008695.1		-1.69 ***	-1.69 ***	-1.83 ***
Perlecan (Hspg2) [£]	NM_008305		+1.02	-2.29 *	-1.31
3. Receptors of the ECM components					
Dystroglycan (Dag1)	NM_010017.3		-1.03	-1.13 *	-1.38 ***
Integrin α 7 (Itga7)	NM_008398.1		+1.69 **	+1.57 ***	+1.44 **
Integrin β 1 (Itgb1)	NM_010578.1		-1.11	-1.07	+1.01
Sarcoglycan α (Sgca)	NM_009161.1		-1.07	-1.03	-1.21
Sarcoglycan β (Sgcb)	NM_011891.2		+1.15	-1.07	-1.06
Sarcoglycan δ (Sgcd)			-1.64 **	-2.28 **	-1.43 *
Sarcoglycan ϵ (Sgce)	NM_011360.2		-1.27	-1.16	+1.05
Sarcoglycan γ (Sgcg)			+2.36 ***	+1.31 **	+1.31 **
Sarcospan (Sspn)			+2.00	+1.37 *	-1.07
4. Intracellular components					
Dystrobrevin α (Dtna)	NM_207650.1		+1.21	-1.31	-1.2 *
Dystrobrevin β (Dtnb)	AK085675.1		-1.31	+1.31	+1.27
Dystrophin (Dmd)	NM_007868.1		-1.04	-1.59 *	+1.47
Rapsyn (Rapsn)	NM_009023.1		+2.09 ***	+1.55 *	+1.27 *
Syntrophin α 1 (Snta1)	NM_009228.1		+1.88	+1.77	+1.81 *
Tumorous imaginal discs 1 (Tid1)			+1.20 **	+1.79 *	+1.40
Utrophin (Utrn)	NM_011682.3		+1.20	-1.01	+1.17
5. Other					
Cluster of differentiation 24 (Cd24)			-1.52 ***	+1.38 *	+1.31 **

gene expression variation confirmed by TLDA. £ gene expression analyzed by SyBR Green RT-PCR. Significance: *($P < 0.05$); **($P < 0.01$); ***($P < 0.001$).

Table5. Fold changes of synaptic genes in ColQ-deficient muscle *in vivo*

Gene (Symbol)	Accession Number	Fold Change and Significance	
		RefSeq	P7
1. Membrane receptors			
Acetylcholine receptor α 1 subunit (Chrna1)	NM_007389.2	+1.43 *	+1.54 **
Acetylcholine receptor β 1 subunit (Chrnbl)	NM_009601.3	+1.19 *	+1.17
Acetylcholine receptor δ subunit (Chrnd)	NM_021600.2	+2.24 *	+3.81 **
Acetylcholine receptor γ subunit (Chrng)	NM_009604.2	+1.04	+2.66**
Acetylcholine receptor ϵ subunit (Chrne)	NM_009603.1	-1.19	+1.85 *
Low density lipoprotein receptor-related protein 4 (Lrp4)	NM_172668.2	+1.00	+1.52 **
Muscle specific kinase (MuSK)	NM_010944.1	+1.04	+1.37 *
Proline rich membrane anchor 1 (Prima1)		+1.34	-1.55 *
2. ECM components			
Acetylcholinesterase (AChE)	NM_009599.3	+2.03 ***	+1.93 *
Laminin α 4 (Lama4)	NM_010681.1	+1.40 *	+1.10
Laminin α 5 (Lama5)	NM_001081171.2	+1.04	+1.41
Laminin β 2 (Lamb2)	NM_008483.2	+1.16	-1.07
Nidogen 2 (Nid2)	NM_008695.1	-1.02	+1.93 *
Perlecan (Hspg2)	NM_008305	+1.43	+2.04 *
3. Receptors of the ECM components			
Dystroglycan (Dag1)	NM_010017.3	+1.07	+1.12
Integrin α 7 (Itga7)	NM_008398.1	+1.10	+1.19 *
Integrin β 1 (Itgb1)	NM_010578.1	-1.03	+1.22
Sarcoglycan α (Sgca)	NM_009161.1	+1.15	-1.05
Sarcoglycan δ (Sgcd)	NM_011891.2	+1.46	-1.01
Sarcoglycan ϵ (Sgce)	NM_011360.2	+1.42	+1.19
Sarcoglycan γ (Sgcg)		+1.26	+1.20
Sarcospan (Sspn)		+1.08	-1.09
4. Intracellular components			
Downstream of kinase 7 (Dok7)	NM_172708.3	+1.02	+1.43 *
Dystrobrevin α (Dtna)	NM_207650.1	+1.17	+1.02
Dystrobrevin β (Dtnb)	AK085675.1	+1.34	+1.61
Dystrophin (Dmd)	NM_007868.1	+1.64	+1.28
Rapsyn (Rapsn)	NM_009023.1	+1.08	-1.35 *
Syntrophin α 1 (Snta1)	NM_009228.1	+1.09	+1.01
Syntrophin β 1 (Sntb1)		-1.09	+1.50
Syntrophin β 2 (Sntb2)		+1.33 *	+1.92 **
Utrophin (Utrn)	NM_011682.3	+1.45	+1.61

Significance: *($P < 0.05$); **($P < 0.01$); ***($P < 0.001$).

Table6. Myogenic genes and regulators of myogenic factors *in vitro* (A) and *in vivo* (B)

A.

Gene (Symbol)	Accession Number	Fold Change and Significance		
	RefSeq	T1	T2	T3
Myogenic factors				
Myocyte enhancer factor 2b (Mef2b)		+1.18	+1.49	-1.17
Myocyte enhancer factor 2c (Mef2c)		+1.29 **	+1.38 **	-1.16
Myocyte enhancer factor 2d (Mef2d)		-1.22	+1.10	+1.85
Myogenic factor 5 (Myf5)		+1.42	-3.24 ***	+1.02
Myogenic factor 6 (Myf6)		-1.51	+1.03	+1.08
Myogenic differentiation 1 (Myod1)		-1.25	+1.06	-1.04
Myogenin (Myog)		+2.01 ***	+1.53 ***	+1.36 **
Paired box genes				
Paired box 1 (Pax1)		+1.39 *	+1.35	+1.03
Paired box 2 (Pax2)		-1.66	+3.33 **	+1.08
Paired box 7 (Pax7)		-18.2 *	-39.4 ***	-65.7 ***

Significance: **($P < 0.01$); ***($P < 0.001$).

B.

Gene (Symbol)	Accession Number	Fold Change and Significance	
	RefSeq	P7	P30
Myogenic factors			
Myocyte enhancer factor 2c (Mef2c)		+1.03	-1.46 *
Myogenic factor 5 (Myf5)		+1.17	+1.46
Myogenic factor 6 (Myf6)		+1.66 *	+1.10
Myogenic differentiation 1 (Myod1)		+1.28	-1.05
Myogenin (Myog)		+1.22	+1.26
Paired box genes			
Paired box 3 (Pax3)		+2.58	-13.36
Paired box 7 (Pax7)		+1.14	+1.19

Significance: *($P < 0.05$).

Supplemental data 1. Table of non significant fold changes of ECM genes in ColQ-deficient muscle *in vivo*

Gene (Symbol)	Accession	Fold Change and	
	Number	Significance	
	GenBank	P7	P30
1. ECM architecture components			
- Laminin			
Laminin α 2 (Lama2)		+1.10	+1.23
Laminin α 5 (Lama5)		+1.04	+1.41
Laminin β 1 (Lamb1)		+1.14	+1.32
Laminin β 2 (Lamb2)		+1.16	-1.07
- Collagens			
Collagen 6 α 1 (Col6a1)		+1.09	+1.16
Collagen 6 α 2 (Col6a2)		+1.11	+1.21
Collagen 6 α 3 (Col6a3)		+1.08	+1.60
Collagen 13 α 1 (Col13a1)		+1.21	+1.15
- Proteoglycans			
Glypican 4 (Gpc4)		-1.01	+1.33
Versican (Vcan)		+1.12	+1.95
Decorin (Dcn) [#]		-1.45	+1.23
Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein (Prelp) [#]		+1.26	+1.19
- Glycoproteins			
Sarcoglycan α (Sgca)		+1.15	-1.05
Sarcoglycan β (Sgcb)		+1.29	-1.28
Sarcoglycan δ (Sgcd)		+1.46	-1.01
Sarcoglycan ϵ (Sgce)		+1.42	+1.19
Sarcoglycan γ (Sgcg)		+1.26	+1.20
2. ECM enzymes and modulators			
- Metalloproteases			
Matrix metalloproteinase 2 (Mmp2)		+1.05	+1.04
A disintegrin and metalloproteinase domain 12 (Adam12)		-1.05	+1.38
A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type1 motif, 2 (Adamts2)		+1.40	+1.27
A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type1 motif, 5 (Adamts5)		-1.13	+1.22
- Growth Factors and associated proteins			
Fibroblast growth factor 6 (Fgf6)		+1.41	+1.99
Tgfb2		+1.01	+1.67
Tgfb3		+1.50	+1.12
Timp1		+1.65	+1.17
Other			
Wingless-type MMTV integration site family, member 1 (Wnt1)		+2.02	+3.02
Fukutin related protein (Fkrp)		+1.33	-1.18
Fukutin (Fktn)		-1.18	+1.10
Protein O-linked mannose b1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (Pomgnt1)		+1.01	-1.14
Protein-O-mannosyltransferase 1 (Pomt1)		-1.17	-1.11
Protein-O-mannosyltransferase 2 (Pomt2)		+1.06	+1.18
3. Receptors of the ECM components			
Dystroglycan (Dag)		+1.07	+1.12
Fibroblast growth factor receptor 1 (Fgfr1)		+1.37	+2.12
Integrin β 1 (Itgb1)		-1.03	+1.22
Syndecan 3 (Sdc3)		+1.32	+1.52

Significance: *($P < 0.05$); **($P < 0.01$); ***($P < 0.001$).

REFERENCES

1. Engel, A. G., and Sine, S. M. (2005) Current understanding of congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Pharmacol* 5, 308-321
2. Palace, J., and Beeson, D. (2008) The congenital myasthenic syndromes. *J Neuroimmunol* 201-202, 2-5
3. Mihaylova, V., Muller, J. S., Vilchez, J. J., Salih, M. A., Kabiraj, M. M., D'Amico, A., Bertini, E., Wolfle, J., Schreiner, F., Kurlemann, G., Rasic, V. M., Siskova, D., Colomer, J., Herczegfalvi, A., Fabriciova, K., Weschke, B., Scola, R., Hoellen, F., Schara, U., Abicht, A., and Lochmuller, H. (2008) Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes. *Brain* 131, 747-759
4. Krejci, E., Thomine, S., Boschetti, N., Legay, C., Sketelj, J., and Massoulie, J. (1997) The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J Biol Chem* 272, 22840-22847
5. Hantai, D., Richard, P., Koenig, J., and Eymard, B. (2004) Congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Neurol* 17, 539-551
6. Krejci, E., Legay, C., Thomine, S., Sketelj, J., and Massoulie, J. (1999) Differences in expression of acetylcholinesterase and collagen Q control the distribution and oligomerization of the collagen-tailed forms in fast and slow muscles. *J Neurosci* 19, 10672-10679
7. Dvir, H., Harel, M., Bon, S., Liu, W. Q., Vidal, M., Garbay, C., Sussman, J. L., Massoulie, J., and Silman, I. (2004) The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. *Embo J* 23, 4394-4405
8. Bon, S., Ayon, A., Leroy, J., and Massoulie, J. (2003) Trimerization domain of the collagen tail of acetylcholinesterase. *Neurochem Res* 28, 523-535
9. Cartaud, A., Strohlic, L., Guerra, M., Blanchard, B., Lambergeon, M., Krejci, E., Cartaud, J., and Legay, C. (2004) MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 165, 505-515
10. Kimbell, L. M., Ohno, K., Engel, A. G., and Rotundo, R. L. (2004) C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse. *J Biol Chem* 279, 10997-11005
11. Deprez, P., Inestrosa, N. C., and Krejci, E. (2003) Two different heparin-binding domains in the triple-helical domain of ColQ, the collagen tail subunit of synaptic acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 278, 23233-23242
12. Jacobson, C., Cote, P. D., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., and Carbonetto, S. (2001) The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J Cell Biol* 152, 435-450
13. Feng, G., Krejci, E., Molgo, J., Cunningham, J. M., Massoulie, J., and Sanes, J. R. (1999) Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol* 144, 1349-1360
14. Arikawa-Hirasawa, E., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., and Yamada, Y. (2002) Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci* 5, 119-123
15. Nicole, S., Davoine, C. S., Topaloglu, H., Cattolico, L., Barral, D., Beighton, P., Hamida, C. B., Hammouda, H., Cruaud, C., White, P. S., Samson, D., Urtizberea, J. A., Lehmann-Horn, F., Weissenbach, J., Hentati, F., and Fontaine, B. (2000) Perlecan,

- the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet* 26, 480-483
16. Stum, M., Davoine, C. S., Vicart, S., Guillot-Noel, L., Topaloglu, H., Carod-Artal, F. J., Kayserili, H., Hentati, F., Merlini, L., Urtizbera, J. A., Hammouda el, H., Quan, P. C., Fontaine, B., and Nicole, S. (2006) Spectrum of HSPG2 (Perlecan) mutations in patients with Schwartz-Jampel syndrome. *Hum Mutat* 27, 1082-1091
 17. Sigoillot, S. M., Bourgeois, F., Lambergeon, M., Strohlic, L., and Legay, C. (2010) ColQ controls postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 30, 13-23
 18. Sigoillot, S. M., Bourgeois, F., and Legay, C. (2010) Cholinesterases regulation in the absence of ColQ. *Chem Biol Interact*
 19. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354
 20. Pavlidis, P., Weston, J., Cai, J., and Noble, W. S. (2002) Learning gene functional classifications from multiple data types. *J Comput Biol* 9, 401-411
 21. Montanaro, F., Lindenbaum, M., and Carbonetto, S. (1999) alpha-Dystroglycan is a laminin receptor involved in extracellular matrix assembly on myotubes and muscle cell viability. *J Cell Biol* 145, 1325-1340
 22. Schofield, J. N., Gorecki, D. C., Blake, D. J., Davies, K., and Edwards, Y. H. (1995) Dystroglycan mRNA expression during normal and mdx mouse embryogenesis: a comparison with utrophin and the apo-dystrophins. *Dev Dyn* 204, 178-185
 23. Martin, P. T. (2003) Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle. *Glycobiology* 13, 55R-66R
 24. Stevenson, E. J., Giresi, P. G., Koncarevic, A., and Kandarian, S. C. (2003) Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *J Physiol* 551, 33-48
 25. Lowrie, M. B., Krishnan, S., and Vrbova, G. (1982) Recovery of slow and fast muscles following nerve injury during early post-natal development in the rat. *J Physiol* 331, 51-66
 26. Engel, A. G. (2007) The therapy of congenital myasthenic syndromes. *Neurotherapeutics* 4, 252-257
 27. Spillane, J., Beeson, D. J., and Kullmann, D. M. (2010) Myasthenia and related disorders of the neuromuscular junction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 850-857
 28. Lashley, D., Palace, J., Jayawant, S., Robb, S., and Beeson, D. (2010) Ephedrine treatment in congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7. *Neurology* 74, 1517-1523
 29. Sanes, J. R., and Lichtman, J. W. (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2, 791-805
 30. Mejat, A., Ravel-Chapuis, A., Vandromme, M., and Schaeffer, L. (2003) Synapse-specific gene expression at the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* 998, 53-65
 31. Mejat, A., Ramond, F., Bassel-Duby, R., Khochbin, S., Olson, E. N., and Schaeffer, L. (2005) Histone deacetylase 9 couples neuronal activity to muscle chromatin acetylation and gene expression. *Nat Neurosci* 8, 313-321
 32. Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F., and Olson, E. N. (1995) Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83, 1125-1136
 33. Wang, D. Z., Valdez, M. R., McAnally, J., Richardson, J., and Olson, E. N. (2001) The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. *Development* 128, 4623-4633

34. Strohlic, L., Cartaud, A., Mejat, A., Grailhe, R., Schaeffer, L., Changeux, J. P., and Cartaud, J. (2004) 14-3-3 gamma associates with muscle specific kinase and regulates synaptic gene transcription at vertebrate neuromuscular synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18189-18194
35. Huang, Y. Z., Wang, Q., Xiong, W. C., and Mei, L. (2001) Erbin is a protein concentrated at postsynaptic membranes that interacts with PSD-95. *J Biol Chem* 276, 19318-19326
36. Huang, Y. Z., Zang, M., Xiong, W. C., Luo, Z., and Mei, L. (2003) Erbin suppresses the MAP kinase pathway. *J Biol Chem* 278, 1108-1114
37. Lin, H. Q., Choi, R., Chan, K. L., Ip, D., Tsim, K. W., and Wan, D. C. (2010) Differential gene expression profiling on the muscle of acetylcholinesterase knockout mice: a preliminary analysis. *Chem Biol Interact* 187, 120-123
38. Xu, Z., Ichikawa, N., Kosaki, K., Yamada, Y., Sasaki, T., Sakai, L. Y., Kurosawa, H., Hattori, N., and Arikawa-Hirasawa, E. (2010) Perlecan deficiency causes muscle hypertrophy, a decrease in myostatin expression, and changes in muscle fiber composition. *Matrix Biol*
39. Carlson, C. J., Booth, F. W., and Gordon, S. E. (1999) Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol* 277, R601-606

IV. DOUBLECORTINE, UNE PROTEINE MUSCULAIRE ?

A. Introduction

Le cytosquelette joue un rôle crucial dans la formation de la jonction neuromusculaire à la fois dans la différenciation du motoneurone, la navigation du cône de croissance, l'établissement et la croissance du contact synaptique ou encore la plasticité dépendante de l'activité. Toutefois, un grand nombre de questions restent ouvertes. Comment les changements de dynamique du cytosquelette contrôlent la croissance et la différenciation coordonnées des éléments pré- et post-synaptiques ? Comment cette dynamique du cytosquelette affecte la distribution et le métabolisme des protéines synaptiques ? Comment les récepteurs sont-ils liés au cytosquelette ? Quels sont les signaux et les cascades moléculaires qui modulent les interactions entre les protéines synaptiques et les protéines du cytosquelette ?

Au cours de l'analyse globale du transcriptome des cellules musculaires par microarray, nous avons découvert que la doublecortine (DCX), une protéine exprimée principalement dans les neuroblastes en migration, est également exprimée par les cellules musculaires. La DCX est une MAP (*Microtubule-Associated Protein*) d'assemblage des microtubules ayant pour fonction de les nucléer et de les stabiliser. Cette protéine est essentielle pour le développement normal du cerveau. Les mutations dans le gène codant pour la protéine DCX sont responsables de la lissencéphalie de type I chez l'homme. Cette pathologie, caractérisée par l'absence de circonvolutions cérébrales, une structure anormale du cerveau résultant de défauts de migration des neurones et une désorganisation corticale associée à la présence de neurones anormaux, se manifeste par un retard mental, une épilepsie réfractaire et par des désordres de la motricité. Une souris déficiente pour la DCX a été générée par l'équipe de Jamel Chelly (Institut Cochin). Les souris DCX^{-/-} sont épileptiques et présentent des défauts de migration de certains neurones, en particulier ceux de l'hippocampe et des interneurones. De façon surprenante, les défauts sont relativement subtils au niveau du cerveau de cette souris ce qui limite l'utilisation de cette structure pour disséquer le mode d'action cellulaire de la DCX qui reste inconnu (Nosten-Bertrand et al., 2008). Nous avons donc entrepris une étude du phénotype de la souris mutante afin d'explorer la fonction éventuelle de la DCX dans le muscle et/ou à la jonction neuromusculaire (Sujet de recherche de Francine Bourgeois).

B. Principaux résultats obtenus

1. Expression de la DCX dans les cellules musculaires

L'analyse du transcriptome de la lignée de cellules musculaires MLCL sauvages établie au laboratoire a révélé la présence d'ARNm codant pour la DCX. De plus, l'expression de la DCX semble être régulée au cours de la différenciation musculaire puisque la quantité relative d'ARNm augmente entre les temps T1 et T2, puis diminue au temps T3 (T1 : fusion des myoblastes en myotubes ; T2 : apparition des agrégats de RnACh ; T3 : apparition des agrégats d'AChE (Sigoillot et al., 2010a) ; Figure 18A). L'analyse par western blot que j'ai réalisée a ensuite révélé que la protéine DCX est bien produite au niveau des cellules musculaires et cela aux trois temps de différenciation décrits précédemment. De plus, les niveaux de protéines semblent refléter le profil d'expression des ARNm, la quantité de protéines atteignant un pic à T2 (Figure 18B). Des analyses de RT-PCR nous ont permis de montrer qu'en plus d'être exprimée dans des cellules musculaires différenciées en culture, la DCX est également exprimée *in vivo* dans des muscles d'embryons aux stades E14 et E18. Contrairement aux protéines DCLK et DCLK2 (*Doublecortin-like kinase*), appartenant à la même famille que la DCX, la DCX n'est exprimée ni dans des myoblastes *in vitro*, ni dans le muscle adulte (Figure 18C). Ce profil d'expression suggère donc que la DCX est spécifiquement produite dans des cellules musculaires post-mitotiques en différenciation et au cours de la vie embryonnaire, en accord avec son profil d'expression neuronale (Francis et al., 1999). Ainsi, la DCX est régulée non seulement au cours du développement du cerveau mais également au cours du développement musculaire.

2. L'absence de la DCX engendre des défauts pré- et post-synaptiques

La DCX étant régulée au cours du développement musculaire embryonnaire, Véronique Bernard a réalisé une analyse morphologique de muscles d'embryons à E16.5 par microscopie électronique afin d'observer les éventuels défauts provoqués par l'absence de la DCX. Aucun défaut majeur de la structure du muscle n'a pu être observé chez les mutants déficients pour la DCX. En effet, les sarcomères sont semblables aux sarcomères d'embryons sauvages, les noyaux et le système sécrétoire sont normaux dans leur localisation, dans leur forme ainsi que dans leur abondance (Figure 19A).

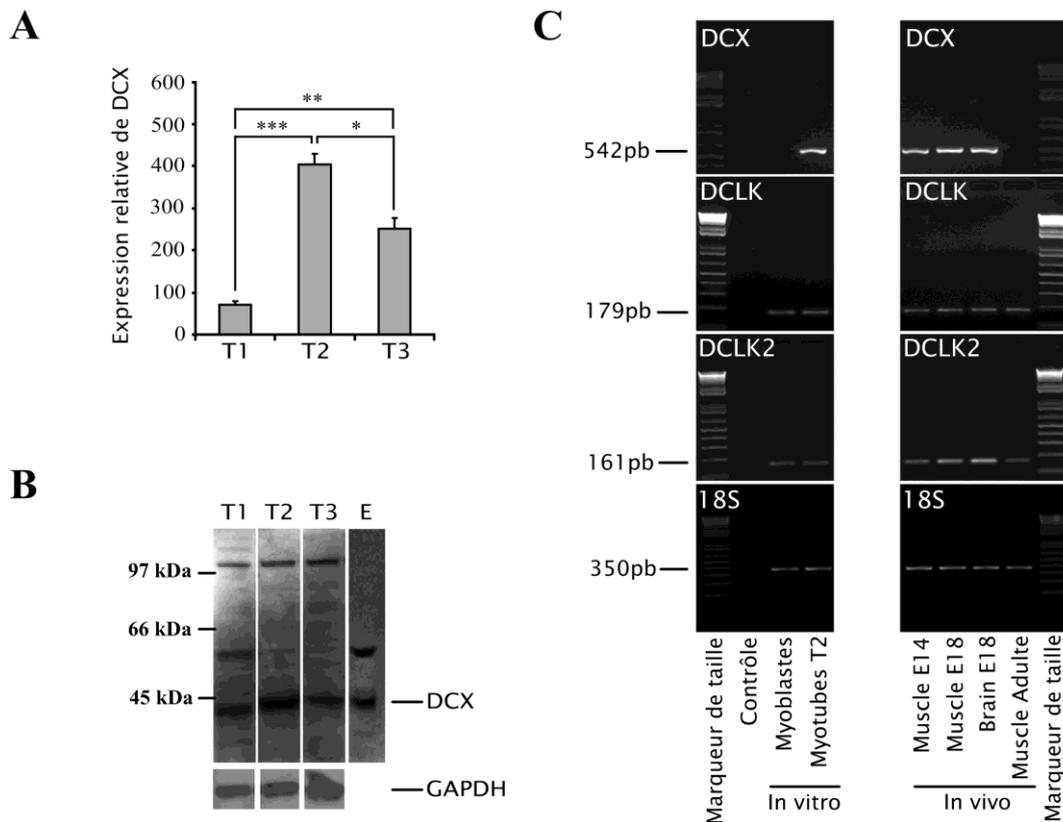


Figure 18. Expression de la DCX au cours du développement musculaire

A. Quantification par microarray des ARNm codant pour la DCX dans des myotubes en culture aux trois temps de différenciation musculaire T1, T2 et T3. Des ARNm codant pour la DCX sont exprimés dans les myotubes en culture, leur quantité augmentant entre T1 et T2 puis diminuant à T3. **B.** Western blot de la protéine DCX détectée grâce à un anticorps anti-DCX (produit au laboratoire de J. Chelly, Institut Cochin) aux trois temps de différenciation musculaire en culture. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de dépôt des échantillons. La protéine DCX est exprimée dans des myotubes aux stades T1, T2 et T3 selon le même profil que les ARNm. E, contrôle positif correspondant à un extrait total de protéines d'embryon. **C.** Gel d'agarose de la RT-PCR des ARNm codant pour la DCX, pour deux protéines de la même famille, DCLK et DCLK2 et pour le contrôle de RT-PCR 18S. La DCX n'est pas exprimée dans les myoblastes alors qu'elle l'est dans des myotubes différenciés à T2 en culture. La DCX est également exprimée dans des muscles embryonnaires à différents stades de différenciation (E14 et E18) et dans le cerveau à E18 mais pas dans le muscle adulte. DCLK et DCLK2 sont exprimées dans les myoblastes, myotubes, muscles embryonnaires et adultes. Contrôle : RT-PCR sans ADN.

Francine Bourgeois a ensuite analysé le phénotype des jonctions neuromusculaires au niveau de diaphragmes et de muscles intercostaux entiers d'embryons de souris mâles sauvages et $DCX^{-/-}$ à E16.5. Les terminaisons nerveuses et les agrégats de RnACh ont été analysés par immunofluorescence et visualisés par microscopie confocale (Figure 19B et 19C ; microscope Zeiss LSM-510, Z-step de $0.5\mu\text{m}$, objectif 40x). Les images ont été traitées grâce au logiciel image J et les quantifications réalisées à l'aide du plugin « 3D object counter » (Bolte and Cordelieres, 2006). Autant d'agrégats de RnACh contactés par les terminaisons axonales motrices ont été trouvés chez les embryons déficients pour la DCX et chez les embryons sauvages. Le nombre d'agrégats de RnACh, leur taille ainsi que leur densité en RnACh sont identiques chez les embryons $DCX^{-/-}$ comparés aux embryons sauvages de la même portée, que ce soit au niveau du diaphragme gauche ou du diaphragme droit (Figure 19C). Par contre, une augmentation significative d'environ 25% a été observée au niveau de la largeur de la bande d'agrégats de RnACh dans les diaphragmes gauche et droit ainsi qu'une augmentation de 80% au niveau des muscles intercostaux des embryons $DCX^{-/-}$ (Figure 19C). Dans ces deux types de muscles, le poids et la largeur des tissus sont identiques chez les embryons sauvages et mutants.

Afin de déterminer si des défauts pré-synaptiques sont associés aux défauts post-synaptiques observés, l'analyse du profil d'innervation a été réalisée sur les diaphragmes de ces mêmes embryons (Figure 19B). Cette étude a permis de mettre en évidence une différence d'innervation chez les mutants $DCX^{-/-}$ comparés aux sauvages. On remarque que les terminaisons axonales ne s'arrêtent pas toutes à leurs cibles, les agrégats de RnACh, mais continuent leur chemin dans le muscle sans trouver de nouveaux agrégats à innover. Ce défaut d'innervation a été quantifié sur des stacks d'images ($n=5$ à 9) choisies dans la région centrale du diaphragme, là où la bande synaptique est la plus large dans le tissu. Il y a 2.4 fois plus de terminaisons axonales ne s'arrêtant pas au niveau des agrégats de RnACh et continuant leur chemin de manière anormale chez le mutant $DCX^{-/-}$ que chez le sauvage (Figure 19B et 19C). Ainsi, l'analyse du phénotype de la souris mutante pour DCX révèle des défauts de formation de la jonction neuromusculaire au niveau pré- et post-synaptique, ouvrant la voie à une étude mécanistique.

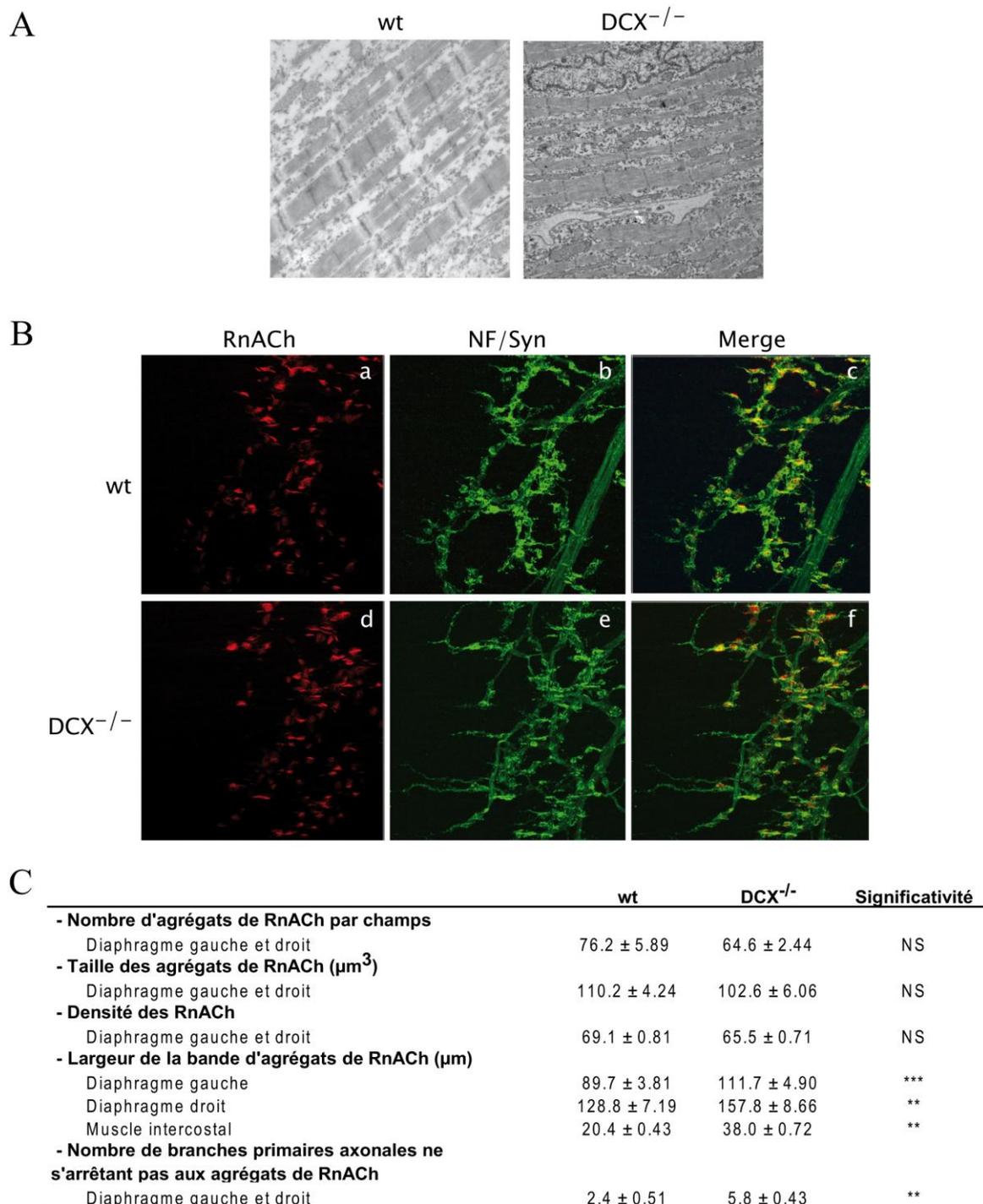


Figure 19. Les défauts pré- et post-synaptiques chez les embryons DCX^{-/-} à E16.5

A. Microscopie électronique réalisée sur des muscles d'embryons sauvages et déficients pour la DCX à E16.5. Aucune anomalie morphologique n'est observable en absence de DCX. **B.** Microscopie confocale (40X) réalisée en partie centrale de diaphragmes gauches sauvage (a-c) et déficient pour la DCX (d-f). Les agrégats de RnACh (a, d) et les axones (b, e) ont été marqués respectivement avec l' α -bungarotoxine Alexa 594 et les anticorps anti-neurofilament (NF) et anti-synaptophysine (Syn). **C.** Quantifications pré- et post-synaptiques dans des diaphragmes et muscles intercostaux d'embryons wt

et DCX^{-/-} à E16.5. Les variations significatives entre wt et DCX^{-/-} sont indiquées dans la colonne significativité (** P<0.01 ; *** P<0.001, NS : non significatif ; Test de Mann-Whitney). L'absence de DCX ne modifie pas significativement le nombre, la taille et la densité des agrégats de RnACh dans le diaphragme (5 à 9 stacks d'images au 40X prises dans la région centrale du tissu). Par contre, la largeur de la bande d'agrégats de RnACh augmente à la fois dans le diaphragme (+25%) et dans le muscle intercostal (+80%), tout comme le nombre d'axones ayant une croissance aberrante dans le diaphragme (+141%) (5 à 9 stacks d'images au 40X prises dans la région centrale du tissu).

3. Localisation et partenaires de la DCX dans les cellules musculaires

L'absence de DCX perturbant la structure de la jonction neuromusculaire au cours du développement, nous avons voulu savoir où se trouve la protéine DCX dans le muscle. Sa localisation a été déterminée sur des cellules musculaires MLCL sauvages en culture par immunofluorescence aux stades T1 et T2 de différenciation musculaire grâce aux anticorps anti-DCX. Aux deux temps de différenciation, la DCX est localisée dans les myotubes, autour des noyaux musculaires ainsi que dans des vésicules circulaires au niveau du cytoplasme, laissant penser que la protéine est présente dans le réticulum endoplasmique et/ou au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 20A). La même localisation est observée dans des muscles d'embryons (données non présentées). Afin de déterminer si la DCX est associée aux microtubules dans le muscle comme cela est le cas dans le cerveau, les myotubes ont été traités avec du nocodazole connu pour désorganiser les microtubules en dépolymérisant les filaments de tubuline. Les myotubes ainsi traités ont ensuite été marqués au moyen d'un anticorps anti- α -tubuline et de l'anticorps anti-DCX (données non présentées). Le nocodazole produit une dispersion du marquage de l' α -tubuline mais également de la DCX, laissant penser que la DCX est bien associée aux microtubules dans le muscle (Résultats à reconfirmer).

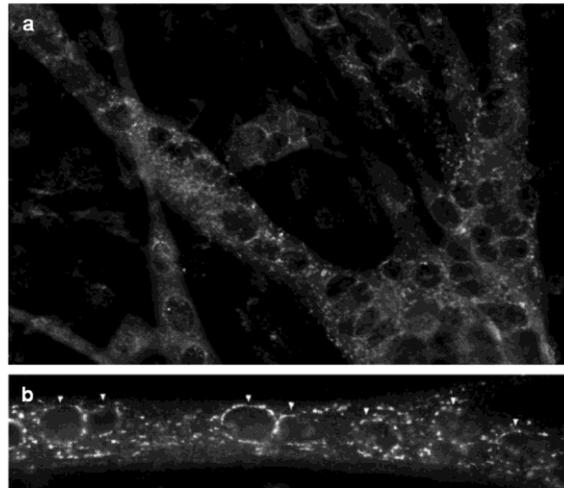
L'utilisation d'un criblage double hybride chez la levure a permis de montrer l'interaction de DCX avec les complexes de protéines adaptatrices adaptine 1 et 2 (AP-1 et AP-2) dans le cerveau embryonnaire de souris (Friocourt et al., 2001). Ces adaptateurs sont impliqués dans la sortie des protéines au niveau trans-golgien qui se fait de manière dépendante de la clathrine. Afin d'étudier plus précisément la localisation de la DCX dans le muscle, nous avons donc réalisé un co-marquage des cellules musculaires avec l'anticorps anti-DCX et un anticorps anti- γ -adaptine (AP-1), une protéine de l'appareil trans-golgien. Ces deux protéines co-localisent partiellement au niveau des vésicules cytoplasmiques et autour

du noyau. De plus, le traitement des myotubes par une drogue connue pour fragmenter l'appareil de Golgi, la brefeldine A, entraîne la dispersion dans le cytoplasme du marquage de la γ -adaptine mais aussi de la DCX. Même si ce résultat reste à reconfirmer, il semble donc que la DCX soit associée à la structure golgienne.

Dans les cellules musculaires, le réticulum endoplasmique forme des anneaux autour du noyau et des points de tailles variables au niveau du cytoplasme (Lu et al., 2001). Un grand nombre des éléments du réticulum endoplasmique sont localisés près des vésicules golgiennes. Les éléments du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi étant localisés près des sites de nucléation des microtubules, il est donc possible que la DCX soit impliquée dans le trafic entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi de manière dépendante des microtubules.

Afin de déterminer plus précisément le rôle de la DCX dans le muscle, j'ai réalisé une étude de ses partenaires. Pour cela, des cellules musculaires ont été transfectées avec une construction DCX-GFP et différenciées jusqu'au stade T2. L'extraction de protéines totales a été suivie d'une immunoprécipitation des protéines DCX-GFP grâce à des anticorps anti-GFP et les protéines immunoprécipitées avec la DCX-GFP ont été séparées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE 7%. Un échantillon contrôle a été transfecté avec la GFP seule et les protéines immunoprécipitées avec la GFP ont également été analysées sur gel (puits contrôle). Les protéines du gel ont ensuite été colorées à l'argent et les bandes correspondant aux protéines immunoprécipitées avec la DCX-GFP mais pas avec la GFP seule, ont été extraites du gel puis analysées par spectrométrie de masse (ESPCI ParisTech). Trois bandes ont ainsi été analysées (Bande N°1 à N°3 ; Figure 20B). La bande N°1 a révélé la présence de la protéine MAP1B (*microtubule-associated protein 1b*). La bande N°2 correspond aux protéines FXR1 (*Fragile X-mental retardation syndrome protein 1*), *clathrin interactor 1* et *actin-binding LIM protein 1*. Enfin, la bande N°3 comprend les protéines actine- α du muscle squelettique, UPF0027 et la coronine 6. La plupart de ces protéines interagissent avec les filaments d'actine ou les microtubules, suggérant donc fortement l'association de la DCX avec les microtubules dans le muscle.

A



B

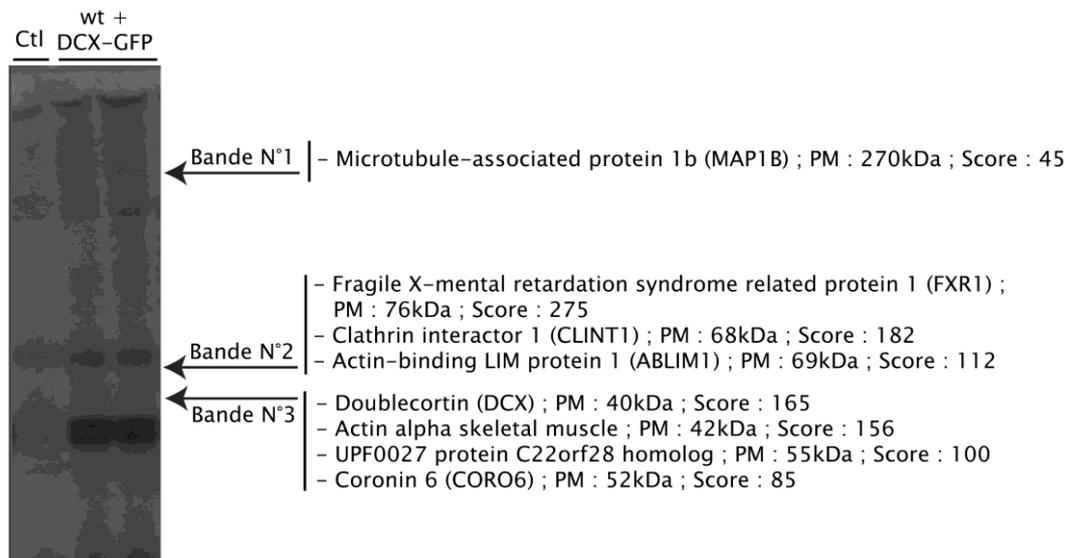


Figure 20. Localisation de la DCX et détermination de ses partenaires musculaires *in vitro*

A. La DCX a été marquée par un anticorps anti-DCX dans des myotubes au stade de différenciation musculaire T2. La DCX est localisée autour des noyaux (a ; b, flèches) et dans le cytoplasme (a, b) selon une distribution ressemblant à celle de l'appareil de Golgi et/ou du réticulum endoplasmique. **B.** Gel d'électrophorèse des échantillons protéiques de myotubes contrôles (Ctl) et transfectés avec la DCX-GFP (wt + DCX-GFP) à T2, coloré à l'argent. Trois bandes de protéines présentes dans les puits correspondant aux myotubes transfectés avec la DCX-GFP mais pas dans le puits contrôle ont été sélectionnées. L'analyse par spectrométrie de masse de chacune des bandes a révélé la présence de protéines immunoprécipitées avec la DCX.

C. Conclusion et Perspectives

1. DCX et le transport vésiculaire

Nous avons montré que la DCX est exprimée dans les cellules musculaires post-mitotiques en différenciation uniquement durant la vie embryonnaire, comme cela a été observé dans les neurones. Dans les cellules musculaires, la DCX est localisée autour des noyaux et dans des vésicules cytoplasmiques (vésicules du réticulum endoplasmique et/ou golgiennes). Au niveau des neurones, la DCX est associée aux microtubules mais aussi parfois accumulée aux points de jonction de l'actine ou aux points d'intersection entre microtubules (Tint et al., 2009). La DCX étant probablement associée aux microtubules dans le muscle, les résultats obtenus nous ont permis d'envisager le fait que la DCX soit impliquée dans le trafic entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi ou entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, de manière dépendante des microtubules. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à présent restent à confirmer. Il est également envisagé de réaliser d'autres expériences afin de confirmer l'association de la DCX au cytosquelette. Par exemple, nous comparerons la localisation de la DCX dans des cellules musculaires traitées avec une drogue affectant spécifiquement les microfilaments d'actine, la cytochalasine D. Nous ferons ensuite un double marquage des cellules musculaires ainsi traitées avec l'anticorps anti-DCX et la phalloïdine permettant la visualisation des microfilaments d'actine. L'association putative de la DCX avec les microtubules sera également testée par des méthodes biochimiques après des traitements permettant la séparation des compartiments solubles et appartenant au cytosquelette. Les cellules seront ainsi traitées avec des détergents afin de séparer les protéines solubles des protéines du cytosquelette contenues dans la fraction insoluble de détergent. La présence de la DCX dans ces deux compartiments sera ensuite analysée par western blot. L'utilisation de traitement au taxol sur des cellules musculaires en culture nous permettra également d'analyser par western blot la présence de la DCX dans des fractions enrichies en tubuline. Enfin, un co-marquage de la DCX et de BIP, un marqueur spécifique du réticulum endoplasmique, permettra de déterminer si la DCX est présente au niveau du réticulum endoplasmique tout comme elle semble être présente au niveau de vésicules golgiennes.

2. DCX et défauts d'innervation

Le défaut le plus caractéristique dû au déficit de la DCX chez des embryons à E16.5 concerne l'axone qui arrive au contact des agrégats post-synaptiques de RnACh mais qui continue de façon aberrante sa migration. Reste maintenant à savoir si cet effet est rétrograde, et donc dû à l'absence de DCX dans le muscle, ou antérograde et donc provoqué par l'absence de la DCX dans les motoneurones. Pour répondre à cette question, une étude d'hybridation *in situ* est envisagée afin de déterminer si la DCX est exprimée dans le motoneurone. Il serait également intéressant de savoir si la DCX musculaire est exprimée tout le long du muscle ou simplement à la jonction neuromusculaire, mais aussi de connaître la ou les formes de DCX présentes, c'est-à-dire phosphorylées ou non phosphorylées. En effet, la DCX neuronale a été rapportée comme co-existant dans des formes phosphorylées et non phosphorylées. Deux kinases exprimées dans les neurones, JNK et Cdk5 ont été montrées comme phosphorylant la DCX, régulant ainsi son affinité pour les microtubules (Lin et al., 2005; Reiner et al., 2006). JNK et Cdk5 étant également exprimées à la jonction neuromusculaire, il est donc envisagé de réaliser des expériences d'immunofluorescence grâce à des anticorps anti-DCX et des anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée de la protéine. Nous allons analyser la localisation des différentes formes de la DCX le long du muscle et à la synapse, et voir si l'utilisation d'inhibiteurs des deux kinases, ou à l'inverse leur stimulation, affecte le phénotype des jonctions neuromusculaires.

L'étude de l'innervation musculaire des souris déficientes pour DCX se poursuit maintenant avec l'analyse de la jonction neuromusculaire à différents stades de la vie embryonnaire et postnatale afin de voir si les défauts observés à E16.5 persistent ou si des processus compensatoires se mettent en place. Il est également envisagé de réaliser des tests d'exercice physique chez les jeunes souriceaux afin de déterminer quelle peut être l'incidence de tels défauts, même si aucun trouble évident de la motricité n'a à l'heure actuelle été observé chez les souris DCX^{-/-}. En parallèle, nous avons initié une étude comparative d'un mutant de la tubuline (*tuba1a*) et du mutant DCX. La logique de cette démarche est basée sur le fait que des mutations dans le gène TUBA1A entraînent également une lissencéphalie de type 1. Cependant, DCX est une protéine associée aux microtubules alors que *tuba1a* est une protéine de structure des microtubules. L'analyse comparée de ces deux mutants devrait donc nous apporter des informations sur les rôles communs et spécifiques de ces protéines au cours de la synaptogenèse. (Ce projet est réalisé en collaboration avec Fiona Francis (Institut du fer-à-moulin, Paris) et Jamel Chelly (Institut Cochin, Paris)).

3. DCX, une molécule régulée par ColQ ?

Au cours de l'analyse globale du transcriptome des cellules musculaires par microarray, nous avons non seulement découvert que la DCX est exprimée dans les cellules musculaires, mais aussi que l'absence de ColQ provoque une diminution très importante de son expression. Ainsi, la déficience en ColQ est responsable d'une diminution de plus de 80% de la quantité d'ARNm codant pour la DCX quel que soit le stade de différenciation des cellules musculaires (Figure 21). Si la DCX est impliquée dans le trafic vésiculaire dans le muscle, on peut alors se demander quels peuvent être les effets d'une telle diminution sur le transport de protéines synaptiques chez les mutants ColQ. De plus, lors de l'étude par spectrométrie de masse des partenaires de MuSK, récepteur tyrosine kinase spécifique du muscle, la DCX est apparue comme étant un partenaire potentiel bien que le score soit très bas. L'interaction de MuSK-DCX pourra être déterminée par immunoprécipitation de MuSK dans des extraits de protéines musculaires, suivie de l'analyse par western blot de MuSK et de la DCX. ColQ interagissant avec MuSK, ce dernier pourrait donc représenter un lien fonctionnel entre ColQ et la DCX.

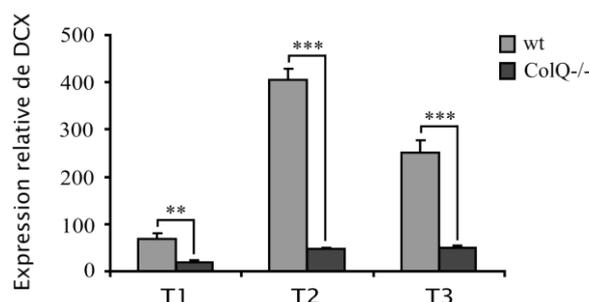


Figure 21. La DCX est sous-exprimée en absence de ColQ

Quantification par microarray des ARNm codant pour la DCX dans des myotubes sauvages et déficients pour ColQ en culture aux trois temps de différenciation musculaire T1, T2 et T3. La quantité d'ARNm codant pour la DCX est diminuée de 80% à 90% en absence de ColQ.

L'analyse des embryons DCX^{-/-} a permis de mettre en évidence des défauts plutôt pré-synaptiques que post-synaptiques. L'étude d'un rôle mécanistique encore jamais exploré de la DCX dans les motoneurons serait donc à envisager.

V. WNT4 ET LE GUIDAGE AXONAL A LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

A. Introduction

La jonction neuromusculaire se forme en trois étapes successives incluant la reconnaissance du muscle par le nerf, la différenciation synaptique et la maturation de la synapse. Précocement au cours du développement et juste avant que l'innervation ne se produise, un certain nombre de protéines s'agrègent dans la partie centrale des fibres musculaires pour former la « pré-empreinte » musculaire aboutissant à l'accumulation des RnACh (Lin et al., 2001; Yang et al., 2001). Cette « pré-empreinte » nécessite la présence du récepteur tyrosine kinase MuSK et de la protéine LRP4 (*low-density lipoprotein receptor related protein 4*) interagissant avec MuSK (DeChiara et al., 1996; Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008). Même si cet établissement d'un territoire semblant guider le nerf jusqu'au muscle est connu, les signaux musculaires impliqués dans le guidage du cône de croissance vers sa cible restent encore mal connus et peu étudiés chez le mammifère. Des expériences récentes montrent que MuSK est une molécule attractive dans ce processus (Zhang et al., 2004; Kim and Burden, 2008). Cependant seules des expériences effectuées chez le poisson zèbre montrent qu'une protéine interagissant avec MuSK, à savoir Wnt11r, est un élément attractif du cône de croissance (Jing et al., 2009). Les Wnts sont des glycoprotéines sécrétées régulant des processus variés au cours du développement du système nerveux central comme le guidage axonal et la différenciation synaptique (Salinas, 2005; Speese and Budnik, 2007; Korkut and Budnik, 2009). L'étude de l'expression des Wnts au niveau du muscle a révélé la présence d'un certain nombre d'entre elles et notamment celle de Wnt4. Wnt4 ayant un pic d'expression correspondant au moment de l'innervation du muscle, nous avons fait l'hypothèse que cette Wnt pourrait avoir un rôle dans une étape précoce de la formation de la jonction neuromusculaire, en particulier dans l'attraction du cône de croissance. L'innervation des fibres musculaires a donc été analysée par immunofluorescence sur des embryons de souris déficientes pour Wnt4.

B. Principaux résultats obtenus

Parmi le grand nombre de Wnts exprimée par le muscle, Wnt 4 est en plus régulé au cours du développement d'une manière qui peut laisser penser qu'il est impliqué dans l'innervation du muscle. En effet, dans la lignée de cellules musculaires sauvages MLCL,

l'expression de Wnt4 augmente entre le moment où les myoblastes fusionnent en myotubes et le moment où les agrégats de RnACh apparaissent, puis diminue quelques jours plus tard. Le pic d'expression de Wnt4 observé *in vitro* pourrait être corrélé au stade où le muscle commence à être innervé *in vivo*, soit quelques heures après la fusion des myoblastes en myotubes. L'analyse de l'expression de cette Wnt dans des muscles de souris à différents stades embryonnaires corrobore ce résultat puisque Wnt4 est fortement exprimée au stade E13.5 où apparaissent les premiers contacts synaptiques puis diminue au cours du développement de l'embryon.

Afin d'analyser le rôle potentiel de Wnt4 dans l'innervation musculaire, les axones, les terminaisons nerveuses ainsi que les agrégats de RnACh ont été marqués respectivement par des anticorps anti-neurofilament, anti-synaptophysine et par l' α -bungarotoxine dans différents muscles d'embryons sauvages et déficients pour Wnt4 à E18.5. Des défauts au niveau du nerf ont été observés chez les mutants Wnt4 comparés à des embryons sauvages. En effet, les axones des motoneurones observés chez des embryons sauvages se projettent à proximité du tronc nerveux principal et les terminaisons nerveuses sont directement juxtaposées aux agrégats de RnACh accumulés selon une bande synaptique étroite au centre du muscle. En revanche, chez des embryons déficients pour Wnt4, le tronc principal semble défasciculé et les axones se projettent bien au-delà de la bande centrale d'agrégats de RnACh, cette dernière étant plus large que dans des muscles sauvages. De plus, les agrégats de RnACh sont beaucoup plus gros en absence de Wnt4 et 30% d'entre eux ne sont pas innervés contre seulement 7% chez les sauvages. Ces défauts ne sont probablement pas le résultat de défauts post-synaptiques puisque l'analyse des embryons déficients pour Wnt4 montre (1) que la « pré-empreinte » musculaire est établie au stade E13.5 et (2) que la différenciation post-synaptique semble se dérouler correctement, l'AChE, MuSK et la rapsyne étant correctement localisés à la synapse à E18.5. Les défauts d'innervation observés en absence de Wnt4 et notamment la croissance des axones au-delà des agrégats de RnACh suggèrent donc que Wnt4 pourrait être un signal musculaire attractif pour le nerf.

Afin de tester l'effet attractif de Wnt4 sur la croissance des axones des motoneurones, des explants de la partie ventrale de la moelle épinière d'embryon à E13.5 ont été mis en culture à proximité d'agrégats de cellules COS-7 exprimant soit Wnt4-HA soit la protéine contrôle GFP. Dans les conditions contrôles, les axones s'étendent de façon homogène tout autour de l'explant. En revanche, les axones s'étendent préférentiellement en direction des

agrégats de cellules COS-7 produisant Wnt4-HA, indiquant que Wnt4 est capable d'attirer les cônes de croissance en développement, faisant de lui une protéine d'attraction pour les axones des motoneurones.

C. Conclusion et Perspectives

Les données obtenues à partir des souris déficientes pour Wnt4 montrent le rôle important de cette Wnt dans la reconnaissance du muscle par l'axone, Wnt4 étant un signal attractif dans le guidage axonale à la jonction neuromusculaire. Cependant, ces travaux et notamment le fait que seulement une partie des agrégats de RnACh ne soit pas innervée, suggèrent qu'un autre facteur coopère avec Wnt4 pour guider le cône de croissance vers le muscle. L'observation de la « pré-empreinte » musculaire chez le mutant Wnt4 révèle la présence de pré-agrégats plus petits et plus dispersés par rapport au sauvage. De même, chez le poisson zèbre mutant pour Wnt11, la « pré-empreinte » musculaire est fortement perturbée mais quand même présente. Plus tard, des défauts de guidage axonal sont également observés, les mutants Wnt11 présentant une croissance excessive des axones et une partie des agrégats de RnACh n'étant pas innervée (Jing et al., 2009). L'hypothèse est donc que Wnt4 et Wnt11 pourraient coopérer pour coordonner la différenciation du nerf et du muscle tôt au cours de la formation de la jonction neuromusculaire. Sachant que tout comme Wnt4, Wnt11 est exprimée préférentiellement au stade embryonnaire E13.5, il est donc envisagé d'analyser le phénotype du mutant Wnt11 en ce qui concerne l'innervation chez la souris et d'explorer le phénotype d'un double mutant Wnt4/Wnt11.

Les Wnts étant des protéines sécrétées, un récepteur est donc nécessaire à leur ancrage et à leur localisation. Plusieurs études réalisées chez le poisson zèbre et les mammifères montrent que MuSK est indispensable à l'attraction du cône de croissance vers la « pré-empreinte » musculaire (Zhang et al., 2004; Kim and Burden, 2008). De plus, MuSK possède dans son ectodomaine un domaine riche en cystéines (CRD), homologue du récepteur des Wnts, frizzled (DeChiara et al., 1996). Chez le poisson zèbre, Wnt11r a récemment été montrée comme étant le ligand du récepteur unplugged, homologue de MuSK chez cette espèce. L'interaction Wnt11r-unplugged se fait grâce au domaine CRD et permet l'organisation de la « pré-empreinte » musculaire et le guidage axonal (Jing et al., 2009). Cependant, aucune donnée ne décrivent l'identité d'un ligand précoce de MuSK pouvant être impliqué dans l'établissement de la « pré-empreinte » musculaire et dans le guidage du cône de croissance chez le mammifère. Les Wnts semblant être de bonnes candidates, il a

donc été envisagé que Wnt4 puisse interagir avec MuSK pour exercer son action attractrice sur le cône de croissance au centre du muscle, l'hypothèse étant que MuSK trapperait Wnt4 afin de créer une concentration locale de ce morphogène. Des données récentes d'hybridation *in situ* obtenues au laboratoire montrent que Wnt4 n'est pas exprimée dans le motoneurone, démontrant le rôle autocrine de Wnt4. De plus, des résultats d'immunoprécipitation ont également révélé une interaction directe entre MuSK et Wnt4. Cependant, comme cela a été envisagé, Wnt4 agit probablement en synergie avec un autre facteur. Si Wnt11 se révèle être ce facteur, il restera ensuite à savoir si Wnt11 interagit également avec MuSK chez la souris pour agir conjointement avec Wnt4 sur le guidage axonal.

Sachant qu'il existe deux types de fibres musculaires, les fibres lentes et les fibres rapides, une question peut également se poser : existe-t-il une spécificité de reconnaissance entre le cône de croissance et un type de fibre musculaire particulier ? Il a déjà été montré que les homéoprotéines Six sont impliquées dans le développement et la genèse de l'hétérogénéité des fibres musculaires. Ainsi, l'analyse du transcriptome du double mutant Six1/Six4 par puces à ADN a révélé que l'expression des gènes impliqués dans la formation des fibres rapides du muscle est spécifiquement réduite (Niro et al., 2010). Cette étude a également permis de mettre en évidence une réduction sévère de l'expression de Wnt4 en absence de Six1/Six4, suggérant une régulation de l'expression de Wnt4 par ces homéoprotéines. Le phénotype des jonctions neuromusculaires du double mutant Six1/Six4 a également été étudié par immunofluorescence à différents stades du développement embryonnaire. Tout comme chez le mutant Wnt4, des défauts importants d'innervation ont été observés, notamment au stade E18.5, avec 55% des agrégats de RnACh non innervés. Les défauts d'innervation présents chez les deux mutants pourraient donc être le résultat de l'absence ou de la faible expression de Wnt4. La restauration de Wnt4 chez les doubles mutants Six1/Six4 permettra de déterminer si la forte diminution d'expression de Wnt4 est à elle seule responsable des défauts observés ou si d'autres facteurs régulés par Six1/Six4 pourraient participer au phénotype du double mutant. Restera ensuite à savoir si les fibres musculaires non innervées chez le mutant Wnt4 sont des précurseurs des fibres rapides, pouvant révéler qu'un défaut d'innervation peut être lié à la perturbation des protéines chémo-attractives spécifiquement produites par ces fibres chez les embryons (Ce projet est réalisé en collaboration avec Pascal Maire, Institut Cochin).

D. Article en préparation

Title: Wnt4 controls the formation of the mouse neuromuscular junction

Abbreviated title: Wnt4 and neuromuscular junction

Authors and authors addresses:

Laure Stochlic¹, Séverine M. Sigoillot¹, Julien Falk², Francine Bourgeois¹, Perrine Delers¹, Valérie Castellani², Amanda Swain³ and Claire Legay¹

¹INSERM U686 and UMR CNRS 8194, Université Paris Descartes, France.

²UMR CNRS 5534, Université Lyon 1, Villeurbanne, France.

³Section of Gene Function and Regulation, Institute of Cancer Research, London, UK.

Corresponding author: Claire Legay

E-mail: claire.legay@univ-paris5.fr

Telephone: +33 1 42 86 20 68

Fax: +33 1 42 86 33 99

Key words: neuromuscular junction; Wnt4; nicotinic acetylcholine receptor; axon guidance; innervation.

Acknowledgments

The authors wish to thank D. Agalliu and T. Jessell for sharing their results with them. They also wish to thank F. Bacou for the Wnt4-HA construct, Bill Buaas and Jean-Maurice Petit for technical advices, Catherine Chevalier, Jean Léger et Remi Houlgatte for help with the microarray analysis. We also wish to thank H. Nawabi for help with the co-cultures. This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Université Paris Descartes. The authors declare that they have no competing financial interests.

Abstract

Identification of the local and early cues in synaptogenesis at neuromuscular junction (NMJ) is still poorly documented in mammals. One of the key pathways of synaptic connectivity is the Wnt signaling. Here, we report that Wnt4 is involved in muscle innervation. Wnt4 expression is regulated during muscle cell differentiation *in vitro* and muscle development *in vivo*, being highly expressed when the first synaptic contacts form and downregulated as muscle differentiation occurs. Analysis of the mouse Wnt4^{-/-} phenotype reveals that muscle pre-patterning is present as acetylcholine receptor (AChR) clusters are localized to the central region of the muscle at stage E13.5. However, profound innervation defects are observed in E18.5 mutant embryos with aberrant nerve branching and overgrowth of primary branches bypassing AChR aggregates. AChR cluster distribution is perturbed, the size of AChR clusters is dramatically increased and 30% of AChR clusters are not apposed to nerve terminals. Interestingly, Wnt4 is able to attract developing motor axons in a spinal cord/COS-7 cells coculture assay. Taken together, these data show that Wnt4 acts during the early step of mammalian NMJ formation and suggest a role in axon guidance.

Introduction

Neuromuscular junctions (NMJs) form in three steps that include specific nerve-muscle recognition, synaptic differentiation, and maturation of the synapse. Early during development and before innervation takes place, acetylcholine receptors (AChRs) are clustered in a central band of the muscle, a process called muscle prepatterning (Lin et al., 2001; Yang et al., 2001). AChR clustering before and following innervation requires a muscle specific kinase (MuSK) receptor and its co-receptor, the low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4), both located in the middle of the muscle (DeChiara et al., 1996; Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008). Innervation provides at least two factors, agrin and acetylcholine (ACh) released from motoneurons that reshape the size and distribution of AChR clusters (Sanes and Lichtman, 2001). Agrin binds the LRP4/MuSK complex, an association that mediates MuSK activation (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008). Activated MuSK induces signaling pathways and stimulates the clustering of synaptic proteins including AChR in the postsynaptic membrane (Strohlic et al., 2005). At the same time, agrin counteracts ACh-elicited dispersal of AChR clusters resulting in the removal of aneural AChR clusters and stabilization of the nerve associated AChR clusters (Lin et al., 2005; Misgeld et al., 2005).

Wnt molecules are secreted glycoproteins that regulate various developmental processes in the nervous system including axon guidance and synaptic differentiation (Salinas, 2005; Speese and Budnik, 2007; Korkut and Budnik, 2009). The main class of Wnt receptors is the seven-pass transmembrane Frizzled (Fz) receptors. In addition to these receptors, two tyrosine kinase receptors, Ryk/Derailed and ROR have been reported as non conventional Wnt receptors (Speese and Budnik, 2007). Importantly, MuSK contains within its extracellular domain a Fz-like cystein rich domain (CRD) homologue to the Wnt binding domain on Fz receptors (DeChiara et al., 1996). In vertebrates, there are little data regarding the roles of Wnts in NMJ formation. However, in zebrafish, Granato and co-workers showed that Wnt11r induces a signaling cascade that restricts the growth cone guidance to the central zone of the muscle (Jing et al., 2009). In mammals, several actors of the Wnt pathways such as Dishevelled (Dvl), β -catenin, APC, GSK-3 and Casein kinase 2 are accumulated at the NMJ and mutants generated for some of these molecules display abnormal AChR clustering (Strohlic et al., 2005; Korkut and Budnik, 2009). Moreover, Wnt3 and Wnt3a affect postsynaptic differentiation (Henriquez et al., 2008; Wang and Luo, 2008).

Here, we provide compelling evidence that Wnt4 plays an important role in muscle recognition by axons. Wnt4 is not required for muscle prepatterning. At a later stage, Wnt4

mutant mouse embryos exhibit profound NMJ innervation defects 1) aberrant nerve branching and overgrowth of primary branches across the muscle, bypassing AChR aggregates are observed 2) the width of the endplate band of AChR clusters is increased 3) the size of AChR clusters is dramatically increased and 4) 30% of AChR clusters are not apposed to nerve terminals. Interestingly, Wnt4 can attract developing motor axons *in vitro*. Taken together, these data show that Wnt4 is involved in the early steps of NMJ formation and suggest a role in axon guidance.

Materials and Methods

Mouse embryos and Antibodies

E13.5 and E18.5 embryos from Wnt4 mutant mice or control littermates (wt) were obtained from A. Swain (Jeays-Ward et al., 2004). Alexa Fluor® 488 conjugated goat anti-rabbit, goat anti-mouse monoclonal and α -bungarotoxin (α -BTX) Alexa Fluor® 594 conjugate were purchased from Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR). The mouse monoclonal anti-synaptophysin was purchased from Zymed (San Francisco, CA, 1/5). The rabbit polyclonal anti-neurofilament (1/2000) and the mouse monoclonal anti-HA (1/1000) were purchased from Chemicon (Temecula, CA) and Eurogentec (California, CA), respectively.

Muscle cell culture

The wt MLCL muscle cell line was generated and studied at 3 time-points T1, T2 and T3 as described previously (Sigoillot et al., 2010b; Sigoillot et al., 2010a).

Immunohistochemical analyses

For whole mount analyses, dissected intercostal or diaphragm muscles from E13.5 and E18.5 wt or Wnt4^{-/-} embryos were fixed in 1% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 90 min. Axons and nerve terminals were stained with antibodies against neurofilament and synaptophysin together with α -BTX to visualize AChR. For cross section analyses, limb muscles from E18.5 wt or Wnt4^{-/-} embryos were fixed in 1% paraformaldehyde for 1 hour at 4°C. Axons and AChR were stained on cross sections (12 μ m) as for whole mount immunostaining. For histological analysis, muscle sections were stained with hematoxylin/Eosin according to the manufacturer's instruction (Sigma-Aldrich, France). All images were collected on a microscope (model BX61; Olympus) equipped with a Fast 1394 Digital CCD FireWire camera (model Retiga 2000R; Qimaging) and a 40X objective or on a confocal microscope (Zeiss) equipped with a 40X or 20X objectives. Collected confocal image stacks and image capture were made using LSM Image Browser or ImageProPlus softwares (version 5.1). Confocal images presented are single-projected images derived from overlaying each set of stacks. The area of individual AChR clusters and the AChR endplate band width were measured using ImageJ (version 1.37c) software. The AChR endplate band width was delimited as previously described (Misgeld et al., 2002).

In situ hybridization

Intercostal muscles from E13.5 wt or *Wnt4*^{-/-} embryos were fixed in 4% paraformaldehyde and hybridized with a digoxigenin-labeled riboprobe directed against mRNAs encoding *Wnt4* (GenBank accession number NM_009523.1) and AChR α -subunit as described previously (Piette et al., 1993; DeChiara et al., 1996).

Microarray analysis

Total RNAs from stage E14 and E16 limb embryos as well as MLCL muscle cell culture (T1, T2 and T3 time points) were extracted as previously described (Sigoillot et al., 2010b). For microarray analysis, RNA from MLCL muscle cells were compared at T1, T2 and T3 (N=3 for each time point) using Applied Biosystems Mouse Genome Survey Microarrays, containing probes representing approximately 32,000 mouse genes from the public and Celera databases. 500 ng of total RNA was reversed transcribed generating a first strand cDNA then converted in cRNA (NanoAmp RT-IVT labeling Kit) and hybridized to the mouse microarray following the manufacturer's instructions. Chemiluminescence detection, image acquisition and analysis were performed using Applied Biosystems Chemiluminescence Detection Kit and Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer. The set of probes differentially expressed between T1, T2 and T3 time points were determined by Student test.

SyBR Green RT-PCR

SyBR Green RT-PCR experiments were performed as described previously (Sigoillot et al., 2010b). *Wnt4* QuantiTect primers were purchased from Qiagen.

Coculture Assays

Spinal cords were dissected out from E13.5 embryos in complete HBSS. After removal of Meninx, spinal cords were put in open-book configuration to remove dorsal (commissural) and floor plate regions. Ventral explants were co-cultured with COS-7 cell aggregates expressing *Wnt4*-HA or GFP in three-dimensional plasma clot as described previously (Castellani et al., 2000). Cultures were grown in Slice Overlay Medium supplemented with B27. After 24 h, co-cultures were fixed in 4% paraformaldehyde and scored as previously described (Castellani et al., 2000). Explants were imaged at 10X on Axiovert 200M (Zeiss) equipped with CoolsnapHQ (Roper Scientific). Composite image of Z-stack of phase images was generated in ImageJ with the Extended Depth-of-Field plug-in.

Results

Wnt4 is expressed in muscle and is regulated during muscle development

Using a microarray strategy, we analyzed the expression levels of mRNAs during muscle cell differentiation in culture at three different time points referred as T1, T2 and T3. The muscle cell line and the stages used have been previously described (Cartaud et al., 2004; Guerra et al., 2005; Sigoillot et al., 2010b; Sigoillot et al., 2010a). Briefly, the transition T1 to T2 can be correlated *in vivo* to the stage at which muscle begins to be innervated, a process that takes place in mice between E13.5 and E14 just after myoblast fusion into myotubes. The transition T2 to T3 corresponds to further maturation of muscle cell marked by the apparition of muscle cell contraction but has no equivalent *in vivo*. Results from the microarray and quantitative RT-PCR experiments revealed that Wnt4 mRNA levels were upregulated at T2 compared to T1 (3-fold) and then downregulated as muscle differentiation proceeded between T2 and T3 (Fig. 1A and B). The Wnt4 mRNA pattern of expression was also regulated *in vivo* during limb development. Indeed, Wnt4 mRNA was highly expressed at stage E13.5 and then downregulated at later stages of development (Fig. 1B). *In situ* hybridization performed on whole mount intercostal muscle from stage E13.5 mouse embryos confirmed that Wnt4 mRNA was expressed in muscle *in vivo* (Fig. 1C). However, whereas α -AChR mRNAs were localized in the central region of the muscle as previously described, Wnt4 mRNAs were expressed all along the muscle fibers (Fig. 1C and D). Taken together, the temporal pattern of Wnt4 mRNA expression during embryonic development and muscle cell differentiation *in vitro* suggests that Wnt4 could play a role in early synapse formation.

AChR pre patterning is present in Wnt4^{-/-} muscle

To explore the role of Wnt4 in NMJ formation, we analyzed the postsynaptic differentiation in Wnt4 mutant mice embryos. Since AChR clusters are localized in the central region of muscles before muscle innervation at E13.5, we wondered if pre patterned AChRs were present in the Wnt4 mutant at E13.5 (Lin et al., 2001; Yang et al., 2001). Whole mount intercostal muscles from E13.5 Wnt4^{-/-} embryos and control littermates were stained with neurofilament (NF) and synaptophysin (Syn) together with α -bungarotoxin (α -BTX) to observe nerve terminals and AChR. As expected at this early stage of development, no axon terminals contacted the muscle in wt and Wnt4 mutants. AChR clusters were observed in both wt and Wnt4^{-/-} muscles indicating that Wnt4 does not induce AChR pre patterning (Fig. 2A and B). However, AChR clusters appeared smaller and more dispersed in Wnt4 mutant

compared to wt suggesting that Wnt4 could participate in the establishment of muscle pre patterning (Fig. 2A and B).

No significant difference in the muscle limb mass of E18.5 Wnt4^{-/-} embryos compared with that of the control limb was found (data not shown). Arrangement and gross structure of muscle fibers as revealed by histological analysis of limb muscle sections, appeared to be unaltered in E18.5 Wnt4^{-/-} embryos suggesting that Wnt4 is not essential for myotube formation (Supplemental data).

Aberrant neuromuscular junction innervation in muscles of Wnt4^{-/-} embryos

Since AChR pre patterning is present in the absence of Wnt4, we next asked if NMJ formation proceeds normally in the Wnt4 mutant. We analyzed NMJ formation in three different muscle types (intercostal, diaphragm and limb) from E18.5 Wnt4^{-/-} embryos and control littermates. Whole mount muscles were stained with NF and Syn together with α -BTX (Fig. 3A-D). In control embryos, the projections of motor axons terminated close to the main nerve trunk and nerve terminals were directly juxtaposed to AChR clusters. The main nerve trunk of Wnt4^{-/-} embryos ran in the center of the muscle indicating that the positioning of the nerve is rather normal although it appeared defasciculated (Fig. 3B and D). However, branches extending from the nerve trunk of the Wnt4 mutant were longer compared to the control embryos, passing through and projecting beyond the central band of AChR clusters (Fig. 3B and D). The same phenotype was observed in intercostal (Fig. 3A and B) and diaphragm (Fig. 3C and D) muscles suggesting that loss of Wnt4 function causes muscle innervation defects that are not specific to muscle types.

Quantitative analysis of the postsynaptic defects observed in intercostal muscles revealed a change in AChR clusters distribution in Wnt4^{-/-} muscles. The surface area of AChR clusters in Wnt4 mutant was larger than that observed in wt embryos ($35\mu\text{m}^2$ in wt vs. $78\mu\text{m}^2$ in Wnt4^{-/-}; Fig. 3G). The width of the central band of AChR clusters was significantly broader in Wnt4 mutant ($120\mu\text{m}$ in wt vs. $160\mu\text{m}$ in Wnt4^{-/-}; Fig. 3G). To assess whether AChR clusters were normally innervated, we immunostained cross sections of limb muscles from Wnt4^{-/-} embryos or control littermates (E18.5) using NF/Syn antibodies together with α -BTX (Fig. 3E and F). Quantification analysis showed that in the Wnt4^{-/-} embryos, 30% of AChR clusters were not apposed to nerve terminals compared to 7% in wt embryos indicating that a large subset of synapses were not innervated (Fig. 3G). No obvious difference could be detected in the localization of acetylcholinesterase, MuSK and rapsyn proteins at the NMJ of limb muscle cross sections from stage E18.5 Wnt4 mutant compared to control embryos (data

not shown). This suggests that postsynaptic differentiation was qualitatively similar in control and Wnt4 mutant.

Wnt4 acts as an attractive cue for developing motor growth cones

Innervation defects prompted us to ask if Wnt4 could be an attractive guidance cue. To answer this question, we performed explant assay experiments using cocultures of ventral spinal cord explants with COS-7 cell aggregates expressing either Wnt4-HA or GFP control constructs (Fig. 4A-D). In the control condition, motor axons extended radially from the spinal cord explant and showed no preferential outgrowth direction (Fig. 4A, C and E). Motor axons grew toward the source of Wnt4-HA produced by COS-7 cells as indicated by a positive guidance index (+1.3) suggesting that Wnt4 is able to attract developing growth cones (Fig. 4B, D and E). Immunostaining using anti-HA antibody confirmed that Wnt4 was expressed by COS-7 cells aggregates (data not shown). Thus, the Wnt4 response is consistent with the idea that Wnt4 is an attractive axon guidance cue in NMJ formation.

Discussion

Our *in vivo* results show that loss of Wnt4 function results in aberrant neurite outgrowth and AChR clustering defects including an increase in AChR cluster size and AChR endplate band width. Similar axon behavior is observed in MuSK, LRP4 and agrin mutants (Gautam et al., 1995; DeChiara et al., 1996; Weatherbee et al., 2006). Among these mutants, MuSK has been shown to play an attractive role for the growth cone in zebrafish and mice (Zhang et al., 2004; Kim and Burden, 2008). Similarly, in our study, neurites are responsive to Wnt4 and grow toward a source of this specific Wnt. The postsynaptic defects are partially similar to other loss of function mutants affecting the cholinergic pathway such as the ChAT or CDK5 mutants (Fu et al., 2005; Lin et al., 2005; Misgeld et al., 2005). This common phenotype can be explained by the lack of ACh secretion or a defect in the ACh transduction system through CDK5. Therefore, in the absence of ACh or nerve endings, AChR clusters and the synaptic band are larger. However, in the cholinergic mutants and in contrast to Wnt4 mutant, the nerve terminals colocalized with AChR clusters at E18.5.

Taken together, several lines of evidence in our study support a role for Wnt4 in axon guidance at final destination. First, the temporal pattern of Wnt4 mRNA expression matches the timing of muscle innervation. Second, loss of Wnt4 function causes defects in axon pathfindings and a subset of AChR clusters are not innervated. Third, Wnt4 attracts the growth cone in an *in vitro* assay. Alternatively, the defects in presynaptic organization induced by loss of Wnt4 function could be the result of a lack or delay in motoneuron or muscle differentiation. However, the group of Jessell has shown that a redundancy between Wnt4 and Wnt5 insures that motoneurons differentiate and acquire proper connectivity in the spinal cord (Agalliu et al., 2009). Regarding possible defects in muscle differentiation, although Wnt4 has been reported to stimulate satellite cell proliferation and to modulate the ratio of fast to slow fibers in muscles (Anakwe et al., 2003; Takata et al., 2007), general observations of muscles in the Wnt4 mutant embryos did not reveal any gross disorganization of this tissue and different muscles were explored in this study exhibiting the same innervation defects.

What is the functional source of Wnt4? It has long been suggested that molecular cues in axon pathfindings are provided by the muscle and it has been demonstrated that Wnts act in retrograde signaling (Lewis et al., 1981; Burden, 2000). It is therefore tempting to postulate that Wnt4 produced by muscle cells mediates the control of muscle innervation. However, we cannot exclude that Wnt4 may also be produced by the motor nerve terminal or the Schwann

cell. As revealed by *in situ* hybridization experiments, mice motoneurons do not produce Wnt4 at least until E12 (D. Agalliu and T. Jessell, personal communication). But it still remains that Wnt4 expression could be upregulated in the next few days around the final stage of muscle innervation. It is unlikely that Schwann cells are involved in early steps of synaptogenesis since they follow neurite extension (Feng and Ko, 2008).

Several aspects of the Wnt4 mutant phenotype suggests that Wnt4 might act together with another partner sequentially or at the same time to fully coordinate nerve and muscle apposition in the early phase of NMJ formation. Our observations show that although Wnt4 might play a role in AChR prepatterning, it does not impair this process and that only a subset of AChR clusters are not innervated. In this context, it is interesting to compare the phenotypes of the Wnt4 mouse mutant and the zebrafish Wnt11r morphant. When Wnt11 is knockdown, AChR prepatterning although drastically reduced can still be detected (Jing et al., 2009). The same group also shows that the knockdown of unplugged/MuSK which binds Wnt11r leads to a total absence of AChR prepatterning suggesting that besides Wnt11, an other ligand of MuSK or an other complex organized by MuSK is involved in this process. No early ligand of MuSK has been so far identified but MuSK is required for AChR prepatterning in mammals (Kim and Burden, 2008). It is now tempting to speculate that Wnt4 together with another factor could bind MuSK to trigger locally an attractive zone in the muscle guiding motor axons to their final target destination and initiating the innervation process. Further experiments will be needed to identify the putative partner of Wnt4 and the specific Wnt4 receptors during NMJ development.

References

- Agalliu D, Takada S, Agalliu I, McMahon AP, Jessell TM (2009) Motor neurons with axial muscle projections specified by Wnt4/5 signaling. *Neuron* 61:708-720.
- Anakwe K, Robson L, Hadley J, Buxton P, Church V, Allen S, Hartmann C, Harfe B, Nohno T, Brown AM, Evans DJ, Francis-West P (2003) Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development* 130:3503-3514.
- Burden SJ (2000) Wnts as retrograde signals for axon and growth cone differentiation. *Cell* 100:495-497.
- Cartaud A, Strohlic L, Guerra M, Blanchard B, Lambergeon M, Krejci E, Cartaud J, Legay C (2004) MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 165:505-515.
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27:237-249.
- DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85:501-512.
- Feng Z, Ko CP (2008) The role of glial cells in the formation and maintenance of the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* 1132:19-28.
- Fu AK, Ip FC, Fu WY, Cheung J, Wang JH, Yung WH, Ip NY (2005) Aberrant motor axon projection, acetylcholine receptor clustering, and neurotransmission in cyclindependent kinase 5 null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15224-15229.
- Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, Sanes JR, Merlie JP (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377:232-236.
- Guerra M, Cartaud A, Cartaud J, Legay C (2005) Acetylcholinesterase and molecular interactions at the neuromuscular junction. *Chem Biol Interact* 157-158:57-61.
- Henriquez JP, Webb A, Bence M, Bildsoe H, Sahores M, Hughes SM, Salinas PC (2008) Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18812-18817.
- Jeays-Ward K, Dandonneau M, Swain A (2004) Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol* 276:431-440.
- Jing L, Lefebvre JL, Gordon LR, Granato M (2009) Wnt signals organize synaptic prepattern and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor. *Neuron* 61:721-733.
- Kim N, Burden SJ (2008) MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nat Neurosci* 11:19-27.
- Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH, Hubbard SR, Dustin ML, Burden SJ (2008) Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 135:334-342.
- Korkut C, Budnik V (2009) WNTs tune up the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* 10:627-634.
- Lewis J, Chevallier A, Kieny M, Wolpert L (1981) Muscle nerve branches do not develop in chick wings devoid of muscle. *J Embryol Exp Morphol* 64:211-232.
- Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, Sanes JR, Lee KF (2001) Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410:1057-1064.

- Lin W, Dominguez B, Yang J, Aryal P, Brandon EP, Gage FH, Lee KF (2005) Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron* 46:569-579.
- Misgeld T, Kummer TT, Lichtman JW, Sanes JR (2005) Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11088-11093.
- Misgeld T, Burgess RW, Lewis RM, Cunningham JM, Lichtman JW, Sanes JR (2002) Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* 36:635-648.
- Piette J, Huchet M, Houzelstein D, Changeux JP (1993) Compartmentalized expression of the alpha- and gamma-subunits of the acetylcholine receptor in recently fused myofibers. *Dev Biol* 157:205-213.
- Salinas PC (2005) Retrograde signalling at the synapse: a role for Wnt proteins. *Biochem Soc Trans* 33:1295-1298.
- Sanes JR, Lichtman JW (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2:791-805.
- Sigoillot SM, Bourgeois F, Legay C (2010a) Cholinesterases regulation in the absence of ColQ. *Chem Biol Interact*.
- Sigoillot SM, Bourgeois F, Lambergeon M, Strohlic L, Legay C (2010b) ColQ controls postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 30:13-23.
- Speese SD, Budnik V (2007) Wnts: up-and-coming at the synapse. *Trends Neurosci* 30:268-275.
- Strohlic L, Cartaud A, Cartaud J (2005) The synaptic muscle-specific kinase (MuSK) complex: new partners, new functions. *Bioessays* 27:1129-1135.
- Takata H, Terada K, Oka H, Sunada Y, Moriguchi T, Nohno T (2007) Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle. *Dev Dyn* 236:2800-2807.
- Wang J, Luo ZG (2008) The role of Wnt/beta-catenin signaling in postsynaptic differentiation. *Commun Integr Biol* 1:158-160.
- Weatherbee SD, Anderson KV, Niswander LA (2006) LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 133:4993-5000.
- Yang X, Arber S, Williams C, Li L, Tanabe Y, Jessell TM, Birchmeier C, Burden SJ (2001) Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* 30:399-410.
- Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L (2008) LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 60:285-297.
- Zhang J, Lefebvre JL, Zhao S, Granato M (2004) Zebrafish unplugged reveals a role for muscle-specific kinase homologs in axonal pathway choice. *Nat Neurosci* 7:1303-1309.

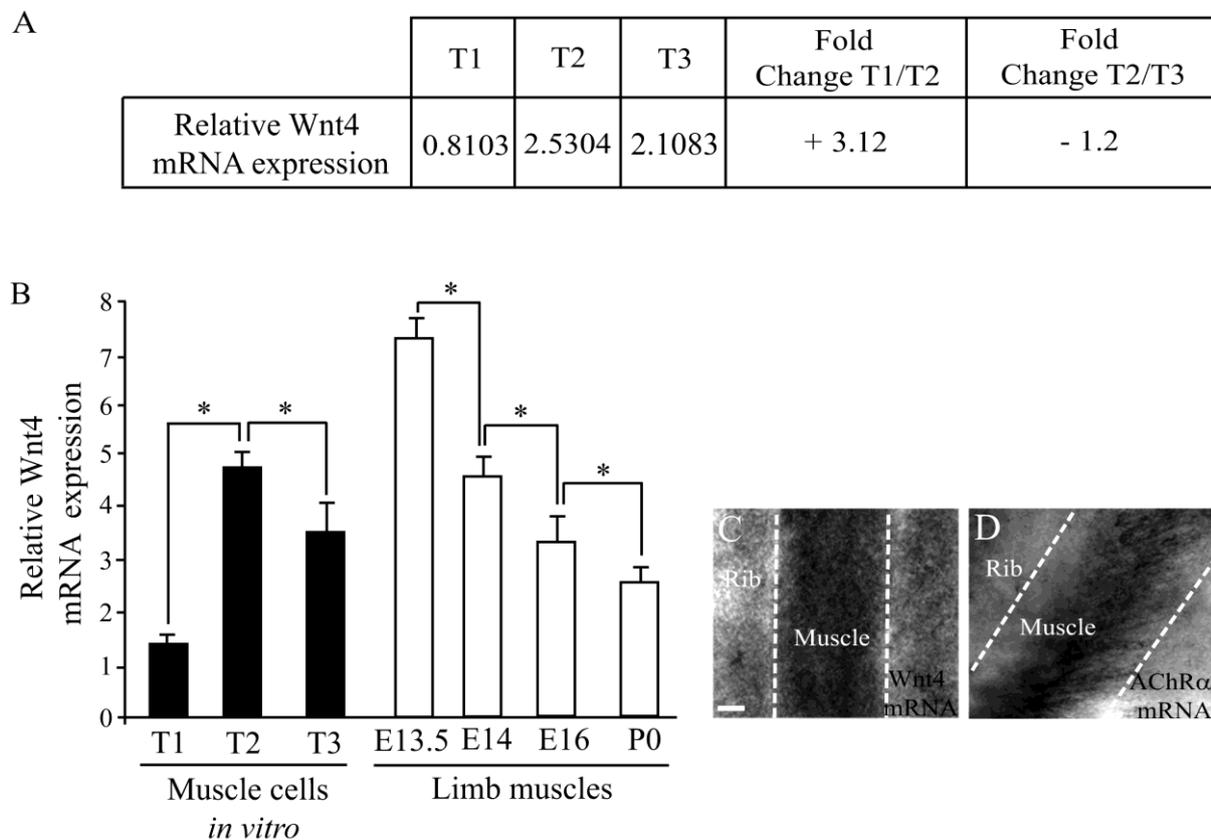


Figure 1: Wnt4 is expressed in muscle and is regulated during muscle development

(A) Table showing results of the microarrays data comparing relative Wnt4 mRNA expression during myotube differentiation. (B) Real time RT-PCR quantification of relative Wnt4 mRNA expression during myotube differentiation and limb development (N=6). Results are represented as relative expression ($2^{-\Delta Ct}$ versus reference gene x 100). (C, D) Wnt4 (C) and AChR α (D) mRNAs expression in whole mount intercostal muscles from E13.5 wt mouse embryos (N=3). The positions of the ribs and muscle are indicated and separated by dashed lines. Error bars show means \pm SEM from three independent experiments. * $P < 0.005$; Mann-Whitney U test. Scale bar: in C, 20 μ m for C and D.

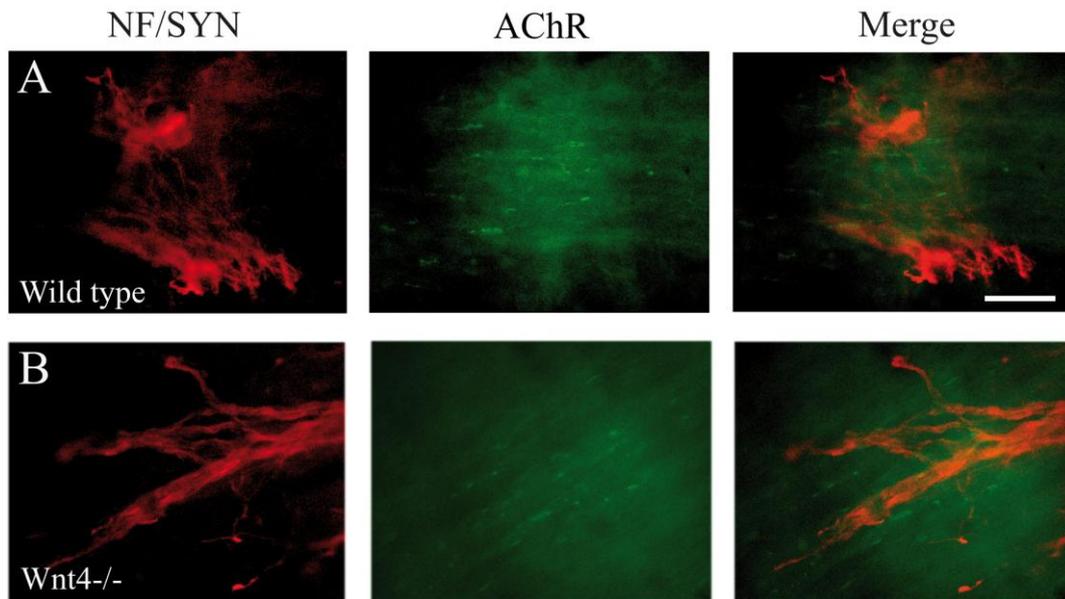


Figure 2: AChR prepatterning is present in Wnt4^{-/-} embryos

Confocal images of whole mount intercostal muscles from E13.5 wt (A) or Wnt4^{-/-} embryos (B) stained with neurofilament (NF, red) and synaptophysin (Syn, red) antibodies together with α -bungarotoxin (AChR, green). N=2 Wnt4^{-/-} and N=4 wt embryos. Scale bar in the merged image in A, 30 μ m for A and B.

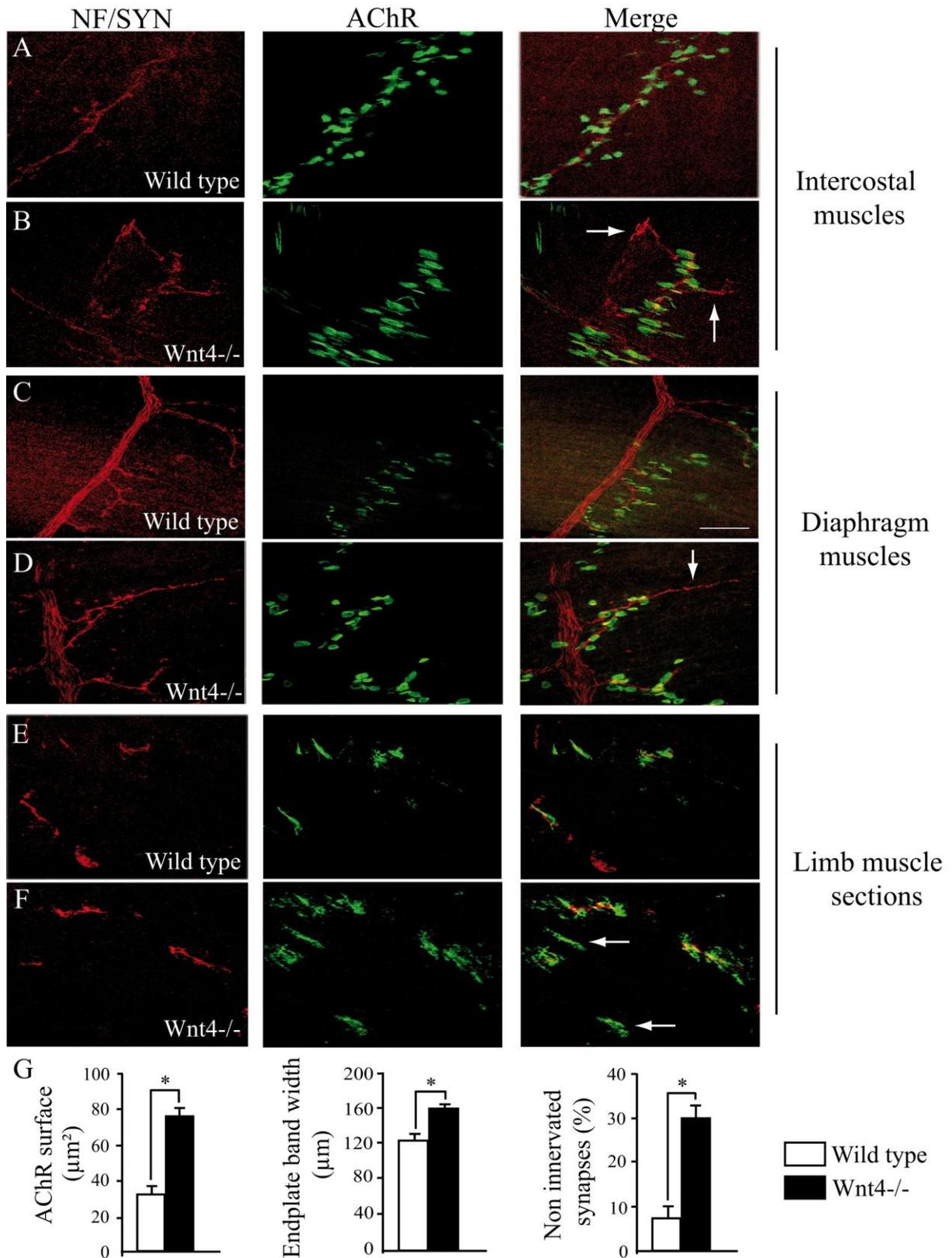


Figure 3: Aberrant neuromuscular junction innervation in muscles of *Wnt4*^{-/-} embryos
 (A-F) Confocal images of whole mount intercostal muscles (A-B), diaphragm muscles (C-D) or cross sections of limb muscles (E-F) from E18.5 wt (A, C and E) or *Wnt4*^{-/-} embryos (B, D and F) stained

with neurofilament (NF, red) and synaptophysin (Syn, red) antibodies together with α -bungarotoxin (AChR, green). Examples of nerve terminals passing through and projecting beyond the central band of AChR clusters in mutant intercostal or diaphragm muscles are indicated by white arrows in the merged image in B and D. Examples of non innervated synapses in mutant limb muscles are indicated by white arrows in the merged image in F. (G) Measurement of AChR endplate band width and AChR cluster surface in intercostal muscles (numbers of AChR clusters tested: 95 in control and 76 in Wnt4 mutant). The percentage (%) of non innervated synapses was quantified from limb muscle cross sections (N=3 Wnt4^{-/-} and N=4 wt embryos). Error bars show means \pm SEM. * P <0.005; Mann-Whitney U test. NS: non significant. Scale bars: in the merged image in A, 30 μ m for A, B, E and F; in the merged image in C, 50 μ m for C and D.

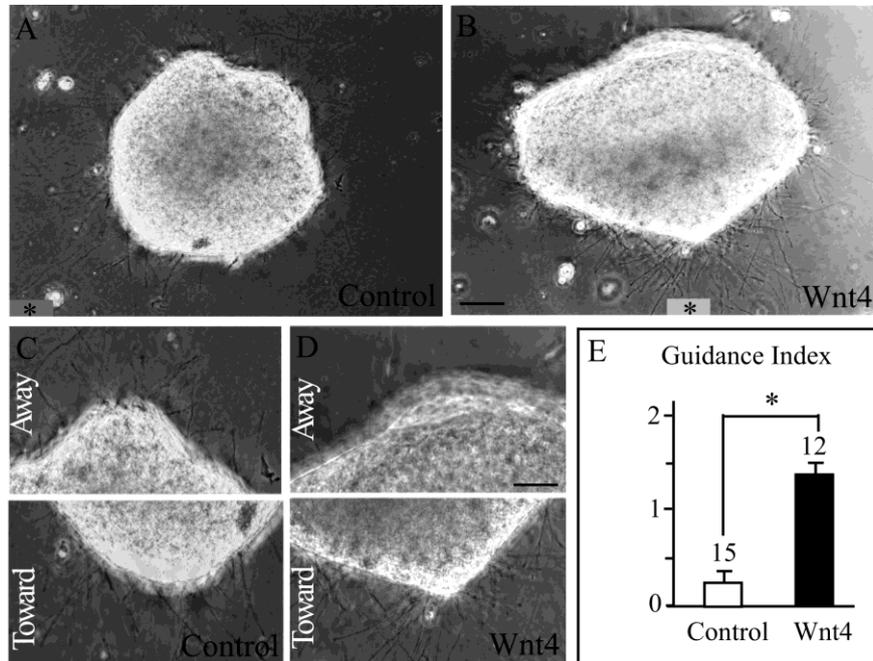
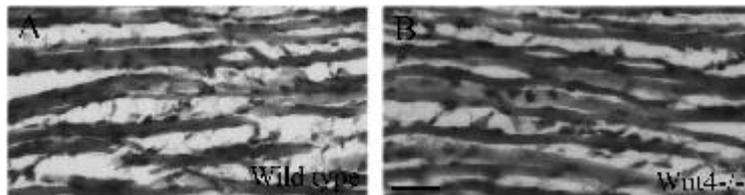


Figure 4: Wnt4 acts as an attractive cue for developing motor growth cones

(A-D) Illustration of cocultures of ventral spinal cord explants with GFP control (A) or Wnt4 (B) secreting COS-7 cell aggregates. Star indicates the source of secreting COS-7 cells. C and D are higher magnification views of A and B. (E) Representative guidance index analysis. Error bars show means \pm SEM from three independent experiments. Numbers indicate explants analyzed. * $P < 0.005$; Mann-Whitney U test. Scale bar in B, 20 μm for A and B; in D, 40 μm for C and D.



Supplement data

(A, B) Histological analysis of limb muscles from cross sections of stage E18.5 control littermates (wild type, A) or *Wnt4*^{-/-} embryos (B) stained with heamatoxylin/eosin. N=3 *Wnt4* mutant and N=4 control littermate embryos. Scale bar: in B, 20 μ m for A and B.

DISCUSSION

I. COMMENTAIRES METHODOLOGIQUES CONCERNANT L'ETUDE

Deux grandes techniques apparues dans les années 90 et permettant d'analyser l'expression de gènes d'intérêt en routine ont été utilisées dans le cadre de mon étude : la RT-PCR en temps réel ou RT-PCR quantitative et le microarray. Mais récemment, est apparue une nouvelle technique, le RNA-seq qui va révolutionner notre façon de travailler avec les ARN.

A. RT-PCR en temps réel et Microarray : Description et Comparaison

1. La RT-PCR en temps réel : détection et quantification

La RT-PCR en temps réel permet de mesurer l'évolution au cours des cycles de PCR de la quantité des ADNc obtenus par reverse transcription des ARN d'un échantillon. Cette technique utilise différents systèmes de détection par rapporteurs fluorescents et permet une quantification absolue ou relative des ARN cibles.

a. Systèmes de détection

Les deux systèmes de détection utilisés pour la RT-PCR ont été :

- les sondes TaqMan qui fluorescent suite à leur hydrolyse (Applied Biosystems),
- l'agent fluorescent intercalant de l'ADN, SYBR Green.

- Sondes fluorescentes après hydrolyse

La technologie TaqMan utilise des sondes séquences-spécifiques non extensibles marquées avec un rapporteur fluorescent et un quencher ou bloqueur de fluorescence qui sont maintenus à proximité jusqu'à leur hybridation sur leur séquence cible. En général, le rapporteur de fluorescence est la fluorescéine (FAM) fixée en 5' de la sonde et le quencher de fluorescence est la rhodamine (TAMRA) fixée en 3' de la sonde. Le transfert d'énergie du rapporteur au quencher par résonance (FRET, *Förster/Fluorescence-resonance energy transfert*) entraîne la suppression de fluorescence du rapporteur. A la suite de la fixation des oligonucléotides et de la sonde sur leur séquence cible, la Taq polymérase va étendre la séquence à partir des oligonucléotides et arrivée à la sonde, l'activité exonucléase 5'-3' de la polymérase va hydrolyser la sonde, entraînant la suppression du blocage de fluorescence du rapporteur par le quencher (Figure 22A). Ainsi, proportionnellement à la quantité de transcrits présents, on assiste à une augmentation cumulative de la fluorescence émise. Par contre, si

aucun ADNc cible n'est présent, les oligonucléotides et la sonde ne se fixent pas, la sonde n'est pas dégradée et la fluorescence du rapporteur reste inhibée par le quencher. Cette approche fonctionnant grâce à l'utilisation de deux oligonucléotides et d'une sonde pour chaque séquence cible, la précision et la spécificité des produits de PCR est très importante. De plus, cette technique permet l'analyse de plusieurs gènes dans une même réaction, aussi appelée analyse multiplexe grâce à l'utilisation d'une sonde possédant un fluorophore différent pour chaque séquence cible.

- Intercalant de l'ADN

Le SYBR Green est un exemple d'agent intercalant de l'ADN double brin. Suite à la fixation d'un oligonucléotide sur sa séquence cible et à la réplication de celle-ci par PCR, un grand nombre de molécules de SYBR Green se lient aux produits doubles brins ou amplicons et émettent un signal fluorescent (Figure 22B). Ces agents intercalant sont simples d'utilisation et comme ils ne sont pas séquences-spécifiques, ils peuvent être utilisés pour n'importe quelle réaction. Cependant, comme ils ne distinguent pas les différentes séquences de gènes, l'analyse multiplexe n'est pas possible. De plus, le SYBR Green liant sans discrimination les doubles brins d'ADN, les artéfacts tels que les dimères d'oligonucléotides et les erreurs d'amplification sont intégrés à la fluorescence détectée pour une réaction pouvant biaiser le résultat obtenu. La conséquence de la liaison d'un grand nombre de molécules intercalantes est que la quantité de signal détectée dépend de la taille du double brin d'ADN produit lors de la réaction, il n'est donc pas possible de comparer l'expression de différents gènes entre eux. Quelle que soit la technique de RT-PCR, l'utilisation d'oligonucléotides spécifiques de chaque séquence cible fait qu'il est impossible de comparer l'expression des différents gènes entre eux, l'affinité des oligonucléotides pour leur séquence cible n'étant pas toujours la même. Ainsi, la RT-PCR en temps réel permet de comparer uniquement l'expression d'un même gène dans différentes conditions.

b. Quantifications et contrôles

Les résultats obtenus suite à une RT-PCR peuvent être exprimés soit en quantités absolues, c'est-à-dire en nombre de copies d'un ARN spécifique dans un échantillon, soit en quantités relatives, c'est-à-dire en quantité d'un ARN spécifique par rapport à un autre ARN dans un même échantillon.

Pour la quantification absolue, une courbe de standards d'ARN est nécessaire pour chaque gène d'intérêt afin de pouvoir calculer le nombre de copies du transcrit présent au départ de la réaction. Ainsi, une série de dilutions est réalisée à partir d'un échantillon d'ARN pur dont le nombre de copies est connu puis soumis à amplification. Tout comme pour des analyses protéiques, le signal inconnu est comparé à la courbe de standards d'ARN afin de déterminer la concentration de départ, ici le nombre de copies d'ARN.

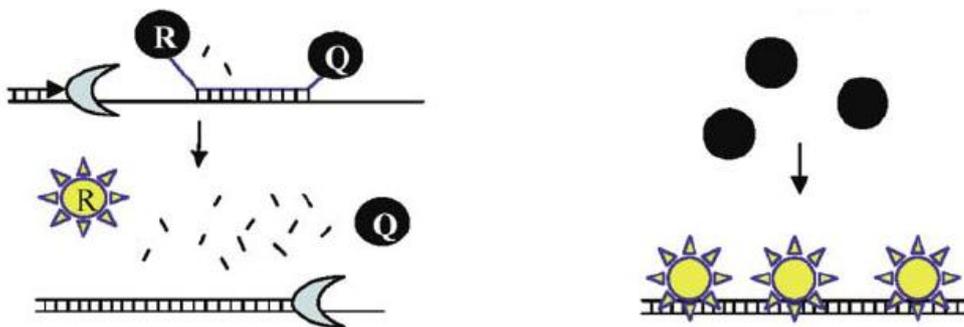


Figure 22. Systèmes de détection utilisés pour les analyses de RT-PCR quantitative

A. Le système de détection TaqMan fonctionne grâce à l'utilisation d'oligonucléotides et d'une sonde constituée d'un rapporteur de fluorescence (R) et d'un quencher de fluorescence (Q). Lorsque la Taq polymérase copie la séquence cible à partir des oligonucléotides et qu'elle arrive au niveau de la sonde, son activité exonucléase 5'-3' élimine la sonde, le quencher et le rapporteur se trouvant séparés et le rapporteur émettant de la fluorescence.

B. Le système de détection SyBR Green repose sur le fait qu'en s'intercalant entre deux brins d'ADN, le SyBR Green émet de la fluorescence.

La majorité des analyses utilisent la quantification relative qui est plus facile à mesurer et présente un plus grand intérêt lorsque l'on travaille en comparaison d'un état normal avec un état pathologique par exemple. Les méthodes de quantification relative utilisées sont le plus souvent basées sur les calculs $2^{-\Delta Ct}$ ou du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Ces méthodes reposent sur deux hypothèses. La première hypothèse est que la réaction se fait avec 100% d'efficacité, c'est-à-dire qu'à chaque cycle de PCR, le nombre d'amplicons double. Ainsi, l'analyse des résultats devra se faire au début de la phase exponentielle de production d'amplicons, lorsque les substrats ne sont pas limitant et qu'il n'y a pas de dégradation. Le Ct, nombre de cycles

nécessaires à chaque réaction pour atteindre un niveau arbitraire de fluorescence, doit donc correspondre au plus petit nombre de cycles possible au début de la phase exponentielle. La deuxième hypothèse est qu'il doit y avoir un gène dont l'expression reste constante entre les différents échantillons. Ce contrôle endogène est en fait utilisé pour corriger les différences de pipettage entre les échantillons. Les calculs d'expressions relatives peuvent ensuite être faits comme suit avec X le gène d'intérêt et GAPDH le gène contrôle endogène :

- Expression relative du gène dans une condition donnée :

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct X - Ct GAPDH)}$$

- Expression relative du gène entre deux conditions :

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct X - Ct GAPDH)_{mutant} - (Ct X - Ct GAPDH)_{sauvage}]}$$

2. Le microarray

Le microarray Applied Biosystems utilise des sondes séquences-spécifiques de 60 nucléotides co-spottées sur une puce avec des sondes immobilisées de 24 nucléotides servant de contrôle interne à chaque spot. Ainsi, des sondes correspondant à environ 32 000 gènes de la souris sont spottés sur chaque microarray. Les échantillons d'ARN sont tout d'abord reverse transcrits en ADNc eux-mêmes transcrits en ARNc en présence d'UTP-digoxigénine. Les ARNc marqués à la digoxigénine sont ensuite purifiés puis fragmentés avant d'être hybridés sur les puces en présence d'oligonucléotides marqués d'un fluorophore et spécifiques des sondes immobilisées du contrôle interne. Les ARNc fixés sur leurs sondes sont ensuite révélés grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-digoxigénine conjugué à la phosphatase alcaline, l'ajout d'un substrat chimiluminescent dégradé par la phosphatase alcaline produisant de la lumière. A chaque spot d'un gène spécifique correspond ainsi un signal luminescent dépendant de la quantité d'ARNc fixé et un signal fluorescent correspondant à la fixation des oligonucléotides contrôles. Le signal luminescent est ensuite rapporté au signal fluorescent du contrôle interne, ce dernier permettant de mettre en évidence d'éventuels problèmes de répartition de l'échantillon sur l'ensemble de la puce, mais surtout de normaliser les valeurs d'une puce pour pouvoir les comparer à une autre puce. L'utilisation de sondes spécifiques de chaque séquence cible fait qu'il est impossible de comparer l'expression des différents gènes entre eux, l'affinité des sondes pour leurs séquences cibles n'étant pas toujours la même. Ainsi, le microarray tout comme la RT-PCR en temps réel permet de comparer uniquement l'expression d'un même gène dans différentes conditions.

3. Comparaison des différentes techniques d'analyse du transcriptome

Afin de déterminer les gènes différentiellement exprimés entre mes échantillons sauvages et déficients pour ColQ, plusieurs techniques ont été utilisées. Pour mes analyses en culture cellulaire, j'ai tout d'abord utilisé la technique du microarray (Applied Biosystems) ainsi que la technique de RT-PCR TaqMan selon un protocole à haut-débit permettant l'analyse simultanée de 95 gènes, le TaqMan Low Density Array (TLDA, Applied Biosystems). La reproductibilité des résultats entre ces deux technologies est relativement bonne puisque 91% des variations observées sont semblables, avec 76% des résultats strictement identiques et 15% des variations qui sont significatives avec seulement une des deux techniques. Pour les analyses réalisées chez la souris, j'ai utilisé à la fois la RT-PCR par détection d'agents intercalants (SYBR Green) et la technique du TLDA. Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec ces deux techniques sont également reproductibles puisque 86% des variations observées sont similaires. Par contre, 41% des résultats sont strictement identiques alors que 45% des variations sont similaires mais non significatives dans l'une ou l'autre des techniques et la plupart du temps en détection par SYBR Green. Ces observations montrent que les techniques de microarray et TLDA sont relativement sensibles comparées à la RT-PCR SYBR Green.

Plusieurs éléments peuvent expliquer les 9% de résultats différents entre le microarray et le TLDA et les 14% de résultats différents entre le TLDA et le SYBR Green. Tout d'abord, la spécificité des oligonucléotides pour leurs séquences cibles peut être variable selon la technique. Ainsi, le TLDA est beaucoup plus spécifique que le microarray ou la RT-PCR SYBR Green du fait que l'amplification nécessite à la fois la fixation de deux oligonucléotides et d'une sonde sur une même séquence cible. De plus, les techniques n'utilisant qu'une sonde (microarray) ou deux oligonucléotides (RT-PCR SYBR Green) peuvent être moins précises si les sondes et oligonucléotides ne sont pas produits dans une région uniquement présente dans la séquence cible. Ainsi, une sonde ou un oligonucléotide peut reconnaître des séquences homologues à la séquence cible ce qui engendrera un résultat biaisé, celui-ci étant représentatif de l'expression de plusieurs gènes. Il est également important de souligner que l'analyse des résultats sous forme d'expression relative pour les techniques de RT-PCR, nécessite l'utilisation d'un gène servant de contrôle endogène, ce dernier ne devant pas varier entre les différents échantillons de l'expérience. Contrairement à la RT-PCR, le microarray utilise un oligonucléotide marqué d'un fluorochrome, ce contrôle étant externe aux échantillons. Il est donc important de tenir compte de ces différences lorsque l'on compare des résultats obtenus avec différentes technologies. L'ensemble de ces données

montrent en tout cas qu'il est important de toujours reconfirmer un résultat en utilisant une autre technique.

Malgré leur reproductibilité, ces techniques ont en commun le fait qu'il ne soit pas possible de comparer les niveaux d'expression des gènes entre eux. Seule une comparaison de l'expression d'un gène entre différentes conditions est possible. Ceci est dû au fait que chaque oligonucléotide ou sonde utilisé pour chaque gène, possède une spécificité pour sa cible qui n'est pas la même d'un gène à l'autre. Ainsi, les systèmes de compensation d'expression que les cellules peuvent mettre en place lors de défauts de production de certaines protéines, ne peuvent pas être analysés avec ces techniques. Ceci a été montré dans l'article « Cholinesterases regulation in the absence of ColQ » (Partie Résultats, II D), dans lequel l'augmentation d'expression de la forme d'AChE_R due à l'absence de ColQ ne peut pas être considérée comme une forme de compensation pour la perte d'AChE_T ancrée par ColQ. De plus, ces techniques ne permettent pas une analyse complète du transcriptome puisque les petits ARN tels que les microARN ne sont pas analysables en même temps que les autres ARN, un système spécifique aux microARN ayant été développé. Ceci présente donc un désavantage, surtout lorsque l'on cherche à étudier le système de régulation post-transcriptionnel (Partie Résultats, I C).

B. Le RNA-seq

Afin de remédier aux différents problèmes évoqués ci-dessus, une technique est apparue très récemment : le RNA-seq. Le RNA-seq permet non seulement de mesurer les niveaux d'expression absolue des transcrits codant et non codant quelles que soient leurs tailles mais aussi de découvrir de nouveaux transcrits et exons. En effet, cette technologie fonctionne sans avoir recours aux connaissances actuelles de la séquence d'un génome, ce qui n'est pas le cas des techniques de RT-PCR ou de microarray. De plus, le RNA-seq permet de mesurer l'efficacité d'épissage donnant ainsi des informations sur la quantité d'un transcrit mes aussi de ses isoformes. Cette méthode de quantification à haut-débit est relativement puissante et sensible puisqu'elle permet d'obtenir des résultats même pour des ARN à l'état de traces dans un échantillon et à l'inverse ne présente pas de phénomène de saturation lorsqu'un ARN est présent en très grande quantité. De plus, elle ne présente que très peu voire pas du tout de bruit de fond contrairement aux autres techniques d'analyse des ARN.

Une des procédures utilisées pour l'analyse d'expression des transcrits dans différentes conditions par RNA-seq consiste à purifier les ARNm à partir d'échantillons d'ARN totaux.

Pour cela, la fraction d'ARN-polyA de chaque échantillon est purifiée sur des billes magnétiques associées à des queues polyT. Les ARNm ainsi récupérés sont ensuite fragmentés, reverse transcrits en ADNc par des amorces aléatoires et les ADNc transformés en doubles brins d'ADNc grâce à la synthèse d'un second brin. Des adaptateurs sont ensuite liés aux extrémités des fragments d'ADNc afin de pouvoir les fixer sur une matrice solide d'une part et permettre le séquençage grâce à la présence d'un site unique d'hybridation de l'oligonucléotide de séquençage d'autre part. Une fois fixés en phase solide, les ADNc sont amplifiés pour créer des clusters d'ADNc. Dans d'autres procédures, les ARN totaux sont conservés afin de pouvoir analyser non seulement les ARNm mais aussi les micro-ARN et les ARN non-codant. De plus, l'amplification n'est pas toujours réalisée, la technique ne nécessitant pas de grandes quantités d'ARN. Quelque soit la procédure, un catalogue des ARN présents dans chaque échantillon est ainsi créé. Les ADNc sont ensuite séquencés, les séquences de chaque fragment sont alignées sur la séquence du génome et leurs quantités mesurées, cette mesure reflétant la concentration molaire d'un transcrit dans l'échantillon de départ. Ainsi, contrairement aux autres techniques d'analyse des ARN pour lesquelles la comparaison des niveaux d'expression entre différentes expériences nécessite des méthodes de normalisation parfois compliquées, le RNA-seq permet une comparaison directe puisque les résultats obtenus correspondent à des quantifications absolues.

Il faut cependant garder à l'esprit que l'analyse d'ARN n'est pas toujours pertinente car elle ne reflète pas la production de protéines biologiquement actives. La preuve en a été faite dans l'article « ColQ controls postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction » (Partie Résultats, I D) où la quantité d'ARN codant pour MuSK ainsi que la quantité totale de protéines MuSK sont toutes deux augmentées en absence de ColQ alors que la quantité de protéines réellement fonctionnelles présentes à la surface des cellules est fortement diminuée par rapport aux cellules sauvages.

II. APPORT DE MES TRAVAUX A LA COMPREHENSION DU SYNDROME MYASTHENIQUE CONGENITAL AVEC DEFICIENCE EN ACETYLCHOLINESTERASE

A. Lame basale et différenciation synaptique

Jusqu'à présent, les études du développement de la jonction neuromusculaire se sont focalisées sur la formation et la maintenance des domaines pré- et post-synaptiques, notamment par le biais de cascades moléculaires faisant intervenir des ligands et leurs récepteurs. Ainsi, la différenciation synaptique nécessite la présence de signaux antérogrades, facteurs pré-synaptiques se fixant généralement sur des récepteurs post-synaptiques mais aussi de signaux rétrogrades, éléments provenant du muscle se liant à des récepteurs pré-synaptiques. Par exemple, les neurégulines et l'agrine libérées par la terminaison axonale diffusent dans la fente synaptique et se fixent sur leurs récepteurs musculaires respectifs, ErbB et LRP4/MuSK aboutissant à l'activation de diverses cascades de signalisation et de différenciation post-synaptique (Trinidad et al., 2000; Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008). De même, des FGFs libérés par le muscle diffusent dans l'espace synaptique puis se fixent sur leurs récepteurs pré-synaptiques permettant ainsi l'agrégation des vésicules synaptiques, indispensable à la différenciation du domaine pré-synaptique (Fox et al., 2007). Dans ce schéma, la matrice extracellulaire et ses constituants se sont donc vu attribuer soit un rôle plutôt passif de tamis moléculaire, soit un rôle dans la consolidation de la fixation des différents ligands sur leurs récepteurs respectifs ou encore un rôle d'adhésion.

Très peu d'études ont pu mettre en évidence l'implication de constituants de la matrice extracellulaire dans la différenciation synaptique, les collagènes de type IV, les laminines ou encore le nidogène ayant toujours été étudiés dans leur rôle premier de protéines structurales nécessaires à la formation d'un réseau entre les cellules. Les premières expériences ayant permis de montrer l'importance des composants de la matrice extracellulaire dans le développement de la synapse, ont été réalisées dans les années 90, démontrant l'implication de la laminine- β 2 dans la différenciation du domaine pré-synaptique. Cette isoforme exprimée spécifiquement à la jonction neuromusculaire serait en fait un signal stoppant la croissance axonale au niveau de régions post-synaptiques pré-établies (Green et al., 1992; Porter et al., 1995). Plus récemment, les sous-unités α 1 et α 2 du collagène IV ont été montrées comme nécessaires à la différenciation de la terminaison nerveuse en agissant sur l'agrégation des vésicules synaptiques au niveau des sites actifs pré-synaptiques (Fox et al., 2007). Ces

données ont donc établies les constituants structuraux de la lame basale comme des facteurs potentiels du développement de la terminaison axonale. Deux autres protéines structurales de la matrice extracellulaire, le perlecan et le collagène spécifique ColQ, sont impliquées dans l'ancrage et l'accumulation de l'enzyme nécessaire à terminer la transmission synaptique, l'acétylcholinestérase (Peng et al., 1999; Arikawa-Hirasawa et al., 2002; Cartaud et al., 2004). Pour l'instant, aucun rôle développemental n'a été établi pour le perlecan à la jonction neuromusculaire. En revanche, mes travaux ont permis de montrer l'implication de ColQ dans la différenciation post-synaptique, faisant de ColQ la première protéine structurale de la lame basale impliquée dans ce processus (Sigoillot et al., 2010b). Il faut cependant noter que ces études ont été réalisées chez des souris déficientes pour les différentes protéines, aucune information n'est donc disponible concernant les effets d'une régulation à la baisse de l'expression de ces protéines sur la différenciation pré- ou post-synaptique.

A l'heure actuelle, trois gènes dont les produits sont exprimés dans la lame basale sont impliqués dans des syndromes myasthéniques congénitaux (SMC) synaptiques : ColQ, la laminine- β 2 et l'agrine. ColQ et la laminine- β 2 sont des protéines ayant des fonctions structurales mais sont également impliquées dans la différenciation pré-synaptique pour la laminine- β 2 ou dans la différenciation post-synaptique pour ColQ, alors que l'agrine est une protéine sécrétée participant essentiellement à la différenciation du domaine post-synaptique. Les mutations de ces gènes engendrent des déformations architecturales des jonctions neuromusculaires associées à des défauts fonctionnels (Engel, 2008; Huze et al., 2009; Maselli et al., 2009). Le phénotype associé aux SMC synaptiques est ainsi lié aux défauts de structure de la lame basale synaptique mais aussi et surtout aux défauts de développement de la jonction neuromusculaire qui en résultent. Contrairement aux SMC post-synaptiques qui représentent 80% de l'ensemble des SMC, les SMC synaptiques n'en représentent que 13%, une faible proportion pouvant refléter une viabilité faible lorsque des mutations des gènes synaptiques sont présentes, suggérant donc l'importance fonctionnelle des protéines de la lame basale à la synapse. Cependant, cette faible proportion pourrait également venir du fait qu'historiquement, les recherches de défauts se sont focalisées sur le RnACh et les protéines associées lors du diagnostic des patients myasthéniques, l'étude du rôle de la lame basale synaptique dans ces syndromes étant beaucoup plus récente. Les protéines de la lame basale synaptique sont néanmoins à considérer en tant qu'éléments à part entière de la différenciation synaptique.

B. ColQ et l'innervation du muscle

Mes études se sont focalisées sur le rôle de ColQ dans la lame basale et dans la différenciation post-synaptique. Cependant, il n'est pas à exclure que ColQ puisse avoir un effet rétrograde sur l'innervation ou la différenciation pré-synaptique.

Quel que soit le processus de régulation de la quantité de MuSK à la membrane, j'ai pu montrer que l'absence de ColQ diminue la quantité de MuSK présente au niveau du sarcolemme, ce qui pose la question des effets de ColQ sur l'établissement de la « pré-empreinte » musculaire. Sachant que (1) MuSK joue un rôle central dans la formation de la « pré-empreinte » musculaire et que (2) ColQ est exprimé tôt durant la différenciation musculaire, on peut se demander si ColQ participe à l'établissement de cette « pré-empreinte ». Une fonction possible de la « pré-empreinte » musculaire est d'organiser un territoire indiquant au motoneurone son site de contact avec le muscle. Dans ce cas, la « pré-empreinte » musculaire et donc l'innervation qui suit sont-ils perturbés en absence de ColQ ? Afin de répondre à cette question, l'analyse de la « pré-empreinte » musculaire et de l'innervation sera réalisée juste avant les premiers contacts synaptiques, à savoir aux alentours du stade embryonnaire E13.5 chez la souris.

Les résultats récents obtenus au laboratoire montrent que MuSK et Wnt4 interagissent et que l'absence de Wnt4 est responsable de défauts d'innervation. Mes résultats ayant montré qu'en absence de ColQ, MuSK est fortement diminué au niveau du domaine post-synaptique de la jonction neuromusculaire de souris, il serait intéressant d'analyser l'innervation chez des embryons ColQ^{-/-} dans le contexte de l'interaction MuSK-Wnt4. Si l'analyse de la « pré-empreinte » musculaire des embryons déficients pour ColQ révèle une perturbation de l'expression de MuSK à la membrane post-synaptique, comme cela a été montré chez des souris, il est possible que la perturbation du complexe MuSK-Wnt4 puisse aboutir à des défauts d'innervation chez les mutants de ColQ.

Dans ce contexte, il est intéressant de noter que des études cliniques montrent un retard dans le développement moteur chez des patients myasthéniques, ce qui pourrait être le résultat de défauts de maturation de l'innervation. Ces études permettront de définir les conséquences de la déficience en ColQ sur l'innervation musculaire.

C. ColQ et le syndrome myasthénique congénital avec déficience en acétylcholinestérase

Mes travaux réalisés chez la souris ont permis de démontrer que l'absence de ColQ entraîne une diminution d'environ 25% de la quantité de MuSK à la jonction neuromusculaire, cette diminution étant responsable de l'altération de la voie de signalisation agrine/MuSK aboutissant à la réduction de la phosphorylation de la sous-unité β du RnACh. Il est donc maintenant nécessaire de déterminer si tout comme chez la souris déficiente pour ColQ, les patients atteints de SMC de type 1c présentent une diminution de l'expression de ce récepteur tyrosine kinase au niveau de leurs synapses. Ce travail sera réalisé, en collaboration avec Daniel Hantaï (Institut de Myologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, France) et Hans Lochmüller (Institut Friedrich-Baur, Département de Neurologie, Université Ludwig-Maximilians, Munich, Allemagne), leurs groupes de recherche possédant une collection de biopsies musculaires de patients atteints de SMC-1c ou étant en rapport avec les nouveaux patients diagnostiqués.

Aux vues de mes résultats, il est également intéressant de revenir sur les symptômes et phénotypes des patients myasthéniques présentant soit des mutations de ColQ, soit des mutations de MuSK mais aussi des mutations de Dok-7 ou de l'agrine, éléments indispensables à l'activation de MuSK. Les symptômes de ces différentes myasthénies récapitulés dans le tableau 3 montrent de grandes similitudes chez l'ensemble des patients, que ce soit au niveau de l'apparition de la maladie ou des problèmes musculaires engendrés par les différentes mutations. Cependant, les patients possédant une mutation de l'agrine semblent moins gravement atteints que les autres par la maladie. L'analyse de la mutation découverte dans le gène codant pour l'agrine en culture cellulaire ou chez le rat, a permis de montrer que ni la phosphorylation de MuSK, ni l'agrégation du RnACh ne sont altérées (Huze et al., 2009). Cette mutation de l'agrine ne semble donc pas modifier sa fonction d'induction de l'agrégation du RnACh *via* MuSK, mais semble plutôt perturber la maintenance des jonctions neuromusculaires. Dans la suite des comparaisons de phénotypes, je vais donc me focaliser sur ColQ, MuSK et Dok-7.

L'analyse des mutations humaines de MuSK reproduites chez des souris a montré que l'activité catalytique du récepteur tyrosine kinase n'est en général pas perturbée. En revanche, une forte diminution de l'expression de MuSK à la jonction neuromusculaire engendre l'altération de l'agrégation du RnACh par l'agrine, cette perturbation pouvant également être

le résultat de la perte d'interaction entre MuSK et Dok-7 (Chevessier et al., 2004; Maselli et al., 2010). Même si cela n'a pas été étudié, il est également envisageable que la diminution d'expression de MuSK produise une diminution de l'accumulation de ColQ-AChE au niveau de la synapse de ces souris. De même que pour les mutations de MuSK, les mutations humaines de Dok-7 analysées en culture cellulaire entraînent en général une diminution de la phosphorylation de MuSK et de la sous-unité β du RnACh et donc de l'agrégation des RnACh du fait de la réduction de l'activité de MuSK.

Gènes	ColQ	MuSK	Dok-7	Agrine
Symptômes				
Début de la Maladie				
Période/Âge	De la naissance à 7 ans ; pas de début tardif	Période néonatale	2 ans ; début plus tardif possible	Enfance
Premiers symptômes	Ptosis et faiblesses musculaires	Ptosis, hypotonie et détresse respiratoire	Difficultés à marcher	Difficultés à courir
Contractures articulaires congénitales	Aucune		Aucune	Aucune
Faiblesses Musculaires				
Muscles oculaires	Affectés dans 50% des cas ; ptosis	Ptosis	Ptosis	Ptosis
Muscles bulbaires et faciaux	Affectés dans la plupart des cas	Affectés	Affectés	Pas de symptômes bulbaires, faiblesse faciale légère
Muscles distaux, du tronc et démarche	Faiblesses souvent sévères, parfois de type limb-girdle	Faiblesses, fatigabilité lors de la marche	Faiblesses de type limb-girdle, faiblesses axiales et démarche sinueuse	Pas de faiblesse axiale mais difficulté à courir

Problèmes respiratoires	Détérioration progressive de la fonction respiratoire, parfois crises respiratoires	Détresse respiratoire avec crises respiratoires possibles	Détérioration progressive de la fonction respiratoire, parfois crises respiratoires	
Fluctuation des faiblesses musculaires	Variations selon les jours	Variations selon les jours	Variations selon les jours	Variations selon les jours
Progression de la maladie	Souvent à progression lente		Souvent à progression lente	Stable
Caractéristiques Electrophysiologiques				
Réponse à une stimulation simple	PAMC ⁽¹⁾ répétitifs	Pas de PAMC ⁽¹⁾ répétitifs	Pas de PAMC ⁽¹⁾ répétitifs	Pas de PAMC ⁽¹⁾ répétitifs
Réponse à des stimulations répétitives (2 ou 3 Hz)	Réponse décroissante des PAMC ⁽¹⁾	Réponse décroissante des PAMC ⁽¹⁾	Réponse décroissante des PAMC ⁽¹⁾	Réponse décroissante des PAMC ⁽¹⁾
Traitements				
Traitement aux inhibiteurs d'estérasés	Pas d'effets ou aggrave la maladie	Pas d'effets seul ; bonne réponse en combinaison avec le 3,4-DAP ⁽²⁾ dans un cas sur les deux	Pas d'effets ou à court terme, aggrave parfois la maladie	Pas d'effets même en combinaison avec le 3,4-DAP ⁽²⁾
Traitements expérimentaux	Efficacité de l'éphédrine dans certains cas			Efficacité de l'éphédrine

Tableau 3. Symptômes associés aux syndromes myasthéniques congénitaux provoqués par des mutations des gènes codant pour ColQ, MuSK, Dok-7 et l'agrine chez l'homme

⁽¹⁾PAMC : Potentiel d'Action Musculaire Composé (groupe de potentiels d'action simultanés provenant de plusieurs fibres musculaires de la même région). ⁽²⁾3,4-DAP : 3,4-diamino pyridine. (Chevessier et al., 2004; Beeson et al., 2006; Muller et al., 2007b; Muller et al., 2007a; Huze et al., 2009; Ben Ammar et al., 2010; Maselli et al., 2010).

De plus, les mutations de Dok-7 sont responsables d'une diminution de l'activité acétylcholinestérase chez les patients, suggérant une diminution de l'accumulation de ColQ-AChE pouvant être liée à une réduction de la quantité de MuSK exprimée (Beeson et al., 2006). Enfin, l'analyse des mutations de ColQ en culture cellulaire a permis de montrer que soit le complexe ColQ-AChE ne peut pas être inséré dans la lame basale, soit l'AChE ne peut pas lier ColQ, aboutissant à l'absence d'AChE dans la lame basale (Ohno et al., 2000). Ainsi, les mutants de MuSK ou Dok-7 pourraient avoir en commun avec les patients mutés pour ColQ, non seulement une diminution ou une perte de l'AChE synaptique, mais aussi une diminution de la quantité de MuSK à la jonction neuromusculaire responsable de l'altération de la voie de signalisation agrine/MuSK/Dok-7. Les patients atteints de SMC-1c ont donc probablement plus de défauts en commun avec les myasthénies post-synaptiques dues aux mutations de MuSK ou Dok-7 que ce que l'on aurait pu penser au départ. L'étude électrophysiologique révèle que seules les mutations de ColQ engendrent une réponse répétitive au niveau du potentiel d'action musculaire suite à une stimulation simple. Ceci est dû au fait que les mutations de ColQ entraînent la perte totale de l'AChE à la synapse alors que les mutations de MuSK ou Dok-7 en diminuent juste la quantité. Le problème majeur de ces trois SMC reste donc maintenant de savoir quels sont les symptômes liés aux perturbations de la voie de signalisation agrine/MuSK/Dok-7 et ceux liés aux perturbations de la quantité d'AChE, afin de pouvoir établir un traitement approprié pour ces patients. L'étude comparative des embryons déficients pour ColQ et déficients pour les cholinestérases (AChE-/-BChE-/-) prévue au laboratoire devrait ainsi aider à la compréhension du phénotype des patients myasthéniques présentant des mutations de ColQ, mais peut être aussi des patients ayant des mutations de MuSK ou Dok-7.

D. Les souris sont-elles de bons modèles pour les pathologies ?

La souris déficiente pour ColQ semble être assez représentative du SMC-1c, la perte totale de ColQ-AChE ancré dans la lame basale synaptique étant relativement fréquente chez les patients. Ainsi, on note des similitudes à la fois dans la composition moléculaire, dans la morphologie et dans la physiologie des jonctions neuromusculaires. Les synapses sont dépourvues d'AChE même si des traces sont parfois observées chez certains patients. Les terminaisons nerveuses sont en général de taille réduite, les cellules de Schwann terminales les recouvrant anormalement. Chez la souris ColQ^{-/-} comme chez les patients atteints du SMC-1c, les potentiels de plaques motrices miniatures présentent un déclin plus lent que la

normale. De plus, le potentiel d'action musculaire présente une double réponse suite à une simple stimulation, ceci étant lié à la sur-activation du RnACh par l'acétylcholine non dégradée par l'AChE (Feng et al., 1999; Engel, 2008). Les souris déficientes pour ColQ ont également des faiblesses musculaires observées lors de tests d'agrippement à un support qu'elles lâchent beaucoup plus rapidement sous l'effet de leur propre poids que des souris sauvages de la même portée (résultat non publié). Un point distingue cependant les patients de ce modèle murin : les caractéristiques des fibres musculaires. En effet, les patients myasthéniques voient souvent apparaître une atrophie des fibres rapides ou une prédominance des fibres lentes ou encore les deux (Engel, 2008). L'étude réalisée chez la souris n'a pas permis de révéler de différence dans la quantité de fibres lentes présente dans un muscle à contraction rapide entre les souris sauvages et mutantes, que ce soit à sept jours ou trente jours après la naissance (Partie Résultats, III B et D). Cette observation montre que la souris peut parfois ne pas refléter complètement la pathologie humaine. Il faut cependant noter que la recherche de caractéristiques dystrophiques a été réalisée sur des souris ColQ^{-/-} de 7, 30 et 90 jours. Les souris de 7 jours sont probablement trop jeunes pour voir apparaître un phénotype dystrophique. Quant aux souris de 30 et 90 jours, elles représentent moins de 50% des souris ColQ^{-/-} ayant survécu. Il est donc probable que ces souris présentent des défauts moins importants que les souris qui sont mortes avant d'atteindre ce stade. Une dystrophie évoluant entre les stades de 7 jours et de 30 ou 90 jours ne serait donc pas observable.

Au départ, les patients myasthéniques sont souvent diagnostiqués dystrophiques à cause de leurs faiblesses musculaires qui peuvent ressembler à celles observées chez des patients atteints de dystrophies de type limb-girdle. Ce n'est qu'à l'analyse par électromyogramme que des défauts de transmission synaptique sont révélés. Cependant rien ne dit que la myasthénie ne soit pas associée à une dystrophie plus ou moins légère. Ainsi, même si l'étude de la souris ColQ^{-/-} n'a pas permis de mettre en évidence de caractéristique dystrophique (Partie Résultats, III B et D), les patients atteints du SMC-1c pourraient très bien présenter une dystrophie légère. Cette idée vient du fait que les souris générées comme modèles de dystrophies humaines ne sont pas toujours de bons modèles pour cette pathologie. Les dystrophies limb-girdle touchent souvent les sous-unités du sarcoglycan alors que les dystrophies de Duchenne ou Becker touchent la dystrophine ; le sarcoglycan et la dystrophine appartenant au complexe glycoprotéines-dystrophine. Dans les deux cas, des mutations perturbent fortement le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette musculaire caractéristique des dystrophies (Durbeej and Campbell, 2002). Il a été montré que chez la souris, la pathologie associée aux mêmes mutations est souvent légère comparée à la

pathologie humaine, une perturbation des protéines du complexe glycoprotéines-dystrophine suffisant à provoquer une grave dystrophie chez l'homme mais pas chez la souris (Bulfield et al., 1984). La souris semble en fait mettre en place un système de compensation qui n'est pas possible chez l'homme. Par exemple, lorsque la dystrophine est mutée chez la souris, l'utrophine, homologue de la dystrophine exprimée spécifiquement à la jonction neuromusculaire, semble compenser la perte ou la diminution de dystrophine. Ainsi, il faut que la dystrophine et l'utrophine soient mutées pour provoquer une dystrophie semblable à la dystrophie humaine (Deconinck et al., 1997; Grady et al., 1997). De plus, il faut souvent une déficience totale de l'une des protéines du complexe dystrophine pour créer une dystrophie chez la souris alors que chez l'homme une faible diminution de l'expression de l'une d'entre elles suffit à provoquer des symptômes caractéristiques des dystrophies. Il serait donc intéressant d'analyser les biopsies humaines de patients atteints du SMC-1c d'un point de vue dystrophique, afin de déterminer si le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette musculaire est perturbé, ce qui pourrait participer au syndrome.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- An MC, Lin W, Yang J, Dominguez B, Padgett D, Sugiura Y, Aryal P, Gould TW, Oppenheim RW, Hester ME, Kaspar BK, Ko CP, Lee KF (2010) Acetylcholine negatively regulates development of the neuromuscular junction through distinct cellular mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10702-10707.
- Anakwe K, Robson L, Hadley J, Buxton P, Church V, Allen S, Hartmann C, Harfe B, Nohno T, Brown AM, Evans DJ, Francis-West P (2003) Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development* 130:3503-3514.
- Arias HR (1997) Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res Brain Res Rev* 25:133-191.
- Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, Yamada Y (2002) Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci* 5:119-123.
- Bajard L, Relaix F, Lagha M, Rocancourt D, Daubas P, Buckingham ME (2006) A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes Dev* 20:2450-2464.
- Banwell BL, Russel J, Fukudome T, Shen XM, Stilling G, Engel AG (1999) Myopathy, myasthenic syndrome, and epidermolysis bullosa simplex due to plectin deficiency. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:832-846.
- Beeson D, Higuchi O, Palace J, Cossins J, Spearman H, Maxwell S, Newsom-Davis J, Burke G, Fawcett P, Motomura M, Muller JS, Lochmuller H, Slater C, Vincent A, Yamanashi Y (2006) Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science* 313:1975-1978.
- Belbeoc'h S, Massoulie J, Bon S (2003) The C-terminal T peptide of acetylcholinesterase enhances degradation of unassembled active subunits through the ERAD pathway. *Embo J* 22:3536-3545.
- Ben Ammar A, Petit F, Alexandri N, Gaudon K, Bauche S, Rouche A, Gras D, Fournier E, Koenig J, Stojkovic T, Lacour A, Petiot P, Zagnoli F, Viollet L, Pellegrini N, Orlikowski D, Lazaro L, Ferrer X, Stoltenburg G, Paturneau-Jouas M, Hentati F, Fardeau M, Sternberg D, Hantai D, Richard P, Eymard B (2010) Phenotype genotype analysis in 15 patients presenting a congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7. *J Neurol* 257:754-766.
- Bergamin E, Hallock PT, Burden SJ, Hubbard SR (2010) The cytoplasmic adaptor protein Dok7 activates the receptor tyrosine kinase MuSK via dimerization. *Mol Cell* 39:100-109.
- Bishop DL, Misgeld T, Walsh MK, Gan WB, Lichtman JW (2004) Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron* 44:651-661.
- Bloch RJ (1986) Loss of acetylcholine receptor clusters induced by treatment of cultured rat myotubes with carbachol. *J Neurosci* 6:691-700.
- Bolte S, Cordelieres FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224:213-232.
- Bon S, Rieger F, Massoulie J (1973) [Properties of elongated acetylcholinesterase molecules in solution. Stokes radius, density, and mass]. *Eur J Biochem* 35:372-379.
- Bon S, Coussen F, Massoulie J (1997) Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. *J Biol Chem* 272:3016-3021.
- Bon S, Ayon A, Leroy J, Massoulie J (2003) Trimerization domain of the collagen tail of acetylcholinesterase. *Neurochem Res* 28:523-535.
- Bowen DC, Park JS, Bodine S, Stark JL, Valenzuela DM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Glass DJ, DiStefano PS (1998) Localization and regulation of MuSK at the neuromuscular junction. *Dev Biol* 199:309-319.

- Brenner HR, Witzemann V, Sakmann B (1990) Imprinting of acetylcholine receptor messenger RNA accumulation in mammalian neuromuscular synapses. *Nature* 344:544-547.
- Briguet A, Ruegg MA (2000) The Ets transcription factor GABP is required for postsynaptic differentiation in vivo. *J Neurosci* 20:5989-5996.
- Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M (2001) The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 15:66-78.
- Brockhausen J, Cole RN, Gervasio OL, Ngo ST, Noakes PG, Phillips WD (2008) Neural agrin increases postsynaptic ACh receptor packing by elevating rapsyn protein at the mouse neuromuscular synapse. *Dev Neurobiol* 68:1153-1169.
- Brohmann H, Jagla K, Birchmeier C (2000) The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development* 127:437-445.
- Bromann PA, Weiner JA, Apel ED, Lewis RM, Sanes JR (2004) A putative ariadne-like E3 ubiquitin ligase (PAUL) that interacts with the muscle-specific kinase (MuSK). *Gene Expr Patterns* 4:77-84.
- Bruneau E, Sutter D, Hume RI, Akaaboune M (2005) Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *J Neurosci* 25:9949-9959.
- Bruneau EG, Akaaboune M (2006) The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo. *Development* 133:4485-4493.
- Bryson-Richardson RJ, Currie PD (2008) The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet* 9:632-646.
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 202:59-68.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ (1984) X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1189-1192.
- Burden SJ (1998) The formation of neuromuscular synapses. *Genes Dev* 12:133-148.
- Cartaud A, Coutant S, Petrucci TC, Cartaud J (1998) Evidence for in situ and in vitro association between beta-dystroglycan and the subsynaptic 43K rapsyn protein. Consequence for acetylcholine receptor clustering at the synapse. *J Biol Chem* 273:11321-11326.
- Cartaud A, Strohlic L, Guerra M, Blanchard B, Lambergeon M, Krejci E, Cartaud J, Legay C (2004) MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 165:505-515.
- Catone C, Ternaux JP (2003) Involvement of the alpha 7 subunit of the nicotinic receptor in morphogenic and trophic effects of acetylcholine on embryonic rat spinal motoneurons in culture. *J Neurosci Res* 72:46-53.
- Chen F, Qian L, Yang ZH, Huang Y, Ngo ST, Ruan NJ, Wang J, Schneider C, Noakes PG, Ding YQ, Mei L, Luo ZG (2007) Rapsyn interaction with calpain stabilizes AChR clusters at the neuromuscular junction. *Neuron* 55:247-260.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38:228-233.
- Cheusova T, Khan MA, Schubert SW, Gavin AC, Buchou T, Jacob G, Sticht H, Allende J, Boldyreff B, Brenner HR, Hashemolhosseini S (2006) Casein kinase 2-dependent serine phosphorylation of MuSK regulates acetylcholine receptor aggregation at the neuromuscular junction. *Genes Dev* 20:1800-1816.

- Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, Richard P, Gaudon K, Bauche S, Prioleau C, Herbst R, Goillot E, Ioos C, Azulay JP, Attarian S, Leroy JP, Fournier E, Legay C, Schaeffer L, Koenig J, Fardeau M, Eymard B, Pouget J, Hantai D (2004) MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 13:3229-3240.
- Cohen I, Rimer M, Lomo T, McMahan UJ (1997) Agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle fibers in vivo. *Mol Cell Neurosci* 9:237-253.
- Condon K, Silberstein L, Blau HM, Thompson WJ (1990) Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. *Dev Biol* 138:256-274.
- Dahlqvist C, Blokzijl A, Chapman G, Falk A, Dannaeus K, Ibanez CF, Lendahl U (2003) Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development* 130:6089-6099.
- Dai Z, Peng HB (1998) A role of tyrosine phosphatase in acetylcholine receptor cluster dispersal and formation. *J Cell Biol* 141:1613-1624.
- Danino D, Hinshaw JE (2001) Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol* 13:454-460.
- Dasen JS, Jessell TM (2009) Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Curr Top Dev Biol* 88:169-200.
- DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85:501-512.
- Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG, Tinsley JM, Davies KE (1997) Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90:717-727.
- Deprez P, Inestrosa NC, Krejci E (2003) Two different heparin-binding domains in the triple-helical domain of ColQ, the collagen tail subunit of synaptic acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 278:23233-23242.
- Deprez PN, Inestrosa NC (1995) Two heparin-binding domains are present on the collagenic tail of asymmetric acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 270:11043-11046.
- Deschenes-Furry J, Belanger G, Mwanjewe J, Lunde JA, Parks RJ, Perrone-Bizzozero N, Jasmin BJ (2005) The RNA-binding protein HuR binds to acetylcholinesterase transcripts and regulates their expression in differentiating skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 280:25361-25368.
- d'Houtaud S, Sztermer E, Buffenoir K, Giot JP, Wager M, Bauche S, Lapierre F, Rigoard P (2009) [Synapse formation and regeneration]. *Neurochirurgie* 55 Suppl 1:S49-62.
- Dimitropoulou A, Bixby JL (2005) Motor neurite outgrowth is selectively inhibited by cell surface MuSK and agrin. *Mol Cell Neurosci* 28:292-302.
- Dobbertin A, Hrabovska A, Dembele K, Camp S, Taylor P, Krejci E, Bernard V (2009) Targeting of acetylcholinesterase in neurons in vivo: a dual processing function for the proline-rich membrane anchor subunit and the attachment domain on the catalytic subunit. *J Neurosci* 29:4519-4530.
- Dobbins GC, Luo S, Yang Z, Xiong WC, Mei L (2008) alpha-Actinin interacts with rapsyn in agrin-stimulated AChR clustering. *Mol Brain* 1:18.
- Donger C, Krejci E, Serradell AP, Eymard B, Bon S, Nicole S, Chateau D, Gary F, Fardeau M, Massoulié J, Guicheney P (1998) Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am J Hum Genet* 63:967-975.

- Dubovy P, Haninec P (1990) Non-specific cholinesterase activity of the developing peripheral nerves and its possible function in cells in intimate contact with growing axons of chick embryo. *Int J Dev Neurosci* 8:589-602.
- Durbeej M, Campbell KP (2002) Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 12:349-361.
- Duval N, Krejci E, Grassi J, Coussen F, Massoulie J, Bon S (1992) Molecular architecture of acetylcholinesterase collagen-tailed forms; construction of a glycolipid-tailed tetramer. *Embo J* 11:3255-3261.
- Dvir H, Harel M, Bon S, Liu WQ, Vidal M, Garbay C, Sussman JL, Massoulie J, Silman I (2004) The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. *Embo J* 23:4394-4405.
- Engel AG (2008) Congenital myasthenic syndromes. *Handb Clin Neurol* 91:285-331.
- Engel AG, Ohno K, Sine SM (2003) Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* 4:339-352.
- Engel AG, Shen XM, Selcen D, Sine SM (2008) Further observations in congenital myasthenic syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 1132:104-113.
- Epstein HF, Fischman DA (1991) Molecular analysis of protein assembly in muscle development. *Science* 251:1039-1044.
- Escher P, Lacazette E, Courtet M, Blindenbacher A, Landmann L, Bezakova G, Lloyd KC, Mueller U, Brenner HR (2005) Synapses form in skeletal muscles lacking neuregulin receptors. *Science* 308:1920-1923.
- Farah CS, Reinach FC (1995) The troponin complex and regulation of muscle contraction. *Faseb J* 9:755-767.
- Feng G, Krejci E, Molgo J, Cunningham JM, Massoulie J, Sanes JR (1999) Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol* 144:1349-1360.
- Finn AJ, Feng G, Pendergast AM (2003) Postsynaptic requirement for Abl kinases in assembly of the neuromuscular junction. *Nat Neurosci* 6:717-723.
- Fox MA, Umemori H (2006) Seeking long-term relationship: axon and target communicate to organize synaptic differentiation. *J Neurochem* 97:1215-1231.
- Fox MA, Ho MS, Smyth N, Sanes JR (2008) A synaptic nidogen: developmental regulation and role of nidogen-2 at the neuromuscular junction. *Neural Dev* 3:24.
- Fox MA, Sanes JR, Borza DB, Eswarakumar VP, Fassler R, Hudson BG, John SW, Ninomiya Y, Pedchenko V, Pfaff SL, Rheault MN, Sado Y, Segal Y, Werle MJ, Umemori H (2007) Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell* 129:179-193.
- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J (1999) Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23:247-256.
- Friocourt G, Chafey P, Billuart P, Koulakoff A, Vinet MC, Schaar BT, McConnell SK, Francis F, Chelly J (2001) Doublecortin interacts with mu subunits of clathrin adaptor complexes in the developing nervous system. *Mol Cell Neurosci* 18:307-319.
- Fu AK, Cheung J, Smith FD, Ip FC, Ip NY (2001) Overexpression of muscle specific kinase increases the transcription and aggregation of acetylcholine receptors in *Xenopus* embryos. *Brain Res Mol Brain Res* 96:21-29.
- Fuentes-Medel Y, Logan MA, Ashley J, Ataman B, Budnik V, Freeman MR (2009) Glia and muscle sculpt neuromuscular arbors by engulfing destabilized synaptic boutons and shed presynaptic debris. *PLoS Biol* 7:e1000184.

- Galli T, Haucke V (2001) Cycling of synaptic vesicles: how far? How fast! *Sci STKE* 2001:re1.
- Garratt AN, Britsch S, Birchmeier C (2000) Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* 22:987-996.
- Gervasio OL, Phillips WD (2005) Increased ratio of rapsyn to ACh receptor stabilizes postsynaptic receptors at the mouse neuromuscular synapse. *J Physiol* 562:673-685.
- Gervasio OL, Armson PF, Phillips WD (2007) Developmental increase in the amount of rapsyn per acetylcholine receptor promotes postsynaptic receptor packing and stability. *Dev Biol* 305:262-275.
- Gesemann M, Denzer AJ, Ruegg MA (1995) Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J Cell Biol* 128:625-636.
- Girard E, Bernard V, Minic J, Chatonnet A, Krejci E, Molgo J (2007) Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice. *Life Sci* 80:2380-2385.
- Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, DeChiara TM, Yancopoulos GD (1996) Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85:513-523.
- Glicksman MA, Sanes JR (1983) Differentiation of motor nerve terminals formed in the absence of muscle fibres. *J Neurocytol* 12:661-671.
- Gonzalez M, Ruggiero FP, Chang Q, Shi YJ, Rich MM, Kraner S, Balice-Gordon RJ (1999) Disruption of Trkb-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions. *Neuron* 24:567-583.
- Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR (1997) Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90:729-738.
- Grassi J, Massoulie J, Timpl R (1983) Relationship of collagen-tailed acetylcholinesterase with basal lamina components. Absence of binding with laminin, fibronectin, and collagen types IV and V and lack of reactivity with different anti-collagen sera. *Eur J Biochem* 133:31-38.
- Green TL, Hunter DD, Chan W, Merlie JP, Sanes JR (1992) Synthesis and assembly of the synaptic cleft protein S-laminin by cultured cells. *J Biol Chem* 267:2014-2022.
- Green WN (1999) Ion channel assembly: creating structures that function. *J Gen Physiol* 113:163-170.
- Grifone R, Demignon J, Houbron C, Souil E, Niro C, Seller MJ, Hamard G, Maire P (2005) Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. *Development* 132:2235-2249.
- Guerra M, Dobbertin A, Legay C (2008) Identification of cis-acting elements involved in acetylcholinesterase RNA alternative splicing. *Mol Cell Neurosci* 38:1-14.
- Guerra M, Cartaud A, Cartaud J, Legay C (2005) Acetylcholinesterase and molecular interactions at the neuromuscular junction. *Chem Biol Interact* 157-158:57-61.
- Hantai D, Richard P, Koenig J, Eymard B (2004) Congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Neurol* 17:539-551.
- Herlitze S, Villarroel A, Witzemann V, Koenen M, Sakmann B (1996) Structural determinants of channel conductance in fetal and adult rat muscle acetylcholine receptors. *J Physiol* 492 (Pt 3):775-787.
- Hippenmeyer S, Huber RM, Ladle DR, Murphy K, Arber S (2007) ETS transcription factor Erm controls subsynaptic gene expression in skeletal muscles. *Neuron* 55:726-740.
- Hippenmeyer S, Shneider NA, Birchmeier C, Burden SJ, Jessell TM, Arber S (2002) A role for neuregulin1 signaling in muscle spindle differentiation. *Neuron* 36:1035-1049.

- Hirsinger E, Duprez D, Jouve C, Malapert P, Cooke J, Pourquie O (1997) Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. *Development* 124:4605-4614.
- Hollway G, Currie P (2005) Vertebrate myotome development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:172-179.
- Huang YZ, Zang M, Xiong WC, Luo Z, Mei L (2003) Erbin suppresses the MAP kinase pathway. *J Biol Chem* 278:1108-1114.
- Hunter DD, Shah V, Merlie JP, Sanes JR (1989) A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature* 338:229-234.
- Hunter DD, Cashman N, Morris-Valero R, Bullock JW, Adams SP, Sanes JR (1991) An LRE (leucine-arginine-glutamate)-dependent mechanism for adhesion of neurons to S-laminin. *J Neurosci* 11:3960-3971.
- Hutcheson DA, Zhao J, Merrell A, Haldar M, Kardon G (2009) Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin. *Genes Dev* 23:997-1013.
- Huze C, Bauche S, Richard P, Chevessier F, Goillot E, Gaudon K, Ben Ammar A, Chaboud A, Grosjean I, Lecuyer HA, Bernard V, Rouche A, Alexandri N, Kuntzer T, Fardeau M, Fournier E, Brancaccio A, Ruegg MA, Koenig J, Eymard B, Schaeffer L, Hantai D (2009) Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am J Hum Genet* 85:155-167.
- Inoue A, Setoguchi K, Matsubara Y, Okada K, Sato N, Iwakura Y, Higuchi O, Yamanashi Y (2009) Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation. *Sci Signal* 2:ra7.
- Jacobson C, Cote PD, Rossi SG, Rotundo RL, Carbonetto S (2001) The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J Cell Biol* 152:435-450.
- Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D (1991) Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5096-5100.
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.
- Jessen KR, Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6:671-682.
- Jing L, Lefebvre JL, Gordon LR, Granato M (2009) Wnt signals organize synaptic prepattern and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor. *Neuron* 61:721-733.
- Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE (2010) Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 33:409-440.
- Kassar-Duchossoy L, Giacone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomes D, Tajbakhsh S (2005) Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* 19:1426-1431.
- Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomes D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S (2004) Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* 431:466-471.
- Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A (2006) Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol* 174:677-687.
- Kim N, Burden SJ (2008) MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nat Neurosci* 11:19-27.

- Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH, Hubbard SR, Dustin ML, Burden SJ (2008) Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 135:334-342.
- Kim S, Buonanno A, Nelson PG (1998) Regulation of prothrombin, thrombin receptor, and protease nexin-1 expression during development and after denervation in muscle. *J Neurosci Res* 53:304-311.
- Koike S, Schaeffer L, Changeux JP (1995) Identification of a DNA element determining synaptic expression of the mouse acetylcholine receptor delta-subunit gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10624-10628.
- Korkut C, Budnik V (2009) WNTs tune up the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* 10:627-634.
- Krejci E, Legay C, Thomine S, Sketelj J, Massoulie J (1999) Differences in expression of acetylcholinesterase and collagen Q control the distribution and oligomerization of the collagen-tailed forms in fast and slow muscles. *J Neurosci* 19:10672-10679.
- Krejci E, Thomine S, Boschetti N, Legay C, Sketelj J, Massoulie J (1997) The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J Biol Chem* 272:22840-22847.
- Krejci E, Coussen F, Duval N, Chatel JM, Legay C, Puype M, Vandekerckhove J, Cartaud J, Bon S, Massoulie J (1991) Primary structure of a collagenic tail peptide of Torpedo acetylcholinesterase: co-expression with catalytic subunit induces the production of collagen-tailed forms in transfected cells. *Embo J* 10:1285-1293.
- Lacazette E, Le Calvez S, Gajendran N, Brenner HR (2003) A novel pathway for MuSK to induce key genes in neuromuscular synapse formation. *J Cell Biol* 161:727-736.
- Lanuza MA, Garcia N, Santafe M, Nelson PG, Fenoll-Brunet MR, Tomas J (2001) Pertussis toxin-sensitive G-protein and protein kinase C activity are involved in normal synapse elimination in the neonatal rat muscle. *J Neurosci Res* 63:330-340.
- Lanuza MA, Garcia N, Santafe M, Gonzalez CM, Alonso I, Nelson PG, Tomas J (2002) Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C. *J Neurosci Res* 67:607-617.
- Lee HH, Choi RC, Ting AK, Siow NL, Jiang JX, Massoulie J, Tsim KW (2004) Transcriptional regulation of acetylcholinesterase-associated collagen ColQ: differential expression in fast and slow twitch muscle fibers is driven by distinct promoters. *J Biol Chem* 279:27098-27107.
- Legay C (2000) Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microsc Res Tech* 49:56-72.
- Lichtman JW, Colman H (2000) Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25:269-278.
- Lin S, Landmann L, Ruegg MA, Brenner HR (2008) The role of nerve- versus muscle-derived factors in mammalian neuromuscular junction formation. *J Neurosci* 28:3333-3340.
- Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, Sanes JR, Lee KF (2001) Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410:1057-1064.
- Lin W, Dominguez B, Yang J, Aryal P, Brandon EP, Gage FH, Lee KF (2005) Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron* 46:569-579.
- Linnoila J, Wang Y, Yao Y, Wang ZZ (2008) A mammalian homolog of *Drosophila* tumorous imaginal discs, Tid1, mediates agrin signaling at the neuromuscular junction. *Neuron* 60:625-641.
- Lu BD, Allen DL, Leinwand LA, Lyons GE (1999) Spatial and temporal changes in myosin heavy chain gene expression in skeletal muscle development. *Dev Biol* 216:312-326.

- Lu Z, Joseph D, Bugnard E, Zaal KJ, Ralston E (2001) Golgi complex reorganization during muscle differentiation: visualization in living cells and mechanism. *Mol Biol Cell* 12:795-808.
- Lu Z, Je HS, Young P, Gross J, Lu B, Feng G (2007) Regulation of synaptic growth and maturation by a synapse-associated E3 ubiquitin ligase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 177:1077-1089.
- Luo L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601-635.
- Lwebuga-Mukasa JS, Lappi S, Taylor P (1976) Molecular forms of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: their relationship to synaptic membranes. *Biochemistry* 15:1425-1434.
- Marchand S, Devillers-Thiery A, Pons S, Changeux JP, Cartaud J (2002) Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J Neurosci* 22:8891-8901.
- Maselli RA, Ng JJ, Anderson JA, Cagney O, Arredondo J, Williams C, Wessel HB, Abdel-Hamid H, Wollmann RL (2009) Mutations in LAMB2 causing a severe form of synaptic congenital myasthenic syndrome. *J Med Genet* 46:203-208.
- Maselli RA, Arredondo J, Cagney O, Ng JJ, Anderson JA, Williams C, Gerke BJ, Soliven B, Wollmann RL (2010) Mutations in MUSK causing congenital myasthenic syndrome impair MuSK-Dok-7 interaction. *Hum Mol Genet* 19:2370-2379.
- Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 41:31-91.
- McMahan UJ (1990) The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:407-418.
- McMahan UJ, Sanes JR, Marshall LM (1978) Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. *Nature* 271:172-174.
- Mejat A, Ramond F, Bassel-Duby R, Khochbin S, Olson EN, Schaeffer L (2005) Histone deacetylase 9 couples neuronal activity to muscle chromatin acetylation and gene expression. *Nat Neurosci* 8:313-321.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700-703.
- Mihaylova V, Muller JS, Vilchez JJ, Salih MA, Kabiraj MM, D'Amico A, Bertini E, Wolfle J, Schreiner F, Kurlemann G, Rasic VM, Siskova D, Colomer J, Herczegfalvi A, Fabriciova K, Weschke B, Scola R, Hoellen F, Schara U, Abicht A, Lochmuller H (2008) Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes. *Brain* 131:747-759.
- Misgeld T, Kummer TT, Lichtman JW, Sanes JR (2005) Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11088-11093.
- Missias AC, Chu GC, Klocke BJ, Sanes JR, Merlie JP (1996) Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch. *Dev Biol* 179:223-238.
- Moore C, Leu M, Muller U, Brenner HR (2001) Induction of multiple signaling loops by MuSK during neuromuscular synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14655-14660.
- Moransard M, Borges LS, Willmann R, Marangi PA, Brenner HR, Ferns MJ, Fuhrer C (2003) Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering. *J Biol Chem* 278:7350-7359.
- Morel N, Leroy J, Ayon A, Massoulie J, Bon S (2001) Acetylcholinesterase H and T dimers are associated through the same contact. Mutations at this interface interfere with the

- C-terminal T peptide, inducing degradation rather than secretion. *J Biol Chem* 276:37379-37389.
- Moscoso LM, Merlie JP, Sanes JR (1995) N-CAM, 43K-rapsyn, and S-laminin mRNAs are concentrated at synaptic sites in muscle fibers. *Mol Cell Neurosci* 6:80-89.
- Muller JS, Mihaylova V, Abicht A, Lochmuller H (2007a) Congenital myasthenic syndromes: spotlight on genetic defects of neuromuscular transmission. *Expert Rev Mol Med* 9:1-20.
- Muller JS, Jepson CD, Laval SH, Bushby K, Straub V, Lochmuller H (2010) Dok-7 promotes slow muscle integrity as well as neuromuscular junction formation in a zebrafish model of congenital myasthenic syndromes. *Hum Mol Genet* 19:1726-1740.
- Muller JS, Herczegfalvi A, Vilchez JJ, Colomer J, Bachinski LL, Mihaylova V, Santos M, Schara U, Deschauer M, Shevell M, Poulin C, Dias A, Soudo A, Hietala M, Aarimaa T, Krahe R, Karcagi V, Huebner A, Beeson D, Abicht A, Lochmuller H (2007b) Phenotypical spectrum of DOK7 mutations in congenital myasthenic syndromes. *Brain* 130:1497-1506.
- Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I (1993) Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364:532-535.
- Naguib M, Flood P, McArdle JJ, Brenner HR (2002) Advances in neurobiology of the neuromuscular junction: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 96:202-231.
- Nelson PG, Fields RD, Yu C, Liu Y (1993) Synapse elimination from the mouse neuromuscular junction in vitro: a non-Hebbian activity-dependent process. *J Neurobiol* 24:1517-1530.
- Ngo ST, Noakes PG, Phillips WD (2007) Neural agrin: a synaptic stabiliser. *Int J Biochem Cell Biol* 39:863-867.
- Nicole S, Davoine CS, Topaloglu H, Cattolico L, Barral D, Beighton P, Hamida CB, Hammouda H, Cruaud C, White PS, Samson D, Urtizberea JA, Lehmann-Horn F, Weissenbach J, Hentati F, Fontaine B (2000) Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet* 26:480-483.
- Niro C, Demignon J, Vincent S, Liu Y, Giordani J, Sgarioto N, Favier M, Guillet-Deniau I, Blais A, Maire P (2010) Six1 and Six4 gene expression is necessary to activate the fast-type muscle gene program in the mouse primary myotome. *Dev Biol* 338:168-182.
- Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS (2004) A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 432:580-587.
- Nosten-Bertrand M, Kappeler C, Dinocourt C, Denis C, Germain J, Phan Dinh Tuy F, Verstraeten S, Alvarez C, Metin C, Chelly J, Giros B, Miles R, Depaulis A, Francis F (2008) Epilepsy in Dcx knockout mice associated with discrete lamination defects and enhanced excitability in the hippocampus. *PLoS One* 3:e2473.
- Ohno K, Brengman J, Tsujino A, Engel AG (1998) Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9654-9659.
- Ohno K, Engel AG, Brengman JM, Shen XM, Heidenreich F, Vincent A, Milone M, Tan E, Demirci M, Walsh P, Nakano S, Akiguchi I (2000) The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol* 47:162-170.
- Owens J, Kullberg R, Brehm P (1993) Contributions of the gamma and epsilon subunit family to nicotinic acetylcholine receptor function. *Receptors Channels* 1:173-180.

- Parker MH, Seale P, Rudnicki MA (2003) Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet* 4:497-507.
- Pato C, Stetzkowski-Marden F, Gaus K, Recouvreur M, Cartaud A, Cartaud J (2008) Role of lipid rafts in agrin-elicited acetylcholine receptor clustering. *Chem Biol Interact* 175:64-67.
- Patton BL (2000) Laminins of the neuromuscular system. *Microsc Res Tech* 51:247-261.
- Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR (1997) Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol* 139:1507-1521.
- Peng HB, Xie H, Rossi SG, Rotundo RL (1999) Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J Cell Biol* 145:911-921.
- Perrier AL, Massoulie J, Krejci E (2002) PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* 33:275-285.
- Perrier NA, Kherif S, Perrier AL, Dumas S, Mallet J, Massoulie J (2003) Expression of PRiMA in the mouse brain: membrane anchoring and accumulation of 'tailed' acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci* 18:1837-1847.
- Porter BE, Weis J, Sanes JR (1995) A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin. *Neuron* 14:549-559.
- Ravel-Chapuis A, Vandromme M, Thomas JL, Schaeffer L (2007) Postsynaptic chromatin is under neural control at the neuromuscular junction. *Embo J* 26:1117-1128.
- Reiner O, Coquelle FM, Peter B, Levy T, Kaplan A, Sapir T, Orr I, Barkai N, Eichele G, Bergmann S (2006) The evolving doublecortin (DCX) superfamily. *BMC Genomics* 7:188.
- Reist NE, Werle MJ, McMahan UJ (1992) Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Neuron* 8:865-868.
- Relaix F, Marcelle C (2009) Muscle stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 21:748-753.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M (2005) A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435:948-953.
- Rieger F, Bon S, Massoulie J (1973) [Electron microscopic studies on stretched and globular acetylcholinesterase molecules of the electric eel (*Electrophorus electricus*)]. *Eur J Biochem* 34:539-547.
- Rigoard P, Bauche S, Buffenoir K, Giot JP, Faure JP, Scepi M, Richer JP, Lapierre F, Wager M (2009a) [The anatomical substrate of muscle contractility]. *Neurochirurgie* 55 Suppl 1:S69-82.
- Rigoard S, Wager M, Buffenoir K, Bauche S, Giot JP, Maixent JM, Rigoard P (2009b) [Major mechanisms involved in the synaptic transmission of the neuromuscular apparatus]. *Neurochirurgie* 55 Suppl 1:S22-33.
- Rochon D, Rousse I, Robitaille R (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21:3819-3829.
- Ruegg MA, Bixby JL (1998) Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci* 21:22-27.
- Sacks LD, Cann GM, Nikovits W, Jr., Conlon S, Espinoza NR, Stockdale FE (2003) Regulation of myosin expression during myotome formation. *Development* 130:3391-3402.
- Salinas PC (2005) Retrograde signalling at the synapse: a role for Wnt proteins. *Biochem Soc Trans* 33:1295-1298.
- Sanes JR (2003) The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem* 278:12601-12604.
- Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22:389-442.

- Sanes JR, Lichtman JW (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2:791-805.
- Sanes JR, Marshall LM, McMahan UJ (1978) Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J Cell Biol* 78:176-198.
- Schaeffer L, de Kerchove d'Exaerde A, Changeux JP (2001) Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron* 31:15-22.
- Schaeffer L, Duclert N, Huchet-Dymanus M, Changeux JP (1998) Implication of a multisubunit Ets-related transcription factor in synaptic expression of the nicotinic acetylcholine receptor. *Embo J* 17:3078-3090.
- Schreiner F, Hoppenz M, Klaeren R, Reimann J, Woelfle J (2007) Novel COLQ mutation 950delC in synaptic congenital myasthenic syndrome and symptomatic heterozygous relatives. *Neuromuscul Disord* 17:262-265.
- Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6:683-690.
- Shi L, Butt B, Ip FC, Dai Y, Jiang L, Yung WH, Greenberg ME, Fu AK, Ip NY (2010) Ephexin1 is required for structural maturation and neurotransmission at the neuromuscular junction. *Neuron* 65:204-216.
- Sigoillot SM, Bourgeois F, Legay C (2010a) Cholinesterases regulation in the absence of ColQ. *Chem Biol Interact*.
- Sigoillot SM, Bourgeois F, Lambergeon M, Strohlic L, Legay C (2010b) ColQ controls postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 30:13-23.
- Simon S, Krejci E, Massoulie J (1998) A four-to-one association between peptide motifs: four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway. *Embo J* 17:6178-6187.
- Smith CL, Mittaud P, Prescott ED, Fuhrer C, Burden SJ (2001) Src, Fyn, and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilization of agrin-induced clusters of acetylcholine receptors. *J Neurosci* 21:3151-3160.
- Speese SD, Budnik V (2007) Wnts: up-and-coming at the synapse. *Trends Neurosci* 30:268-275.
- St John PA, Gordon H (2001) Agonists cause endocytosis of nicotinic acetylcholine receptors on cultured myotubes. *J Neurobiol* 49:212-223.
- Stetzkowski-Marden F, Gaus K, Recouvreur M, Cartaud A, Cartaud J (2006a) Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J Lipid Res* 47:2121-2133.
- Stetzkowski-Marden F, Recouvreur M, Camus G, Cartaud A, Marchand S, Cartaud J (2006b) Rafts are required for acetylcholine receptor clustering. *J Mol Neurosci* 30:37-38.
- Strohlic L, Cartaud A, Cartaud J (2005) The synaptic muscle-specific kinase (MuSK) complex: new partners, new functions. *Bioessays* 27:1129-1135.
- Strohlic L, Cartaud A, Mejat A, Grailhe R, Schaeffer L, Changeux JP, Cartaud J (2004) 14-3-3 gamma associates with muscle specific kinase and regulates synaptic gene transcription at vertebrate neuromuscular synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18189-18194.
- Stum M, Girard E, Bangratz M, Bernard V, Herbin M, Vignaud A, Ferry A, Davoine CS, Echaniz-Laguna A, Rene F, Marcel C, Molgo J, Fontaine B, Krejci E, Nicole S (2008) Evidence of a dosage effect and a physiological endplate acetylcholinesterase deficiency in the first mouse models mimicking Schwartz-Jampel syndrome neuromyotonia. *Hum Mol Genet* 17:3166-3179.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.

- Tajbakhsh S (2003) Stem cells to tissue: molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle. *Curr Opin Genet Dev* 13:413-422.
- Takata H, Terada K, Oka H, Sunada Y, Moriguchi T, Nohno T (2007) Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle. *Dev Dyn* 236:2800-2807.
- Takayama H, La Rochelle WJ, Anver M, Bockman DE, Merlino G (1996) Scatter factor/hepatocyte growth factor as a regulator of skeletal muscle and neural crest development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5866-5871.
- Tanowitz M, Si J, Yu DH, Feng GS, Mei L (1999) Regulation of neuregulin-mediated acetylcholine receptor synthesis by protein tyrosine phosphatase SHP2. *J Neurosci* 19:9426-9435.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.
- Tint I, Jean D, Baas PW, Black MM (2009) Doublecortin associates with microtubules preferentially in regions of the axon displaying actin-rich protrusive structures. *J Neurosci* 29:10995-11010.
- Trinidad JC, Cohen JB (2004) Neuregulin inhibits acetylcholine receptor aggregation in myotubes. *J Biol Chem* 279:31622-31628.
- Trinidad JC, Fischbach GD, Cohen JB (2000) The Agrin/MuSK signaling pathway is spatially segregated from the neuregulin/ErbB receptor signaling pathway at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 20:8762-8770.
- Tsuji S (2006) Rene Cousteaux (1909-1999) and the morphological identification of synapses. *Biol Cell* 98:503-509.
- Tsujino A, Maertens C, Ohno K, Shen XM, Fukuda T, Harper CM, Cannon SC, Engel AG (2003) Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7377-7382.
- Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, Rojas E, Mattsson K, Compton DL, Nunez L, Park JS, Stark JL, Gies DR, et al. (1995) Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* 15:573-584.
- Valiron O, Caudron N, Job D (2001) Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* 58:2069-2084.
- Weatherbee SD, Anderson KV, Niswander LA (2006) LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 133:4993-5000.
- Wells DG, McKechnie BA, Kelkar S, Fallon JR (1999) Neurotrophins regulate agrin-induced postsynaptic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1112-1117.
- Wu H, Xiong WC, Mei L (2010) To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 137:1017-1033.
- Wyatt RM, Balice-Gordon RJ (2003) Activity-dependent elimination of neuromuscular synapses. *J Neurocytol* 32:777-794.
- Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, Taylor P, Hinrichs SH, Lockridge O (2000) Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 293:896-902.
- Yamanashi Y, Higuchi O, Beeson D (2008) Dok-7/MuSK signaling and a congenital myasthenic syndrome. *Acta Myol* 27:25-29.
- Yang X, Arber S, William C, Li L, Tanabe Y, Jessell TM, Birchmeier C, Burden SJ (2001) Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* 30:399-410.
- Yurchenco PD, Patton BL (2009) Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des* 15:1277-1294.

- Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL (2004) Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol* 22:521-538.
- Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L (2008) LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 60:285-297.
- Zhang B, Luo S, Dong XP, Zhang X, Liu C, Luo Z, Xiong WC, Mei L (2007) Beta-catenin regulates acetylcholine receptor clustering in muscle cells through interaction with rapsyn. *J Neurosci* 27:3968-3973.
- Zhang J, Lefebvre JL, Zhao S, Granato M (2004) Zebrafish unplugged reveals a role for muscle-specific kinase homologs in axonal pathway choice. *Nat Neurosci* 7:1303-1309.
- Zheng JQ, Felder M, Connor JA, Poo MM (1994) Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* 368:140-144.
- Zhou H, Glass DJ, Yancopoulos GD, Sanes JR (1999) Distinct domains of MuSK mediate its abilities to induce and to associate with postsynaptic specializations. *J Cell Biol* 146:1133-1146.
- Zhu D, Xiong WC, Mei L (2006) Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Neurosci* 26:4841-4851.
- Zhu D, Yang Z, Luo Z, Luo S, Xiong WC, Mei L (2008) Muscle-specific receptor tyrosine kinase endocytosis in acetylcholine receptor clustering in response to agrin. *J Neurosci* 28:1688-1696.
- Zhu X, Lai C, Thomas S, Burden SJ (1995) Neuregulin receptors, erbB3 and erbB4, are localized at neuromuscular synapses. *Embo J* 14:5842-5848.