



**HAL**  
open science

## Le domaine riche en cystéine de MuSK dans la myasthénie auto-immune

Marius Halliez

► **To cite this version:**

Marius Halliez. Le domaine riche en cystéine de MuSK dans la myasthénie auto-immune. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS093 . tel-04137804

**HAL Id: tel-04137804**

**<https://theses.hal.science/tel-04137804v1>**

Submitted on 22 Jun 2023

**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.

Ecole doctorale Complexité du Vivant – ED515  
INSERM UMR-S 974 – Centre de Recherche en Myologie

## **THÈSE DE DOCTORAT**

En vue de l'obtention du grade de  
**Docteur de Sorbonne Université**

Présentée par M. Marius HALLIEZ

Sujet de la thèse :

### **Le domaine riche en cystéine de MuSK dans la myasthénie auto-immune**

Soutenue publiquement le 31 mars 2023

Composition du jury :

<b>Pr. Ann LOHOF</b>	Professeur des universités	<b>Président</b>
<b>Pr. Laurent SCHAEFFER</b>	PUPH	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Frédéric CHARBONNIER</b>	Professeur des universités	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. Rozen LE PANSE</b>	Directrice de recherche	<b>Examinatrice</b>
<b>Dr. Suzie LEFEBVRE</b>	Chargée de recherche	<b>Examinatrice</b>
<b>Pr. Bertrand FONTAINE</b>	PUPH	<b>Membre invité</b>
<b>Dr. Frédérique RAU</b>	Chargée de recherche	<b>Membre invité</b>
<b>Dr. Laure STROCHLIC</b>	Directrice de recherche	<b>Directrice de thèse</b>





A mon père

# REMERCIEMENTS

Au Pr. Bertrand Fontaine, co-directeur de l'équipe, merci pour m'avoir témoigné son soutien et apporté son écoute dès qu'il en avait l'occasion.

Au Dr. Laure Stochlic, co-directrice de l'équipe et directrice de thèse, merci d'avoir cru en moi et en mes idées. Merci d'avoir su prendre le relai pour mon encadrement afin de rétablir un équilibre de travail crucial pour le déroulement de ma thèse. Ta confiance en moi a contribué à mon développement personnel en tant que scientifique.

Aux membres du jury, mes remerciements sincères pour avoir accepté d'évaluer mon travail et de s'être intéressé à ce projet qui me tient beaucoup à cœur. Merci au Pr. Ann Lohof de présider ma soutenance de thèse, vos enseignements resteront d'excellents souvenirs de mon parcours académique. Merci aux Pr. Frédéric Charbonnier et Pr. Laurent Schaeffer d'avoir lu et discuté ce manuscrit en tant que rapporteurs. Merci au Dr. Rozen Le Panse et au Dr. Suzie Lefebvre, examinatrices de mon travail, pour votre soutien et pour ces nombreuses discussions scientifiques stimulantes.

Aux membres de mon équipe, merci pour votre assistance technique mais surtout votre bonne humeur et votre soutien. J'espère que vous aurez apprécié le temps passé ensemble autant que c'est le cas pour moi.

A mes collaborateurs, Sestina et Massiré ainsi que Frédérique et Charles, de m'avoir fait confiance et permis de m'impliquer dans vos ambitieux projets. Je suis très fier d'avoir travaillé à vos côtés. Mes remerciements vont aussi à Nathalie Sans, Mireille Montcouquiol et Jerome Ezan qui ont toujours fait preuve d'une grande réactivité et ont rendu ce projet possible.

Aux membres du centre de recherche en myologie et à ceux de la myocoop', un immense merci pour tous les bons moments partagés mais aussi les événements scientifiques, sportifs, ludiques, chaleureux et festifs. Je garderai en mémoire la bienveillance dont vous avez tous fait preuve à mon égard. A tous mes jeunes (et moins jeunes) collègues : Anne-Charlotte, Anaïs, Edouard, Amélie, Ines, Aly, Zoheir, Charles, Massiré, Antoine, Cécile... : à très bientôt !

A mes anciens collègues, Olivia, Myriam, Juliette, Déborah, Odessa, Axel, Cloé, Alexandra, Benoît, Nicolas, Samy, Caroline, Elise. Je ne vous oublie pas et je mesure à quel point votre

présence au laboratoire a été importante pour moi. J'espère pouvoir entretenir encore longtemps nos liens qui dépassent maintenant largement le stade de simple collègue.

A mes amis, Sevak, Nathan, Lauraline, Fabian, Max, Simon, Pauline, Guillaume, Hannah, Nicolas, Arthur, Brice, Louis, Baptiste, Cyprien, Victor. Merci de m'avoir écouté me plaindre mais en dehors de tout ça, merci d'être toujours aussi géniaux et uniques. Je ne voudrais changer d'amis pour rien au monde.

A ma famille, mes sœurs Roxane et Clémentine et à ma maman, qui se sont toujours assurées de mon bien-être et m'ont encouragé dans tous les instants. Merci à mes parents pour la confiance qu'ils m'ont accordée et pour leur soutien dans tous mes projets professionnels et personnels. Papa, je fais aujourd'hui, et je ferai demain, tout pour te rendre fier.

De profonds remerciements à Suzie et à Frédérique, qui ont su rétablir ma confiance et être toujours disponibles aux moments où j'en avais le plus besoin. Vos conseils et vos encouragements ont été des atouts indispensables à ma réussite. Je n'oublie pas nos longues discussions scientifiques ainsi que la considération que vous portez à mon égard.

A Céline B., merci pour ton soutien infailible et ta présence quotidienne dans cette aventure. Je ne peux que te souhaiter la réussite et le bonheur que vous méritez, toi et ta petite famille.

A Steve, mon acolyte de (presque) toujours. Je te dois beaucoup, de ma formation technique initiale avec Suzie jusqu'à notre travail en binôme sur ce projet. Partager mon bureau et mes journées avec toi restera un souvenir impérissable. Voir aujourd'hui ta place vide me rappelle encore à quel point tu as été important pendant mon apprentissage.

A Stéphanie, qui est rapidement devenue un repère dans ce nouveau monde. Je suis heureux d'avoir pu travailler à tes côtés et de pouvoir aujourd'hui encore te compter parmi les merveilleuses rencontres que j'ai pu faire au CdR. Vive le E prépausal !

A Julien, sans qui je ne serai jamais arrivé là. Un immense merci de m'avoir transmis ton savoir et ta passion. Tu m'as fait confiance et tiré vers le haut dès mon premier stage en laboratoire et depuis nous ne sommes plus quittés. Tu es pour moi un éminent scientifique mais surtout le meilleur mentor que j'aurai pu espérer. Je souhaite à tout le monde d'avoir quelqu'un comme toi dans la vie.

A Morgane, dont la place dans mon cœur n'a fait que grandir depuis notre rencontre. Tu m'as toujours encouragé, peu importe les situations et ça a beaucoup compté pour moi. Je suis heureux de pouvoir partager ma vie avec toi dans une relation de confiance et d'honnêteté.

# ABREVIATIONS

---

<b><math>\alpha</math>-BTX</b>	$\alpha$ -bungarotoxine	<b>DOK7</b>	<i>Downstream of tyrosine kinase 7</i>
<b><math>\beta</math>-TrCP</b>	<i>Beta-transducin repeats-containing protein</i>	<b>dsRNA</b>	<i>Double stranded ribonucleic acid</i>
<b>2H3</b>	<i>Neurofilament medium chain</i>	<b>Dvl</b>	<i>Dishevelled</i>
<b>ACh</b>	Acétylcholine	<b>EAMG</b>	<i>Experimental autoimmune myasthenia gravis</i>
<b>AChE</b>	Acétylcholinestérase	<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>
<b>APC2</b>	<i>Adenomatous polyposis Coli</i>	<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger	<b>EMG</b>	Electromyogramme
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate	<b>(m)EPP</b>	<i>(miniature) end-plate potential</i>
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<b>C1q</b>	<i>Complement component 1q</i>	<b>Fzd</b>	<i>Frizzled</i>
<b>CBA</b>	<i>Cell based assay</i>	<b>GAPB</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B</i>
<b>CFA</b>	<i>Complete Freund's adjuvant</i>	<b>GDNF</b>	<i>Glial-cell neurotrophic factor</i>
<b>ChAT</b>	<i>Choline acetyltransferase</i>	<b>Gsk3</b>	<i>Glycogen synthase kinase</i>
<b>CHT</b>	<i>Choline transporter</i>	<b>HB9</b>	<i>Homeobox 9</i>
<b>CK1</b>	<i>Casein kinase 1</i>	<b>HEK293T</b>	<i>Human embryonic kidney 293T</i>
<b>CoA</b>	Co-enzyme A	<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>ColQ</b>	<i>Collagen-like tail subunit of asymmetric acetylcholinesterase</i>	<b>HSA</b>	<i>Human skeletal actin</i>
<b>CRD</b>	<i>Cystein rich domain</i>	<b>IFA</b>	<i>Incomplete Freund's adjuvant</i>
<b>CST</b>	Cellule de Schwann terminale	<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>C-ter</b>	Carboxy terminal	<b>JNM</b>	Jonction neuromusculaire
<b>DEC</b>	Domaine extracellulaire	<b>KD</b>	<i>Kinase domain</i>
<b>Dkk1</b>	<i>Dickkopf-related protein 1</i>	<b>KO</b>	<i>Knock out</i>
<b>LB</b>	Lymphocyte B	<b>RYK</b>	<i>Receptor-like tyrosine kinase</i>



<b>LDL</b>	<i>Low-density lipoprotein</i>	<b>SEA</b>	<i>Sea urchin sperm protein, enterokina, Agrin</i>
<b>LEF</b>	<i>Lymphoid enhancer binding factor</i>	<b>Sfrp4</b>	<i>Secreted frizzled-related protein 4</i>
<b>LG</b>	<i>Laminin-like globular</i>	<b>SH2</b>	<i>Src homology 2</i>
<b>Lrp4</b>	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 4</i>	<b>shRNA</b>	<i>Short hairpin ribonucleic acid</i>
<b>MACF1</b>	<i>Microtubule-actin cross-linking factor 1</i>	<b>siRNA</b>	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
<b>ME</b>	Moelle épinière	<b>SLA</b>	Sclérose latérale amyotrophique
<b>MG</b>	<i>Myasthenia Gravis</i>	<b>SMC</b>	Syndrome myasthénique congénital
<b>MuSK</b>	<i>Muscle specific kinase</i>	<b>SNAP25</b>	<i>Synaptosome associated protein 25</i>
<b>NGF</b>	<i>Nerve growth factor</i>	<b>SNARE</b>	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
<b>NtA</b>	<i>N-terminal Agrin</i>	<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>N-ter</b>	Terminaison amine	<b>Sorbs1/2</b>	<i>Sorbin and SH3 domain containing 1/2</i>
<b>P2YR</b>	Récepteur purinergique P2Y	<b>SRPα</b>	<i>Signal recognition particle α</i>
<b>PAK1</b>	<i>Serine/threonine-protein kinase 1</i>	<b>SV2</b>	<i>Synaptic Vesicle 2</i>
<b>PAMC</b>	Potentiel d'action musculaire composé	<b>TA</b>	<i>Tibialis Anterior</i>
<b>Pax3</b>	<i>Paired box gene 3</i>	<b>TCF</b>	<i>T-cell factor</i>
<b>PCP</b>	<i>Planar cell polarity</i>	<b>TM</b>	Transmembranaire
<b>PTB</b>	<i>Phosphotyrosine-binding</i>	<b>Tyr</b>	Tyrosine
<b>PTK7</b>	<i>Protein tyrosine kinase 7</i>	<b>VACHT</b>	<i>Vesicular acetylcholine transporter</i>
<b>(m)RACH</b>	Récepteur à l'acétylcholine (muscarinique)	<b>Vangl2</b>	<i>Van Gogh-like 2</i>
<b>RIA</b>	<i>Radio immunoassay</i>	<b>VGCC</b>	<i>Voltage gated calcium channel</i>
<b>RIM1α/2α</b>	<i>Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1α/2α</i>	<b>VGSC</b>	<i>Voltage gated sodium channel</i>
<b>RING-H2</b>	<i>Really interesting new gene H2</i>	<b>VS</b>	Vésicule synaptique
<b>ROR1/2</b>	<i>Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1/2</i>	<b>Wls</b>	<i>Wntless</i>
<b>RTK</b>	Récepteur à activité tyrosine kinase	<b>WT</b>	<i>Wild type</i>

---

# TABLE DES MATIERES

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
Préambule : la commande motrice volontaire chez l'Homme, naissance et voie empruntée	2
<b>Chapitre I. Structure, formation et fonctionnement de la jonction neuromusculaire chez la souris</b>	<b>6</b>
<b>I.1. La JNM, un assemblage tripartite complexe</b>	<b>6</b>
I.1.1. La terminaison du motoneurone	8
I.1.2. La fibre musculaire striée squelettique	10
I.1.3. La cellule de Schwann terminale	12
I.1.4. Outils de comparaison et différences structurales de la JNM chez les modèles vertébrés d'étude connus	16
I.1.5. La transmission synaptique neuromusculaire	20
<b>I.2. Phénoménologie de la formation, maturation et maintenance de la JNM murine</b>	<b>21</b>
I.2.1. Stades précoces pré-innervation	21
I.2.2. Contacts synaptiques	22
I.2.3. Maturation de la JNM	24
I.2.4. Mécanismes de maintenance de la JNM	29
<b>I.3. Acteurs moléculaires à la synapse neuromusculaire</b>	<b>30</b>
I.3.1. MuSK, le chef d'orchestre	30
I.3.2. La signalisation Agrine/Lrp4/MuSK	32
I.3.3. La signalisation Wnt à la JNM	39
<b>Chapitre II. La myasthénie auto-immune et MuSK</b>	<b>46</b>
<b>II.1. Généralités sur la MG anti-MuSK</b>	<b>47</b>
II.1.1. Statistiques, diagnostic, symptômes et traitements	47
II.1.2. Différences majeures entre MG anti-RACH et anti-MuSK	51
<b>II.2. Physiopathologie de l'immunoréactivité contre MuSK</b>	<b>53</b>
II.2.1. Mécanismes pathologiques connus	53
II.2.2. Modèles d'étude établis	59
<b>Chapitre III. Objectifs de la thèse : mettre en évidence la pathogénicité des anticorps dirigés contre le domaine riche en cystéine de MuSK</b>	<b>64</b>
<b>Résultats</b>	<b>67</b>
Article - MuSK cystein rich domain antibodies are pathogenic in autoimmune myasthenic syndrome	68
Résumé de l'étude	68
MuSK cystein rich domain antibodies are pathogenic in autoimmune myasthenic syndrome	70
<b>Discussion générale</b>	<b>112</b>
I. La difficulté de génération des modèles animaux de MG anti-MuSK	114
II. Focus sur le CRD de MuSK et son rôle à la JNM	119
III. Les potentielles cibles collatérales des anticorps anti-MuSK <sup>CRD</sup>	122
<b>Bibliographie</b>	<b>128</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**

## **Préambule : la commande motrice volontaire chez l'Homme, naissance et voie empruntée**

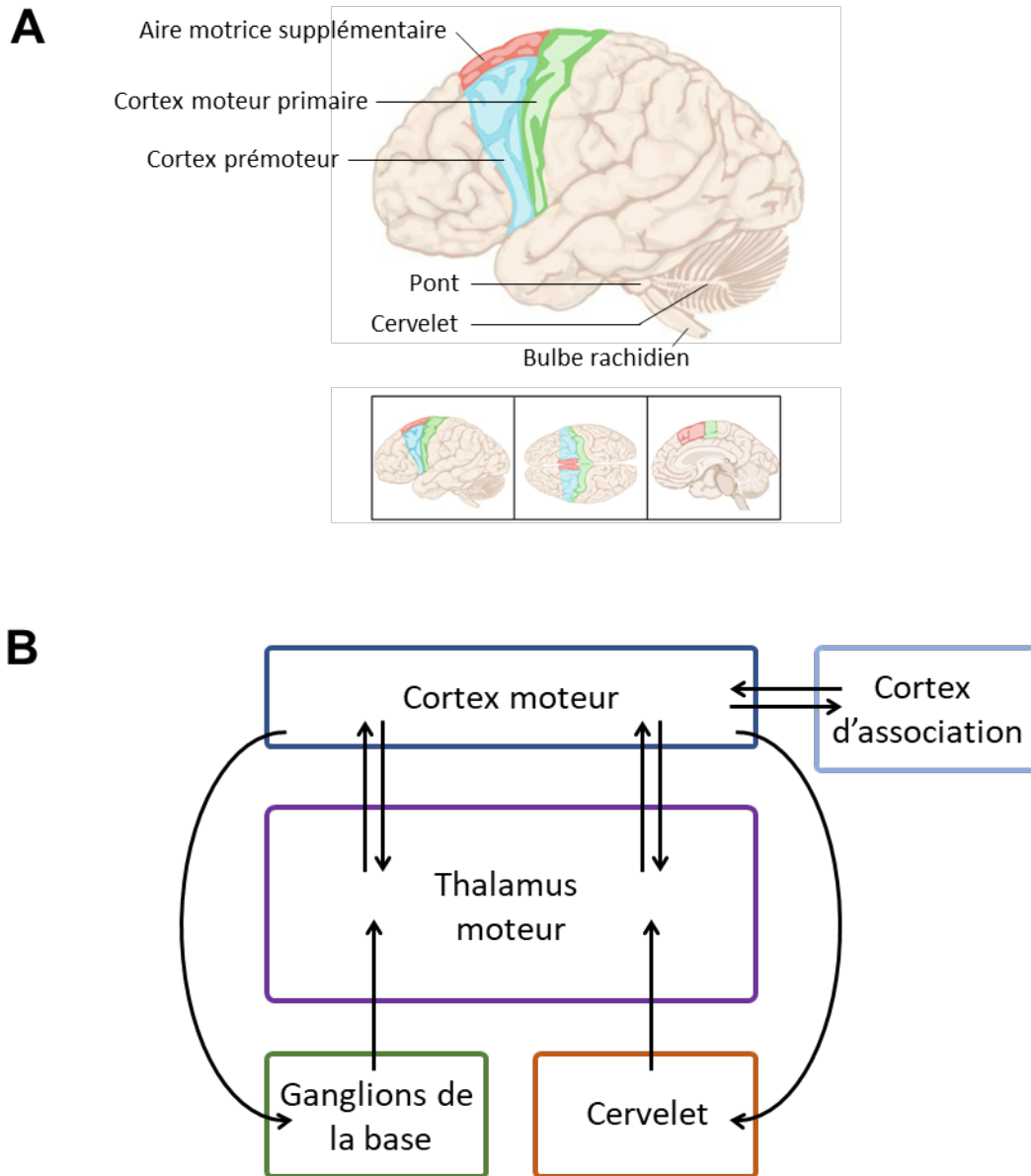
La mise en œuvre de mouvements volontaires simples ou complexes et stéréotypés tels que la marche repose sur le cortex moteur et le cortex d'association. L'action organisée de ces aires permet de transmettre les messages nerveux au bon ensemble de motoneurons afin d'effectuer des mouvements coordonnés, précis et adaptés à la situation.

Le cortex moteur se décompose en 3 zones retrouvées dans le lobe frontal : le cortex moteur primaire aussi appelée aire M1 correspondant à l'aire 4 de Brodmann, le cortex prémoteur et l'aire motrice supplémentaire (Figure 1A). Chacune des 3 zones du cortex moteur est impliquée dans différents processus afin de mener à des mouvements complexes et harmonieux. Le cortex primaire M1 va principalement participer à la force donnée à un mouvement indépendamment de la force générée par chaque muscle individuel qui elle sera régie par le message codé en fréquence par les motoneurons  $\alpha$ . De plus, l'activité du cortex primaire code aussi pour la direction, l'amplitude et la vitesse des mouvements. Le cortex prémoteur semble être plutôt impliqué dans l'aspect comportemental des mouvements plutôt que dans leur exécution directe. De fait, les neurones de cette région vont décharger lors de la préparation des mouvements mais aussi d'une manière dépendante du contexte et de la justesse de l'action. Enfin, l'aire motrice supplémentaire va, elle, être chargée de la programmation et la coordination de séquences complexes de mouvements bilatéraux et de la répétition de telles séquences. La commande motrice volontaire fait intervenir le cortex d'association et ce dernier est impliqué dans la bonne sélection des mouvements en fonction du contexte comportemental et environnemental. Il va aider à la représentation spatiale de l'environnement indépendamment des messages visuels et à l'appréhension des conséquences d'un mouvement (Knierim, 2020).

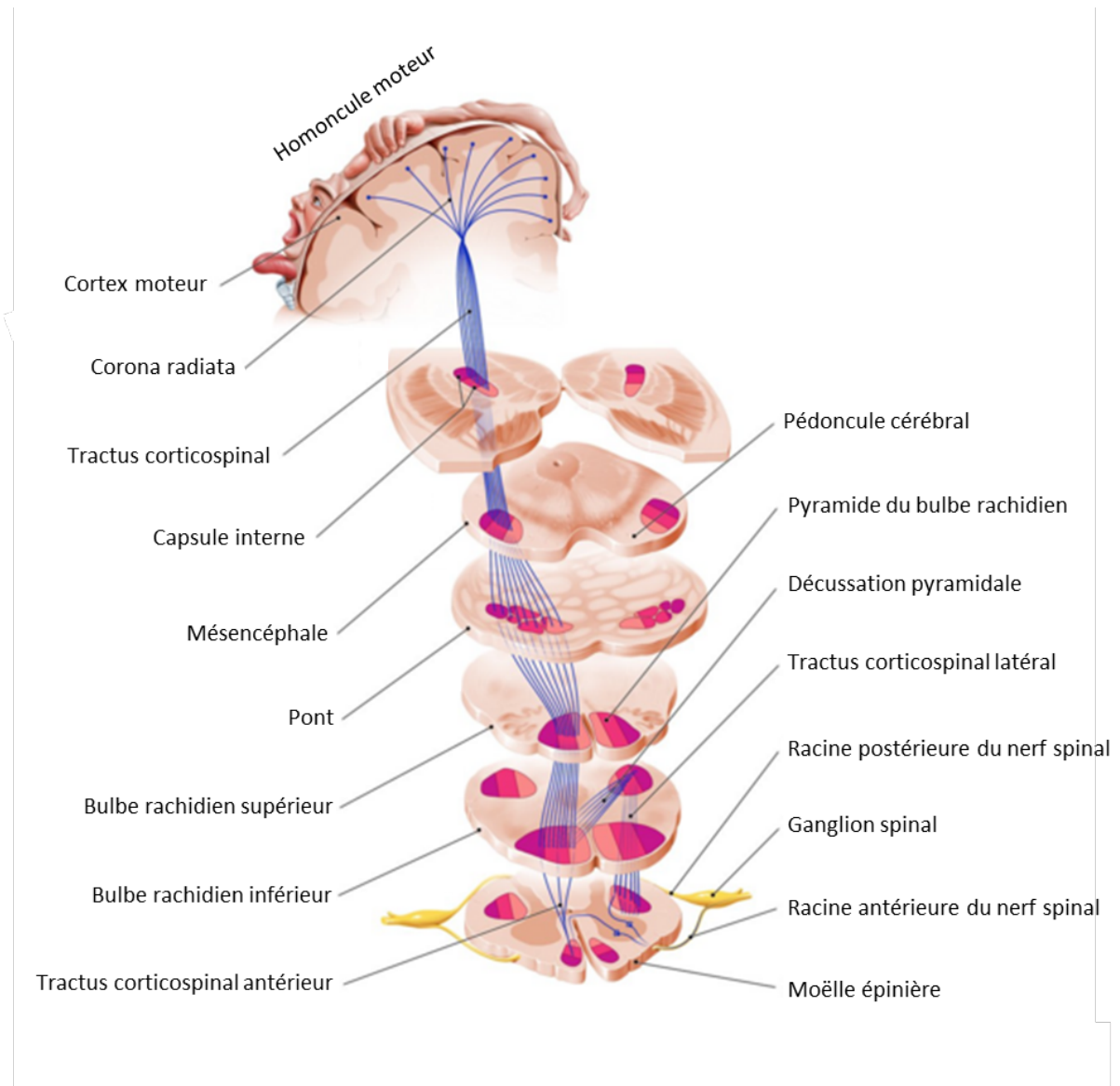
Le cortex moteur primaire est organisé de manière somatotopique c'est-à-dire que chaque région est associée à certaines parties de corps. Plus précisément, il est important de noter que chaque groupe de neurones n'est pas responsable de la contraction d'un seul muscle ; les neurones sont plutôt regroupés afin d'agir sur le mouvement de parties entières du corps. Le cortex moteur n'est pas le seul effecteur dans la commande motrice. Il est en communication permanente avec d'autres régions du système nerveux central et ces connexions régulent le message final du cortex moteur. Parmi ces signalisations, on retrouve la voie reliant le cortex aux ganglions de la base (ou noyaux gris centraux) ainsi que la voie cortico-cérébelleuse. Ces signalisations passent par l'intermédiaire du thalamus jouant un rôle d'intégrateur d'une grande

partie des messages qui y passent. A ces voies s'ajoutent les messages venant d'autres régions du cortex cérébral passant, ou non, par le thalamus. Ce réseau gagne en complexité puisque certaines des voies énoncées sont bidirectionnelles (Figure 1B) (Bosch-Bouju et al., 2013). En termes d'histologie, de manière analogue à l'ensemble du cortex cérébral, le cortex moteur regroupe un grand nombre de types neuronaux différents cependant, les cellules caractérisant le cortex moteur sont les cellules de Betz, d'énormes neurones pyramidaux localisés dans la couche V du cortex (McColgan et al., 2020). Les axones de ces derniers participent notamment aux projections à longue portée du faisceau corticospinal.

Le tractus corticospinal constitue la majeure voie efférente chargée de transmettre l'information des commandes motrices (Figure 2). Il est constitué en partie des axones de cellules de Betz mais aussi d'axones de neurones du cortex prémoteur, de l'aire motrice supplémentaire et du cortex somatosensoriel. Ces fibres regroupées vont transiter par les pédoncules cérébraux du mésencéphale et traverser le pont. Dans la partie inférieure du bulbe rachidien, le tractus va se diviser en 2 voies distinctes : environ 90% des axones vont croiser la ligne médiane et former le tractus corticospinal latéral qui transite dans le cordon latéral de la moëlle spinale ; c'est le phénomène de décussation pyramidale. Les efférences restantes persistent du côté ipsilatéral, passent par le cordon ventral de la moëlle épinière (ME) et forment le tractus corticospinal ventral. Les axones du tractus latéral vont notamment aller innerver les motoneurones  $\alpha$  dont le corps cellulaire est localisé dans la corne antérieure de la ME avec celui des motoneurones  $\beta$  et  $\gamma$ . Les motoneurones  $\alpha$  composent donc le dernier relais avant la contraction musculaire ; pour ce faire, le regroupement des axones de ces motoneurones est projeté dans la racine ventrale de la ME et constitue le nerf spinal (Tatu, 2018). Chaque axone motoneuronal, à l'approche de sa cible musculaire striée squelettique, va se ramifier de manière à pouvoir innerver plusieurs fibres musculaires. Une unité motrice regroupe donc un motoneurone et toutes les fibres musculaires qu'il innerve (Liddell & Sherrington, 1925). On note qu'à l'âge adulte, chaque fibre musculaire est innervée par un seul axone. Une fois arrivé à la terminaison de l'axone du motoneurone, le message électrique initialement né dans le cortex moteur, va être converti en message chimique au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM), synapse cholinergique établie entre la terminaison du motoneurone et une fibre musculaire striée squelettique.



**Figure 1. Schéma organisationnel et fonctionnel des aires impliquées dans la commande motrice.** (A) Représentation schématique des différentes aires corticales composant le cortex moteur en vue latérale, du dessus et latérale en coupe sagittale. (B) Schéma fonctionnel de la communication entre les différentes aires du cerveau lors de l'initiation des mouvements. Plusieurs voies sont à double sens et on constate l'existence de boucles d'autorégulation entre le cortex, le cervelet et le thalamus moteur et entre le cortex, les ganglions de la base et le thalamus moteur. Adapté de Knierim, 2020.



**Figure 2. Parcours du tractus corticospinal chez l'Homme.** Au sein du cortex, l'homuncule moteur atteste de l'organisation somatotopique des neurones moteur. Le rassemblement de leurs axones transite par le mésencéphale, le pont puis le bulbe rachidien où a lieu la décussation pyramidale. De ceci découle le tractus corticospinal antérieur ipsilatéral minoritaire et le tractus corticospinal controlatéral majoritaire. Ces axones établissent des synapses notamment sur les motoneurones  $\alpha$  dont les corps cellulaires sont accumulés dans la corne antérieure de la moëlle épinière. Adapté de (Andruşca, 2022) pour Kenhub.com.

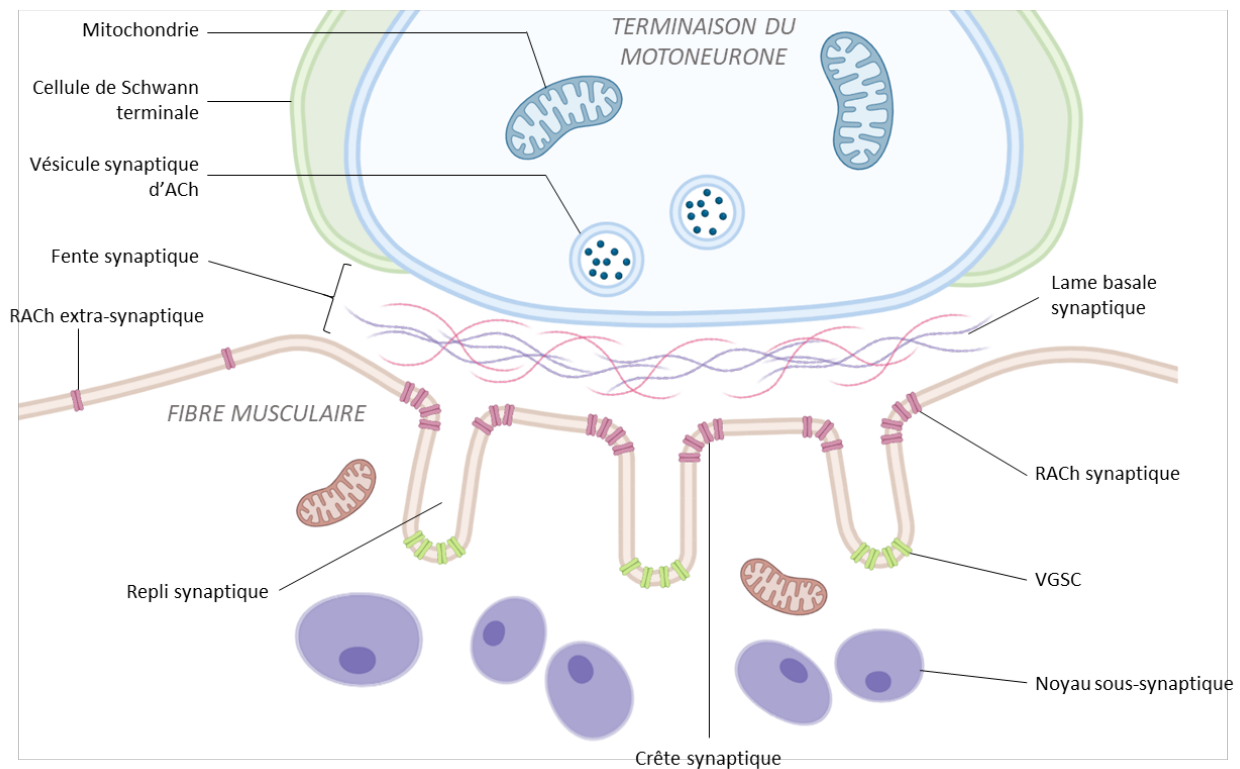
## **Chapitre I. Structure, formation et fonctionnement de la jonction neuromusculaire chez la souris**

La jonction neuromusculaire est une synapse périphérique complexe et hautement différenciée au niveau de laquelle le message nerveux transite afin de mener à la contraction musculaire et donc au mouvement. Son accessibilité ainsi que sa grande taille en font un système de choix dans l'étude de la synaptogenèse et de la connectivité périphérique. Les communications entre les différents types cellulaires qui composent la JNM sont des mécanismes critiques dans la formation, la maturation et la maintenance de cette synapse. Même si ces processus sont bien documentés chez la plupart des organismes modèles en biologie parmi lesquels on mentionne particulièrement la souris, le rat, le poisson zèbre et la drosophile, ce manuscrit se concentrera sur la description des connaissances acquises à propos de la JNM murine.

### **I.1. La JNM, un assemblage tripartite complexe**

La JNM fait intervenir 3 cellules aux origines et fonctions différentes qui coopèrent afin d'assurer une neurotransmission efficace. Ses composantes sont (i) la terminaison axonale d'un motoneurone  $\alpha$ , aussi appelée bouton synaptique, (ii) la fibre musculaire striée squelettique et (iii) la cellule de Schwann terminale qui vient englober la terminaison nerveuse ainsi que la zone synaptique de la fibre musculaire (Figure 3).



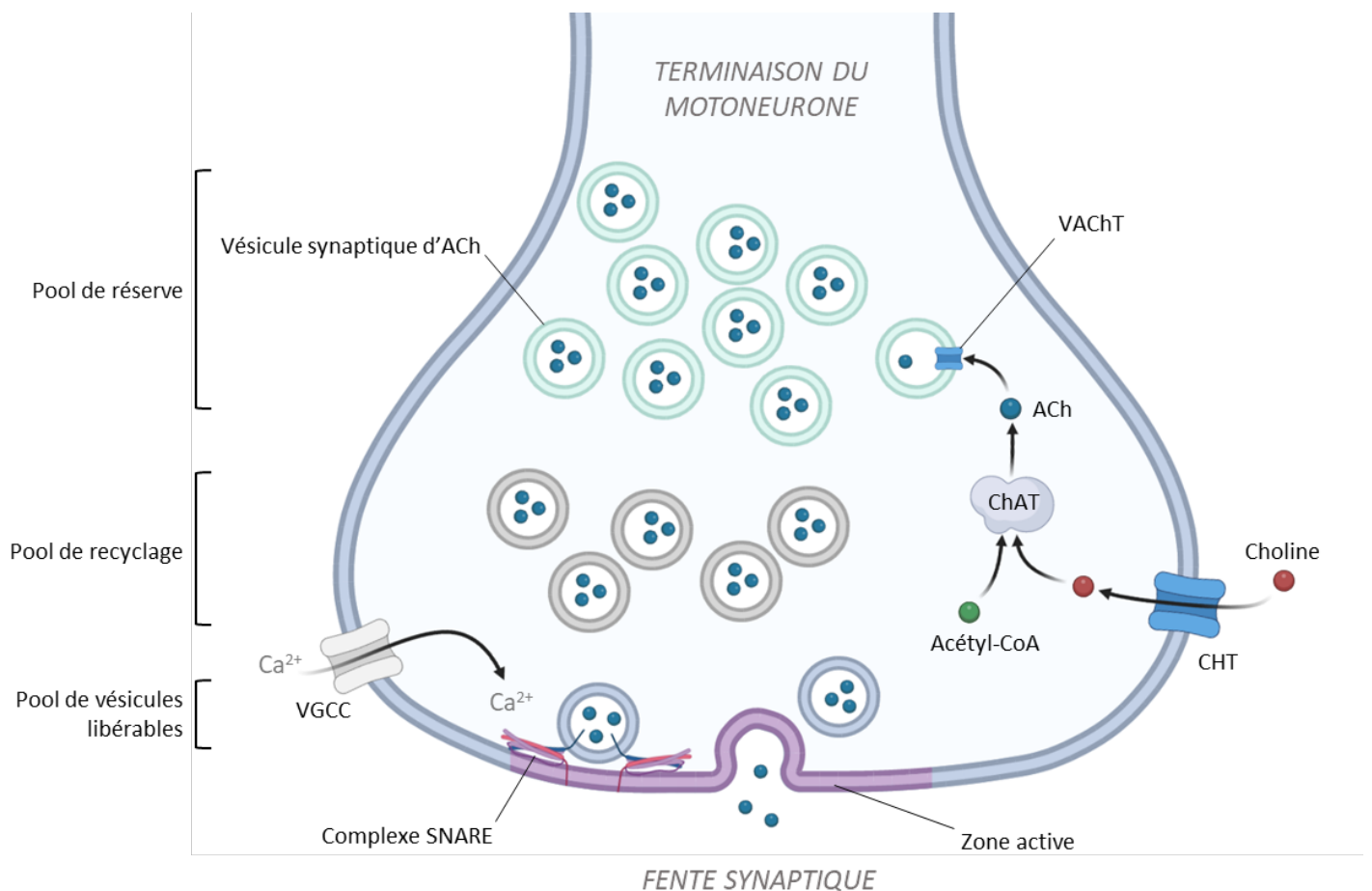


**Figure 3. Organisation générale de la jonction neuromusculaire des mammifères.** Représentation schématique organisée des différents types cellulaires et composants intracellulaires de la JNM. La terminaison nerveuse et la fibre musculaire sont séparées par la fente synaptique, un espace d'environ 50-100 nm. La fente synaptique abrite la lame basale synaptique contenant notamment des fibres de collagène et laminine. Cette matrice contribue à la diffusion des molécules secrétées et permet l'ancrage de certaines protéines à la JNM parmi lesquelles on trouve l'acétylcholinestérase ancrée via sa queue collagénique ColQ. La membrane de la fibre musculaire s'invagine de manière à former une gouttière dans laquelle la terminaison nerveuse s'insère. La membrane post-synaptique présente aussi des replis secondaires serrés au sommet desquels les récepteurs à l'acétylcholine (RACH) s'accumulent. Au fond des replis synaptiques, les canaux sodiques voltage dépendants (VGSC) sont regroupés. Le sarcoplasme de la zone synaptique musculaire est caractérisé par une accumulation de noyaux dits « sous-synaptiques » présentant un profil d'expression distinct de celui des noyaux extra-synaptiques musculaires.

### 1.1.1. La terminaison du motoneurone

La terminaison du motoneurone est située à l'extrémité distale d'un axone et compose l'élément pré-synaptique de la JNM. Elle est spécialisée dans la synthèse et l'exocytose du neurotransmetteur de la synapse neuromusculaire : l'acétylcholine (ACh) (Figure 4). La synthèse de l'ACh fait intervenir une molécule d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) provenant de la transformation du pyruvate par l'enzyme pyruvate déshydrogénase via le métabolisme mitochondrial. L'autre composant de l'ACh est la choline qui entre dans la terminaison nerveuse par un transporteur de choline couplé au sodium (CHT). L'enzyme choline acétyltransférase (ChAT) catalyse la réaction entre l'acétyl-CoA et la choline menant à la synthèse d'ACh. On note que l'étape limitante dans ce mécanisme est la capacité de transport de la choline depuis le milieu extracellulaire vers la terminaison motoneuronale (Ojiakor & Rylett, 2020). De plus, l'expression du gène codant le CHT est elle-même régulée par la fraction nucléaire de la ChAT (Matsuo et al., 2011). Pour éviter leur dégradation, les molécules d'ACh sont accumulées dans des vésicules en passant par le transporteur vésiculaire d'ACh (VACHT). Ces vésicules, dont la membrane contient un grand nombre de protéines transmembranaires comme la synapsine 1, les synaptotagmines 1 et 2 et la synaptobrevine, vont être accumulées et réparties en différents pools : (i) le pool de vésicules libérables constitué par un faible nombre de vésicules synaptiques (VS) accumulées au niveau des zones actives, (ii) le pool de recyclage situé en amont du pool libérable et comprenant un plus grand nombre de VS. Ce pool de recyclage est responsable du remplissage du pool libérable en remplaçant les VS récemment libérées permettant ainsi la nouvelle libération d'ACh rapidement après la décharge initiale. Enfin, (iii) le pool de réserve qui constitue la source principale de VS ; ces dernières sont distantes de la membrane synaptique et non propices à la libération ; ce stock de VS va alimenter le pool de recyclage plus lentement que le pool de recyclage alimente le pool libérable (Alabi & Tsien, 2012). L'ensemble de ces vésicules est mobilisé via un réseau complexe et structuré mettant en jeu les filaments d'actine, le réseau de microtubule ainsi qu'un grand nombre de protéines associées aux dynamiques vésiculaires. Les VS du pool libérable sont accumulées au niveau des zones actives caractérisées par une haute dynamique de la membrane plasmique et par une accumulation intracellulaire de protéines régulant la fusion des VS avec la membrane synaptique. Les plus étudiées sont RIM1 $\alpha$ , RIM2 $\alpha$ , Bassoon et Piccolo. L'interaction de la synaptobrevine de la membrane des VS avec SNAP25 et la Syntaxine, deux protéines ancrées dans la membrane plasmique du motoneurone, mène à la formation du complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*). Cet assemblage

permet une dynamique assez puissante pour imposer des contraintes menant à la fusion des vésicules d'ACh avec la membrane de la terminaison axonale, permettant ainsi la diffusion instantanée de l'ACh dans la fente synaptique. (Fejtova & Gundelfinger, 2006; Garner et al., 2000; Guiheneuc, 2003). L'ensemble de ces mécanismes est notamment régi par des flux calciques qui sont rendus possibles par la présence de canaux calciques de type P/Q dont l'ouverture dépend du voltage (VGCC) dans la membrane du bouton synaptique.



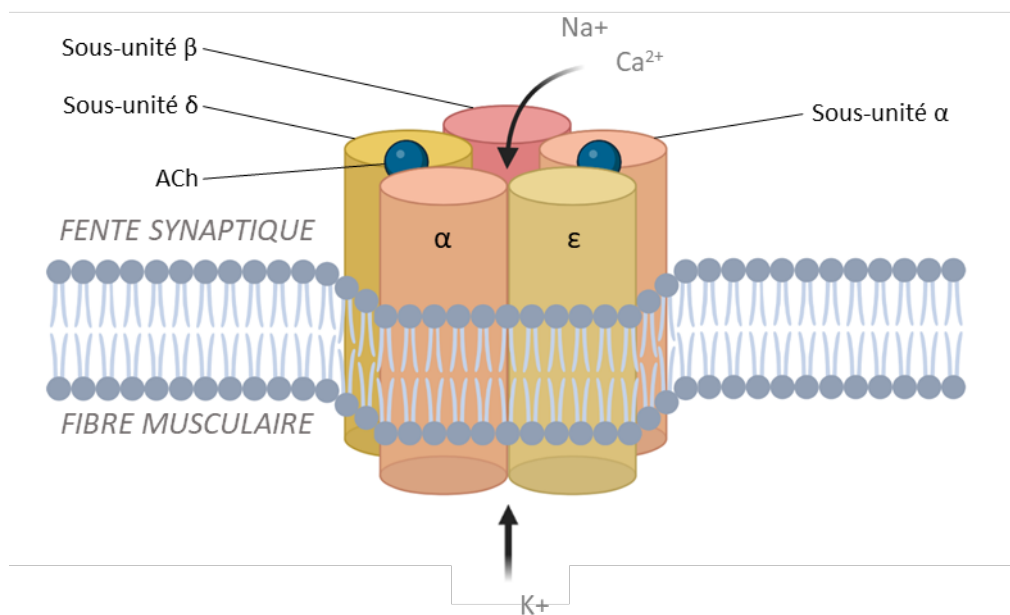
**Figure 4. Synthèse et libération d'acétylcholine dans la terminaison du motoneurone.** La choline extracellulaire est recapturée dans la terminaison par le transporteur de choline (CHT). La choline acétyltransférase catalyse la réaction entre la choline et l'acétyl-CoA pour former une molécule d'acétylcholine (ACh). L'ACh est ensuite accumulée dans des vésicules via le transporteur vésiculaire d'ACh (VACHT). Les vésicules d'ACh sont stockées dans trois différents pools aux effectifs et localisations variables au sein de la terminaison motoneuronale. La fusion des vésicules d'ACh pour la libération de neurotransmetteur a lieu au niveau des zones actives notamment caractérisées par une haute dynamique membranaire. Le complexe SNARE participe à la fusion des vésicules avec la membrane neuronale médiée par des ions  $Ca^{2+}$  ayant transité par les canaux calciques dont l'ouverture dépend du voltage (VGCC) présents à proximité.

### 1.1.2. La fibre musculaire striée squelettique

Une fibre musculaire est une cellule polynucléée résultant de la différenciation d'un myotube lui-même à l'origine de la fusion de myoblastes pendant l'embryogenèse. Un ensemble de myofibrilles contenant des myofilaments forme une fibre musculaire. De nouveau, un ensemble de fibres musculaires séparées par l'endomysium et encapsulées dans le pérимysium compose un faisceau musculaire. C'est la somme des faisceaux musculaires au sein de l'épimysium qui compose un muscle entier.

Les muscles striés squelettiques sont innervés en leur centre par les motoneurones  $\alpha$  et cela au niveau des fibres musculaires. Le centre d'une fibre constitue donc l'élément post-synaptique de la JNM. Cette zone spécifique est hautement différenciée et se distingue des autres régions de la fibre musculaire par une accumulation de noyaux dits « sous synaptiques » au sein desquels les événements de régulation de l'expression des gènes sont différents de ceux qui ont lieu dans les autres noyaux de la fibre. L'élément post-synaptique se caractérise aussi par une très haute spécialisation de sa membrane plasmique en regard de la terminaison nerveuse. En effet, elle adopte une conformation typique avec des invaginations principales sous forme de gouttières synaptiques dans lesquelles les ramifications de la terminaison du motoneurone vont s'engouffrer. Au sein même de ces gouttières, la membrane musculaire présente un second niveau de complexité : elle possède de très nombreux replis généralement perpendiculaires à la direction de la gouttière synaptique où ils sont retrouvés. Ces invaginations à plusieurs niveaux permettent d'augmenter fortement la surface de contact entre les éléments pré et post-synaptiques. Les différentes zones de ces replis sous neurax sont, elles même différenciées ; en effet, (i) le haut des plis forme les crêtes synaptiques qui sont très fortement enrichies en récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (RACH). La densité en RACH dans ces zones est estimée à 10000 unités par  $\mu\text{m}^2$  et chute à 10 unités par  $\mu\text{m}^2$  dans les zones extra-synaptiques. Les RACH nicotiques sont des récepteurs canaux hétéropentamériques ionotropiques non sélectifs aux cations composés de deux sous-unités  $\alpha$ , une  $\beta$ , une  $\delta$  et une  $\epsilon$  sous sa forme adulte. Deux sites de liaison à l'ACh sont retrouvés à l'interface des sous-unités  $\alpha$  et  $\delta$  et des sous-unités  $\alpha$  et  $\epsilon$  (Figure 5). On note que le site  $\alpha\delta$  présente une affinité jusqu'à 40 fois inférieure pour l'ACh par rapport au site  $\alpha\epsilon$  (Cetin et al., 2020; Nayak et al., 2014). La liaison réversible d'un agoniste sur un des deux sites de liaison du RACH va entraîner l'ouverture du canal par un changement conformationnel allostérique afin de permettre la diffusion des cations. Ensuite, (ii) le fond des replis synaptiques est lui tapissé de canaux sodiques voltage-dépendants de type  $\text{Na}_v1.4$  qui sont essentiels dans la genèse des potentiels

d'action musculaires. Ces canaux sont des dimères, la sous-unité  $\alpha$  constituant le pore par lequel les ions  $\text{Na}^+$  transitent et la sous-unité  $\beta$  régissant notamment les propriétés électrophysiologiques du canal (Nicole & Lory, 2021). Ce sont ces canaux qui seront à l'origine de la dépolarisation massive de la membrane musculaire menant à terme à la contraction musculaire ; les RACH induisant des courants bien moins importants. Le détail de la séquence d'évènements qui a lieu lors de la neurotransmission à la JNM est décrit par la suite dans ce manuscrit.



**Figure 5. Structure du récepteur à l'acétylcholine nicotinique à la JNM murine adulte.** Le RACH suit une stoechiométrie  $\alpha 2\beta\delta\epsilon$ . Chaque sous-unité comporte 4 domaines transmembranaires. On retrouve deux sites de liaison à l'acétylcholine (ACh) à l'interface entre les sous-unités  $\alpha$ - $\epsilon$  et  $\alpha$ - $\delta$ . Au sein de ce site de liaison, une des deux sous-unités constitue la face principale d'interaction et la seconde forme la face complémentaire. Quand l'ACh se lie au RACH, ce dernier passe dans sa conformation ouverte et devient perméable aux cations de manière non sélective. Les flèches indiquent les flux des cations. Aux stades embryonnaires et en cas de dénervation, la sous-unité  $\epsilon$  est remplacée par une sous-unité  $\gamma$  changeant ainsi les propriétés conductrices du RACH. Adapté de (Karlín, 2002).

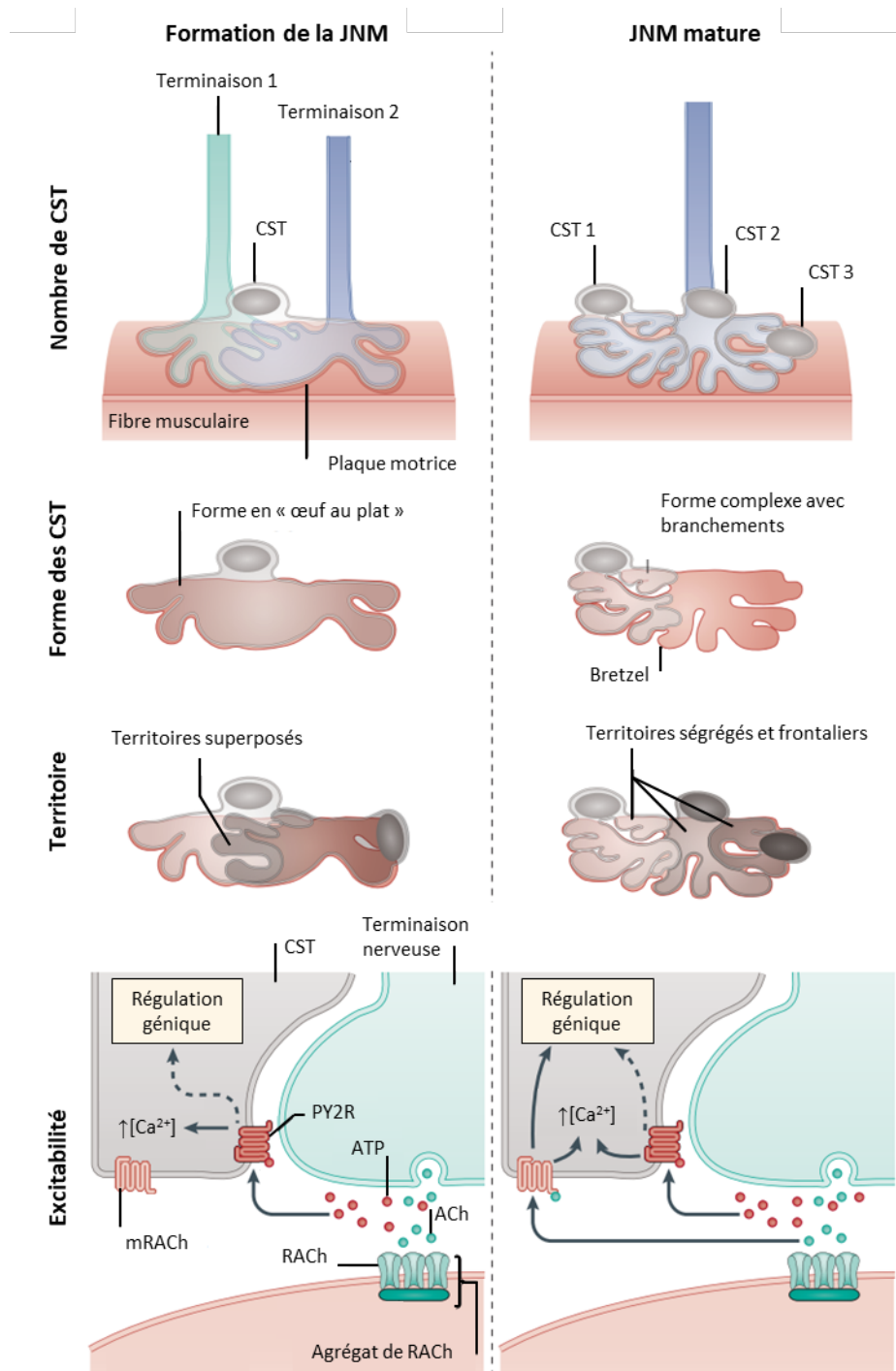
### 1.1.3. La cellule de Schwann terminale

Le troisième partenaire cellulaire de la JNM est la cellule de Schwann (CS). Elle co-existe sous 3 types à la JNM : les CS myélinisantes englobant l'axone, les CS non myélinisantes et les CS terminales (CST) aussi appelées CS péri-synaptiques. Les CS sont originaires des crêtes neurales pendant l'embryogenèse et, alors qu'elles ne sont pas encore totalement différenciées, vont co-migrer avec le cône de croissance du motoneurone quand celui-ci va trouver son chemin depuis la ME jusqu'à sa cible musculaire striée squelettique. Ce n'est qu'une fois le contact synaptique établi que les CS immatures vont terminer leur processus de différenciation. Les CS vont participer à la formation et la maintenance de la JNM (Feng et al., 2005; Reddy et al., 2003) mais leur implication directe est discutée : même si la perte des CS chez la souris n'abolit pas la bonne innervation des muscles par les motoneurons pendant le développement, les terminaisons nerveuses entrent rapidement dans un processus de dégénération et l'appareil post-synaptique perd en complexité structurale (W. Lin et al., 2000).

Pendant les processus précoces d'innervation de la JNM, cette dernière est dite poly-innervée suite à la présence de plusieurs terminaisons motoneuronales à la même synapse. Un nombre limité de CST différenciées englobent alors les terminaisons nerveuses ainsi que la zone synaptique du muscle. Ces CST présentent sur leur membrane des récepteurs muscariniques à l'ACh (mRACH) et des récepteurs purinergiques P2Y (P2YR) de type récepteur couplé aux protéines G liant notamment l'ATP. Elles sont capables de capter et comparer l'activité de chacun des motoneurons (aussi appelée force synaptique) indépendamment, via des courants calciques résultants de l'activation des mRACH et P2YR, et de participer à la sélection de la terminaison nerveuse qui va persister suite à la perte de la poly-innervation (Figure 6) (Darabid et al., 2014). La CST est activement impliquée dans l'élimination des terminaisons nerveuses non sélectionnées : à l'image de la phagocytose, la CST va englober les boutons synaptiques et les dégrader, menant à la formation de structures sphériques contenant les organelles de la cellule neuronale aussi nommés axosomes. Le contenu de ces mêmes axosomes est ensuite retrouvé dans le cytoplasme des CS ayant participé à ce mécanisme particulier via l'implication suggérée de la voie lysosomale (Bishop et al., 2004; Darabid et al., 2013; Smith et al., 2013).

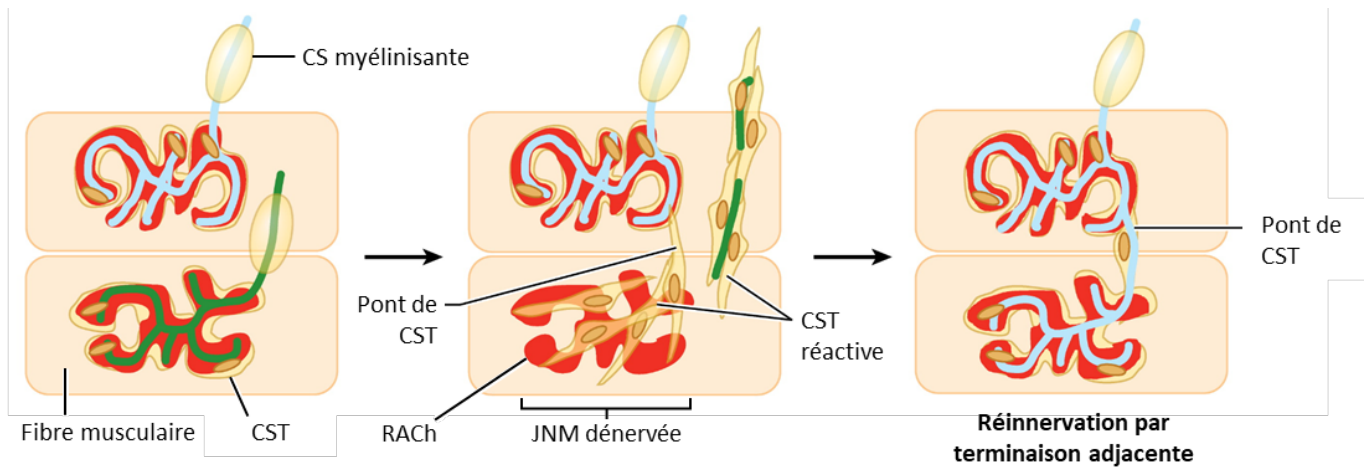
Pendant la maturation de la JNM, le nombre de CST présent à chaque synapse va augmenter et ces dernières vont se répartir sur toute la surface de la JNM sans la persistance de zones de superposition (Figure 6). Ces CST vont adopter des propriétés différentes après cette répartition ; les CST présentes pendant la phase précoce de formation de la JNM sont plastiques

et promeuvent la croissance du motoneurone et le remodelage synaptique alors que les CST des synapses matures favorisent plutôt la stabilité et la modulation de la transmission synaptique. Il est suggéré que ces différences soient dues aux signalisations passant par les mACh de la CST, cette dernière étant stimulée par l'ACh libérée par le motoneurone (Darabid et al., 2014). Enfin, les CST vont aussi intervenir pour la régénération de la JNM suite à une lésion. En cas de rupture de l'intégrité axonale, le segment distal du prolongement entre en processus de dégénérescence Wallérienne menant ainsi à la dénervation de la JNM. La CST va contribuer (i) à la phagocytose des débris résiduels dus à la dégénération, notamment en se différenciant et en proliférant. La CST va aussi (ii) générer des prolongements cytoplasmiques en direction des JNM adjacentes, formant ainsi un échafaudage que les axones d'autres motoneurones vont emprunter pour trouver leur chemin vers la synapse à réinnover (Figure 7) (L. Li et al., 2018; Son & Thompson, 1995). L'environnement favorable à la réinnervation dû à l'implication des CS dans la régénération synaptique implique entre autres la libération de facteurs parmi lesquels on retrouve le GDNF, le BDNF, l'artémine ou le NGF (Fontana et al., 2012; L. Li et al., 2018; Nocera & Jacob, 2020).



**Figure 6. Maturation des cellules de Schwann terminales à la JNM.** Pendant la formation de la JNM, les quelques cellules de Schwann terminales (CST) se partagent le territoire synaptique de manière imprécise : des zones de recouvrement existent. Pendant la maturation de la JNM, les CST vont proliférer et se répartir sur toute la JNM de manière à ce qu'aucune zone de superposition ne persiste. Les profils d'expression des CST sont différents entre les stades embryonnaire et adulte et ceci est régulé par des signalisations dépendantes de récepteurs purinergiques à l'ATP PY2R et récepteurs métabotropiques muscariniques à l'ACh. Adapté de (Darabid et al., 2014).





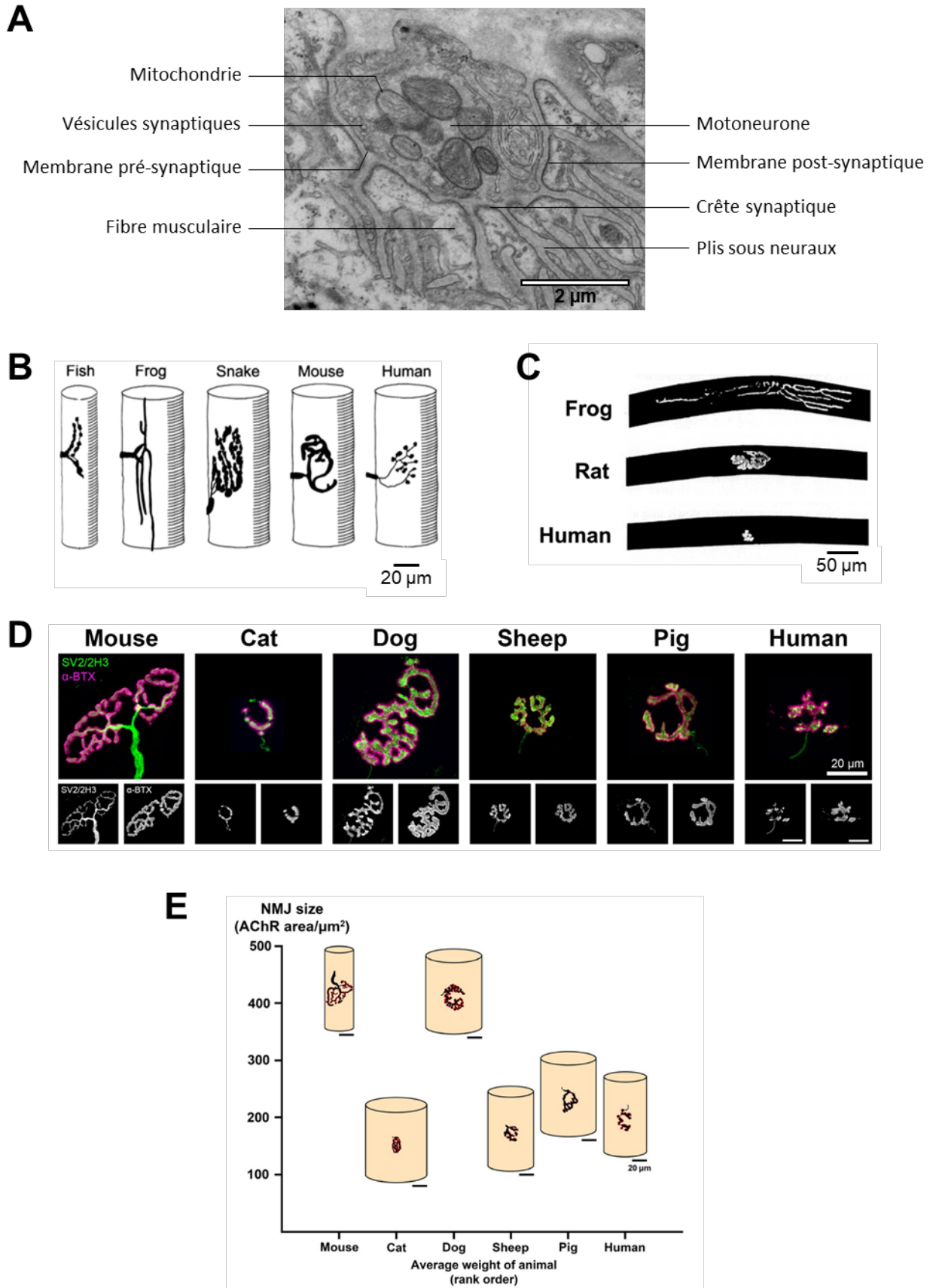
**Figure 7. Formation de ponts inter-synapses par les cellules de Schwann.** En cas de lésion d'une terminaison nerveuse à l'origine du retrait de cette dernière, les CST associées à cette JNM participent à la phagocytose des débris cellulaires et se rétractent avec l'axone alors que les CST adjacentes adaptent leur profil d'expression et prolifèrent. Cela permet la formation d'un échafaudage originaire d'une JNM à proximité et composé de prolongements de CST. Des branchements axonaux de terminaisons motoneuronales adjacentes vont utiliser ces ponts inter-synapses pour réinnover la JNM nouvellement dénervée. Adapté de (L. Li et al., 2018).

#### I.1.4. Outils de comparaison et différences structurales de la JNM chez les modèles vertébrés d'étude connus

La JNM est un modèle d'étude de synapse idéal de par sa taille et son accessibilité. Les travaux de René Couteaux dans les années 1940 portant sur l'activité de l'acétylcholinestérase ont permis de visualiser la JNM pour la première fois. C'est en parallèle le développement de la microscopie électronique qui a mené à un grand nombre de découvertes notamment avec les premières photographies de synapses neuromusculaires de Xénope dans les années 1960 (Birks et al., 1960; De Robertis & Bennett, 1955). L'observation des JNM aujourd'hui est encore souvent réalisée en microscopie électronique (Figure 8A) mais aussi et surtout en microscopie optique grâce notamment à la conjugaison de fluorophores sur l' $\alpha$ -bungarotoxine ( $\alpha$ -BTX), une toxine provenant du venin des serpents du genre *Bungarus* agissant comme antagoniste des RACH nicotiques. Des outils comme l'analyse semi automatisée de clichés 2D par macro comme NMJ-morph (R. A. Jones et al., 2016) et sa mise à jour aNMJ-morph (Minty et al., s. d.), d'analyse de représentation 3D de JNM (Mejia Maza et al., 2021) et l'utilisation de microscopie à super résolution (Marinello et al., 2021) permettent la quantification rapide d'un grand nombre de photographies et mesurent de nombreux paramètres afin de mettre en évidence de potentielles altérations structurales des JNM. Il est important de noter que des outils aussi puissants et le dogme, de plus en plus débattu, des statistiques basées sur la P value peuvent mener à des interprétations inadaptées quand des différences significatives sont retrouvées ; des altérations morphologiques de la JNM n'attestent pas d'une neurotransmission compromise.

La morphologie des JNM de nombreuses espèces a déjà été étudiée et a rendu compte de l'existence de grandes variations aussi bien au niveau de la taille que de l'organisation : alors que les plaques motrices de l'Homme se présentent sous forme d'ilots de RACH aussi appelés pattes de chat, celles de la souris adoptent une forme très caractéristique dite en bretzel avec un réseau complexe et ininterrompu de gouttières synaptiques. La JNM de la souris adulte mesure entre 20 et 40  $\mu$ m en fonction du muscle analysé et en prenant en compte la grande variabilité de taille intra musculaire. La fente synaptique séparant la terminaison du motoneurone et la fibre musculaire mesure environ 100 nm. L'étude de CR Slater visant à comparer morphologiquement les synapses neuromusculaires de différents vertébrés a mené à un postulat qui présente la taille de la JNM comme inversement proportionnelle à la taille de l'espèce (Figure 8B, C) (Slater, 2017). Cette hypothèse a récemment été débattue suite aux travaux du groupe de TH Gillingwater. Ayant étudié les JNM chez différents mammifères, les auteurs n'ont pas mis en évidence de corrélation entre la taille des synapses et celle de l'animal ni entre

la taille des synapses et celle des fibres musculaires. En effet, parmi les échantillons analysés, les JNM les plus grosses sont retrouvées chez la souris et le chien alors que les plus petites sont observées chez le chat qui présente pourtant les fibres musculaires les plus imposantes. En outre, les auteurs mentionnent qu'au niveau de l'organisation structurelle, ce sont les JNM du porc et du mouton qui sont les plus similaires à celles de l'Homme (Figure 8D, E). Cette précision permet d'insister sur les précautions nécessaires à prendre quant à la translation des résultats obtenus chez les rongeurs vers l'humain même s'il existe de grandes similarités cellulaires et moléculaires entre les JNM de ces deux espèces (Boehm et al., 2020).



**Figure 8. Comparaisons morphologiques des JNM de différents vertébrés.** (A) Cliché de microscopie électronique à transmission représentant l'ultrastructure d'une JNM de Tibialis Anterior de souris adulte. (B) Représentations schématiques des JNM de différents vertébrés permettant de comparer la

taille et la morphologie des JNM mais aussi de les rapporter à la taille des fibres musculaires de chaque organisme (Slater, 2017). (C) Images représentatives de JNM chez la grenouille, le rat et l'Homme marquées avec de l' $\alpha$ -bungarotoxine fluorescente et observées au microscope à fluorescence (Slater, 2017). (D) Images représentatives en microscopie confocale de JNM chez différents mammifères. La terminaison nerveuse a été marquée avec des anticorps anti-SV2 et anti-2H3 (vert) et les RACH avec de l' $\alpha$ -bungarotoxine fluorescente (magenta) (Boehm et al., 2020). (E) Représentation schématique des JNM de différents mammifères permettant d'apprécier la taille des JNM en fonction de la taille de la fibre musculaire et de la masse de l'animal pour chaque espèce (Boehm et al., 2020).

### 1.1.5. La transmission synaptique neuromusculaire

La dépolarisation de la terminaison axonale due à l'arrivée de l'influx nerveux depuis le corps cellulaire du motoneurone  $\alpha$  permet l'ouverture des VGCC, menant ainsi à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. L'interaction du  $\text{Ca}^{2+}$  avec le complexe SNARE intimement lié au VS d'ACh va activer les dynamiques de fusion des membranes et ainsi mener à la libération de l'ACh dans la fente synaptique. L'ouverture du RACH par la liaison d'ACh induit des flux de cations menant à un potentiel de plaque (EPP). On appelle quanta d'ACh la quantité de neurotransmetteur libérée par une seule vésicule ; la dépolarisation causée par ce quanta est un potentiel de plaque miniature (mEPP) et c'est la somme des mEPP qui est à l'origine du potentiel de plaque. Si le potentiel de plaque atteint un seuil suffisant, il provoque l'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants  $\text{Nav}1.4$  au fond des replis de la membrane musculaire. De ceci découle un important courant sodique entrant à l'origine d'un potentiel d'action musculaire composé qui va se propager tout le long de la fibre musculaire. Sur son trajet, le potentiel d'action parcourt les tubules T du sarcolemme et déclenche la libération de calcium depuis le réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme musculaire. Cette augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est à l'origine de la contraction musculaire, l'ensemble du phénomène étant appelé le couplage excitation-contraction. Pour terminer la neurotransmission afin d'éviter un maintien de la contraction musculaire, l'ACh liée de manière réversible se sépare de son récepteur et est hydrolysée, avec l'ACh excédentaire, en acétate et en choline par l'acétylcholinestérase (AChE) localisée dans la lame basale de la JNM. Cette choline est ensuite recapturée par la terminaison nerveuse via les CHT afin de générer d'autres molécules d'ACh.

Afin de garantir le fonctionnement de la JNM en conditions non physiologiques, elle est dotée du facteur de sécurité (Wood & Slater, 2001). Ce dernier se matérialise par la libération d'une quantité d'ACh plus importante que nécessaire lors de la neurotransmission de manière à rendre disponible une quantité grandement suffisante pour la génération d'un EPP dépassant le seuil. Le facteur de sécurité peut être représenté par le rapport entre l'amplitude de l'EPP généré et le seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendants. Ce mécanisme fait entrer en jeu un grand nombre de paramètres comme la taille des quanta d'ACh, la quantité de RACH ou de canaux  $\text{Nav}1.4$  dans la membrane post-synaptique et son intégrité est compromise dans de nombreuses pathologies neuromusculaires (Ruff & Lennon, 2008; Tintignac et al., 2015).

## 1.2. Phénoménologie de la formation, maturation et maintenance de la JNM murine

La formation et la maintenance de la synapse neuromusculaire chez les mammifères sont des processus nécessitant une communication dynamique et intime entre tous les éléments qui la composent. Dans ce manuscrit, nous nous concentrons sur les étapes qui mènent à la formation de la JNM de la souris. Ces mécanismes commencent dès l'embryogenèse indépendamment de toute innervation puis sont complexifiés et raffinés suite à l'arrivée des terminaisons motoneuronales sur les sites synaptiques (Figure 9). L'intégrité des JNM doit être maintenue tout au cours de la vie, c'est pourquoi un grand nombre de signalisations interviennent dans la maintenance de cette synapse. On indique les stades embryonnaires par une codification utilisant la lettre E suivie du nombre de jour post fécondation, la gestation chez la souris durant environ 20 jours. A partir de la naissance, la lettre P est utilisée et le nombre de jour est réinitialisé.

### 1.2.1. Stades précoces pré-innervation

Les axones provenant du même groupe de motoneurones dans la ME sont projetés ensemble et forment les nerfs. Les cônes de croissance à l'extrémité de ces prolongements captent leur environnement afin de trouver le chemin qui les mènent vers leur cible pré déterminée. Le guidage des motoneurones fait intervenir les molécules classiques de guidage retrouvées dans les processus de guidage du SNC avec principalement les nétrines, éphrines, sémaphorines et slits (Kolodkin & Tessier-Lavigne, 2011). Les effets attractifs ou répulsifs de ces molécules en interaction avec leurs récepteurs respectifs sont très bien étudiés de manière isolée cependant c'est bien l'effet combinatoire de tous ces signaux qui dirige la croissance de l'axone. Même si l'étude des mécanismes d'intégration de l'ensemble de ces messages par le cône de croissance est incomplète, il a été montré que ces signalisations interagissent entre elles. Par exemple, alors que les axones rejoignent les muscles des pattes chez la souris, les signaux de la nétrine-1 et des éphrines ont montré un effet synergique pour attirer ou repousser le cône de croissance (Poliak et al., 2015). En addition de ces molécules de guidage classiques, d'autres facteurs sécrétés par les cellules impliquées dans la formation de la JNM sont impliqués comme des cytokines ou le GDNF libérés par les CS (Bonanomi & Pfaff, 2010; Haase et al., 2002). C'est donc un ensemble de signaux de différentes origines qui guide les axones des motoneurones vers le muscle.

En parallèle, les fibres musculaires issues de myotubes primaires terminent leur différenciation au stade E12 cependant, un pool de progéniteurs musculaires continue à proliférer et donnera naissance aux myotubes dits secondaires plus tardivement. Entre les stades E13.5 et E14, un nombre restreint d'agrégats de RACH va s'accumuler préférentiellement dans la zone centrale des fibres musculaires. Ces agrégats sont dits aneuxaux car ce phénomène, appelé prepatterning musculaire, se met en place de manière intrinsèque au muscle et indépendamment de toute innervation (Figure 9A) (Arber et al., 2002; W. Lin et al., 2001; Yang et al., 2001).

### 1.2.2. Contacts synaptiques

Alors que les neurones moteurs sont déjà électriquement actifs, les ramifications des axones établissent les premiers contacts synaptiques à partir du stade E14 et l'innervation des fibres musculaire se poursuit jusqu'à E18.5 (Figure 9A). Pendant ce processus, les terminaisons nerveuses vont connecter certains des agrégats pré formés de RACH, on passe de 10% d'agrégats innervés à 50% entre E13.5 et E15.5 (S. Lin et al., 2008). L'implication du prepatterning dans la localisation des futures synapses semble donc réelle et pourtant elle est encore aujourd'hui débattue (Kummer et al., 2006). Même si l'abolition du prepatterning par activation constitutive du récepteur ErbB2 mène à la formation de contacts synaptiques en périphérie des muscles suite à une croissance aberrante des motoneurons (Vock et al., 2008), l'innervation aléatoire et sous numéraire des agrégats de RACH pré formés laisse penser l'existence d'un rôle motoneuronale dans la sélection de la position des futures synapses. En effet, au cours du prepatterning, l'augmentation de l'expression des sous-unités du RACH est spécifique aux noyaux au centre de la fibre cependant, il a été montré que l'innervation va permettre de raffiner ce processus, la bande dans laquelle les sous-unités du RACH sont surexprimés étant bien plus large chez des souris ne présentant pas d'axones moteurs (Yang et al., 2001). La controverse s'étend jusqu'à la remise en cause de la nécessité du prepatterning musculaire dans la formation de la JNM quand le groupe de MA Rüegg et HR Brenner a mis en évidence la formation de synapses, induite par un traitement local par de l'Agrine exogène, dans des zones sans agrégats de RACH préformés (S. Lin et al., 2008).

Entre les stades E15 et E17, les myoblastes encore en prolifération vont fusionner pour former des myotubes secondaires (Cossu & Biressi, 2005). Dès lors, les ramifications axonales vont, après avoir innervé les fibres primaires formées auparavant, contacter ces myotubes secondaires qui forment jusqu'à 80% des fibres d'un muscle (Tintignac et al., 2015). On note



que la formation de ces derniers est dépendante de l'innervation, en effet, dans le diaphragme de souris chez lesquelles la synthèse d'ACh est abolie, les fibres musculaires sont atrophiées, désorganisées et immatures (Misgeld et al., 2002). Suite à l'innervation, l'élément pré-synaptique libère au moins deux facteurs qui affinent la zone prepatternée qu'ils innervent de telle sorte à ce que les agrégats de RACH ne soient concentrés qu'au niveau de sites synaptiques : (i) la libération d'ACh va mener à la dispersion des agrégats de RACH non engagés dans la synaptogenèse par dépolarisation de la membrane musculaire et (ii) l'Agrine neurale, dont l'identité et les rôles seront détaillés plus tard, qui entrave l'action de l'ACh dans les zones synaptiques et permet la stabilisation des RACH neuraux (Misgeld et al., 2005). Ceci fut mis en évidence notamment par le fait que les agrégats de RACH formés lors du prepatternning sont maintenus plus longtemps chez des souris ne présentant pas de motoneurone comparativement à des animaux ne sécrétant pas d'Agrine neurale. Ces données indiquent bien l'existence d'un facteur neuronal capable de désagréger les RACH (W. Lin et al., 2001). Ces phénomènes de stabilisation et de concentration des agrégats de RACH mènent, entre E17 et E18.5, à la fusion de micro agrégats de RACH en agrégats plus larges au sein desquels les récepteurs sont répartis uniformément sous forme de plaque ovale. En parallèle, les terminaisons nerveuses se différencient en boutons synaptiques et commencent à accumuler des VS d'ACh. Ce processus fait intervenir la signalisation rétrograde d'une protéine aux rôles multiples à la JNM ancrée dans la membrane post-synaptique, Lrp4 (low density lipoprotein receptor-related protein 4). De ce fait, Lrp4, en interagissant avec le bouton synaptique de manière trans-synaptique, participe à l'arrêt de la croissance des axones au niveau des futures synapses mais aussi à la formation des VS avec une accumulation des protéines vésiculaires synapsine, synaptophysine et SV2 dans les zones de contact avec Lrp4. Cette action rétrograde semble en plus contribuer à la mise en place des zones actives, en témoigne la présence exacerbée de la protéine Bassoon à la membrane de l'élément pré-synaptique. Lrp4 est donc impliqué dans la différenciation précoce et plus tardive de la terminaison nerveuse, à la fois sur le cône de croissance et sur le bouton synaptique en formation (Yumoto et al., 2012). De nombreuses autres molécules, parfois à action rétrograde à l'instar de Lrp4, sont impliquées dans la différenciation pré-synaptique cependant il est important de noter que leur implication n'est pas essentielle à la formation précoce de synapses neuromusculaires ; ces molécules semblant participer à des processus plus tardifs. Parmi ces partenaires, on retrouve la laminine  $\beta$ 2 qui, en se liant aux VGCC pré-synaptiques, est impliquée dans l'organisation des zones actives (Nishimune et al., 2004) mais aussi les laminines  $\alpha$ 4 et  $\alpha$ 5, les FGF 7, 10 et 22, le GDNF,

la SRP $\alpha$ , le collagène IV et l'intégrine  $\beta 1$  (Fox et al., 2007; L. Li et al., 2018; Rodríguez Cruz et al., 2020; Shi et al., 2012; Wu et al., 2010).

### 1.2.3. Maturation de la JNM

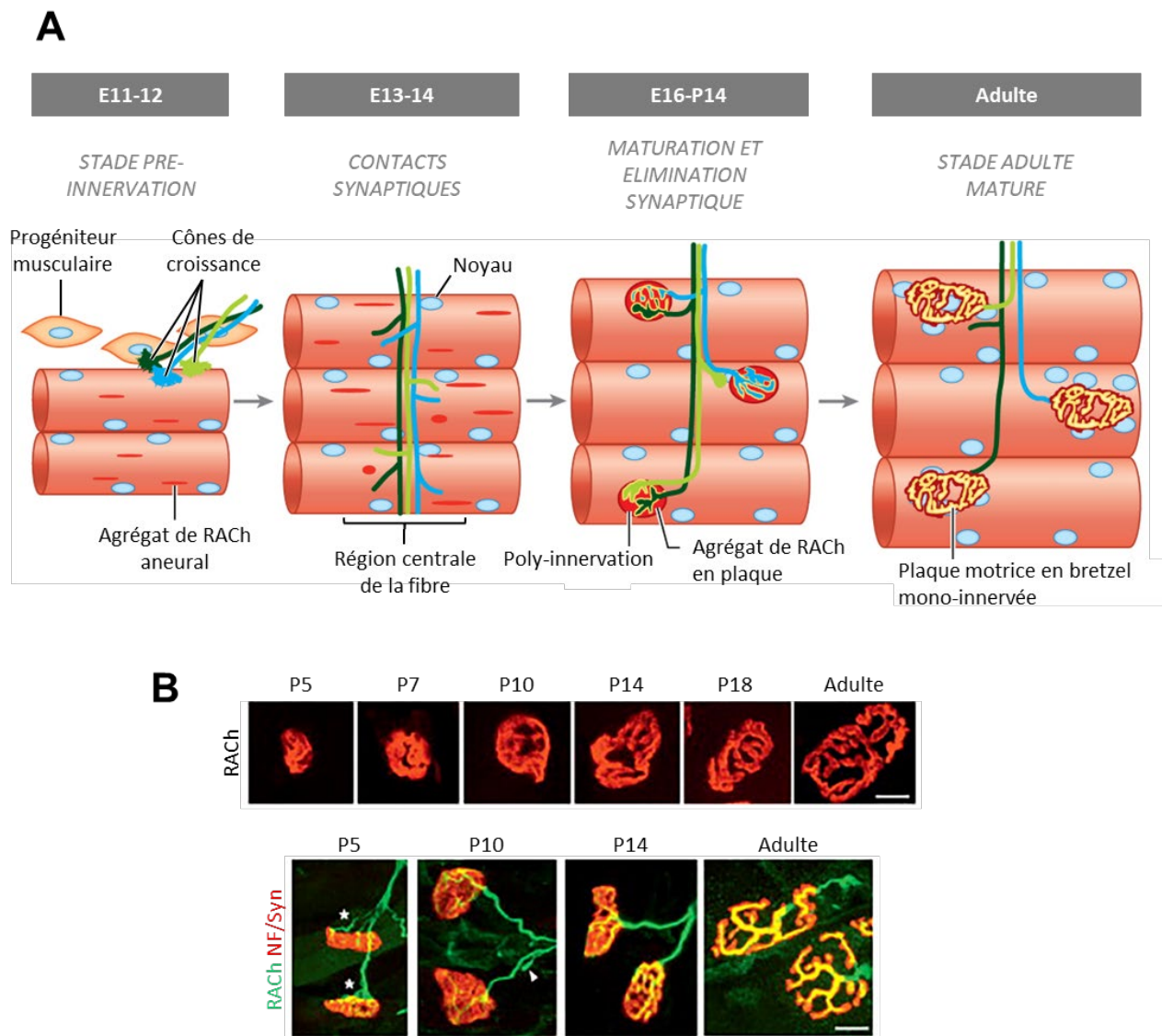
A la naissance, les synapses neuromusculaires formées sont fonctionnelles mais dans une moindre mesure, ne garantissant pas une neurotransmission efficace pour la commande motrice. Un ensemble de mécanismes complexes et coordonnés se met donc en place pour mener à des JNM matures structurellement et fonctionnellement.

Entre les stades P0 et P20, la surface dans laquelle les RACH sont répartis s'agrandit et la plaque commence à se perforer progressivement : les RACH se concentrent dans des zones précises en laissant d'autres vacantes (Figure 9B). Cette migration mène à la répartition des agrégats de RACH au sein d'un réseau de branchements complexes bien défini s'apparentant à une structure dite en bretzel (Slater, 1982). Cette réorganisation n'est pas observée suite à une dénervation post-natale suggérant un rôle critique du compartiment pré-synaptique dans ce mécanisme. D'un point de vue macroscopique, les branches de l'appareil post-synaptique sont en réalité des dépressions linéaires du sarcolemme qu'on appelle gouttières synaptiques. Pendant la maturation et la formation de ces gouttières, en leur sein, a lieu la mise en place d'invaginations secondaires plus serrées et plus profondes à intervalle régulier : ce sont les replis sous-neuraux secondaires et ces derniers sont orientés de manière orthogonale à la direction des gouttières primaires. La migration des agrégats de RACH va donc se traduire par une relocalisation de ces derniers au niveau du haut des plis sous-neuraux, aussi appelés crêtes. Au fond des replis seront retrouvés, comme mentionné précédemment, des canaux sodiques voltage dépendant de type Na<sub>v</sub> 1.4.

Moléculairement, la signalisation des neurégulines et leurs récepteurs à activité tyrosine kinase ErbB contribue *in vitro* à l'augmentation de l'expression de gènes synaptiques en particulier les sous-unités du RACH. Les neurégulines spécifiquement accumulées à la JNM vont permettre le recrutement du facteur de transcription GAPB se liant aux N box des régions régulatrices de transcription de gènes synaptiques et augmentant ainsi leur expression (Schaeffer et al., 2001). Il est certain que l'Agrine neurale participe à la stabilisation des RACH et que de nombreuses autres molécules interviennent dans les dynamiques de transformation de l'appareil post-synaptique comme par exemple, l'existence d'une interaction entre les laminines de la lame basale et le dystroglycan ancré à la membrane musculaire (Patton et al., 2001; Shi et al., 2012).

En parallèle, les RACH eux-mêmes subissent un phénomène de maturation. En effet, pendant l'embryogenèse, les RACH agrégés au niveau des futures synapses sont de stœchiométrie  $\alpha 2\beta\gamma\delta$ . Pendant les premiers jours de vie, la sous-unité embryonnaire  $\gamma$  est substituée par une sous-unité  $\varepsilon$ , le récepteur adoptant ainsi sa forme adulte (Missias et al., 1996). Ce changement de composition s'accompagne par des changements fonctionnels du RACH : (i) sa demi vie augmente largement, témoignant d'une stabilisation de la forme adulte du récepteur et (ii) ses propriétés électrophysiologiques changent. Une fois activé, le canal présente une ouverture de plus courte durée cependant sa conductance pour les cations, notamment le  $\text{Ca}^{2+}$  est augmentée (E. Bruneau et al., 2005; E. G. Bruneau & Akaaboune, 2006).

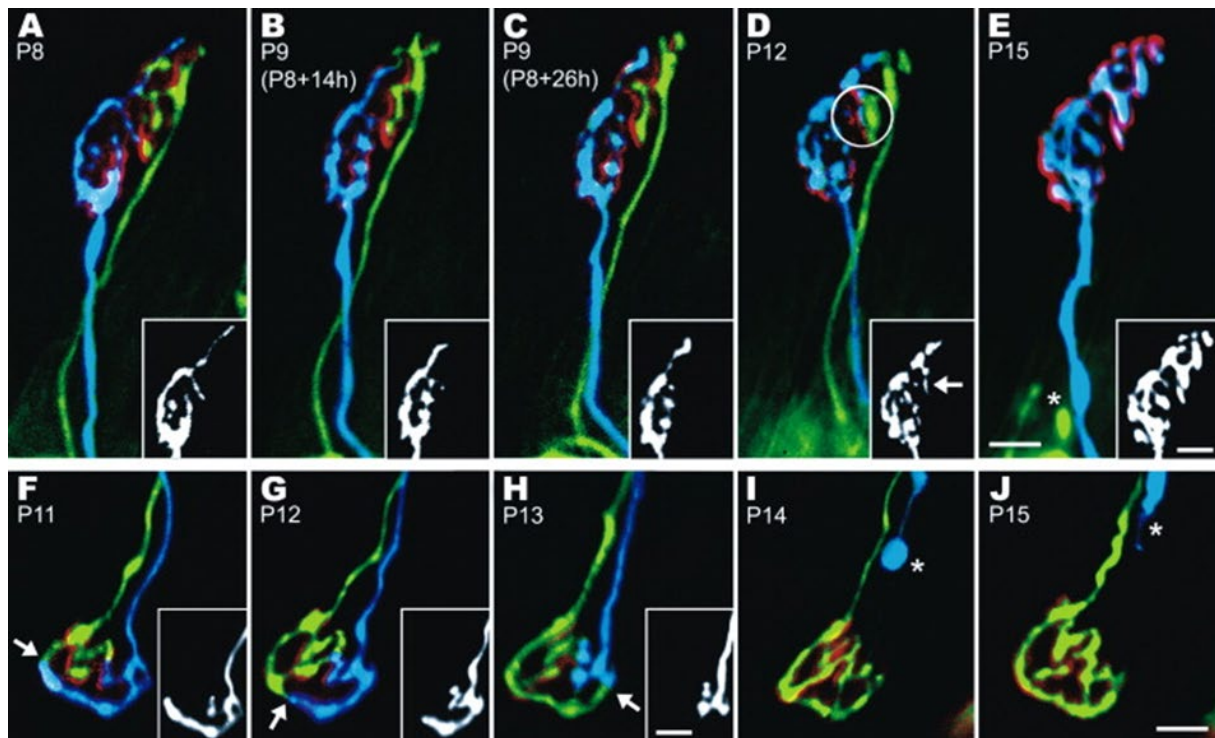
A la naissance, toutes les plaques motrices sont innervées par au moins deux axones moteurs différents, ce nombre pouvant être bien plus important en fonction des synapses (Figure 9A, B) (Tapia et al., 2012). Une hypothèse à l'existence de ce mécanisme est la nécessité d'innover toutes les fibres musculaires, cette poly-innervation compensatoire augmentant fortement la probabilité d'innervation d'un maximum de JNM. Durant les deux premières semaines post-natales, cette poly-innervation est perdue progressivement pour ne laisser qu'une terminaison nerveuse par synapse. Il est important de noter que ce processus est asynchrone : même si on mesure à 10% par jour la perte de poly-innervation, la vitesse et la cinétique de retrait des axones pour les JNM d'un même muscle sont très variables. Ce phénomène faisant entrer les axones moteurs en compétition est appelé l'élimination synaptique. Les terminaisons destinées à être supprimées se rétractent, laissant vacants les sites synaptiques qu'elles occupaient (Figure 10). L'axone restant va donc propager ses prolongements de manière à occuper l'ensemble de la plaque motrice. Les mécanismes d'invasion progressive du territoire au détriment des terminaisons éliminées est encore étudiée même si l'hypothèse proposant qu'une terminaison repousse l'autre a été exclue (Turney & Lichtman, 2012; Walsh & Lichtman, 2003). La littérature apporte un grand nombre de preuves sur l'implication de l'activité électrique de chaque efférence dans la sélection du prolongement gagnant, les axones ayant la plus grande force synaptique prévalant sur les autres. Les travaux de SG Turney et JW Lichtman constituent une preuve solide de l'existence de cette compétition : le retrait forcé de la terminaison avec l'activité électrique la plus forte va mener à l'invasion de la plaque motrice par l'axone plus faible alors que ce dernier était destiné à être éliminé et qu'il avait déjà entamé son processus de retrait (Turney & Lichtman, 2012).



**Figure 9. Etapes de la formation et maturation de la JNM chez la souris.** (A) Représentations schématiques des différentes étapes de formation de la JNM. Avant les premières connections synaptiques, les RACH sont déjà pré-agrégés dans la zone centrale des myotubes primaires. Des progéniteurs musculaires sont, à ce stade, encore en prolifération et fusionneront ensuite pour donner les myotubes secondaires. Lors de l'innervation, les agrégats de RACH extra-synaptiques sont dispersés et les agrégats synaptiques sont innervés par plusieurs terminaisons provenant de plusieurs motoneurones. Pendant la maturation, la poly-innervation est perdue au profit de la mono-innervation pendant le processus d'élimination synaptique. En parallèle, les plaques de RACH s'agrandissent et se perforent. Chez l'adulte, les RACH s'organisent en un réseau complexe de branchements au niveau desquels s'apposent les prolongements d'une même terminaison nerveuse. Adapté de (L. Li et al., 2018). (B) Images représentatives en microscopie confocale de JNM de souris à différents stades de la maturation de la synapse. Les terminaisons nerveuses sont marquées avec des anticorps anti-neurofilament et anti-synaptophysine (NF/Syn - vert) et les RACH avec de l' $\alpha$ -bungarotoxine fluorescente (rouge). Entre les stades P5 et Adulte, les plaques de RACH s'agrandissent et se perforent progressivement. Les RACH se répartissent afin de donner la forme finale dite en bretzel à l'appareil post-synaptique. Le marquage des terminaisons nerveuses permet d'illustrer la poly-innervation (astérisques) existante au stade P5 et progressivement perdue pendant la maturation. Adapté de (Shi et al., 2012).

La force synaptique n'est pas le seul paramètre neuronal qui participe à la sélection de la terminaison finale qui va innervier la JNM ; le timing d'activité l'est tout autant. En effet, la stimulation simultanée des axones qui innervent une même synapse mène à l'inhibition du phénomène d'élimination synaptique. Au contraire, quand les efférences sont actives de manière asynchrone, ce processus est exacerbé même si l'activité totale des deux terminaisons sur une durée donnée est identique (Favero et al., 2010, 2012, 2015). Il est possible que les stimulations alternées permettent aux acteurs de l'élimination synaptique de mieux discriminer les signaux de chaque terminaison indépendamment des autres. En effet, les terminaisons nerveuses ne sont pas les seules décisionnaires et effectrices de l'élimination synaptique.

La CS et la fibre musculaire participent aussi activement à cette dynamique. Par exemple, la neuréguline 1 de type III exprimée par les terminaisons motoneuronales pendant la période d'élimination synaptique va mettre en jeu l'activité des CS dans l'élimination synaptique qui se caractérise notamment par la phagocytose des terminaisons en cours de retrait comme évoqué précédemment (Lee et al., 2016). L'isoforme gliale de la neurofascine Nfasc155 exprimé dans les CS participe aussi aux processus d'élimination synaptique en influant sur la composition et les dynamiques du cytosquelette des terminaisons nerveuses (Roche et al., 2014). Au regard de la fibre musculaire, plusieurs candidats ont été identifiés comme participant à l'élimination synaptique : le complexe majeur d'histocompatibilité de type I semblant promouvoir le retrait axonal mais aussi le BDNF et son précurseur le proBDNF, le premier ayant pour effet de stabiliser l'axone favorisé et le second participant à la rétraction des autres efférences (Je et al., 2013; Tetrushvily et al., 2016).



**Figure 10. Imagerie en temps réelle de l'élimination synaptique à la JNM murine.** Images représentatives en microscopie à fluorescence de JNM de sterno-cléido-mastoïdien de souris à différents stades de maturation de la synapse. Les motoneurones sont fluorescents suite à l'utilisation et au croisement de souris transgéniques exprimant différentes protéines fluorescentes dans le cytoplasme motoneuronal. Les séries de clichés illustrent la compétition entre les deux terminaisons présentes à chaque synapse. La partie encadrée permet d'apprécier le territoire et la morphologie adoptée par une des deux terminaisons (blanc). Progressivement, le territoire occupé par une terminaison progresse au détriment de l'autre (flèches blanches – D, E, F et G) et l'axone perdant finit par se rétracter (astérisque – E, I et J). On note que ce n'est pas toujours la terminaison qui occupe le plus de territoire initialement qui innerve la synapse mature (Walsh & Lichtman, 2003).

#### 1.2.4. Mécanismes de maintenance de la JNM

La pérennisation du fonctionnement de la JNM est indispensable pour assurer une mobilité complète et efficace tout au long de la vie. Cela passe par le maintien de l'intégrité de tous les partenaires qui composent la JNM. Bien entendu, la dégénération d'un des types cellulaires compromet totalement la stabilité de cette synapse. En effet, l'ablation inductible des CST 30 jours après la naissance mène à la fragmentation du réseau de RACH, au retrait de la terminaison nerveuse et à des défauts fonctionnels profonds de la JNM à l'origine du décès des animaux après seulement 3 jours (Barik et al., 2016). Certaines signalisations critiques pour la formation et la maturation de la JNM sont à nouveau mises en jeu dans la maintenance de la synapse. Une signalisation clé pour toutes ces étapes, qui sera détaillée plus tard dans ce manuscrit, est la voie Agrine/Lrp4/MuSK. La perte post-natale de chacun des membres de ce système incluant l'un des partenaires intracellulaires de MuSK nommé DOK7, mène à la destruction des JNM. L'ensemble de ces études fait intervenir différents modèles animaux afin d'induire la déplétion en protéine cible seulement après la maturation complète de la synapse : délétion du gène Lrp4 inductible par la doxycycline (Barik, Lu, et al., 2014), électroporation de siRNA ou dsRNA dirigés contre l'ARNm de MuSK (Kong et al., 2004), modèle de délétion conditionnelle de MuSK (Hesser et al., 2006) et injection de virus adéno-associés codant un shRNA contre les transcrits DOK7 (Eguchi et al., 2016). On note que l'Agrine, en plus d'activer la signalisation Lrp4/MuSK, participe à la maintenance de la JNM par un autre biais ; en effet le groupe de Y Yamanashi a montré que l'activation induite de MuSK par la surexpression de DOK7 ne suffisait pas à maintenir les JNM formées chez des souris délétées pour l'Agrine (Tezuka et al., 2014).

En parallèle, plusieurs protéines ont été montrées comme intervenant dans la maintenance de la JNM sans pour autant avoir un rôle dans sa formation. C'est le cas des protéines  $\alpha$ -syntrophine et  $\alpha$ -dystrobrevine du complexe post-synaptique dystrophine-glycoprotéine participant à la stabilité des RACH à la membrane (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2011). L'implication des dynamiques du cytosquelette sous-synaptique est aussi déterminante pour le maintien de la structure de l'appareil post-synaptique. C'est notamment le cas de la protéine d'échafaudage MACF1 qui participe à l'ancrage des RACH en interagissant avec la rapsyne, dont le rôle est précisé ultérieurement, et les réseaux d'actine et de microtubule (Oury et al., 2019). On note que les RACH ancrés à la membrane post-synaptique sont quand même sujets à une forte dynamique d'échange avec les RACH extra-synaptiques (Akaaboune et al., 2002). Certains mécanismes intervenant dans la différenciation post-synaptique

contribuent aussi à la maintenance de la terminaison nerveuse, la rupture de signalisations rétrogrades menant à la dégradation voir à la perte de l'innervation.

Le vieillissement physiologique mène de manière invariable à une déstabilisation progressive des JNM matérialisée par la fragmentation de l'appareil post-synaptique et une augmentation de la zone de répartition des RACH, diminuant ainsi la densité des JNM en agrégats de récepteurs. Le compartiment pré-synaptique âgé est lui plus enclin à former des prolongements aberrants, des gonflements locaux des branches terminales jusqu'à se retirer de la synapse menant ainsi à la dénervation partielle ou totale de la synapse.

### 1.3. Acteurs moléculaires à la synapse neuromusculaire

#### 1.3.1. MuSK, le chef d'orchestre

La protéine Muscle Specific Kinase (MuSK) est l'acteur principal et l'organisateur intégratif de toutes les étapes de la formation, la différenciation, la maturation et la maintenance de la JNM. La séquence de MuSK est bien conservée entre les mammifères facilitant ainsi son étude et rendant sa structure plus uniforme entre différents modèles. C'est une glycoprotéine à un domaine transmembranaire d'environ 110 kDa. Son domaine extracellulaire contient 3 domaines immunoglobuline-like (Ig1 à Ig3), composés chacun de deux feuillets  $\beta$ , puis un domaine riche en cystéine (CRD) analogue au domaine de liaison des protéines Wnt à leur récepteurs conventionnels Frizzled. Une seule hélice compose le domaine transmembranaire et connecte l'ectodomaine à la fraction intracellulaire qui contient successivement un domaine juxta-membranaire, un domaine à activité tyrosine kinase et une queue C-terminale (Figure 11C) (Hubbard & Gnanasambandan, 2013). Des études cristallographiques ont entre autres permis de simuler les structures 3D des domaines Ig1 et Ig2 (Stiegler et al., 2006), du domaine riche en cystéine (Stiegler et al., 2009) et du domaine tyrosine kinase de MuSK (Till et al., 2002).

Même si MuSK est aussi exprimé dans le système nerveux central, nous nous concentrerons ici uniquement sur son expression et sa localisation dans le muscle squelettique. MuSK est retrouvé dès le stade embryonnaire E9.5 chez les souris dans les myotomes, correspondants aux somites à l'origine des muscles. MuSK est présent dans les myoblastes en prolifération ainsi que dans les myotubes en fusion. On note qu'il est différentiellement exprimé au sein des muscles, une corrélation entre son niveau d'expression et la composition des



muscles en différents types de fibres étant suggérée. Dans le muscle mature sain, l'expression de MuSK est limitée exclusivement à la JNM (Valenzuela et al., 1995). En effet, tout comme l'expression des sous-unités du RACH, celle de MuSK est fortement diminuée dans les régions extra-synaptiques et enrichie au niveau des noyaux sous-synaptiques. De plus, MuSK semble être prepatterné comme les RACH pendant les stades précoces de la formation de la JNM, indépendamment de l'innervation. L'expression uniforme forcée de MuSK au sein de fibres musculaires mène à la formation de structures post-synaptiques en dehors de la zone centrale du muscle qui sont par la suite innervées, suggérant un rôle dans le déterminisme spatial des JNM en formation (Kim & Burden, 2008). De manière intéressante, au niveau de synapses adultes dénervées, l'expression de MuSK est temporairement restaurée dans les zones extra-synaptiques, impliquant tout de même un rôle neuronal dans la régulation de la zone d'expression de MuSK (Bowen et al., 1998).

MuSK est indispensable à la formation de la synapse neuromusculaire, en témoigne l'absence totale de JNM à la naissance des animaux MuSK<sup>-/-</sup> qui meurent de détresse respiratoire (DeChiara et al., 1996). MuSK intervient dès les étapes initiales de formation de la JNM ; en effet, le phénomène de formation d'agrégats de RACH pendant le prepatternning musculaire indépendant du nerf n'est pas retrouvé chez les embryons délétés pour MuSK. L'implication de MuSK dans cette étape semble faire intervenir au moins deux mécanismes distincts : (i) l'activation de MuSK médiée par certaines protéines Wnt qui sera détaillée plus tard dans ce manuscrit et (ii) l'activation de MuSK par interaction avec ses partenaires classiques Lrp4 et DOK7 (Remédio et al., 2016; Tezuka et al., 2014; Weatherbee et al., 2006). D'autres études plus anciennes suggéraient que MuSK seul et plus précisément son domaine tyrosine kinase, artificiellement activé par différents protocoles, serait capable d'initier la formation de synapses neuromusculaires. En effet, l'expression d'une protéine MuSK délétée de son ectodomaine dans des fibres musculaires ne présentant pas de MuSK endogène permet quand même l'agrégation de RACH (Sander et al., 2001). Encore, la surexpression d'une protéine de fusion correspondant à un dimère de domaines intracellulaires de MuSK avec une activité constitutive suffirait à agréger des RACH et initier la transcription de gènes synaptiques y compris *MUSK* (G. Jones et al., 1999). Une précédente étude similaire avait cependant indiqué que l'activité kinasique de MuSK ne suffisait pas à former des agrégats de RACH (Glass et al., 1997) nuanciant ainsi la capacité de MuSK seul à initier la différenciation post-synaptique. Le rôle de MuSK dans la différenciation post-synaptique ne s'arrête pas au prepatternning : il intervient dans le recrutement des noyaux synaptiques et dans la régulation de l'expression des

gènes nécessaires pour la JNM (G. Jones et al., 1999; Sander et al., 2001). Cette régulation comprend notamment une boucle complexe et bimodale de régulation positive dans laquelle MuSK, activé par l'Agrine neurale, augmente l'expression de son propre gène au niveau des noyaux synaptiques afin de maintenir son niveau à la membrane (Lacazette et al., 2003).

L'implication de MuSK dans la différenciation pré-synaptique et l'arrêt de la croissance axonale pendant la formation de la JNM a aussi été mise en évidence. Dans le diaphragme des embryons MuSK<sup>-/-</sup>, les branchements neuritiques secondaires grandissent de manière irrégulière et aberrante et s'éloignent de la bande synaptique centrale. Ce phénotype pourrait être dû à l'absence de sites à innover ce qui mène à la croissance des terminaisons sans but (DeChiara et al., 1996; W. Lin et al., 2001). Cependant, il a été montré que l'expression ectopique de MuSK dans le même tissu induisait la croissance axonale et initiait l'innervation, suggérant fortement l'implication de MuSK dans la genèse de signaux rétrogrades influant sur la différenciation pré-synaptique. Enfin, comme précisé précédemment, MuSK participe également dans la maintenance de la synapse neuromusculaire ; son absence induite à partir de l'âge adulte menant entre autres à la fragmentation et au démantèlement de l'appareil post-synaptique (Kong et al., 2004).

### 1.3.2. La signalisation Agrine/Lrp4/MuSK

La voie Agrine/Lrp4/MuSK constitue la signalisation centrale de maturation et de maintenance de la JNM (Figure 12B). L'Agrine est un héparane sulfate protéoglycane exprimé à la JNM par toutes les composantes. Cependant, plusieurs isoformes existent et l'expression de ces différentes isoformes varie chez les différents types cellulaires. Deux événements d'épissage alternatif ont lieu au niveau de son domaine N-terminal menant à la synthèse d'une forme d'Agrine courte transmembranaire et à une forme longue sécrétée interagissant avec la lame basale synaptique notamment avec les protéoglycanes (M. Ferns et al., 1992). Au niveau C-terminal, l'épissage mène à la formation d'un plus grand nombre d'isoformes : 3 sites respectivement nommés X, Y et Z sont les lieux d'inclusion d'acides aminés et ce système est à l'origine de l'isoforme Z8 de l'Agrine contenant 8 acides aminés supplémentaires dans son domaine laminine-like globulaire 3 (LG3) (Figure 11A). Cette Agrine aussi appelée Z<sup>+</sup> ou Agrine neurale, dont l'expression est exclusive au motoneurone, est la seule capable d'induire l'agrégation consécutive des RACH et son absence n'est pas compatible avec la vie car elle ne permet pas la formation de JNM matures (Cornish et al., 1999; M. J. Ferns et al., 1993; Gautam et al., 1995; Gesemann et al., 1995). Le rôle prédominant de l'Agrine neurale n'exclut pas la

participation des autres isoformes de l'Agrine dans la synaptogenèse neuromusculaire mais s'ils existent, leurs impacts sont beaucoup plus subtils (Burgess et al., 1999).

L'Agrine a été rapidement identifiée comme capable d'activer MuSK et d'induire l'agrégation des RACH dans la membrane post-synaptique cependant, ce n'est qu'en 2008 que deux études ont permis de préciser ce mécanisme en montrant que l'Agrine se lie à Lrp4 qui constitue donc le co-récepteur de MuSK (Kim et al., 2008; B. Zhang et al., 2008). Auparavant, le rôle de Lrp4 dans la différenciation post-synaptique était encore peu clair alors qu'il avait déjà été montré qu'il était indispensable au prepatterning musculaire et aux autres étapes de la synaptogenèse (Weatherbee et al., 2006). Lrp4 est une protéine transmembranaire monomérique composée d'un domaine N-terminal extracellulaire constituant la majorité de la protéine, un segment transmembranaire et une petite queue C-terminale. L'ectodomaine est composé de la succession de huit domaines LDL de classe A, 2 domaines *epidermal growth factor-like* (EGF-like) puis 4 domaines  $\beta$ -propeller, numérotés  $\beta 1$  à  $\beta 4$ -propeller, associés en tandem avec des domaines EGF-like (Figure 11B). Une étude a montré que seule, la fraction extracellulaire de Lrp4 était suffisante pour garantir l'action de la protéine à la JNM (Gomez & Burden, 2011). De manière intéressante, Lrp4 est accumulé à la JNM à la fois dans la terminaison du motoneurone et dans la membrane de la fibre musculaire. Même si seul Lrp4 musculaire semble critique pour la différenciation post-synaptique, Lrp4 semble participer à la différenciation pré-synaptique à la fois de manière directe, via sa présence dans la terminaison nerveuse, et indirecte par la signalisation rétrograde dans laquelle Lrp4 musculaire est impliqué (Wu, Lu, Shen, et al., 2012).

L'Agrine neurale interagit avec le domaine  $\beta 1$ -propeller de Lrp4 via son domaine LG3. Plus précisément, les acides aminés centraux de l'insert Z8, notamment l'asparagine 1783 et l'isoleucine 1785, semblent critiques pour initier la signalisation (Scotton et al., 2006; Zong et al., 2012). Deux dimères Agrine-Lrp4 s'assemblent ensuite, faisant intervenir deux interfaces de liaisons entre Agrine et Lrp4 d'un dimère avec l'autre et une interface entre les deux molécules d'Agrine. Il apparaît que dans cet hétérodimère de composition 2:2, les protéines Lrp4 n'interagissent pas entre elles (Figure 12A). En absence d'Agrine, Lrp4 se lie au domaine Ig1 de MuSK via son domaine  $\beta 3$ -propeller formant ainsi des hétérodimères permettant une activité basale de MuSK. On peut supposer que c'est en partie par le biais de cette activation que le phénomène de prepatterning peut avoir lieu. La liaison du complexe tétramérique Agrine-Lrp4 va renforcer l'interaction pré-existante entre Lrp4 et MuSK par un mécanisme encore inconnu et permettre l'activation de MuSK médiée par une potentielle dimérisation de deux

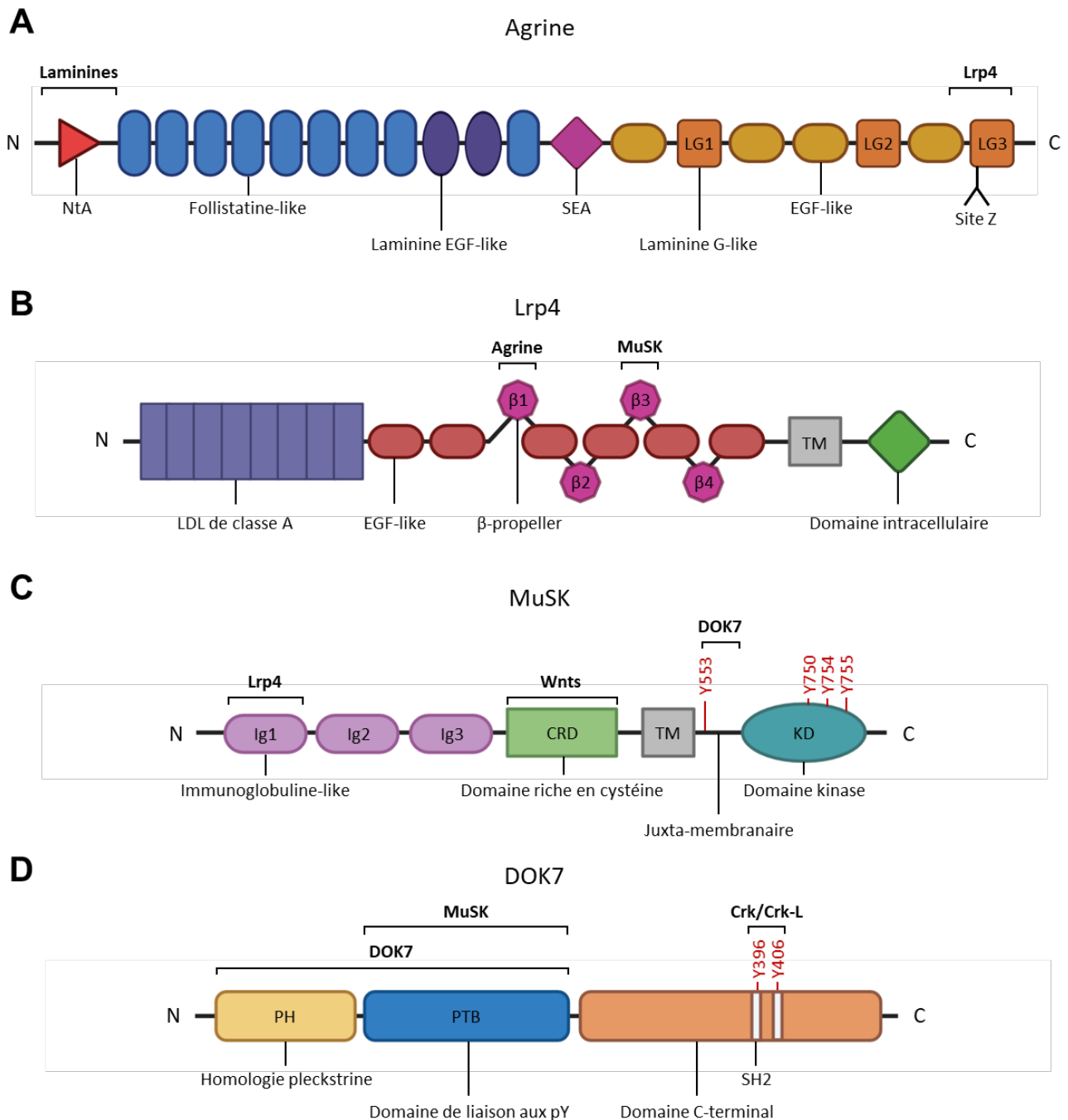
molécules MuSK (Herbst, 2020). On note qu'un dimère Agrine-Lrp4 n'est pas capable de mener à l'activation de MuSK, seuls les hétérodimères 2:2 complets en sont capables (Zong et al., 2012).

L'activation de MuSK passe par sa transphosphorylation sur la tyrosine Y553 d'un motif NPXY dans le domaine juxta-membranaire et la Y754 dans la boucle d'activation du domaine kinase (Watty et al., 2000). La phosphorylation de la Y553 a été montrée comme indispensable pour l'activation de MuSK et sa position au sein d'un motif NPXY suggère fortement la nécessité de recrutement d'une protéine ayant un domaine de liaison aux phosphotyrosines (PTB) pour la suite de la signalisation (Herbst & Burden, 2000). La phosphorylation de la Y553 permet le recrutement de DOK7, une protéine adaptatrice dont la surexpression permet d'activer MuSK entièrement et qui est indispensable à la formation et la maintenance de la JNM (Eguchi et al., 2016; Inoue et al., 2009; Okada et al., 2006). C'est logiquement par le biais de son domaine PTB que DOK7 interagit avec la Y553 de MuSK mais aussi avec la membrane plasmique via son domaine PH (Figure 11D, 12B) (Buyan et al., 2016). Ce dernier participe aussi la dimérisation des protéines DOK7 renforçant ainsi la proximité entre les domaines kinases intracellulaires de MuSK. De ceci découle la transphosphorylation des tyrosines Y750 et 755 situées dans la boucle d'activation du domaine kinase de MuSK menant ainsi à la forme totalement active de ce dernier (Figure 11C) (Bergamin et al., 2010; Herbst, 2020; Watty et al., 2000).

Suivant ces étapes, d'autres protéines viennent compléter l'échafaudage moléculaire construit sur MuSK : la phosphorylation de DOK7, sur les résidus Y396 et Y406 engagés dans deux domaines SH2, après sa dimérisation, permet le recrutement des protéines Crk et Crk-L (Figure 11D) (Hallock et al., 2010). De fait, en plus de son rôle d'activateur de MuSK, DOK7 joue aussi un rôle de recrutement d'autres partenaires de la voie Agrine/Lrp4/MuSK. Bien qu'impliquées dans la formation de la JNM et indispensables à la vie, Crk et Crk-L ne sont pas indispensables pour la synaptogenèse embryonnaire contrairement aux protéines principales de la signalisation Agrine/Lrp4/MuSK/DOK7 (Hallock et al., 2010). Une étude plus récente a mis en lumière de nouveaux acteurs moléculaires en aval de MuSK/DOK7 : le groupe de DJ Glass a montré que les protéines Sorbs1 et 2 interagissent avec Crk-L, sont accumulées à la JNM *in vivo* et que leur absence inhibe l'agrégation de RACH *in vitro* (Hallock et al., 2016). Enfin, DOK7 participe aussi dans l'équilibre de l'activité de MuSK. En effet, après avoir permis la transduction du message, DOK7 est phosphorylé sur le résidu Y106, permettant ainsi le recrutement de la protéine APC2 participant au complexe APC/C E3 ubiquitine ligase. Ceci va

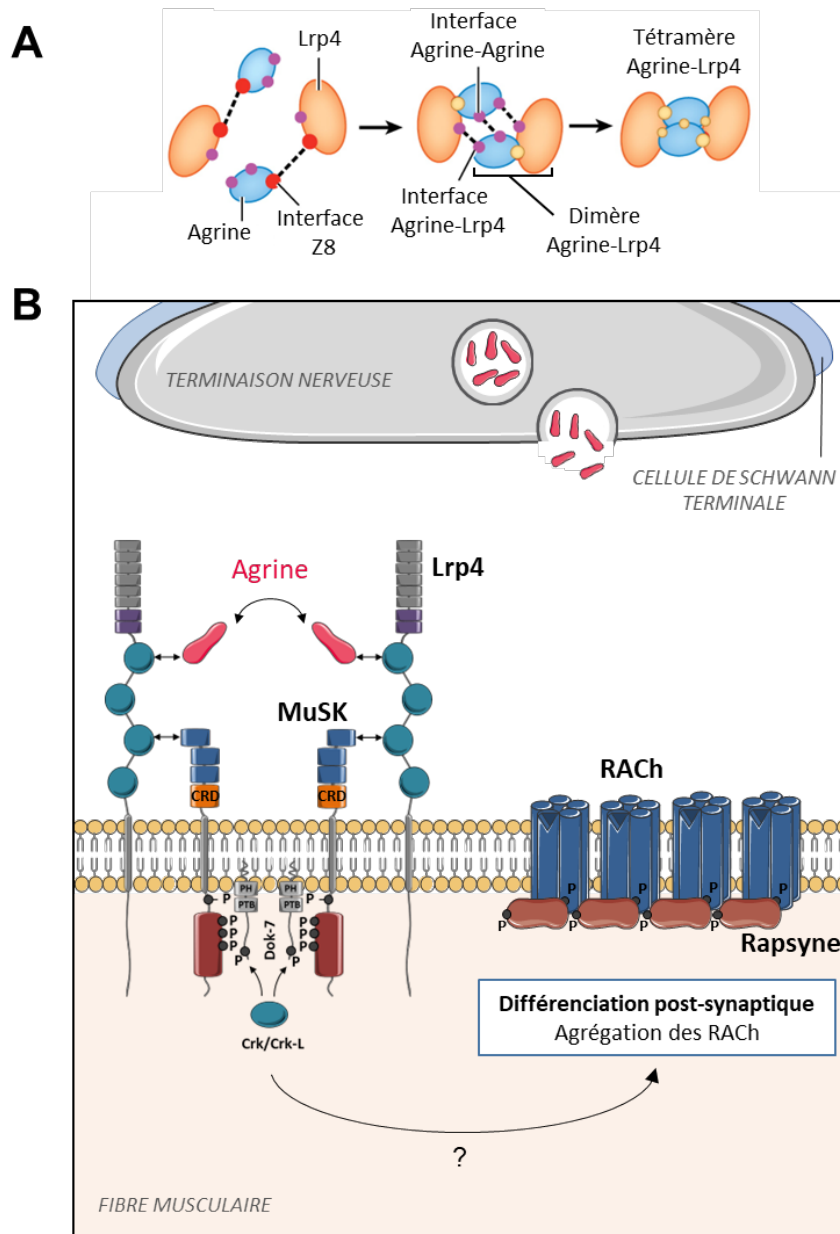
mener à l'ubiquitination de DOK7 et de fait sa dégradation (Chen et al., 2020). Cette voie de régulation négative permet de limiter les phénomènes de suractivation de MuSK et suggère fortement qu'un équilibre dans son activité est nécessaire notamment pour la bonne formation de la JNM.

On note que l'activité de MuSK, en tant que récepteur à activité tyrosine kinase, est médiée par son endocytose (Gemza et al., 2022; Luiskandl et al., 2013; Zhu et al., 2008). La suite des événements en aval de la voie Agrine/Lrp4/MuSK est encore mal connue cependant, on sait que l'activation de cette signalisation mène au recrutement et à l'agrégation des RACH dans la membrane post-synaptique grâce à au moins deux phénomènes. La sous-unité  $\beta$  du RACH voit sa phosphorylation intracellulaire augmenter, stabilisant ainsi les récepteurs et permettant le recrutement de la protéine d'échafaudage rapsyne (Borges et al., 2008), indispensable à la formation de la JNM (Gautam et al., 1995). La rapsyne elle va participer à l'agrégation et la stabilisation des RACH en entretenant un lien fort entre les récepteurs et le cytosquelette sous-synaptique d'actine et de microtubule (Moransard et al., 2003; Oury et al., 2019). La rapsyne devient elle aussi phosphorylée ce qui permet notamment sa liaison avec d'autres molécules de rapsyne. De plus, il a été montré que l'action stabilisatrice de la rapsyne sur les agrégats de RACH passe aussi par son activité d'E3 ubiquitine ligase via son domaine RING-H2, menant à la liaison de groupements Nedd8 sur la sous-unité  $\delta$  des RACH. L'expression d'une rapsyne mutée sans activité de neddylation chez des embryons ne permet pas restaurer le phénotype létal dû à l'absence de rapsyne WT, justifiant ainsi le rôle critique de cette activité enzymatique dans la formation de la JNM (L. Li et al., 2016).



**Figure 11. Structure moléculaire des principaux acteurs de la voie Agrine/Lrp4/MuSK.** La longueur des protéines et des domaines n'est pas proportionnelle à leur taille réelle. Les domaines cités se succèdent depuis le domaine N-terminal vers le domaine C-terminal. Les crochets indiquent les domaines d'interaction avec d'autres protéines. (A) L'Agrine comporte un domaine Agrine N-terminal (NtA), 8 domaines *follistatin-like*, 2 domaines laminine *EGF-like*, un domaine *follistatin-like*, un domaine protéine sperme, entérokinase et Agrine (SEA) entouré de domaines riches en sérines et thréonines (non représentés), un domaine *EGF-like* suivi d'un domaine laminine *G-like*, deux domaines *EGF-like* suivis d'un domaine laminine *G-like* puis à nouveau un domaine *EGF-like* suivi d'un domaine laminine *G-like*. Le troisième domaine Laminine *G-like* abrite le site Z d'insertion d'acides aminés menant aux formes Z de l'Agrine neurale. (Rodríguez Cruz et al., 2020) (B) Lrp4 est une protéine à un domaine transmembranaire (TM) composée d'un grand domaine extracellulaire et d'une queue C-terminale intracellulaire courte. Le domaine extracellulaire de Lrp4 contient 8 domaines *low-density*

*lipoprotein receptor* (LDL) de classe A successifs, 2 domaines *EGF-like* puis 4 domaines  $\beta$ -propeller organisés en tandem avec des domaines *EGF-like*. Lrp4 contient aussi un court domaine intracellulaire (Zong et al., 2012). (C) MuSK est une protéine à un domaine transmembranaire et est composé par 3 domaines *immunoglobulin-like* (Ig1-3), un domaine *Frizzled-like* riche en cystéine (CRD) pour la partie extracellulaire. Le fragment intracellulaire contient un domaine juxta-membranaire suivi d'un domaine à activité tyrosine kinase (KD) (Hubbard & Gnanasambandan, 2013). Les tyrosines indiquées en rouge sont phosphorylées quand MuSK est totalement activé (Herbst, 2020; Watty et al., 2000). (D) DOK7 est une protéine intracellulaire comportant un domaine d'homologie pleckstrine (PH), un domaine de liaison au tyrosines phosphorylées (PTB - pY) et un domaine C-terminal présentant notamment deux domaines d'homologie Src 2 (SH2). Les tyrosines indiquées en rouge sont phosphorylées suite à la stimulation par l'Agrine et permettent l'interaction avec Crk/Crk-L (Rodríguez Cruz et al., 2020).



**Figure 12. Schéma fonctionnel de la signalisation Agrin/Lrp4/MuSK.** (A) Une molécule d'Agrin interagit avec le domaine  $\beta$ 1-propeller via son insert Z8. Les interfaces d'interactions sont représentées par des points rouges. Deux hétérodimères Agrin-Lrp4 s'assemblent pour former un complexe tétramérique, ceci via les différentes interfaces représentées par des points violets (Li et al., 2018). (B) Représentation schématique des étapes connues de la signalisation Agrin/Lrp4/MuSK à la JNM. L'Agrin libérée par le motoneurone se lie à Lrp4 menant à la formation du complexe décrit ci-dessus. De ceci résulte une augmentation de l'interaction entre Lrp4 et MuSK permettant ainsi la transphosphorylation de MuSK. Ces phosphorylations permettent le recrutement de DOK7 ayant une fonction de substrat et d'activateur de MuSK. MuSK est alors à nouveau phosphorylé et se retrouve dans son état totalement actif. DOK7 est aussi phosphorylé. De ceci découle le recrutement de Crk/Crk-L et la redistribution et l'ancrage de protéines critiques pour l'agrégation des RACH. Parmi ces protéines, on retrouve la rapsyne qui est recrutée au niveau des récepteurs à l'ACH phosphorylés sur leur sous-unité  $\beta$ . La phosphorylation de la rapsyne elle-même permet son interaction avec d'autres molécules de rapsyne formant ainsi un réseau (Communication personnelle, J. Messéant).



### 1.3.3. La signalisation Wnt à la JNM

Les glycoprotéines Wnt sont de petites molécules secrétées jouant une action de morphogènes. Bien que leurs implications critiques dans de nombreux processus développementaux ont été largement étudiées, nous nous concentrerons ici seulement sur l'implication des signalisations Wnt dans la formation et la maintenance de la JNM. Les Wnts ont émergé récemment comme facteurs diffusibles capables d'intervenir dans certaines étapes de la synaptogenèse neuromusculaire via différentes signalisations qui s'entrecroisent.

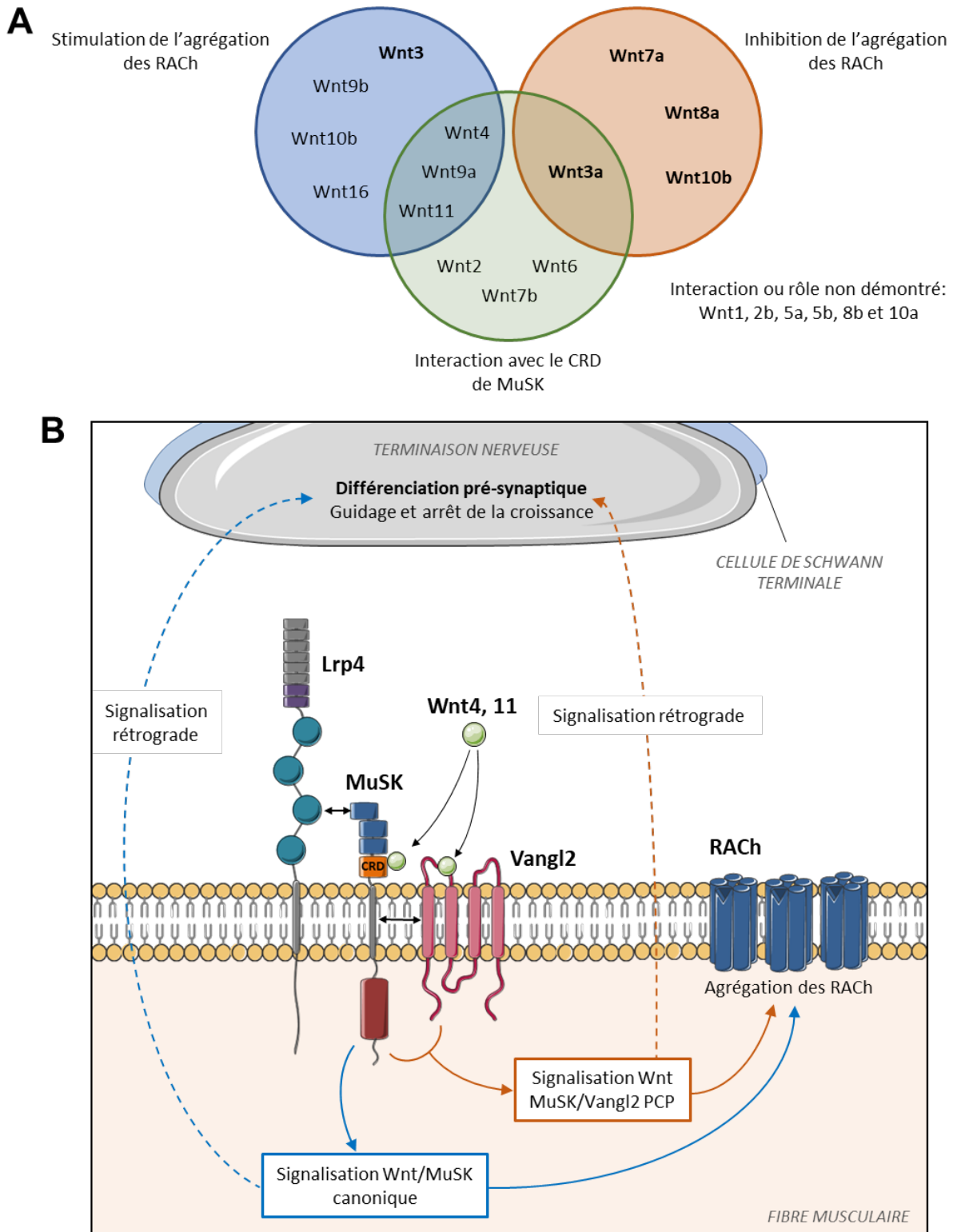
Plusieurs indices suggéraient l'existence d'autres facteurs participants à la formation de la JNM : même si les souris mutantes pour l'Agrine, Lrp4 et MuSK ne présentent pas de JNM, le pre patterning musculaire se met tout de même en place en absence d'Agrine mais pas en absence de Lrp4 ou MuSK, suggérant ainsi une activation de MuSK médiée par Lrp4 seul ou par d'autres ligands. De plus, le clonage de MuSK pour la première fois a permis de révéler la présence d'un domaine riche en cystéine (CRD), présent dans l'ectodomaine de MuSK et homologue au domaine de liaison des Wnts sur leurs récepteurs conventionnels Frizzled (Masiakowski & Yancopoulos, 1998). Les premières preuves de l'interaction des Wnts avec MuSK via le CRD ont été mises en évidence chez le poisson-zèbre avec la liaison de Wnt4 et Wnt11 sur l'orthologue de MuSK *Unplugged* (Jing et al., 2009).

Chez la souris, il existe 19 Wnts et ceux-ci sont sécrétés de manière partiellement redondante par la terminaison motoneuronale, la CST et la fibre musculaire. Même si l'étude du rôle d'un unique Wnt à la JNM est rendue difficile par cette redondance mais aussi par des mécanismes de compensation, il a été montré que Wnt4, Wnt9a et Wnt11 sont capables d'interagir directement avec le CRD de MuSK chez la souris et d'induire l'agrégation des RACH indépendamment de l'Agrine *in vitro* (Strochlic et al., 2012; B. Zhang et al., 2012). Cette induction d'agrégation a aussi été observée avec Wnt9b, Wnt10b et Wnt16 mais leur signalisation n'a été que peu étudiée. Le rôle de Wnt4 et Wnt11 à la JNM a ensuite été confirmé *in vivo* grâce à des animaux délétés pour ces protéines (Messéant et al., 2017; Strochlic et al., 2012). Les rôles des Wnts sont diversifiés : certains sont capables de participer à l'agrégation des RACH induite par l'Agrine comme Wnt3 ou même de l'inhiber comme c'est le cas pour Wnt7a, Wnt8a et Wnt10b (Figure 13A) (Barik, Zhang, et al., 2014; Henriquez et al., 2008). Ce système est complexifié par la capacité et la nécessité de certains Wnts de se lier aussi à Lrp4, comme c'est le cas de Wnt7a, Wnt9a et Wnt11 (W. Zhang et al., 2011). Sur le plan mécanistique, la signalisation Wnt est connue pour passer par au moins 3 voies qui s'entrecroisent : (i) la voie canonique dépendante de la  $\beta$ -caténine, (ii) la voie Wnt de polarité

planaire cellulaire (PCP) et (iii) la voie Wnt-calcium (Komiya & Habas, 2008; Logan & Nusse, 2004; Wiese et al., 2018). L'implication de la signalisation Wnt-calcium n'a cependant pas été étudiée dans le contexte de la synaptogenèse neuromusculaire. Toutes ces voies font intervenir la protéine Dishevelled (Dvl) qui interagit avec MuSK et participe dans l'agrégation des RACH (Luo et al., 2002).

En absence de ligand Wnt, la voie canonique est inhibée. Cela se traduit par la séquestration de la  $\beta$ -caténine dans un complexe composé par Dvl, l'axine, APC, Gsk3 et Ck1. Ck1 et Gsk3 phosphorylent la  $\beta$ -caténine et l'E3 ubiquitine-ligase  $\beta$ -TrCP l'ubiquitine ce qui mène à sa destruction par le protéasome. La liaison des Wnts notamment sur MuSK et Lrp4 va mener à une désolidarisation de  $\beta$ -TrCP du complexe. De fait, la  $\beta$ -caténine phosphorylée n'est plus dégradée et les molécules de  $\beta$ -caténine déphosphorylées actives ne se retrouvent pas séquestrées dans le complexe. Elles peuvent donc être transloquées au noyau où elles vont, en se liant aux facteurs de transcription TCF/LEF, activer la transcription des gènes Wnt cibles parmi lesquels on retrouve les gènes codants les sous-unités du RACH (Figure 13B) (Behrens et al., 1996). L'utilisation de chlorure de lithium (LiCl), un inhibiteur de Gsk3, a permis de démontrer l'implication de la voie Wnt canonique dans la formation de la JNM chez des embryons de souris. En effet, les animaux chez lesquels le CRD de MuSK est délété (MuSK $\Delta$ CRD) traités avec le LiCl montrent une nette amélioration du phénotype initialement dû à la rupture de l'interaction de certains Wnts sur MuSK, ceci passant par l'activation forcée de la voie Wnt canonique (Messéant et al., 2015). Il est important de noter que même si la  $\beta$ -caténine est exprimée en pré et post-synaptique, il apparaît que c'est principalement la  $\beta$ -caténine musculaire qui intervient à la JNM, les animaux KO pour cette protéine dans les motoneurones ne développant pas de défauts (X.-M. Li et al., 2008; Wu, Lu, Barik, et al., 2012). L'injection dans des embryons murins de l'antagoniste des Wnts Dkk1 (Dickkopf1), bloquant spécifiquement la signalisation canonique en se liant aux récepteurs Lrp notamment Lrp4, a mené à l'apparition d'un phénotype moins marqué que celui des embryons injectés avec l'inhibiteur total des Wnts Sfrp4 (*Secreted Frizzled-related protein 4*) (Messéant et al., 2017). Ces données suggèrent fortement l'implication d'une autre signalisation Wnt que la voie canonique dans la formation de la synapse neuromusculaire. Une étude récente a mis en évidence l'implication de la protéine de la voie Wnt PCP Van Gogh-Like 2 (Vangl2) dans la mise en place et la maintenance de la JNM. Cette protéine, en interagissant avec MuSK, initie une nouvelle voie de signalisation agissant notamment sur le réarrangement du cytosquelette sous synaptique (Figure 13B) (Boëx et al., 2022).

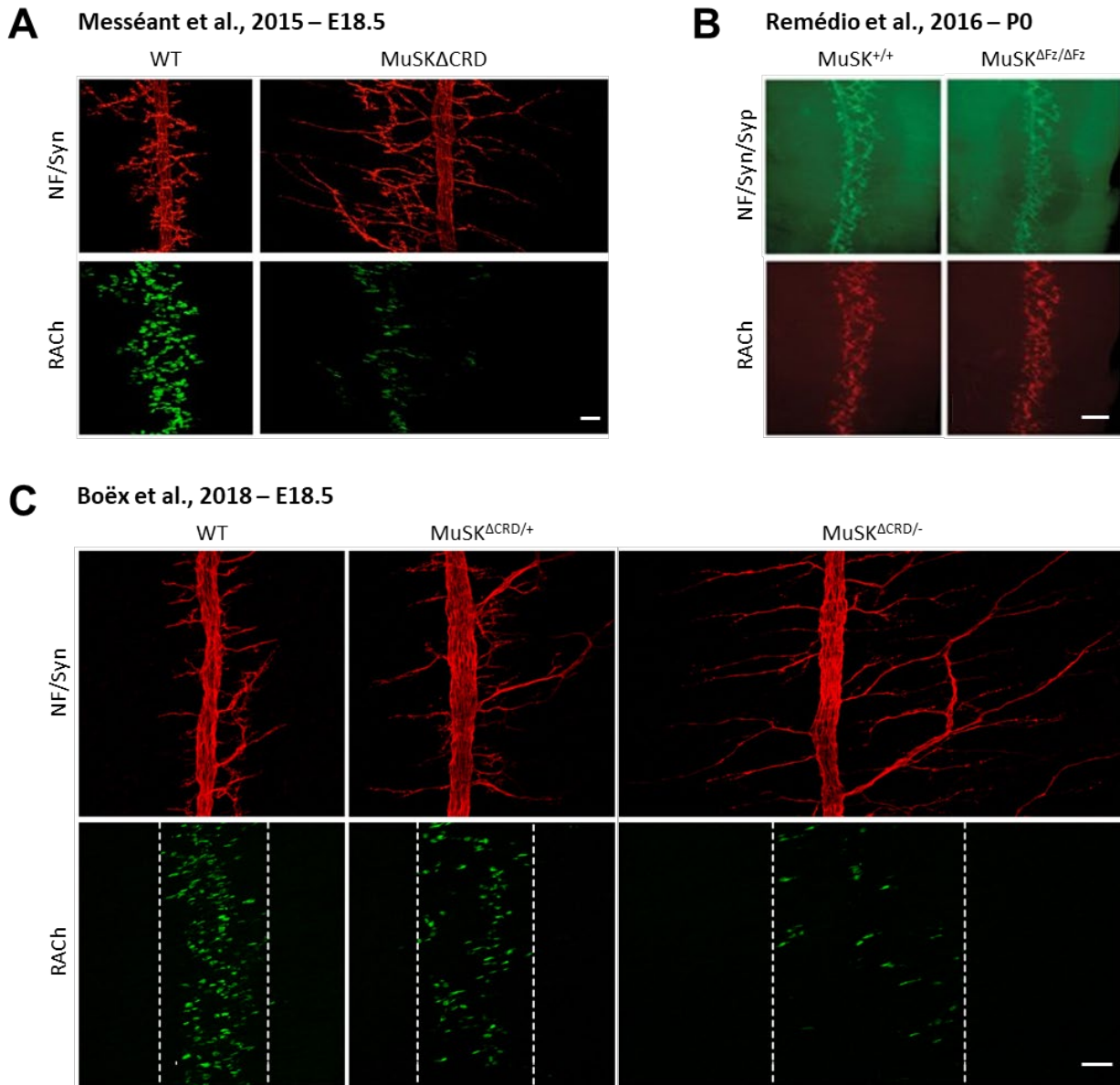
Les voies Agrine/Lrp4/MuSK et Wnt ne sont pas indépendantes à la JNM ; en témoignent l'effet potentiateur de Wnt3 sur l'agrégation des RACH induite par l'Agrine ou encore l'existence de protéines communes aux deux voies. Par exemple, Dvl interagit directement avec MuSK permettant ainsi l'activation de la kinase PAK1 dépendante de l'Agrine (Luo et al., 2002). Encore, ceci est aussi démontré par l'existence de la liaison de la  $\beta$ -caténine sur la rapsyne (B. Zhang et al., 2007). Il est important de noter que, bien que démontrées, les implications des signalisations Wnt ne sont pas indispensables à la synaptogenèse contrairement à la voie Agrine/Lrp4/MuSK. L'agrégation induite par l'Agrine n'étant pas affectée dans des cellules musculaires MuSK $\Delta$ CRD, il semblerait que les Wnts aient plutôt une fonction de régulation de l'activité de MuSK plutôt qu'un rôle critique pour l'intégrité neuromusculaire (Messéant et al., 2015; Remédio et al., 2016). De manière surprenante, alors que l'implication du couple Frizzled-Lrp5/6 est indiscutable pour la naissance des signaux Wnt dans le développement, peu d'informations sont disponibles au sujet du rôle de ces partenaires dans le système neuromusculaire. Il est cependant important de considérer que la dissection de tous les mécanismes dépendants des Wnt à la JNM est grandement incomplète et que ces récepteurs pourraient en réalité y participer à l'instar de Frizzled 9 (Avilés et al., 2014).



**Figure 13. Les signalisations Wnt à la JNM de la souris.** (A) Diagramme de Venn illustrant les Wnts capables d'interagir avec le CRD de MuSK, capables de stimuler ou capables d'inhiber l'agrégation des RACH dans des cellules musculaires en culture. Les Wnts indiqués en gras présentent ces activités en présence d'Agrine. (B) Schéma fonctionnel des signalisations Wnt à la JNM. En se liant au domaine CRD de MuSK, Wnt4 et 11 initient la signalisation Wnt canonique dépendante de la  $\beta$ -caténine (non représentée). Cette signalisation participe à l'agrégation des RACH dans la membrane synaptique et à

un message rétrograde qui participe à la différenciation de la terminaison nerveuse. Wnt4 et Wnt 11 se lient aussi à la protéine de la voie de polarité planaire cellulaire Vangl2. Vangl2 est en interaction avec MuSK et ensemble ils mènent à une signalisation Wnt PCP non-canonique qui elle aussi participe à l'agrégation des RCh et à la différenciation pré-synaptique (Boëx et al., 2022). Les domaines mis en jeu dans l'interaction MuSK-Vangl2 ne sont pas connus. Les doubles flèches noires indiquent les interactions entre protéines, les flèches bleues sont associées à la signalisation Wnt canonique et les flèches oranges sont associées à la signalisation Wnt/MuSK/Vangl2 PCP. Adapté de (Boëx et al., 2018).

Comme évoqué précédemment, les embryons délétés pour Lrp4 et MuSK ne sont pas capables de former des agrégats de RACH aneux pendant la phase de pre patterning contrairement aux embryons KO Agrine. Ceci suggère que l'activité de MuSK résultant de son interaction basale avec Lrp4 suffit ou que d'autres partenaires non neuronaux sont capables d'activer MuSK. De manière intéressante, chez le poisson zèbre, le phénomène de pre patterning est absent chez les animaux n'exprimant pas Wnt4 et Wnt11 (Jing et al., 2009). Le rôle de Wnt4 et Wnt11 murins dans le pre patterning a ensuite été confirmé puisqu'il est fortement altéré chez les embryons de souris délétés pour ces Wnts (Messéant et al., 2017; Strochlic et al., 2012). Plus précisément, au niveau du diaphragme de ces embryons au stade E14, les agrégats préformés dans la région centrale sont moins nombreux que chez les embryons WT. De plus, un phénotype similaire est observé chez les embryons chez lesquels la  $\beta$ -caténine est surexprimée ou délétée dans le muscle (X.-M. Li et al., 2008; Wu, Lu, Barik, et al., 2012). Ensemble, ces résultats précisent donc l'implication de la voie Wnt canonique dans le pre patterning. Le rôle des Wnt ne se limite pas à ce stade précoce : chez tous les animaux mutants évoqués ci-dessus, au stade E18.5, on retrouve de graves défauts de croissance des neurites attestant d'un rôle de la signalisation Wnt canonique musculaire dans la différenciation pré-synaptique et le guidage axonal. Les JNM des souris MuSK $\Delta$ CRD adultes, lignée générée par recombinaison homologue, sont altérées à la fois au niveau morphologique et fonctionnel, laissant ainsi penser que la communication Wnt-MuSK serait impliquée dans la maintenance de la JNM (Figure 14A) (Messéant et al., 2015). Il est aussi possible que ces défauts soient dus aux altérations de synaptogenèse initiale qui sont conservés jusqu'à l'âge adulte chez ces animaux. Par ailleurs, le phénotype observé chez les animaux MuSK $\Delta$ CRD a été remis en cause en 2016 par le groupe de SJ Burden (Figure 14B). Ayant généré par Crispr Cas9 une lignée de souris délétée pour le CRD de MuSK, ils n'ont pas récapitulé le phénotype précédemment observé (Remédio et al., 2016). Ces différences de phénotype peuvent être justifiées par les différents fonds génétiques et méthodologies utilisés afin de générer les lignées. L'étude des embryons MuSK $\Delta$ CRD<sup>-</sup> a permis de clarifier la situation, le diaphragme de ces animaux présentant un phénotype aggravé par rapport à celui retrouvé chez les animaux MuSK $\Delta$ CRD. Ces données indiquent bien une implication du domaine CRD dans la synaptogenèse neuromusculaire alors que les animaux MuSK $\Delta$ CRD<sup>+</sup> ne présentent qu'un très léger phénotype (Figure 14C) (Boëx et al., 2018). En somme, cette dernière décennie a été riche en découvertes vis-à-vis de l'implication des protéines Wnt à la JNM cependant, de nombreux mécanismes sont encore à détailler et sont sujets à discussion.



**Figure 14. Comparaison de diaphragmes murins pour l'étude du rôle du domaine CRD de MuSK dans la synaptogenèse neuromusculaire.** (A) Images représentatives en microscopie confocale de diaphragmes d'embryons WT et MuSK $\Delta$ CRD au stade E18.5. Les RACH sont marqués avec de l' $\alpha$ -bungarotoxine fluorescente (vert), les motoneurones et les terminaisons nerveuses sont marqués avec des anticorps anti-neurofilaments et anti-synaptophysine (NF/Syn – rouge). Les agrégats de RACH sont moins nombreux et les branchements neuritiques anormalement longs. Barre d'échelle 50  $\mu$ m (Messéant et al., 2015). (B) Images représentatives en microscopie à fluorescence de diaphragmes de nouveau nés WT et MuSK $\Delta$ Fz/ $\Delta$ Fz au stade P0. Les RACH sont marqués avec de l' $\alpha$ -bungarotoxine fluorescente (rouge), les motoneurones et les terminaisons nerveuses sont marqués avec des anticorps anti-neurofilament, anti-synaptophysine et anti-synapsine 1/2 (NF/Syn/Syp – vert). Aucun défaut pré ou post-synaptique n'est apparent chez les animaux mutants. Barre d'échelle 250  $\mu$ m (Remédio et al., 2016). (C) Images représentatives en microscopie confocale de diaphragmes d'embryons WT, MuSK $\Delta$ CRD/+, MuSK $\Delta$ CRD/- au stade E18.5. Les tissus sont marqués comme décrit dans le panneau A. Les pointillés blancs délimitent la bande synaptique dans laquelle les synapses sont réparties. Les embryons hétérozygotes MuSK $\Delta$ CRD/- présentent un phénotype plus grave que celui observé chez les animaux MuSK $\Delta$ CRD par Messéant et al. Barre d'échelle 50  $\mu$ m (Boëx et al., 2018).

## Chapitre II. La myasthénie auto-immune et MuSK

La myasthénie auto-immune ou Myasthenia Gravis (MG) est une maladie rare due à la présence d'auto-anticorps dirigés contre des protéines clés de la JNM. La présence de ces anticorps mène, par différents processus, à la rupture de la communication neuromusculaire responsable de fatigabilité progressive des muscles atteints. On retrouve chez environ 85% des patients des anticorps qui ciblent le RACH, en faisant la forme de MG la plus étudiée sur le plan fondamental et clinique. Cette vaste majorité, dans laquelle les patients sont dits « séropositifs », est complétée par environ 15% de patients « séronégatifs » chez lesquels on retrouve des anticorps ciblant MuSK pour environ 50% d'entre eux. De plus, on a retrouvé chez les patients séronégatifs ne présentant pas d'immunoréactivité contre MuSK des anticorps ciblant Lrp4, l'Agrine, ColQ, les canaux sodiques Nav1.4 mais aussi des protéines intracellulaires comme la cortactine, le récepteur à la ryanodine et la titine. Il est important de noter que les MG anti-RACH et anti-MuSK sont les plus étudiées alors que la pathogénicité d'anticorps ciblant certaines autres protéines n'a pas encore été mise en évidence. La MG est aussi mixte sur le plan clinique puisqu'il existe une forte variabilité dans les symptômes, les groupes musculaires atteints et surtout dans la réponse aux traitements chez les patients. Ce dernier paramètre est particulièrement associé à la protéine ciblée par les auto-anticorps.

Même si l'organe cible dans la MG est le muscle strié squelettique, l'étude de la composante immunologique de cette maladie a permis d'identifier le thymus comme organe effecteur. A nouveau, en fonction des types de MG, le thymus peut être plus ou moins atteint modulant ainsi son impact dans la genèse de la pathologie. La MG anti-RACH est entre autres caractérisée par la présence de centre germinatifs au sein du thymus qui sont responsables de la maturation des lymphocytes B. Ce phénomène nommé hyperplasie folliculaire lymphoïde thymique ne se produit pas dans le thymus adulte sein. La MG est aussi fortement associée aux tumeurs cancéreuses retrouvées dans le thymus, aussi appelées thymomes ; la moitié des patients atteints de ce cancer développant une MG (Müller-Hermelink et al., 1993). De fait, les différents types de MG sont classifiés en fonction de l'âge de mise en place de la maladie, des manifestations cliniques, de la cible des anticorps et de l'atteinte du thymus (Table 1). Comme suggéré ci-dessus, l'existence de ces nombreux sous-groupes reflète la grande diversité d'épidémiologie, de mécanismes pathologiques et de réponses aux traitements retrouvés dans la MG (Gilhus et al., 2019; Gilhus & Verschuuren, 2015). D'autres facteurs qui entrent en compte dans la prévalence de la MG sont le sexe, certaines hormones constituant une prédisposition à la maladie mais aussi la géographie ou l'ethnicité.



## II.1. Généralités sur la MG anti-MuSK

### II.1.1. Statistiques, diagnostic, symptômes et traitements

Les patients atteints de MG présentant des anticorps anti-MuSK représentent entre 5 et 8% de la population touchée par cette maladie. Une méta analyse de 2010 récapitulant les résultats d'études réalisées entre 1951 et 2006 indique que cette fraction des patients représente une prévalence d'environ 3 cas pour un million de personnes. L'incidence est comprise entre 0.1 et 0.3 par an pour un million de personne (Carr et al., 2010). Etant donné l'évolution des protocoles de recensement des patients et des outils diagnostics entre les années 1950 et 2000, ces valeurs sont à prendre en compte avec précautions. De plus l'incidence et la prévalence varient en fonction de plusieurs facteurs. En Europe, la répartition des cas semble suivre un gradient Sud-Nord avec une plus forte prévalence dans les pays proches de la méditerranée que dans les pays nordiques (Evoli et al., 2018; Gilhus et al., 2019; Niks et al., 2007; Tsiamalos et al., 2009). Cependant, ce gradient est inversé en Chine écartant donc la latitude comme potentiel facteur géographique. Plusieurs études ont mis en avant les allèles DQ5, DR14 et DR16 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (*HLA Class II*) comme facteurs génétiques de prédisposition (Alahgholi-Hajibehzad et al., 2013; Bartoccioni et al., 2009; Hong et al., 2018; Niks et al., 2006). C'est notamment la superposition de la répartition géographique des cas de MG anti-MuSK avec la distribution géographique de ces allèles qui a suggéré le lien. De manière surprenante, les femmes représentent une grande majorité des patients MG anti-MuSK. Enfin, même si l'âge d'apparition de la maladie est assez variable, on constate un nombre important de déclaration des symptômes autour des 30 ans.

Les patients présentent généralement une faiblesse des muscles oculaires et extra-oculaires à l'origine d'une diplopie et d'un ptosis correspondants au dédoublement de la vue et à l'affaissement de la paupière supérieure respectivement. Occasionnellement, les atteintes oculaires s'étendent à une paralysie partielle des muscles de contraction du globe oculaire aussi appelée ophtalmoparésie limitant ainsi les mouvements latéraux et plus rarement les mouvements verticaux (Evoli et al., 2018). Habituellement, ce ne sont pas ces symptômes oculaires qui sont à l'origine du diagnostic ; les patients présentent des atteintes des muscles bulbaires et crâniens à l'origine de dysarthrie, dysphonie avec voie nasale, dysphagie et difficultés de mastication (Rodolico et al., 2020). De manière caractéristique à la MG anti-MuSK, ces muscles se retrouvent même atrophiés. L'apparition des symptômes initiaux est soudaine et la maladie progresse rapidement en l'espace de quelques semaines. Les muscles

respiratoires sont alors atteints et les patients souffrent de crises respiratoires qui constituent une sérieuse menace pour la vie. La généralisation de la maladie se traduisant par une atteinte d'autres groupes musculaires que ceux touchés à l'origine se produit chez la moitié des patients présentant une immunoréactivité contre MuSK (Guptill et al., 2011).

L'établissement du diagnostic n'est pas toujours évident pour les patients avec anticorps anti-MuSK. En effet, les symptômes se manifestent en premier par une atteinte des muscles bulbaires, crâniens et extenseurs du cou et peuvent être confondus avec une sclérose latérale amyotrophique (SLA) avec impact bulbaire. En cas de soupçons, la présence d'anticorps anti-RACH est étudiée. Si ces derniers sont absents, on mesure ensuite la présence d'anticorps ciblant MuSK. La détection des anticorps se fait principalement avec un dosage par radioimmunoprécipitation (*Radioimmunoassay - RIA*) : une protéine MuSK couplée avec le radioisotope de l'iode  $^{125}\text{I}$  est mise en présence du sérum des patients ; l'ajout d'un anticorps secondaire va mener à la précipitation des complexes anticorps- $^{125}\text{I}$  MuSK et permettre de mesurer la radioactivité proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-MuSK. Ces anticorps peuvent aussi être mesurés par dosage immuno-enzymatique ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Plus récemment, le dosage par étude cellulaire (*cell based assay - CBA*) a permis de mettre en évidence la présence d'anticorps pathogéniques chez des patients initialement caractérisés comme négatifs pour l'immunoréactivité au RACH, à MuSK et à Lrp4. Cette technique consiste à transférer des cellules hétérologues HEK293T avec des constructions codant la protéine supposée comme immunogène, dans notre cas MuSK. Les cellules sont ensuite incubées avec le sérum des patients puis mises en présence d'un anticorps secondaire fluorescent qui cible les immunoglobulines humaines. La présence de signal fluorescent lors de l'observation au microscope des cellules indique donc la présence d'anticorps anti-MuSK dans le sérum. Le CBA est plus sensible que le RIA et récapitule mieux les conditions physiologiques de fixation des anticorps sur leur antigène (Binks et al., 2016; Leite et al., 2008; Tsonis et al., 2015). Le diagnostic peut être dans certains cas renforcé par des analyses électrophysiologiques comprenant l'enregistrement des potentiels d'action musculaires composés (PAMC) après stimulation répétée du nerf, l'électromyogramme sur fibre unique et l'électromyographie à une électrode (*Needle EMG*) (Rodolico et al., 2020). Il est important de noter que ces examens peuvent se révéler négatifs quand ils sont réalisés sur les muscles distaux non touchés par la maladie. Des précautions sont donc à prendre quant à l'interprétation des résultats, les muscles bulbaires et du cou étant à favoriser (Liik & Punga, 2016; Nikolic et al., 2014).

Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement curatif pour la MG. La MG anti-MuSK nécessite un traitement symptomatique à long terme, un suivi régulier et une adaptation des traitements en fonction de l'évolution des symptômes de manière à atténuer au mieux la faiblesse musculaire et le risque de crises myasthéniques. Généralement, ces patients se verront prescrire des corticoïdes stéroïdiens anti-inflammatoires comme le Prednisone et le Prednisolone en tant que traitement de fond. L'échange plasmatique, menant à la déplétion du sérum en immunoglobulines, molécules du complément et cytokines peut être mis en œuvre quand une réponse rapide est nécessaire face à des symptômes menaçant la vie des patients. Ce protocole doit être complété par des immunosuppresseurs puisque les effets n'ont lieu qu'à court terme (Gilhus et al., 2019; Yamada et al., 2015). 10 à 15% des patients présentent une pathologie réfractaire et sont toujours atteints de forts symptômes ou de crises myasthéniques malgré l'utilisation de traitements adaptés (Evoli et al., 2018; Silvestri & Wolfe, 2014; Suh et al., 2013). Cette proportion est encore plus importante chez les patients avec anticorps dirigés contre MuSK (Sudulagunta et al., 2016). Chez ces patients, l'utilisation de thérapies plus récentes peut être envisagée. Le Rituximab, un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20 menant à la déplétion en lymphocytes B, a montré des effets bénéfiques dans plusieurs études et semblerait constituer une alternative pour les personnes myasthéniques réfractaires (El-Salem et al., 2014; Sanders et al., 2016). Même si le mécanisme d'action précis du Rituximab n'est pas encore connu, son utilisation mène à une diminution du titre en anticorps anti-MuSK (Díaz-Manera et al., 2012). Lors d'une thérapie combinée avec des corticoïdes associés à des immunosuppresseurs classiques (comme l'azathioprine ou la cyclosporine) ou du Rituximab, les patients doivent être suivis de manière à pouvoir abaisser le plus rapidement la dose de corticoïdes au niveau minimum efficace en vue de limiter les effets secondaires.

Antigène	RACH	RACH	RACH	MuSK
Sous-catégorie	Survenue précoce	Survenue tardive	MG résultant d'un thymome	-
Age de départ (années)	<50	>50	~50	30-40
Prévalence sexuelle	Femelle > mâle	Femelle < mâle	Femelle = mâle	Femelle > mâle
Phénotype du thymus	Hyperplasie	Atrophie	Thymome	Normal
Isotype des anticorps	IgG1-3	IgG1-3	IgG1-3	IgG4 + (IgG1-3 ?)
Rôle du complément	Oui	Oui	Oui	Non
Efficacité d'inhibiteurs d'AChE	Oui	Oui	Oui	Non
Traitement à long terme	Thymectomie, corticoïdes, immunosuppresseurs	Corticoïdes, immunosuppresseurs	Thymectomie, corticoïdes, immunosuppresseurs, traitement anti-cancéreux	Corticoïdes, immunosuppresseurs, Rituximab

**Table 1. Tableau clinique et physiopathologique des myasthénies anti-RACH et anti-MuSK.** Adapté de (Gilhus et al., 2019; Huijbers et al., 2022; Rodolico et al., 2020).

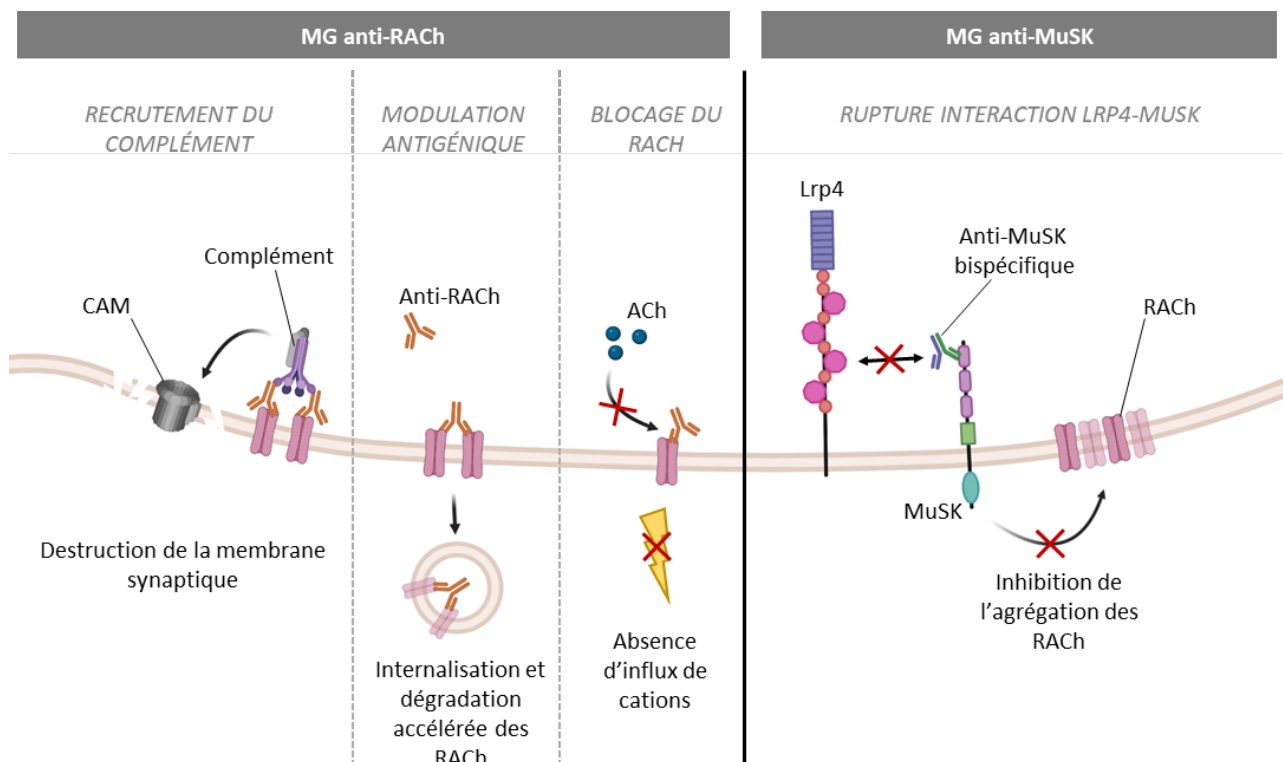
### II.1.2. Différences majeures entre MG anti-RACH et anti-MuSK

La MG anti-RACH présente une prévalence presque 50 fois supérieure à celle de la MG anti-MuSK en fonction des pays (en Hollande 90,0 vs 1,9 ; (Carr et al., 2010; Niks et al., 2007)). De plus, la MG anti-RACH présentant plusieurs types, l'âge de déclaration de la maladie varie: les patients avec anticorps anti-RACH manifestent la maladie soit de manière précoce, soit à partir de 70 ans (Guptill et al., 2011). Le thymus est souvent retrouvé atteint dans les MG anti-RACH si bien que la thymectomie est souvent envisagée et permet la rémission clinique. Cet organe semble très souvent normal chez les patients anti-MuSK, ces derniers ne bénéficiant pas des effets de la thymectomie (Table 1) (AL-Bulushi et al., 2021; Clifford et al., 2019). Sur le plan clinique, à l'instar des patients anti-MuSK, les patients anti-RACH présentent initialement des atteintes des muscles oculaires. La faiblesse musculaire semble souvent sujette à une progression diurne ou fait suite à un effort, de manière caractéristique à l'immunoréactivité contre les RACH. Ce phénomène de fatigabilité progressive est moins marqué chez les patients anti-MuSK, de fait, les symptômes de la MG anti-RACH sont plus indicatifs que ceux de la MG anti-MuSK.

Ces deux types de myasthénie sont différenciés par les antigènes ciblés par les anticorps, de ceci découle de larges différences dans les mécanismes physiopathologiques à l'origine du phénotype. Alors que l'impact des anticorps anti-MuSK repose principalement sur la rupture de l'interaction entre MuSK et Lrp4 (Huijbers et al., 2013), les anticorps anti-RACH agissent à au moins 3 différents niveaux pour déstabiliser la JNM : (i) leur fixation sur le RACH va permettre d'activer la cascade du complément et recruter le complexe d'attaque membranaire à la JNM, (ii) la modulation antigénique, phénomène caractérisé par la liaison de deux RACH par un seul anticorps bivalent menant ainsi à leur internalisation accélérée puis dégradation et (iii) le blocage de la liaison d'ACh sur leur récepteur (Figure 15). Ces disparités sont dues à la différence des isotypes des immunoglobulines ; on retrouve des IgG1-3 dans la MG anti-RACH alors que ce sont principalement les IgG4 fonctionnellement monovalentes ne recrutant pas le complément qui sont pathogéniques dans la MG anti-MuSK (Gilhus et al., 2019; Huijbers et al., 2022).

Etant donné les disparités de physiopathologie entre ces deux MG, il est avéré que les traitements qui y sont associés sont aussi distincts (Table 1). Les patients anti-RACH présentent une bonne réponse aux anti-cholinestérasiques comme la pyridostigmine. Cette dernière a pour effet de limiter l'action des acétylcholinestérasés présentes dans la fente synaptique. De ce phénomène résulte une neurotransmission améliorée, la perte en RACH post-synaptique étant

compensée par l'augmentation de la disponibilité de l'ACh. Les patients anti-MuSK ne répondent pas aux anticholinestérasiques et cela peut même provoquer des crampes musculaires et des crises cholinergiques avec faiblesse musculaire (Evoli & Padua, 2013). Les immunothérapies comme le Rituximab peuvent se montrer bénéfiques chez les deux types de patients cependant, leur efficacité varie à nouveau en fonction du mécanisme ciblé. Par exemple, l'Eculizumab, un anticorps monoclonal inhibant l'activation du complément, fonctionne chez les patients anti-RACH mais présente un intérêt très limité chez les patients anti-MuSK, le complément n'étant pas mis en jeu dans les mécanismes pathologiques (Evoli et al., 2018; Gilhus, 2017; Gilhus et al., 2019).



**Figure 15. Schéma fonctionnel des mécanismes d'action des anti-RACH et anti-MuSK menant à la dégradation de la JNM.** Les anticorps anti-RACH mènent à la destruction des replis membranaires, à la diminution du nombre de RACH agrégés dans la membrane et au blocage du site de liaison de l'ACh sur les récepteurs. Les anticorps anti-MuSK mènent à la diminution du nombre de RACH agrégés par rupture de la signalisation Agrine/Lrp4/MuSK en empêchant la liaison entre Lrp4 et MuSK. On peut qualifier cette action d'indirecte : les IgG4 anti-MuSK ne mènent pas à la perte de protéine MuSK membranaire.

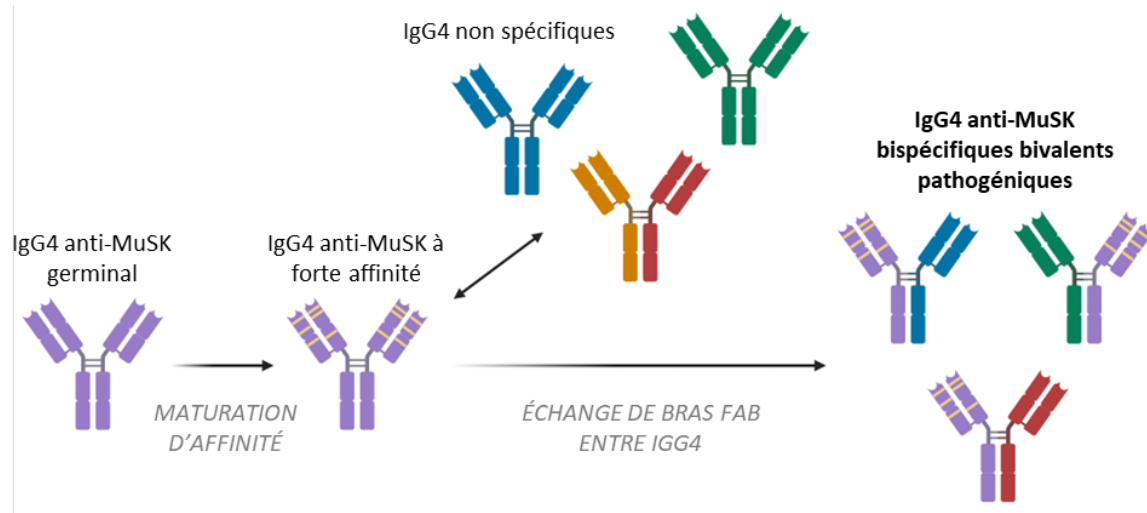
## II.2. Physiopathologie de l'immunoréactivité contre MuSK

### II.2.1. Mécanismes pathologiques connus

Le caractère multifactoriel de l'origine de la MG anti-MuSK est aujourd'hui largement accepté cependant il est encore difficile de déterminer précisément les phénomènes biologiques à l'origine de la pathologie. Contrairement à la MG avec anti-RACH, le thymus des patients anti-MuSK ne semble pas fortement affecté et a involué de manière normale chez les patients adultes (Leite et al., 2008). Bien que le caractère auto-immun de la maladie soit indissociable de cet organe, il ne semble pas que des modifications structurales, infiltrations cellulaires ou retards d'invololution participent à l'apparition des auto-anticorps. D'autres paramètres sont à prendre en compte dans l'apparition de la maladie comme des facteurs environnementaux ou encore les prédispositions génétiques. Comme évoqué précédemment, une forte association de la MG anti-MuSK avec les allèles DQ5, DR14 et DR16 du CMH de classe II a été mise en évidence. On note qu'il n'est pas rare de retrouver certains allèles ou haplotypes du CMH de classe I ou II comme facteurs génétique corrélés avec des pathologies auto-immunes. En somme, peu d'indices sont disponibles afin d'élucider l'origine de la dérégulation immunitaire retrouvé dans la MG anti-MuSK.

Après leur maturation, les lymphocytes B (LB) naïfs expriment un récepteur ciblant un antigène encore jamais rencontré. Ce récepteur contient une immunoglobuline qui présente le même paratope que les immunoglobulines qui seront produites par les LB après rencontre avec l'antigène. Bien que produit par un même LB, l'affinité d'un anticorps pour sa cible va progressivement augmenter. Les immunoglobulines subissent une maturation qui se traduit par l'accumulation de mutations somatiques dans leur domaine hypervariable visant à augmenter l'affinité de l'anticorps pour l'antigène. Il a été montré que ce phénomène participe à la pathogénicité des anticorps dans la myasthénie anti-MuSK (Figure 16). En effet, dans ce contexte auto-immun, les hypermutations somatiques mènent à l'augmentation de l'affinité des anti-MuSK pour MuSK démultipliant ainsi leur pouvoir pathogène (Fichtner et al., 2020). La MG anti-MuSK est caractérisée par la mise en jeu d'anticorps d'isotype IgG4 particuliers impliqués dans la pathophysiologie de la maladie. Contrairement aux IgG1-3, les IgG4 sont des anticorps bispécifiques donc bivalents car ayant deux paratopes différents capables de lier des antigènes différents. Cependant, on dit que les IgG4 anti-MuSK sont fonctionnellement monovalentes car chaque immunoglobuline ne peut, de fait, se lier qu'à une seule protéine MuSK. Cette caractéristique est due à une propriété intrinsèque des IgG4 : de manière

totale et continue, ces immunoglobulines peuvent échanger leurs hétérodimères chaînes lourdes-légères entre elles produisant ainsi des anticorps avec deux bras qui ciblent deux antigènes différents (Figure 16) (Gilhus et al., 2016; Konecny et al., 2017). L'immunisation de souris avec des anticorps monoclonaux purifiés de patients a montré que les IgG4 bispécifiques ayant subi un échange forcé de bras Fab avec une autre IgG4 contrôle ont un pouvoir pathogénique bien plus important que les IgG4 bivalentes monospécifiques comportant de deux paratopes identiques (Vergoossen et al., 2021). Ces résultats avaient au préalable été suggérés par des expériences *in vitro* qui ont montré que l'exposition de myotubes avec des fragments Fab monovalents monospécifiques originaires d'une IgG4 anti-MuSK inhibe l'activation de MuSK et l'agrégation des RACH induites par l'Agrine (Huijbers et al., 2019; Vergoossen et al., 2020). On note que l'étude du groupe de KC O'Connor démontre que les fragments Fab monovalents germinaux, ne présentant donc pas de mutations somatiques, n'inhibent pas l'agrégation des RACH induite par l'Agrine contrairement aux IgG4 bivalentes monospécifiques germinales, insistant ainsi sur le fait que la forte affinité conférée par les hypermutations somatiques est critique pour la pathogénicité des anticorps fonctionnellement monovalents (Fichtner et al., 2020). En somme, c'est la combinaison de la maturation avec les hypermutations somatiques et de la monovalence fonctionnelle des IgG4 qui leur confère leurs propriétés pathogènes dans la MG (Table 2).



**Figure 16. Mécanismes menant à la formation d'IgG4 anti-MuSK pathogéniques.** Suite à la première rencontre avec l'antigène, les mutations somatiques (représentées en jaune) vont permettre l'augmentation de l'affinité des anticorps pour MuSK. Les IgG4 ont la propriété d'échanger de manière continue et stochastique la moitié de leur molécule (bras Fab) avec une autre IgG4. Ceci mène à des anticorps bispécifiques et bivalents mais dits fonctionnellement monovalents car ils ne peuvent lier MuSK qu'avec un seul de leurs paratopes. Adapté de (Fichtner et al., 2020).



Les IgG4 se démarquent aussi des IgG1 par leurs mécanismes menant au phénotype myasthénique à la JNM. Leur monovalence fonctionnelle empêche la mise en place de la modulation antigénique, de fait les altérations de la JNM induites par les IgG4 anti-MuSK ne sont pas dues à la déplétion de la membrane post-synaptique en protéine MuSK. De plus, la partie constante des IgG4 n'est pas capable d'interagir avec C1q, la molécule qui lie les anticorps aux autres protéines du complexe C1 et permet l'initiation de la cascade du complément. Les IgG4 anti-MuSK ne sont donc pas en mesure de mettre en péril l'intégrité de l'appareil post-synaptique en recrutant le complexe d'attaque membranaire. On note que l'équivalent des IgG4 humaines chez la souris sont les IgG1 et bien que ces dernières recrutent le complément dans une très faible mesure, elles en sont capables contrairement aux IgG4 humaines. De fait, l'interprétation des mécanismes d'action d'anticorps murins dans des modèles de MG sont à considérer avec précautions. Enfin, les IgG4 sont souvent considérées comme anti-inflammatoires étant donné l'incapacité de leur partie constante à interagir avec les récepteurs Fc des cellules immunitaires. Les réponses inflammatoires humorale et innée ne sont donc pas mises en jeu dans la MG anti-MuSK.



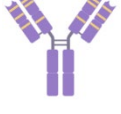



Le mécanisme principal qui mène les IgG4 anti-MuSK à altérer la JNM se matérialise par une rupture de l'interaction entre Lrp4 et MuSK (Figure 15), une communication indispensable dans la voie de signalisation Agrine/Lrp4/MuSK. C'est le domaine Ig1 de MuSK qui est mis en jeu dans l'interaction avec Lrp4 et il constitue la principale région immunogène dans la MG anti-MuSK. L'inhibition du contact entre ces deux protéines empêche l'activation de MuSK et donc l'agrégation des RACH dans la membrane post-synaptique. Ce rôle a été prouvé en premier lieu au cours d'expériences d'interaction en solution et *in vitro* dans des myoblastes murins en culture (Huijbers et al., 2013; Koneczny et al., 2013). Les anti-MuSK sont aussi mis en jeu dans la rupture de l'interaction entre le domaine Ig1 de MuSK et ColQ, la queue collagénique qui permet d'ancrer l'acétylcholinestérase dans la lame basale synaptique (Kawakami et al., 2011; Ohno et al., 2016). Nous pouvons proposer l'hypothèse selon laquelle la déplétion de la JNM en acétylcholinestérase mènerait à une augmentation de la durée d'action de l'ACh aussi bien au niveau de la neurotransmission que dans son rôle de dispersion des RACH (se référer au chapitre I.2.2.). L'activation de la voie Agrine/Lrp4/MuSK contrecarre cette action délétère de l'ACh dans des conditions physiologiques, cependant, dans le contexte de MG anti-MuSK, la signalisation Agrine n'est plus active. De fait, la rupture de l'interaction MuSK-ColQ due à la présence d'anticorps anti-MuSK peut participer à la dégradation de la JNM et au phénotype myasthénique des patients. Ces derniers répondent souvent peu ou mal à

l'exposition avec des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Evoli et al., 2003; Guptill et al., 2011). Ce phénomène peut être expliqué par la perte de l'activité résiduelle de dégradation de l'ACh, menant à une hyperactivité cholinergique mais aussi à une exacerbation du phénomène de dispersion des RACH induit par la libération d'ACh (Morsch et al., 2013). De manière intéressante, des études ont montré que les modèles animaux de MG anti-MuSK ne présentent pas, sur le plan électrophysiologique, l'augmentation adaptative de libération d'ACh retrouvée chez les modèles de MG anti-RACH (Mori et al., 2012; Patel et al., 2014; Viegas et al., 2012). Ces résultats suggèrent que les anticorps ciblant MuSK altèrent une signalisation compensatoire rétrograde qui est mise en place quand la communication neuromusculaire est réduite (Viegas et al., 2012). On note que cette augmentation de libération d'ACh aurait pu être délétère pour l'intégrité neuromusculaire en considérant l'hypothèse de dispersion des RACH proposée ci-dessus.

Même si leur titre est majoritaire, les IgG4 ne sont pas les seuls anticorps à être retrouvés chez les patients MG anti-MuSK. Plusieurs études ont mis en évidence la présence d'IgG1, 2 et 3 cependant leurs rôles dans la dégradation de la synapse neuromusculaire sont encore débattus. Des expériences d'immunisation de souris avec des IgG1-3 purifiées provenant de patients ont montré que ces anticorps ne provoquaient pas l'apparition d'un phénotype myasthénique contrairement à l'injection des IgG4 seules de ces mêmes patients (Klooster et al., 2012). A l'opposé, une étude plus récente a montré que des souris déficientes en IgG1 (équivalent des IgG4 humaines) immunisées avec MuSK présentaient des symptômes typiques de myasthénie, l'effet étant, dans ce modèle, induit par les équivalents murins des IgG1-3 humaines (Küçükerden et al., 2016). Ces données suggèrent un rôle des immunoglobulines capables de recruter le complément et de mettre en place la modulation antigénique afin de compléter l'action bloquante des IgG4 sur l'interaction Lrp4-MuSK (Cao et al., 2020). Un autre modèle murin immunisé avec des IgG totales de patients présentait une déplétion en MuSK dans la membrane synaptique (Cole et al., 2010). Ceci corrobore les résultats évoqués précédemment et renforce l'hypothèse selon laquelle l'internalisation et la dégradation de MuSK pourrait aussi être mise en place dans la MG anti-MuSK. De plus, il a été montré que *in vitro* la fraction IgG1-3 de patients était capable, à l'instar des IgG4, de disperser les agrégats de RACH induits par un traitement à l'Agrine. Les auteurs précisent que cette action des IgG1-3 n'est pas médiée par une rupture de l'interaction Lrp4-MuSK ni par une endocytose de MuSK. La même expérience a été réitérée dans des cellules chez lesquelles MuSK est activé par surexpression de DOK7, de manière à pouvoir étudier l'impact des IgG1-3 indépendamment

de l'Agrine. Les agrégats de RACH induits par la surexpression de DOK7 sont à nouveau dispersés par la mise en présence d'Ig1-3 confirmant bien qu'elles n'agissent pas au niveau de la liaison entre MuSK et Lrp4. Pour ce système, nous pouvons proposer l'hypothèse selon laquelle la liaison des IgG1-3 provoque une modification conformationnelle de MuSK empêchant ainsi son activation. De manière surprenante, les RACH induits par la surexpression de DOK7 sont aussi dispersés par les IgG4, permettant ainsi de suggérer que ces dernières agissent, en plus d'inhiber l'interaction Lrp4-MuSK, par un mécanisme similaire à l'hypothèse évoquée pour les IgG1-3 (Koneczny et al., 2013).

On note que les anticorps anti-MuSK sont aussi capables de médier l'activation de MuSK, d'initier l'agrégation des RACH et de servir comme potentiel traitement dans des contextes de pathologies neuromusculaires (Cantor et al., 2018; Oury et al., 2021; Xie et al., 1997). Il est cependant critique de souligner le caractère monoclonal des anticorps utilisés dans ces études alors que les anticorps retrouvés chez les patients MG anti-MuSK sont polyclonaux et d'isotypes différents. L'action des anticorps sur l'activité de MuSK est donc fortement dépendante des épitopes ciblés, de la clonalité, de la valence et de l'isotype.

Représentation	Isotype	Spécificité	Valence fonctionnelle	Hypermutations somatiques	Effet sur agrégation des RACH	Démonstration
	IgG1-3	Mono	Bivalent	Oui	-	<i>In vitro</i> <sup>1</sup>
	IgG4	Mono	Bivalent	Non	-	<i>In vitro</i> <sup>2</sup>
	IgG4	Mono	Bivalent	Oui	<i>In vitro</i> - - <i>In vivo</i> /	<i>In vitro</i> <sup>2</sup> <i>In vivo</i> <sup>3</sup>
	IgG4	Bi	Monovalent	Oui	- - -	<i>In vitro</i> <sup>3</sup> <i>In vivo</i> <sup>3,4</sup>
	IgG4 Fab	Mono	Monovalent	Non	/	<i>In vitro</i> <sup>2</sup>
	IgG4 Fab	Mono	Monovalent	Oui	- - -	<i>In vitro</i> <sup>2,5</sup>

**Table 2. Impact des différentes formes d'IgG4 anti-MuSK sur l'agrégation des RACH.** La valence fonctionnelle indique le nombre de paratopes spécifiques pour MuSK sur l'immunoglobuline. Les résultats *in vitro* ont été obtenus sur des cellules musculaires traitées avec de l'Agrine. Les résultats *in vivo* ne concernent que des transferts passifs réalisés chez la souris. - : inhibition modérée de l'agrégation des RACH ; - - : inhibition importante ; - - - : inhibition totale ; / : pas d'inhibition. 1. (Koneczny et al., 2013) ; 2. (Fichtner et al., 2020) ; 3. (Vergoossen et al., 2021) ; 4. (Klooster et al., 2012) ; 5. (Huijbers et al., 2019).

### II.2.2. Modèles d'étude établis

Comme dans l'étude de toutes les pathologies humaines, la mise en place de modèles animaux avec des protocoles robustes capables de récapituler le phénotype ou les mécanismes moléculaires de la physiopathologie chez l'Homme est indispensable. Ce sont notamment ces modèles qui ont permis de mettre successivement en évidence la pathogénicité des anticorps ciblant différentes protéines dans les différents types de MG. Nous nous concentrerons dans ce chapitre uniquement sur les modèles murins établis pour l'étude de la MG anti-MuSK. Les symptômes typiques récapitulant un syndrome myasthénique auto-immun chez la souris sont matérialisés par une perte progressive de masse corporelle, une faiblesse musculaire et des défauts de motricité à l'observation et pendant des examens physiques. Les animaux présentent aussi un décrétement de l'amplitude des potentiels d'action musculaires composés lors d'une stimulation répétée et les JNM apparaissent fragmentées et dispersées lors de l'examen morphologique des synapses en immunofluorescence ou microscopie électronique. Il convient au préalable de fixer les seuils limites des modèles pour le bien-être animal et le respect des réglementations en vigueur sur l'expérimentation animale. Au-delà de ces limites, les animaux doivent être euthanasiés.

Les modèles expérimentaux de myasthénie auto-immune (EAMG – *Experimental autoimmune myasthenia gravis*) peuvent être générés de deux manières différentes. Les modèles EAMG de transferts actifs consistent à immuniser les animaux avec un fragment ou la totalité de la protéine d'intérêt. Dans le cadre des modèles avec immunoréactivité contre MuSK, entre 10 et 40 µg de peptide correspondant au domaine extracellulaire de la protéine humaine ou de rat sont généralement utilisés (Table 3). Afin de stimuler la réaction immunitaire, le peptide est émulsifié dans de l'adjuvant de Freund complet (CFA) et injecté notamment dans les coussinets des pattes arrière. Les animaux reçoivent entre deux et trois injections supplémentaires au cours du protocole d'immunisation, généralement espacées de 2 à 4 semaines. Les injections de rappel, aussi appelées *boosts*, correspondent à la même quantité de peptide cependant le CFA est parfois substitué par de l'adjuvant de Freund incomplet (IFA) ne contenant pas de *Mycobacterium Tuberculosis* inactivé par la chaleur. Même si bon nombre de modèles EAMG par transfert actif ont été mis en place pour étudier la MG anti-MuSK, aucun n'a fait intervenir l'injection du domaine Ig1 seul constituant pourtant la principale région immunogène. On note que, de la même manière, même si des anticorps dirigés contre les domaines Ig2 et CRD de MuSK ont été identifiés chez certains patients, seuls ou avec des anti-Ig1, il n'existe pas de modèle animal dans lequel ces domaines particuliers ont été injectés.

La deuxième méthode permettant de générer un modèle de MG anti-MuSK consiste à injecter des immunoglobulines purifiées dans les animaux. Ceci correspond à un transfert passif et est le plus souvent réalisé avec des anticorps de patients, permettant ainsi de mettre en évidence de manière directe la pathogénicité de ces anticorps. Même si ces modèles sont plus à même de récapituler de manière fidèle les mécanismes d'action des anticorps se déroulant chez le patient, la mise en place se voit restreinte par l'accessibilité limitée aux échantillons de sérum humain. Dans ces modèles, les anticorps sont injectés de manière plus régulière et fréquente mais les protocoles d'immunisation sont souvent plus courts que ceux des transferts actifs. La quantité d'anticorps quotidienne injectée varie entre 2 et 45 mg et la première injection est souvent accompagnée de cyclophosphamide monohydrate permettant d'inhiber les réactions auto-immunes contre les anticorps injectés (Table 4). Plus récemment, un modèle de transfert passif avec anticorps anti-MuSK monoclonaux, obtenus grâce à l'isolement de clones de cellules B de patients, a été mis en place. Dans ce protocole, la quantité d'anticorps injectée et la fréquence d'injection sont largement réduites à 50 µg par injection tous les 3-4 jours (Vergoossen et al., 2021).

Transfert actifs			
Immunisation	Fond génétique	Phénotype	Référence
DEC de MuSK de rat - 10 µg - CFA	C57BL/6, A/J, C57BL/6.C-H <sup>bm12</sup> , BALB/c	Faiblesse et fatigabilité musculaire, dispersion des RACH	(Jha et al., 2006)
DEC de MuSK de rat - 10 µg - CFA	C57BL/6J	Faiblesse musculaire, fragmentation des JNM, dénervation occasionnelle	(Punga et al., 2011)
DEC de MuSK de rat - 20 µg - CFA	A/WySnJ, KO C3, A/J, B10.A-H2 <sup>a</sup> , BALB/c, C57BL/6, DBA/2, FVB/N	Variable en fonction des lignées : faiblesse musculaire, perte de poids, diminution de l'amplitude des EPP et mEPP, fragmentation des JNM	(Mori et al., 2012)
DEC de MuSK humain - 30 µg - CFA	C57BL/6J	Faiblesse musculaire, perte de poids, décrétement des PAMC, fragmentation des JNM	(Viegas et al., 2012)
DEC de MuSK humain - 10 ou 30 µg - CFA	C57BL/6J	Faiblesse musculaire dose- dépendante	(Ulusoy et al., 2014)
DEC de MuSK de rat - 40 µg - CFA	C57BL/6J	Faiblesse du diaphragme, dispersion des RACH, fragmentation des JNM, diminution de l'amplitude des EPP et mEPP	(Patel et al., 2014)
DEC de MuSK humain - 30 µg - CFA	C57BL/6J WT et KO IgG1	Faiblesse musculaire, dispersion des RACH	(Küçükerden et al., 2016)

**Table 3. Modèles de transferts actifs de MG anti-MuSK établis chez la souris.** Cette table non exhaustive récapitule les protocoles d'immunisation, les fonds génétiques utilisés et les symptômes développés dans les modèles de MG anti-MuSK mis en place par injection de domaine extracellulaire (DEC) de MuSK.

Transfert passifs			
Immunisation	Fond génétique	Phénotype	Référence
IgG - 45 mg/jour - cyclophosphamide	C57BL/6J	Faiblesse musculaire, perte de poids, décrétement des PAMC, fragmentation des JNM	(Cole et al., 2008)
IgG - 45 mg/jour - cyclophosphamide	C57BL/6J	Dispersion des RACH dans le TA et le diaphragme	(Cole et al., 2010)
IgG - 40 mg/jour - cyclophosphamide	C57BL/6J	Phénotype non étudié	(Kawakami et al., 2011)
IgG - 45 mg/jour - cyclophosphamide	C57BL/6J	Faiblesse musculaire, perte de poids, décrétement des PAMC dans le Gastrocnemius et le diaphragme, dispersion des RACH, diminution de l'amplitude des EPP et mEPP	(Morsch et al., 2012)
IgG4 - 2-4 mg/jour ou IgG1-3 - 4 mg/jour	NOD/SCID	Faiblesse musculaire, dispersion des RACH, décrétement des PAMC dans le mollet, diminution de l'amplitude des EPP dans le diaphragme	(Klooster et al., 2012)
IgG - 50 mg/jour	C57BL/6J	Diminution de l'amplitude des EPP et mEPP, dispersion des RACH dans le diaphragme	(Viegas et al., 2012)
IgG - 45 mg/jour - cyclophosphamide	C57BL/6J	Faiblesse musculaire, perte de poids, dispersion des RACH, fragmentation des JNM, diminution de l'amplitude des EPP et mEPP	(Morsch et al., 2013)
IgG - 45 mg/jour - cyclophosphamide	C57BL/6J	Dispersion des RACH dans le TA et le diaphragme	(Ghazanfari, Morsch, Reddel, et al., 2014)
IgG - 25 mg/jour - cyclophosphamide	C57BL/6J	Faiblesse musculaire	(Ghazanfari, Morsch, Tse, et al., 2014)
IgG	KO ColQ, C57BL/6J	Fragmentation des JNM	(Otsuka et al., 2015)
IgG4 - 100mg/kg/jour	NOD/SCID	Faiblesse musculaire, fragmentation des JNM	(Huijbers et al., 2019)
IgG - 7,5 mg/jour - cyclophosphamide	C57BL/6J	Défaut de reconnaissance des objets, faiblesse musculaire, perte de poids, fragmentation des JNM, décrétement des PAMC dans le masséter	(Sabre et al., 2019)
IgG4 monoclonal monovalent ou bivalent recombinant - 2,5 mg/kg	NOD/SCID	Faiblesse musculaire, perte de poids, décrétement des PAMC, dispersion des RACH	(Vergoossen et al., 2021)



**Table 4. Modèles de transferts passifs de MG anti-MuSK établis chez la souris.** Cette table non exhaustive récapitule les protocoles d'immunisation, les fonds génétiques utilisés et les symptômes développés dans les modèles de MG anti-MuSK mis en place par injection d'anticorps de patients avec MG anti-MuSK.

### Chapitre III. Objectifs de la thèse : mettre en évidence la pathogénicité des anticorps dirigés contre le domaine riche en cystéine de MuSK

MuSK se positionne en chef d'orchestre au cours de toutes les étapes de formation, maturation et maintenance de la JNM. Son activation médiée par l'Agrine et permise par l'interaction avec Lrp4 est critique pour l'intégrité du système neuromusculaire. Le rôle d'intégrateur de MuSK ne se limite pas à la signalisation Agrine, les glycoprotéines Wnt étant capables de se lier au domaine CRD de MuSK et d'activer ce dernier. L'étude des embryons chez lesquels le domaine de liaison des Wnt à MuSK est délété (MuSK $\Delta$ CRD) a permis de mettre en évidence l'implication de ces signalisations dans la différenciation synaptique embryonnaire. Ces altérations précoces mènent à de graves défauts morphologiques et fonctionnels de la connectivité neuromusculaire chez l'adulte. La rupture de l'activité de MuSK constitue donc une réelle menace pour la vie et est souvent mise en cause dans certaines pathologies de la JNM comme les syndromes myasthéniques congénitaux ou la myasthénie auto-immune.

La myasthénie auto-immune ou myasthénie grave (MG) est due à la présence d'auto-anticorps ciblant des protéines clés de la membrane post-synaptique de la JNM. Le tableau clinique présenté par les patients comprend une faiblesse et une fatigabilité musculaire progressive touchant les muscles oculaires, bulbaires et du cou. La MG peut progresser et atteindre des muscles distaux notamment respiratoires, mettant ainsi en péril la vie des patients. Chez 85% des patients, les anticorps ciblent le RACH. Ceux qui ne présentent pas d'anti-RACH sont dits séronégatifs et la moitié d'entre eux présentent des anticorps dirigés contre MuSK. Ces deux types d'immunoréactivité ont été largement étudiés et les résultats indiquent que les mécanismes menant au phénotype myasthénique sont très variables en fonction des antigènes ciblés par les anticorps. La pathogénicité des anticorps ciblant MuSK a été prouvée et caractérisée, le mécanisme principal des IgG4 majoritaires reposant sur la rupture de l'interaction entre Lrp4 et MuSK. Même s'il est clairement accepté que la principale région immunogène de MuSK est son domaine Ig1, plusieurs études ont mis en évidence la présence d'anticorps dirigés contre le CRD de MuSK (anti-MuSK<sup>CRD</sup>) en addition aux anti-Ig1 (Huijbers et al., 2016; Otsuka et al., 2015; Takamori et al., 2013). Cependant, le rôle de ces anti-MuSK<sup>CRD</sup> est encore inconnu dans la genèse de la MG, il est donc crucial de mettre en évidence leur pathogénicité. L'objectif de mon projet de thèse a donc été de prouver l'existence d'un pouvoir pathogène des anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup> et de montrer l'implication du CRD de MuSK dans la MG.

Pour répondre à ces questions, j'ai généré deux modèles expérimentaux de MG avec anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup> par injection d'anticorps générés chez le lapin (transfert passif) et par immunisation avec une protéine recombinante correspondant au CRD de MuSK (transfert actif). Cette étude visait à mettre en place les modèles pour lesquels le matériel biologique humain n'était pas disponible, étudier et caractériser les symptômes retrouvés chez ces animaux, mettre en évidence les altérations morpho-fonctionnelles de la JNM et décrire le mécanisme d'action des anticorps dirigés contre le CRD de MuSK.

L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'une publication en préparation (page 69).

**MuSK cystein rich domain antibodies are pathogenic in autoimmune myasthenic syndrome**

**Marius Halliez**, Steve Cottin, Axel You, Mégane Lemaitre, Jérôme Ezan, Céline Buon, Antony Grondin, Mireille Montcouquiol, Nathalie Sans, Bertrand Fontaine, Julien Messéant, Rozen Le Panse and Laure Storchlic.



# RESULTATS

## Article - MuSK cystein rich domain antibodies are pathogenic in autoimmune myasthenic syndrome

### Résumé de l'étude

#### Introduction

L'ensemble des étapes de formation, maturation et maintenance de la JNM reposent sur l'activation du récepteur à activité tyrosine kinase MuSK. Différents ligands sont capables d'activer MuSK au cours de ces phénomènes parmi lesquels on retrouve l'Agrine neurale et les morphogènes Wnt. Tandis que l'Agrine agit indirectement sur MuSK en se liant au co-récepteur de ce dernier, Lrp4, les Wnts interagissent directement avec MuSK via son domaine riche en cystéine (CRD). La perturbation de l'activation de MuSK met en péril son activité synaptogène et est à l'origine de graves défauts de fonctionnement de la JNM retrouvés dans la myasthénie grave (MG). La MG est une maladie rare causée par la présence d'auto-anticorps ciblant des protéines clés de la JNM. Chez les patients présentant des anticorps dirigés contre MuSK, l'immunoréactivité cible habituellement le domaine d'interaction de MuSK avec Lrp4. De manière intéressante, en plus de ces anticorps, certains patients présentent des anticorps se liant au CRD de MuSK (anti-MuSK<sup>CRD</sup>) cependant l'impact de ces derniers sur les symptômes de MG est encore inconnu. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence le potentiel pouvoir pathogène des anticorps ciblant le CRD de MuSK dans un contexte de MG.

#### Résultats

Afin d'étudier la pathogénicité des anti-MuSK<sup>CRD</sup>, nous avons généré un peptide correspondant spécifiquement à la séquence du domaine CRD de MuSK murin. Cette protéine recombinante a été utilisée pour immuniser des lapins de manière à collecter les immunoglobulines générées et ensuite immuniser des souris. L'étude du phénotype de ce modèle dit de transfert passif a mis en évidence l'apparition typique de la MG chez la souris avec une diminution de la masse corporelle et de la fonction motrice attestée par une batterie de tests cliniques. L'analyse électrophysiologique des JNM a de plus montré une fatigabilité neuromusculaire progressive justifiée par le décrétement des potentiels d'action musculaires composés lors de stimulations répétées du nerf sciatique qui innerve le Tibialis Antérieur. Des immunomarquages sur les JNM au niveau du même muscle ont dévoilé une forte altération de la structure synaptique corrélée avec les défauts fonctionnels observés en électrophysiologie. Ces défauts structurels étaient notamment caractérisés par une fragmentation importante de

l'appareil post-synaptique et une diminution du territoire synaptique occupé par la terminaison motoneuronale. Sur le plan moléculaire, nos travaux *in vitro* montrent que les anti-MuSK<sup>CRD</sup> sont à l'origine d'une abolition du pouvoir d'agrégation des RACH de l'Agrine et d'une diminution de la phosphorylation de MuSK corrélée à son activité. Ce défaut d'activité était concomitant avec une rupture partielle de l'interaction critique pour la signalisation Agrine entre Lrp4 et MuSK. En outre, des immunomarquages sur des échantillons de Gastrocnémiens des souris immunisées avec les anti-MuSK<sup>CRD</sup> ont révélé l'accumulation du complexe d'attaque membranaire à la JNM, intervenant potentiellement dans la dégradation de l'intégrité morphologique de la synapse. Afin de renforcer les résultats phénotypiques et mécanistiques obtenus via le modèle de transfert passif, nous avons entrepris la génération d'un modèle de transfert actif dans lequel des souris ont été immunisées directement avec le peptide correspondant au CRD de MuSK. De manière surprenante, ces animaux n'ont pas développé les symptômes attendus et analogues à ceux retrouvés dans le premier modèle.

### **Perspectives**

Même si l'absence de phénotype chez les animaux activement immunisés avec le peptide CRD de MuSK est largement argumentée dans la discussion de l'article, il apparaît critique d'entreprendre des expériences complémentaires afin de prouver la pathogénicité des anti-MuSK<sup>CRD</sup> dans le plus grand nombre de systèmes *in vivo*. De la même manière, l'immunisation de souris avec des anticorps provenant de sérum de patients MG présentant des anti-MuSK<sup>CRD</sup> constituerait une nouvelle preuve qui renforcerait nos résultats et serait analogue à la méthodologie de transfert habituellement utilisée pour l'établissement de modèles passifs de MG. Sur le plan clinique, les réponses aux différents traitements existants pour la MG sont très variables et sont influencées notamment par l'épitope ciblé par les auto-anticorps. L'identification d'un plus large éventail de protéines et domaines ciblés ainsi que des mécanismes moléculaires d'action de chaque sous-type anticorps sont donc nécessaires pour appliquer des stratégies thérapeutiques personnalisées et diminuer l'intensité des symptômes.

## MuSK cysteine-rich domain antibodies are pathogenic in autoimmune myasthenic syndrome

Marius Halliez<sup>1</sup>, Steve Cottin<sup>1</sup>, Axel You<sup>1</sup>, Mégane Lemaitre<sup>2</sup>, Jérôme Ezan<sup>3</sup>, Céline Buon<sup>1</sup>, Antony Grondin<sup>1</sup>, Mireille Montcouquiol<sup>3</sup>, Nathalie Sans<sup>3</sup>, Bertrand Fontaine<sup>1</sup>, Julien Messéant<sup>1</sup>, Rozen Le Panse<sup>1</sup> and Laure Storchlic<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Sorbonne Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut de Myologie, UMR-S 974 Centre de Recherche en Myologie, Paris 75013, France.

<sup>2</sup> Sorbonne Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMS28 Phénotypage du Petit Animal, Paris 75013, France.

<sup>3</sup> Université Bordeaux, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Magendie, U1215, F-33077 Bordeaux, France.

Key words: neuromuscular junction, MuSK, cysteine-rich domain, myasthenia gravis

Corresponding author: Laure Storchlic ([laure.storchlic@inserm.fr](mailto:laure.storchlic@inserm.fr))

9799 words



**Abstract**

The synapse between the motor neuron terminal and a skeletal muscle fiber is known as the neuromuscular junction (NMJ) and is crucial, throughout life, in maintaining the reliable neurotransmission required for functional motricity. Any disruption of this system leads to neuromuscular disorders, such as auto-immune myasthenia gravis (MG), the most common form of NMJ diseases. MG is caused by autoantibodies directed mostly against the acetylcholine receptor (AChR) or the muscle-specific kinase MuSK. In addition to the well-documented antibodies targeting the Ig1 domain of MuSK, several studies have reported immunoreactivity to the Frizzled-like cysteine-rich Wnt-binding domain of MuSK (CRD) in patients, although the pathogenicity of the antibodies involved remains unknown. We show here that the immunoreactivity to the MuSK CRD induced by the passive transfer of anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies in mice leads to typical MG symptoms, characterized by a loss of body weight and a locomotor deficit. The functional and morphological integrity of the NMJ is compromised with a marked progressive decay of neurotransmission and disruption of the structure of pre- and post-synaptic compartments. We find that anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies completely abolish Agrin-mediated AChR clustering by decreasing the Lrp4-MuSK interaction and also trigger the complement cascade activation. These results provide the first demonstration of the role of the MuSK CRD in MG pathogenesis and improve our understanding of the underlying pathophysiological mechanisms.

## Introduction

The electric signal inducing muscle contraction is transmitted via the neuromuscular junction (NMJ), a peripheral cholinergic synapse between a motor neuron's highly specialized axon terminal and its skeletal muscle fiber target (1–3). Every step in NMJ formation and maintenance mainly relies on a complex of postsynaptic receptors composed of the muscle-specific kinase (MuSK) and its coreceptor, the low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (Lrp4) (4–7). This master complex for NMJ regulation acts as a scaffold for several secreted and intracellular partners required for efficient MuSK signaling. These partners include neural Agrin, secreted by the motor neuron, which constitutes the principal molecular activator of MuSK, along with the Wnt morphogens that bind to MuSK via a Frizzled-like cysteine-rich domain (CRD) in its ectodomain, thereby initiating Wnt/MuSK signaling and participating in NMJ formation (8–13). In addition to the core Agrin/Lrp4/MuSK pathway, we previously demonstrated a role for Wnt-MuSK signaling at the NMJ, as MuSK $\Delta$ CRD mutant mice present morpho-functional alterations of the entire neuromuscular system, including defects of acetylcholine receptor (AChR) clustering, a critical hallmark of postsynaptic differentiation of the synapse (14). In this context, disruption of the key molecular processes required for the precise alignment and differentiation of all components of the NMJ results in a loss of nerve/muscle connection, leading to highly debilitating neuromuscular disorders such as myasthenia gravis (MG).

MG is a severely weakening auto-immune disease caused by the production of autoantibodies against key NMJ proteins, reducing the stability of the NMJ and neurotransmission thus resulting in muscle fatigability. Most patients produce antibodies against the AChR but a small proportion (less than 10%) carry other antibodies, typically targeting MuSK (15). MuSK-MG is characterized by facial, cranial and bulbar muscle weakness that can also affect the diaphragm, resulting in respiratory failure (16, 17).

Symptomatic treatments for MuSK-MG include anti-inflammatory corticosteroids and monoclonal immunotherapies such as rituximab (18, 19). In MuSK-MG, the NMJ is disrupted by immunoglobulins from the IgG4 subclass, excluding antigen crosslinking and complement cascade activation as pathogenic molecular events. Instead, anti-MuSK antibodies usually alter MuSK signaling by preferentially targeting the MuSK-Lrp4 interaction interface corresponding to the immunoglobulin-like domain 1 (Ig1) of MuSK. It is widely accepted that the MuSK Ig1 domain is the main immunogenic region but several recent studies have described patients harboring not only anti-MuSK Ig1 domain antibodies, but also antibodies directed against the MuSK Ig2 domain and the MuSK CRD (20–22). The diversity of the epitopes targeted in these patients makes it difficult to assess the implications of antibodies against MuSK CRD (anti-MuSK<sup>CRD</sup>) in the development of the MG phenotype. The role of the MuSK CRD in NMJ pathogenesis remains largely unknown and studies are therefore required to determine whether and how this particular domain of MuSK is involved in MG pathology.

We addressed this issue by generating mouse models of experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) linked to the MuSK CRD through the passive transfer of rabbit polyclonal anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies or by active immunization with a mouse recombinant MuSK<sup>CRD</sup> protein. We used an extensive array of behavioral, electrophysiological and biochemical experiments to evaluate animal phenotypes, neuromuscular junction integrity and function. We found that the immunization of mice with anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies led to myasthenia-like symptoms accompanied by neurotransmission fatigability and severe morphological defects of the NMJ. Our results indicate that immunoreactivity to the MuSK CRD disrupted Agrin/Lrp4/MuSK signaling by decreasing the interaction between MuSK and Lrp4, thereby inhibiting Agrin-induced AChR clustering. Anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies also led to the accumulation of membrane attack complex at synaptic sites. This study, combining analysis of EAMG models *in vivo* and biochemical experiments *in vitro*, demonstrates the pathogenic

role of the MuSK CRD in the context of MG and strengthens its implication in NMJ formation and stability.

## Materials and Methods

### MuSK<sup>CRD</sup> peptide purification

A cDNA construct encoding a fusion protein composed of a signal peptide, a 6x histidine tag, a thioredoxin fusion tag, and a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site followed by the mouse MuSK (accession number NM\_005592.4) frizzled-like cysteine-rich domain (CRD – amino acids 305-482) was produced by GenScript (Piscataway, NJ, USA). The cassette was subsequently subcloned into a pCS2+ vector as a *Bam*HI/*Xho*I insert and the plasmid was verified by sequencing. This construct was used to transfect HEK293T (ATCC) cells. The fusion protein produced in these cells was purified in two steps. After column equilibration, the supernatant was applied to a Ni-affinity HisTrap Excel column (17-3712-05, GE Healthcare), and the column was washed with 50 mM Tris-HCl pH7.5/250 mM NaCl/10 mM imidazole. The protein was eluted in 50 mM Tris-HCl pH 7.5/250 mM NaCl/500 mM imidazole. The fractions containing the fusion product were pooled, concentrated on centrifugal concentrators with a 5 kDa cutoff (Sartorius) and further purified by size exclusion chromatography on Superdex® 75 HR 10/300 columns (17517401, GE Healthcare). The purified fusion protein was cleaved by a recombinant TEV protease (His6-TEV(S219V)-Arg, ATCC) in 50 mM Tris-HCl pH7.5/250 mM NaCl at 10°C overnight. A second round of purification (Ni affinity chromatography and gel filtration, as above) was performed to obtain a free MuSK<sup>CRD</sup> peptide with a molecular weight of 16.4 kDa. Fractions of interest were pooled and the purified protein was analyzed by SDS-PAGE. MuSK<sup>CRD</sup> identity was confirmed by mass spectrometry (data not shown). A final concentration step was performed and aliquots with a concentration of ~1 mg/ml were collected.

### Production of rabbit anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies

Rabbits were immunized by the injection of 200 µg mouse recombinant MuSK<sup>CRD</sup> peptide, followed by booster injections on days 7, 21 and 56 with another 200 µg of the peptide at each time point. Total IgGs were purified in accordance with Agro-Bio guidelines (La Ferté Saint-Aubin, France). Two of the four rabbits receiving these injections developed clinical signs of muscle weakness (data not shown).

### **Mouse experimental models**

Mice were kept at an animal facility, under a 12-hour light/12-hour dark cycle, with free access to standard rodent food and water *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with European and national guidelines for animal experimentation, with the approval of the institutional ethics committee (no. A1-0018). Animals were allowed to acclimate to conditions in the facility for one week and to the various clinical tests to be performed, before induction of the experimental models.

For passive antibody transfer, 23 eight-week-old female B6/D2F1 mice received daily intraperitoneal (IP) injections, for 20 days, with 200 µL PBS (PBS, *N*=16) or 10 mg total IgGs from rabbits immunized with the MuSK<sup>CRD</sup> peptide diluted in 200 µL PBS (CRD, *N*=7). The first injection was supplemented with 300 mg/kg cyclophosphamide monohydrate (218707, Sigma Aldrich) to inhibit immune responses directed against the injected rabbit IgGs. Body weight was assessed every four days and animals underwent clinical tests and blood collection on days 2, 4, 12 and 19.

For active immunization with the MuSK<sup>CRD</sup> peptide, 16 eight-week-old female C57BL/6 mice were anesthetized with a ketamine/xylazine cocktail. They then received an injection of 30 µg mouse recombinant MuSK<sup>CRD</sup> protein emulsified in a 200 µL solution composed of 50% complete Freund adjuvant (CFA, F5881, Sigma-Aldrich) supplemented with 2 mg inactivated *Mycobacterium tuberculosis* and made up to the required volume with saline.

Equal quantities of the solution were injected into each hindlimb footpad and subcutaneously at three sites on the back. Booster injections of 30  $\mu\text{g}$  MuSK<sup>CRD</sup> peptide emulsified in a 200  $\mu\text{L}$  solution of 50% CFA and 50% saline were administered on days 21, 42 and 59, via subcutaneous injections of equal volumes at three sites on the back (acCRD,  $N=16$ ). In parallel, 10 mice received similar injections without the recombinant MuSK<sup>CRD</sup> protein, as a control (CFA,  $N=10$ ). Body weight was assessed weekly and animals were subjected to clinical tests and blood collection every two weeks.

### **Clinical assessment of myasthenic symptoms**

We subjected the mice to a repeated battery of clinical tests during the experimental procedure to study the onset of muscle weakness and to grade the animals as a function of symptom intensity, as described by Weiss et al. (23). Body weight was measured, compared to the mean value for the control group (PBS or CFA group), and the animal was granted a score out of three. The animals were then gently dragged 10 times over a grid and placed in the middle of the grid, which was then immediately inverted. The behavior of the mice whilst hanging upside-down was observed over a period of 90 secs. This behavior and the time spent hanging upside-down from the inverted grid accounted for another three points. Finally, mice were subjected to strength analysis. They were allowed to run for 5 mins on a treadmill then held by the tail and allowed to grab a bar connected to a force transducer. The animals were then gently pulled horizontally until loss of the grip. Comparisons of strength between control and immunized animals were used as the basis for the attribution of a final grade on a three-point scale. By adding the three scores for these clinical tests together, we obtained a global clinical score (GCS) on a scale of 0 to 9. Higher scores on this scale were associated with worse symptoms. Mice with a GCS of 9 were euthanized in accordance with animal welfare guidelines.

### **Electromyography and *in situ* muscle strength measurements**

*In situ* muscle strength and compound muscle action potential (CMAP) recordings were performed as previously described (24). Briefly, for isometric force analysis, tetanic stimulation of the sciatic nerve and muscle was performed for 500 ms at 100 Hz and optimal TA muscle stretching parameters i.e. those for which the maximal force was recorded for an isometric contraction. For CMAP recordings, the sciatic nerve was stimulated with a multi-electrode setup, as suggested in a previous study (25). CMAPs were recorded for stimulations at frequencies ranging from 1 to 40 Hz, with trains of 10 stimulations separated by one-minute rest periods.

### **Enzyme-linked immunosorbent assay**

ELISAs were performed on the serum samples obtained after each clinical test and when the animals were euthanized. Nunc MaxiSorp flat-bottomed 96-well plates (44-2404-21, Thermo Fisher Scientific) were coated by incubation overnight at 4°C with 1 µg/mL recombinant MuSK<sup>CRD</sup> protein diluted in 10 mM NaHCO<sub>3</sub> coating buffer. The plates were then washed three times with PBS/0.05% Tween 20 and blocked by incubation with PBS/2% BSA at 37°C for 2.5 hours. After three washes in PBS/0.5% Tween 20, the plates were incubated with serum samples with dilution factors in PBS/0.1% BSA ranging from 1:500-1000 (active immunization model) to 1:100000 (passive transfer model) for 90 mins at 37°C. The plates were washed several times and incubated for 60 mins at 37°C with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated or biotin-conjugated secondary antibodies as follows: goat anti-rabbit total IgG (31466, Invitrogen), goat anti-mouse total IgG (1:10000, 31431, Invitrogen), rat anti-mouse Ig1 (1:250, 553441, BD Biosciences) and rat anti-mouse Ig2b (1:250, 553393, BD Biosciences) in PBS/0.1% BSA. If necessary, the plates were then incubated with HRP-biotin conjugate diluted 1:10000 in PBA/0.1% BSA for 30 mins. The plates were subjected to a final series of washes and then incubated with tetramethylbenzidine (TMB, 421101, BioLegend) for



colorimetric reaction. The reaction was stopped by adding 1 M phosphoric acid and optical density was measured at 450 nm with a Spark 10M microplate reader (TECAN Life Sciences).

### **Immunostaining of isolated muscle fibers and cryosections**

Tibialis Anterior (TA) muscles were dissected, rinsed once in 1X PBS and fixed by incubation in PBS/4% PFA at room temperature for 1 hour. Groups of 10-20 muscle fibers were gently dissected from the whole muscle and incubated overnight in 0.1 M glycine in PBS at 4°C with mild shaking. The fibers were washed several times in PBS, permeabilized and blocked by incubation for 4 hours in PBS/4% BSA/5% goat serum/0.5% Triton X-100 at room temperature. The fibers were incubated with the following primary antibodies in blocking solution for 48 hours at 4°C: rabbit polyclonal anti-synaptophysin antibody (1:100, 180130, Thermo Fisher Scientific) and rabbit polyclonal anti-neurofilament light chain (1:500, AB9568, Merck Millipore). The fibers were then rinsed for several hours at room temperature in 0.5% Triton X-100 in PBS and incubated overnight at 4°C with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:400, A32740, Thermo Fisher Scientific) and Alexa Fluor 488-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (1:500, B13423, Thermo Fisher Scientific) in blocking solution. Finally, the fibers were washed for one day every hour in 0.5% Triton X-100 in PBS and were mounted on slides in non-hardening Vectashield mounting medium (H-1000, Vector Laboratories).

For cryosection immunostaining, 10  $\mu$ m gastrocnemius sections from PBS and CRD-passive transfer animals were labeled according to a similar protocol, but with shorter incubation periods. Sections were fixed for 20 mins, rinsed twice in PBS and then permeabilized and blocked for 1 hour. They were then incubated overnight with a rabbit polyclonal anti-complement c5b-9 antibody (1:50, 204903, Merck Millipore) in blocking solution at 4°C. The sections were washed in PBS and incubated with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit

antibody (1:500, A32740, Thermo Fisher Scientific) and Alexa Fluor 488-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (1:500, B13423, Thermo Fisher Scientific) for 1 hour.

### **Cell culture, transfection and treatments**

Primary myoblasts from WT and transgenic MuSK $\Delta$ CRD mouse models (14), HEK293T cells (ATCC), COS7 cells (ATCC) and C2C12 myoblasts (ATCC) were maintained and differentiated, if necessary, as previously described (24). For transfection, COS7 cells were used to seed 10 cm round dishes and were grown to 70-80% confluence. 2  $\mu$ g of MuSK-FLAG (6) and/or Lrp4-HA coding plasmid (S. Bauché, Sorbonne University, Paris, France, personal communication) were diluted in OptiMEM medium (Gibco, Life Technologies) for 15 mins at room temperature in the presence of FuGENE6 transfection reagent (E2691, Promega). 80% of the cell medium was replaced with DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco) alone or DMEM supplemented with 1% normal or MuSK<sup>CRD</sup>-immunized rabbit serum. The DNA mixture was then added to the cells, which were incubated for 24 hours to allow the production of sufficient recombinant protein. For MuSK<sup>CRD</sup> peptide production, adherent HEK293T cells were transfected 24 hours after plating in 24  $\mu$ l polyethylenimine (PEI; 1 mg/ml, Polysciences Inc.) with 12  $\mu$ g pCS2+ MUSK CRD mixed with 400  $\mu$ l of serum-free DMEM. The culture medium was replaced and, after 15 mins of incubation at room temperature, the mixture was added dropwise to each plate. After 24 hours, the cell culture medium was replaced with OptiMEM medium supplemented with 0.5% FBS. Culture supernatants were collected 48–96 hours after transfection, filtered, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until purification.

### **Staining of the AChR cluster *in vitro***

Primary myoblasts from WT and MuSK $\Delta$ CRD (14) mice were allowed to differentiate into myotubes and were then treated with 0.4  $\mu$ g/mL recombinant rat Agrin (550-AG-100/CF, R&D Systems) and 1% control rabbit serum (16120-099, Gibco, Life Technologies) or

MuSK<sup>CRD</sup>-immunized rabbit serum for 16 hours. Cells were rinsed twice with 1X PBS and incubated with PBS/4% PFA for 20 mins. They were washed twice in PBS, and then incubated with tetramethylrhodamine-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (1:1000, T1175, Thermo Fisher Scientific) for 1 hour at room temperature. The cells were rinsed twice in PBS and incubated for 5 mins with Hoechst stain (33342, Thermo Fisher Scientific) diluted to 0.5  $\mu$ g/mL in PBS to label nuclei. After a final wash in PBS, the cells were mounted in Vectashield H-1000 mounting medium.

### **Cell surface biotinylation**

C2C12 myotubes were rinsed 3 times with ice-cold 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>/1 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS (PBS Ca Mg) and were then incubated with 0.5 mg/mL EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (21331, Thermo Fisher Scientific) in PBS Ca Mg for 20 mins at 4°C to label surface proteins. Free biotin was quenched by three washes in PBS Ca Mg supplemented with 50 mM glycine and the cells were then rinsed twice with PBS Ca Mg and once with calcium- and magnesium-free PBS. Cells were lysed by incubation in a specific lysis buffer consisting of 50 mM Tris HCl/150 mM NaCl/2 mM EDTA/1% Triton X-100 plus protease inhibitors for 20 mins at 4°C. Cells were scraped off the dish and the lysates were centrifuged at 20,000 x g and 4°C for 20 mins. The supernatant was collected and a small fraction was retained for input analysis. The remaining volume was incubated with Pierce™ High-Capacity Streptavidin Agarose (20357, Thermo Fisher Scientific) overnight, with end-to-end rotation, in a cold room. The complexed proteins were then washed three times with Pierce™ RIPA buffer (89901, Thermo Fisher Scientific) supplemented with protease inhibitors (78438, Thermo Fisher Scientific) and once with 50 mM Tris supplemented with protease inhibitors. They were then eluted in 4X Laemmli buffer at 95°C for 5 mins.

### **Immunoprecipitation**

Cell protein extracts from COS7, C2C12, WT and MuSK $\Delta$ CRD primary myotubes were pre-cleared by incubation with SureBeads™ Protein G Magnetic Beads (1614023, Bio-Rad) for 1 h at 4°C, with end-to-end rotation. The supernatants were then incubated overnight at 4°C with the following antibodies for immunoprecipitation: rat IgG isotype control (31933, Invitrogen), rabbit polyclonal anti-MuSK (ABS549, Merck Millipore) or serum from MuSK<sup>CRD</sup>-immunized rabbits. The samples were then incubated with magnetic beads supplemented with protease inhibitors and phosphatase inhibitors for 4 hours at 4°C with end-to-end rotation. The beads were collected and washed 3 times in RIPA and once in 50 mM Tris-HCl pH 8, both supplemented with protease inhibitors and phosphatase inhibitors (78426, Thermo Fisher Scientific). Finally, immunoprecipitated proteins were eluted in 4X Laemmli buffer at 95°C for 5 mins. For the immunoprecipitation of FLAG-tagged transfected proteins, we used the DYKDDDDK Fab-Trap™ Agarose Kit (ffak-20, Chromotek, Proteintech) in accordance with the manufacturer's instructions. Complexes were collected by competitive elution with the 3xDYKDDDDK peptide (fp-1, Chromotek, Proteintech).

### **Western blotting**

Cell proteins were extracted and SDS-PAGE was performed as previously described (26). Samples were transferred overnight onto an Immuno-Blot PVDF membrane (1620177, Bio-Rad). The membrane was blocked in TBS/0.1% Tween-20 (TBST) supplemented with 5% bovine serum albumin or 5% non-fat milk powder, depending on the specifications of the primary antibody. The membrane was then incubated overnight at 4°C with mild shaking with the following primary antibodies diluted in the appropriate buffer: rabbit polyclonal anti-HA (1:5000, ab9110, Abcam), rabbit polyclonal anti-MuSK (1:500, ABS549, Merck Millipore), mouse monoclonal anti-GAPDH (1:4000, clone 6C5, sc-32233, Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-transferrin receptor (1:1000, clone H68.4, 13-6800, Invitrogen), mouse monoclonal anti-FLAG (1:1000-10000, clone M2, F1804, Sigma-Aldrich) and mouse

monoclonal cocktail 4G10 platinum anti-phosphotyrosine (1:1000, 05-1050, Sigma-Aldrich). The membrane was washed several times in TBST then incubated for 1 hour at room temperature with the following secondary antibodies: StarBright Blue 700 goat anti-mouse and anti-rabbit (1:10000, 12004158 and 12004161 respectively, Bio-Rad) antibodies. Signals were observed and digitized with the ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad) and signal intensity was quantified with Fiji software and Gels tool.

### **Image acquisition**

All images were acquired with a Zeiss Axio Imager M2 microscope equipped with an ApoTome 2 module, using a Plan-Apochromat 40×/1.3 NA oil DIC or a Zeiss LSM-880 confocal laser scanning microscope using a Plan-Apochromat 63×/1.4 NA oil DIC objective. Image acquisition was performed with ZEN 3.5 Blue edition software (Zeiss) on sets of images taken in multiple focal planes separated by a regular interval (z-stacks). Images were then analyzed and presented as maximum intensity projections derived from z-stacks. Similar acquisition parameters were used for each series of images from the same experiment to ensure relevant comparisons.

### **Statistical analysis**

We first tested the normality of data distribution with the Shapiro-Wilk test and then performed appropriate two-tailed parametric tests or their non-parametric equivalents, including: Student *t*-test, Mann-Whitney *U*-test, Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test and two-way ANOVA with a Tukey or Sidak post-hoc test. All results are expressed as means ± SEM. Differences with *p*-values below the  $\alpha$ -risk threshold of 0.05 were considered significant and trends ( $p < 0.1$ ) are indicated when relevant. No outlier was removed.

## Results

### **MuSK<sup>CRD</sup> immunoreactivity leads to a myasthenic phenotype in mouse**

Given the lack of biological samples from patients, we assessed the pathogenicity of antibodies targeting MuSK CRD by generating polyclonal MuSK<sup>CRD</sup> IgG through immunization of rabbits with a peptide corresponding to the mouse MuSK cysteine-rich domain (CRD). We purified whole rabbit IgG from serum samples for use in subsequent experiments (hereafter referred to as anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies). We first assessed whether the anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies generated targeted MuSK in immunoprecipitation experiments on protein lysates from COS7 cells transfected with a MuSK-HA construct or C2C12-derived myotubes. No MuSK was detected in the fractions immunoprecipitated with control IgG, but a specific signal corresponding to the MuSK protein (110 kDa) was detected in both cell systems following immunoprecipitation with anti-MuSK<sup>CRD</sup>-containing rabbit serum (Figure 1A, B). We then generated a mouse experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) model by passive transfer with daily injections of anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies according to an immunization protocol adapted from Shen et al. (27) (Figure 1C). The immunized animals are referred to hereafter as CRD animals and their counterparts receiving control injections of PBS are referred to as PBS animals. Anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibody titer was determined by ELISA on serum samples obtained on days 2, 12 and 20. The amounts of anti-MuSK<sup>CRD</sup> IgG in immunized animals remained stable from day 12 of the protocol onwards (Figure 1D). Animals were monitored regularly throughout the experiment, and their motor functions were assessed. No behavioral or functional defects were observed in control PBS animals during the course of the protocol. During the last clinical testing session, the CRD animals rapidly became exhausted, displaying a spinal kyphosis and a trailing tail during a five-minute treadmill run (Figure 1E). In both groups, the first injections induced a transient loss of body weight that persisted until day 4. Thereafter, PBS mice gained weight steadily throughout the rest of the protocol whereas their

CRD littermates initially regained weight and then started to lose weight again from day 12, with a 10% loss of body weight relative to the PBS animals observed on day 19 (Figure 1F). Forelimb strength was also assessed in a grip test, to detect potential muscle weakness. The strength of the immunized CRD animals was 12% lower than that of the control mice at the end of the protocol (Figure 1G). We measured overall symptom intensity by calculating a global clinical score (GCS) taking into account body weight loss, muscle strength in the grip test, objective observations of animal behavior and the time spent hanging from an upside-down grid. PBS-injected group GCS was null during the experiment, reflecting an absence of myasthenic symptoms. By contrast, the GCS for the CRD animals increased progressively throughout the protocol and was significantly higher than that of the PBS animals at completion of the series of injections ( $2.93 \pm 0.65$  vs.  $0.38 \pm 0.16$ , Figure 1H). Thus, injections of rabbit sera containing IgG antibodies targeting MuSK CRD induce behavioral and motor deficits typical of myasthenia-like symptoms.

### **Anti-MuSK<sup>CRD</sup>-injected mice display neurotransmission defects and neuromuscular fatigability**

We investigated the effect of anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies on neurotransmission by performing *in situ* muscle strength recordings on the tibialis anterior (TA) after tetanic stimulation of the nerve (indirect) or muscle (direct) (Figure 2A-D). The specific muscle strength, corresponding to the maximal force developed by the TA divided by muscle mass, was not significantly affected for either type of stimulation, although direct stimulation elicited a slightly lower strength in CRD TA ( $15.24 \pm 1.73$  vs.  $17.96 \pm 1.01$  mN/g, Figure 2B;  $13.77 \pm 1.67$  vs.  $16.87 \pm 0.86$  mN/g, Figure 2C). We also quantified the tetanic fade, corresponding to the loss of strength during tetanic stimulation. No tetanic fade was observed for the TA from PBS animals, whereas a mean loss of 18% of the maximal strength during stimulation was observed in all CRD mice (Figure 2D). We investigated the integrity of neurotransmission

further by recording compound muscle action potentials (CMAP) on TA muscle during trains of 10 stimulations of the sciatic nerve at different frequencies — 1, 5, 10, 20 and 40 Hz — and quantifying CMAP amplitudes. Peak-to-peak amplitude measurements showed that CMAP remained stable in PBS mice subjected to stimulation at 10 Hz, whereas these potentials gradually decreased in CRD animals stimulated in the same way (Figure 2E, F). We determined the overall decrease observed at all frequencies tested by comparing the amplitude of the last CMAP of a train of stimuli to the amplitude of the first CMAP for the train concerned. CMAP amplitude in PBS mice was stable for stimulation at frequencies from 1 to 10 Hz and decreased by a total of  $7.88 \pm 1.79\%$  and  $14.55 \pm 2.13\%$  for stimulations at 20 and 40 Hz stimulation, respectively, relative to the amplitude of the first CMAP of the train concerned. In CRD mice, the total decrease was significantly greater, by 12% than that in the control group for stimulation at 10 Hz ( $85.36 \pm 1.95\%$  vs.  $97.65 \pm 0.86\%$ , Figure 2E, F). Indeed, this decrease was exacerbated and greater than that in control animals for stimulations at higher frequencies, with a total decrease of  $19.7 \pm 2.95\%$  at 20 Hz and  $26.2 \pm 4.14\%$  at 40 Hz (Figure 2G). Taken together, these results demonstrate that anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies cause progressive neuromuscular weakness and fatigability.

### **Compromised NMJ morphological organization in anti-MuSK<sup>CRD</sup> injected animals**

We then explored whether the functional defects of the NMJ observed in CRD animals were correlated with structural alterations, by analyzing NMJ morphological phenotypes for TA muscles at the end of the EAMG protocol. Isolated muscle fibers were stained with fluorescent  $\alpha$ -bungarotoxin to label AChR, and with a mixture of antibodies against neurofilament (NF) and synaptophysin (Syn) to label nerve branches and terminals, respectively. As expected, the NMJ of PBS animals adopted a typical pretzel-like shape with a complex continuous network of AChR branches. Motor neuron labeling revealed a high degree of coverage of the post-synaptic apparatus by the nerve terminals. By contrast, in CRD mice, the AChR network



displayed substantial alterations with a loss of branch integrity and continuity and the presence of numerous isolated AChR aggregates. Poor nerve-terminal coverage of the post-synaptic structures was also observed (Figure 3A). A quantitative analysis based on the workflow described by Jones et al. (28) confirmed that the endplate was significantly smaller ( $688.7 \pm 32.54$  vs.  $778.5 \pm 29.7 \mu\text{m}^2$ , Figure 3B) in immunized animals, reflecting the smaller size of the NMJ. AChR labeling in the endplate was also significantly weaker in CRD animals ( $282.5 \pm 10.62$  vs.  $429.4 \pm 12.67 \mu\text{m}^2$ , Figure 3C), resulting in a loss of NMJ compactness, corresponding to the area of the AChR over the endplate area ( $43.09 \pm 1.09$  vs.  $56.52 \pm 0.77\%$ , Figure 3D). Indeed, the NMJ of CRD mice had three times the number of isolated AChR fragments found in control littermates ( $6.57 \pm 0.52$  vs.  $2.19 \pm 0.14$  fragments/NMJ, Figure 3E). None of the control NMJ analyzed consisted of more than six fragments, whereas fragmented synapses accounted for  $40.4 \pm 5.6\%$  of all the NMJ analyzed in CRD animals (Figure 3F). There was a poor overlap between nerve terminals and AChR aggregates in the presence of anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies, as demonstrated by the significantly smaller area of synaptic contact ( $91.47 \pm 12.24$  vs.  $225.6 \pm 8.20 \mu\text{m}^2$ , Figure 3G) and the overlap (i.e. the area of synaptic contact divided by the AChR area,  $31.18 \pm 3.25$  vs.  $51.41 \pm 1.07$ , Figure 3H). Together, these results indicate that immunoreactivity to MuSK CRD leads to pre- and post-synaptic NMJ disassembly, consistent with the electrophysiological findings.

### **Agrin-induced AChR clustering is inhibited by anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies**

AChR clustering at synaptic sites, a hallmark of post-synaptic differentiation, is principally dependent on Agrin/Lrp4/MuSK signaling, this pathway being crucial for NMJ formation, maturation and maintenance (1). Agrin binds to Lrp4, enhancing the pre-existing Lrp4-MuSK interaction and ultimately leading to MuSK activation and AChR aggregation. We investigated whether the NMJ defects observed in the passive EAMG model were due to changes in Agrin signaling. Primary myoblasts from WT mouse limb muscles were allowed to

differentiate into myotubes and were then treated with Agrin, together with control or MuSK<sup>CRD</sup>-immunized rabbit serum. AChR aggregates were labeled with fluorescent  $\alpha$ -bungarotoxin. Agrin treatment elicited a significant increase in the number of AChR clusters when cells were exposed to control rabbit serum ( $1732.61 \pm 76.79$  vs.  $711.97 \pm 44.68$  clusters per mm<sup>2</sup> of myotube, Figure 4 A, B). However, AChR clustering was reset to basal levels when cells were treated with anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibody-containing serum and with Agrin ( $939.87 \pm 66.90$  vs.  $711.97 \pm 44.68$  clusters per mm<sup>2</sup> of myotube, Figure 4A, B). Agrin-induced AChR clustering decreased progressively with increasing concentration of anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies, indicating a dose-dependent effect of serum. The spontaneous formation of AChR aggregates was not affected by immunized rabbit serum, suggesting that anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies specifically inhibit Agrin-induced clustering ( $948.91 \pm 97.37$  vs.  $711.97 \pm 44.68$  Ctl UT, ns, Figure 4A, B). We assessed the specificity of the anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies further by performing immunoprecipitation experiments with extracts from WT or MuSK $\Delta$ CRD primary muscle cultures treated with control IgG or immunized rabbit serum. As expected, a signal corresponding to MuSK was observed when WT lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies. By contrast, these antibodies were unable to bind to MuSK from which the CRD had been deleted (Figure 4C). For confirmation of the specificity of the inhibition of the Agrin-induced AChR clustering mechanism by CRD immunoreactivity, we assessed the aggregation capacity of Agrin on MuSK $\Delta$ CRD primary myotubes treated with immunized rabbit serum. By contrast to the results obtained for WT myotubes (Figure 4A, B), AChR aggregation was similar in cells treated with Agrin and anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies and in cells treated with Agrin and control serum ( $2163.36 \pm 86.06$  vs.  $2211.515 \pm 82.10$ , Figure 4D, E). This set of experiments indicates that antibodies against the MuSK CRD specifically and severely alter Agrin/Lrp4/MuSK signaling *in vitro*.

## **Anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies decrease MuSK activation by inhibiting Lrp4-MuSK interaction**

We then investigated the mechanisms underlying the alterations to Agrin signaling following treatment with anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies. Control experiments based on cell-surface protein biotinylation assays showed that MuSK expression on the cell membrane was not altered by anti-MuSK<sup>CRD</sup> treatment (Figure 5A, B). We then assessed the Lrp4-MuSK interaction in a heterologous system. Interestingly, the presence of anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies decreased the interaction between the recombinant MuSK-FLAG and Lrp4-HA proteins significantly, by 68% relative to the control IgG treatment ( $0.32 \pm 0.11$  vs.  $1.00 \pm 0.16$ , Figure 5C, D). MuSK activation is known to be correlated with its level of tyrosine phosphorylation. We therefore assessed MuSK tyrosine phosphorylation using the 4G10 anti-phosphotyrosine antibody on immunoprecipitated MuSK from C2C12 myotube extracts. Agrin treatment alone resulted in high levels of MuSK tyrosine phosphorylation, whereas concomitant exposure with anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibody treatment resulted in significantly decreased levels of phosphorylation (41% lower;  $37.35 \pm 4.18$  vs.  $63.36 \pm 3.51$ , Figure 5E, F).

As we used rabbit-generated immunoglobulins in our passive transfer model, we could not rule out a role of the complement system in the mechanisms underlying NMJ disassembly in our mouse models. We therefore stained gastrocnemius cryosections from PBS and CRD animals with fluorescent  $\alpha$ -bungarotoxin and antibodies against the complement terminal C5b-9 complex, also known as the membrane attack complex. These two types of labeling were not colocalized in PBS control muscles, whereas a strong and specific C5b-9 signal was observed in synaptic regions of CRD animals (Figure 5G). Overall, our data suggest that anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies disrupt Agrin/Lrp4/MuSK signaling by blocking the physical interaction between Lrp4 and MuSK, thereby impairing MuSK activation and concurrently initiating membrane attack complex accumulation at the synapse.

**MuSK<sup>CRD</sup> active transfer does not recapitulate neuromuscular passive transfer phenotype**

We generated a second EAMG model based on the active immunization of mice with the recombinant mouse MuSK CRD peptide to consolidate our results implicating anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies in MG pathogenesis. Mice were initially immunized with an injection of MuSK CRD peptide emulsified in CFA. They then received three booster injections on days 21, 42 and 59 with the MuSK CRD peptide emulsified in IFA (these animals are referred to hereafter as acCRD animals). Control mice received initial and booster injections with emulsified PBS (these animals are referred to hereafter as CFA animals, Figure 6A). As expected, acCRD mice progressively developed anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies during the course of the protocol (Figure 6B). At the end of the immunization protocol, most of the antibodies against MuSK<sup>CRD</sup> belonged to the Ig1 subclass, but Ig2b antibodies also accounted for a significant proportion of serum immunoglobulins (Figure 6C). Surprisingly, the immunization protocol did not induce any decrease in body weight or grip strength, and the GCS remained low, contrasting with the results obtained with the passive model (Figure 1, 6D-F). Strength (data not shown) and CMAP electrophysiological recordings did not appear to differ from those for the control group (Figure 6G). The progressive decrease in CMAP amplitude was not significantly greater than that in PBS animals, except for high-frequency stimulations at 40 Hz (10<sup>th</sup> CMAP amplitude in % of the first,  $78.33 \pm 2.37$  vs  $87.13 \pm 2.93$ , Figure 6H). The immunolabeling of NMJ on isolated TA muscle fibers from both groups indicated that synapses displayed the expected structural complexity and continuousness (Figure 6I). Quantitative analyses further confirmed that the acCRD animals and their CFA littermates did not differ in terms of AChR labeling area, the number of AChR aggregates isolated or coverage, for pre- and post-synaptic signals (Figure 6J-L). The active transfer immunization protocol based on injection of the MuSK<sup>CRD</sup> peptide does not, therefore, elicit a behavioral, functional or morphological myasthenic phenotype.

## Discussion

We show here that antibodies targeting the MuSK cysteine-rich domain underlie the onset of a myasthenic phenotype accompanied by morphological and functional defects of the NMJ. Given the limited availability of biological material from the small number of patients carrying anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies together with other anti-MuSK antibodies, we investigated the pathogenic effect of MuSK<sup>CRD</sup> antibodies by generating mouse EAMG models by the passive transfer of IgG antibodies purified from MuSK<sup>CRD</sup>-immunized rabbits or active immunization with the MuSK CRD peptide. Mice receiving injections of MuSK<sup>CRD</sup> antibodies clearly reproduced several of the hallmarks of MG, consistent with the findings for other anti-MuSK IgG passive transfer models reported in previous studies (29). However, mice immunized with the recombinant MuSK<sup>CRD</sup> peptide did not display the expected symptoms or NMJ dysfunction. According to the results from several previously described active immunization models for MuSK, MG initiation is variable and does not always occur (30, 31). In our active transfer model, the animals developed antibodies against the injected MuSK<sup>CRD</sup> peptide, but in quantities too small to trigger disease onset. The low levels of antibodies induced probably reflect the small amount of peptide injected or an inappropriate conformational structure, decreasing the immunogenic impact of the protein. However, genetic background has a well-documented role in the triggering of disease symptoms and we cannot rule out a role for this factor here. An effect of genetic background is consistent with the highly variable nature of MuSK MG symptoms following active immunization, according to the mouse strain used. Our data indicate that the injection of the MuSK CRD peptide resulted in a greater decrease in CMAP for stimulations at a frequency of 40 Hz, suggesting that a stronger immune response would probably result in a phenotype similar to that observed in the passive EAMG model. Further studies are, therefore, required to establish a reliable model of MG with anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies by active immunization.

Our results indicate that the serum of MuSK<sup>CRD</sup> peptide-immunized rabbits inhibits the interaction of Lrp4 with MuSK. This interaction is crucial for the essential Agrin/Lrp4/MuSK signaling pathway. This finding is consistent with the widely accepted principal pathological mechanism of antibodies against the MuSK Ig1 domain in human and animal models (32). However, it remains unclear whether the loss of Lrp4-MuSK binding in our model is due to steric hindrance or changes in the conformation of MuSK following antibody binding. We found that anti-MuSK<sup>CRD</sup> treatment *in vitro* induced a partial loss of Agrin-induced MuSK phosphorylation and a total loss of Agrin-induced AChR clustering, with the cultured muscle cells harboring basal levels of AChR aggregates that could potentially account for the NMJ disease symptoms observed. Interestingly, exposure to anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies significantly increased MuSK phosphotyrosine levels relative to the control in the absence of Agrin. MuSK phosphorylation is considered to be proportional to the activation of MuSK and its ability to induce AChR clustering (33). The total loss of Agrin-dependent AChR aggregates therefore remains unexplained. Similar observations were reported in a previous study in which myotubes were treated with a human anti-MuSK monoclonal antibody derived from MuSK MG patients (34). We can hypothesize here that the anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies binding to MuSK are responsible for MuSK crosslinking, allowing the transphosphorylation of this protein to a level below the threshold required for efficient AChR clustering. However, as the intracellular domain of MuSK contains 19 tyrosine residues and phosphorylation of only the membrane-apposed Y553 and activation loop Y750, 754 and 755 residues is required for full MuSK activation (35–37), we cannot exclude the possibility that anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies trigger a change in MuSK conformation, exposing tyrosine residues which are not involved in MuSK signaling and allowing their phosphorylation, raising questions about the relevance of the 4G10 antibody for assessing MuSK activity accurately.

In addition to the core Agrin/LRP4MuSK signaling pathway, other accessory components, such as Wnt morphogens, have been shown to trigger MuSK activation via binding to its CRD, albeit to a lesser extent (12). We cannot rule out the possibility that anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies disrupt Wnt/MuSK interactions, but it remains unclear whether a loss of Wnt signals in adulthood makes a significant contribution to the observed phenotype. Many studies have demonstrated the crucial role played by Wnt pathways in the early steps of neuromuscular synaptogenesis at the NMJ (10, 11, 14). However, beyond the role of these pathways in pre patterning and synaptic contacts, their impact on NMJ maturation and maintenance remains poorly understood, with Agrin/MuSK signaling still largely considered to be the prevailing molecular mechanism responsible for ensuring synapse integrity (37). In the context of the passive transfer of anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies in adult animals, any change in Wnt signals is likely to be masked by the disruption of the core Agrin/MuSK signaling pathway, resulting in the severe NMJ phenotype observed.

It is important to take into account the discrepancies between human disease and animal EAMG models when considering the mechanisms involved in generating the phenotype. MuSK-MG in humans is characterized by a prevalent impact of IgG4 immunoglobulins, which are unable to interact with complement components (38, 39). Our passive transfer model was based on injections of IgG from rabbits immunized with the MuSK CRD peptide. Humans and mice have a broad diversity of IgG subclasses, whereas rabbits have only one IgG subclass, which interacts with Fc receptors and the complement molecule C1q (40). The expected effect of anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies, blocking the MuSK-Lrp4 interaction, was observed following the injection of rabbit immunoglobulins, just as in the human disease, but we cannot rule out the involvement of synaptic degenerative activity due to complement activation, which may contribute to the disrupted NMJ phenotype. This hypothesis is supported, in particular, by the accumulation of C5b-9 at neuromuscular synaptic sites in the animals into which anti-MuSK<sup>CRD</sup>

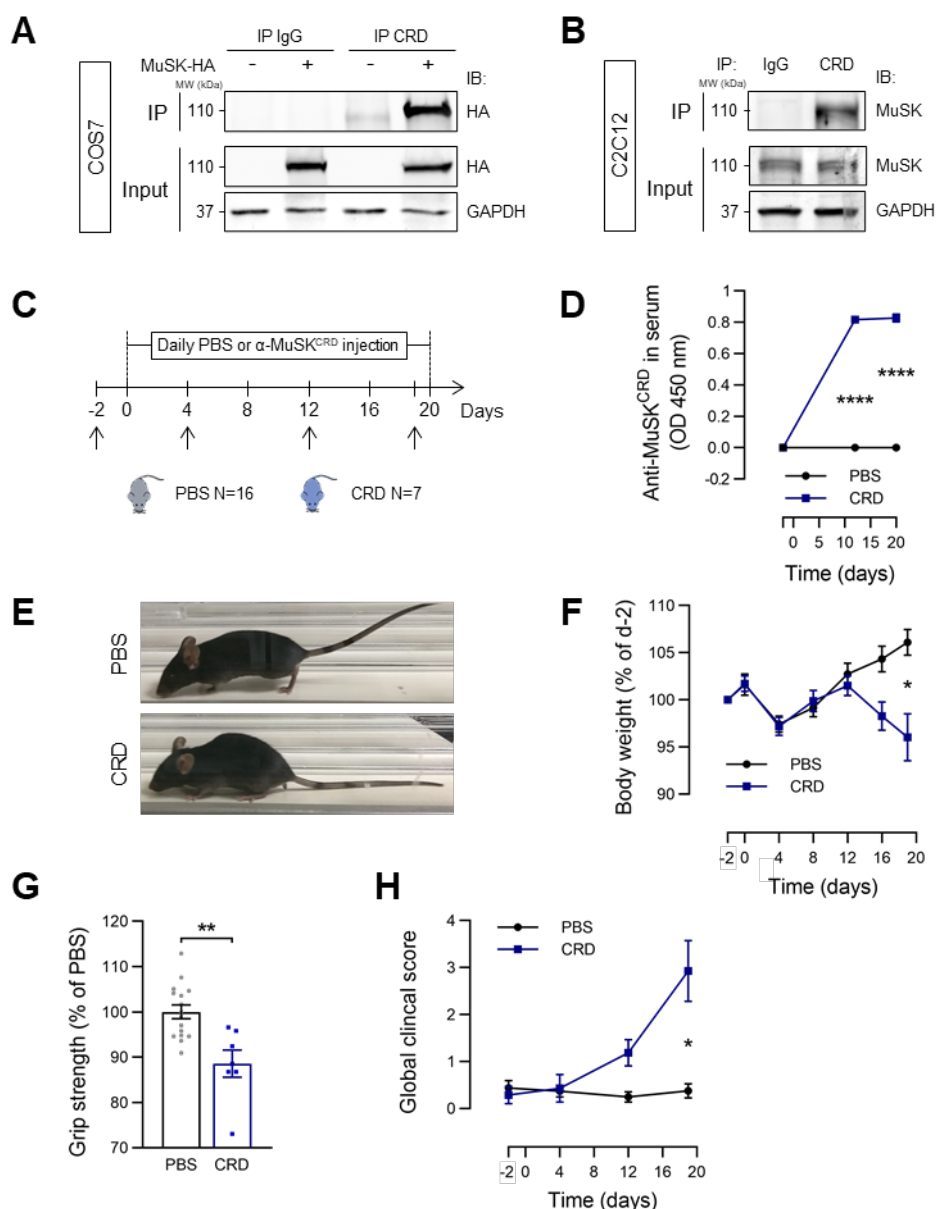
antibodies were injected, due to an effectively activated complement signaling cascade. Furthermore, isotyping experiments in our active transfer mouse model showed that complement-binding IgG2b antibodies were developed following immunization with the MuSK<sup>CRD</sup> peptide. This observation is consistent with the identification of anti-MuSK antibodies of the IgG2b subclass in previous mouse models of MG based on active immunization with the MuSK extracellular domain (ECD) from rats or humans (31, 41, 42). Another intrinsic property of human anti-MuSK IgG4 antibodies is their ability to exchange Fab arms with other IgG4 antibodies, resulting in functionally monovalent antibodies (43, 44). This specific feature of IgG4 in humans plays a critical role in the pathogenic impact of antibodies targeting MuSK. However, to our knowledge, no study has ever reported the occurrence of such a process for rabbit IgG or mouse IgG1 or 2b. The NMJ phenotype observed in our passive transfer model probably result from the combined effects of various pathological mechanisms, contrasting with the molecular events occurring in humans. These mechanisms notably include disruption of the Lrp4-MuSK interaction and complement recruitment. The polyclonal nature and intrinsic properties of the rabbit IgG against MuSK<sup>CRD</sup> used in this study may underlie these multiple effects. Our results provide strong evidence in support of the pathogenicity of antibodies targeting MuSK<sup>CRD</sup>, but further studies are required to decipher the precise molecular effects of this immunoreactivity in humans.

The involvement of the MuSK CRD in NMJ formation and physiology has recently been investigated in numerous studies, but immunoreactivity to this particular domain in the context of MG has rarely been considered (20–22). Therapeutic approaches for restoring NMJ integrity through the injection of agonist monoclonal antibodies targeting the MuSK CRD have been developed in animal models of neuromuscular disorders (45, 46). By contrast, the immunization of mice with a functionally monovalent monoclonal antibody directed against the MuSK Ig1 domain results in a severe MG phenotype (47). Meta-analysis of the existing



passive-transfer models of MuSK MG suggested that the pathogenicity of the injected immunoglobulins depends strongly on the epitope targeted, antibody titer, isotype, clonality and functional valency (29). In summary, the unique NMJ features induced by the anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies generated in this study reproduce the targeting of several epitopes occurring in MuSK MG patients more effectively as opposed to the injection of a monoclonal antibody. This study highlights the importance of the MuSK CRD at the NMJ and provides a deeper understanding of the underlying pathophysiological molecular mechanisms, which are critical for the development of effective personal treatment.

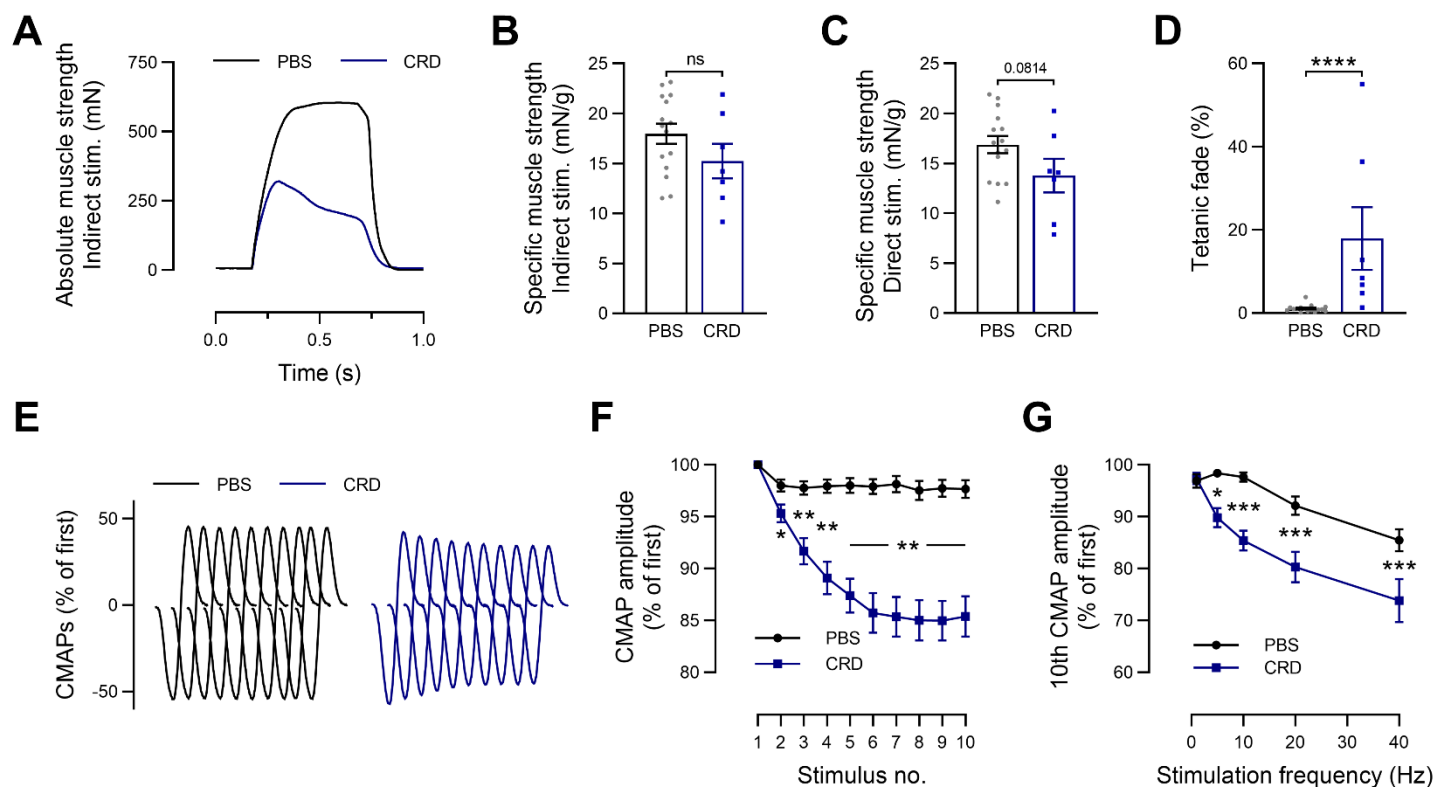
Figures



**Figure 1. Anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibody injections induce myasthenia-like symptoms in mice.**

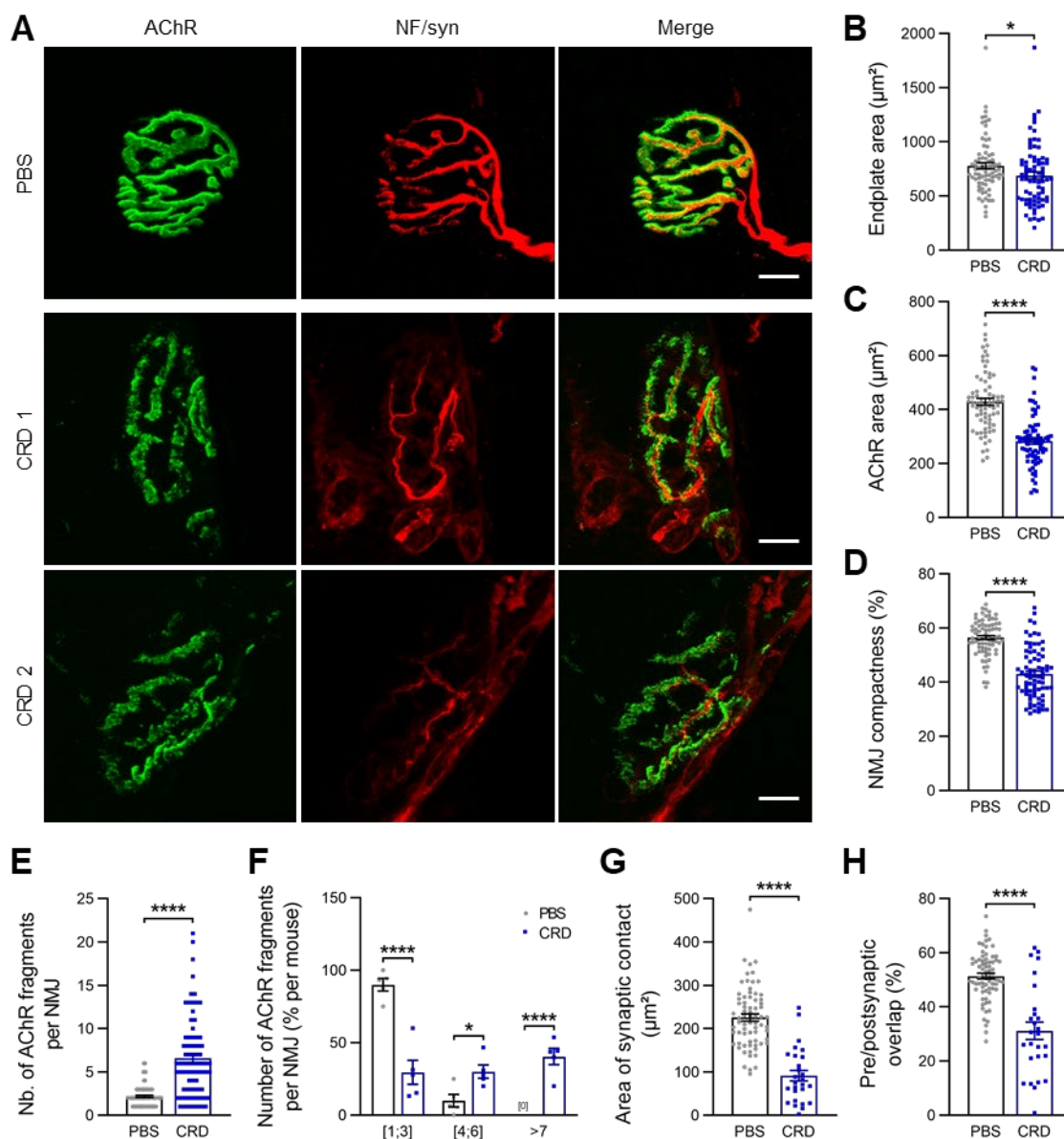
**A-B.** Lysates of COS7 cells transfected with a MuSK-HA construct (A) and C2C12 myotubes (B) were subjected to immunoprecipitation (IP) with control IgG or anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies. Whole-lysate western blots (Input) were performed to demonstrate the presence of the protein of interest. IB, immunoblot; GAPDH, loading control; MW, molecular weight. **C.** Schematic representation of the EAMG passive-transfer model protocol. PBS, control animals receiving injections of PBS; CRD, animals receiving injections of anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies. Black arrows indicate the days on which clinical tests were performed. **D.** ELISA for total anti-

MuSK<sup>CRD</sup> antibody dosing in serum from control (PBS) and immunized (CRD) animals (1:100000) during the course of the protocol. **E.** Representative images of PBS or CRD animals running on a treadmill at the end of the protocol. **F.** Body weight measurements for the PBS and CRD groups during the course of the protocol. Weight was normalized relative to the value obtained during the pre-injection clinical test (day -2). **G.** Forelimb muscle strength in the grip test of PBS and CRD animals on day 19 of the protocol. Data are normalized relative to the PBS group. **H.** Global clinical score (GCS) of PBS and CRD animals during the protocol. GCS includes body weight, objective observation, hanging upside-down test and grip test results. The data shown are the mean  $\pm$  SEM. PBS,  $N=16$ ; CRD,  $N=7$ . \* $p<0.05$ ; \*\*\* $p<0.001$ . Two-way ANOVA with Sidak post-hoc test (D, F and H), Mann-Whitney  $U$ -test (G).



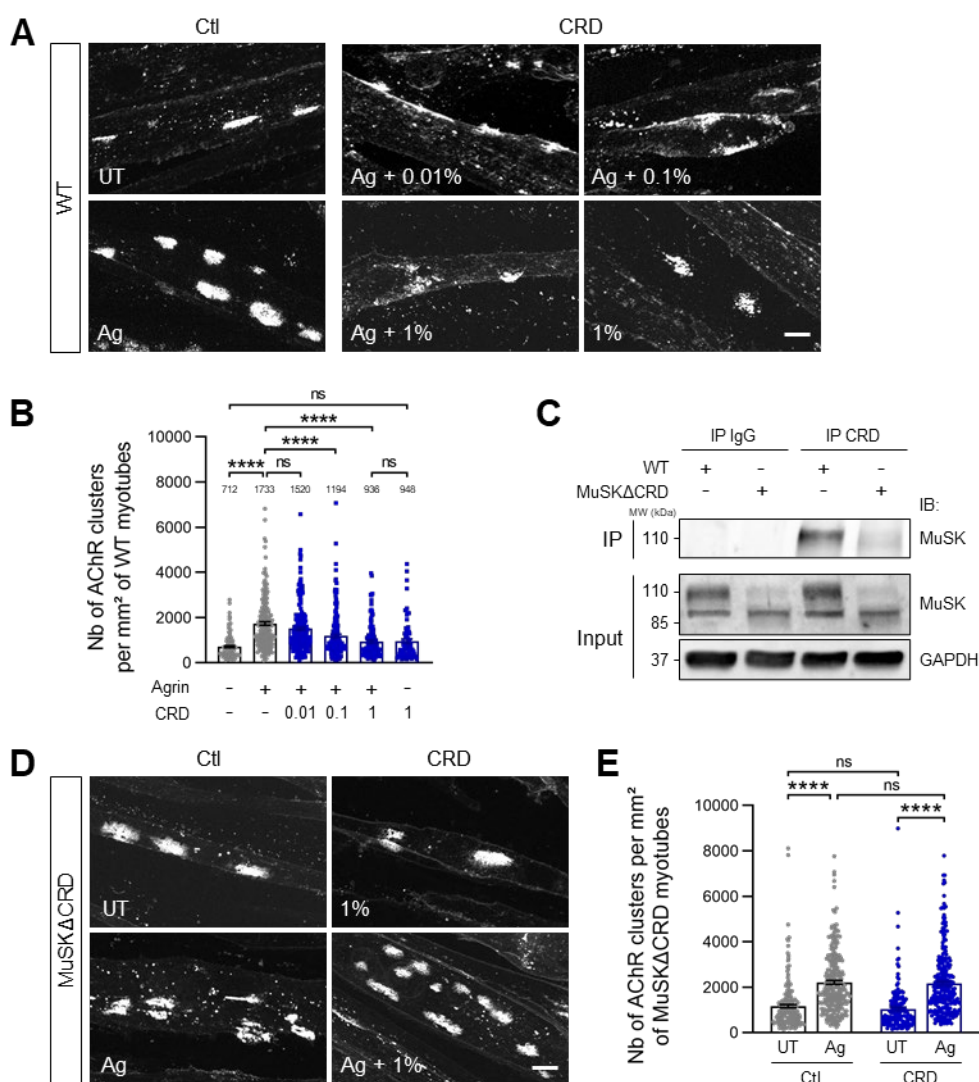
**Figure 2. Changes to *in situ* muscle strength and reduced CMAP amplitude in mice injected with anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies.** **A.** Representative traces of maximal tibialis anterior (TA) muscle strength during tetanic stimulation of the sciatic nerve in a control (PBS) or an anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibody-immunized (CRD) animal. **B, C.** Quantitative analysis of specific TA muscle strength relative to the TA muscle mass after sciatic nerve (B) or TA muscle (C) stimulation. **D.** Quantitative analysis of the tetanic fade represented as the percentage of the maximal strength evoked during stimulation. **E.** Representative traces of CMAPs from a PBS and a CRD animal. CMAPs were recorded in the TA muscles during a train of 10 sciatic nerve stimulations at 10 Hz. **F.** Quantitative analysis of the CMAP amplitude after a 10 Hz stimulation, expressed as a percentage of the first CMAP amplitude. **G.** Quantitative analysis of the amplitude of the 10th CMAP after trains of sciatic nerve stimulation at 1, 5, 10, 20 and 40 Hz. Data are expressed relative to the amplitude of the first CMAP of the train. The data

shown are the mean  $\pm$  SEM. PBS,  $N=16$ ; CRD,  $N=7$ . ns, not significant;  $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$ ;  $****p<0.0001$ . Mann-Whitney  $U$ -test (B-D) or two-way ANOVA with Sidak post-hoc test (F, G).



**Figure 3. NMJ structural defects in the TA muscles of CRD mice** **A.** Representative confocal images of isolated TA muscle fibers from control PBS or CRD mice. CRD 1 and 2 correspond to two individual animals. Muscles were stained with  $\alpha$ -bungarotoxin for detection of the acetylcholine receptor (AChR, green) and antibodies directed against neurofilament and synaptophysin (NF/Syn, red) for the labeling of nerve terminals. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$  in the merged images. **B-H.** Quantitative analysis of the endplate area (B), AChR labeling area (C), NMJ compactness, corresponding to the ratio of C to B (D), number of AChR fragments isolated per NMJ (E), distribution of NMJ by fragment number (F), area of contact between the nerve

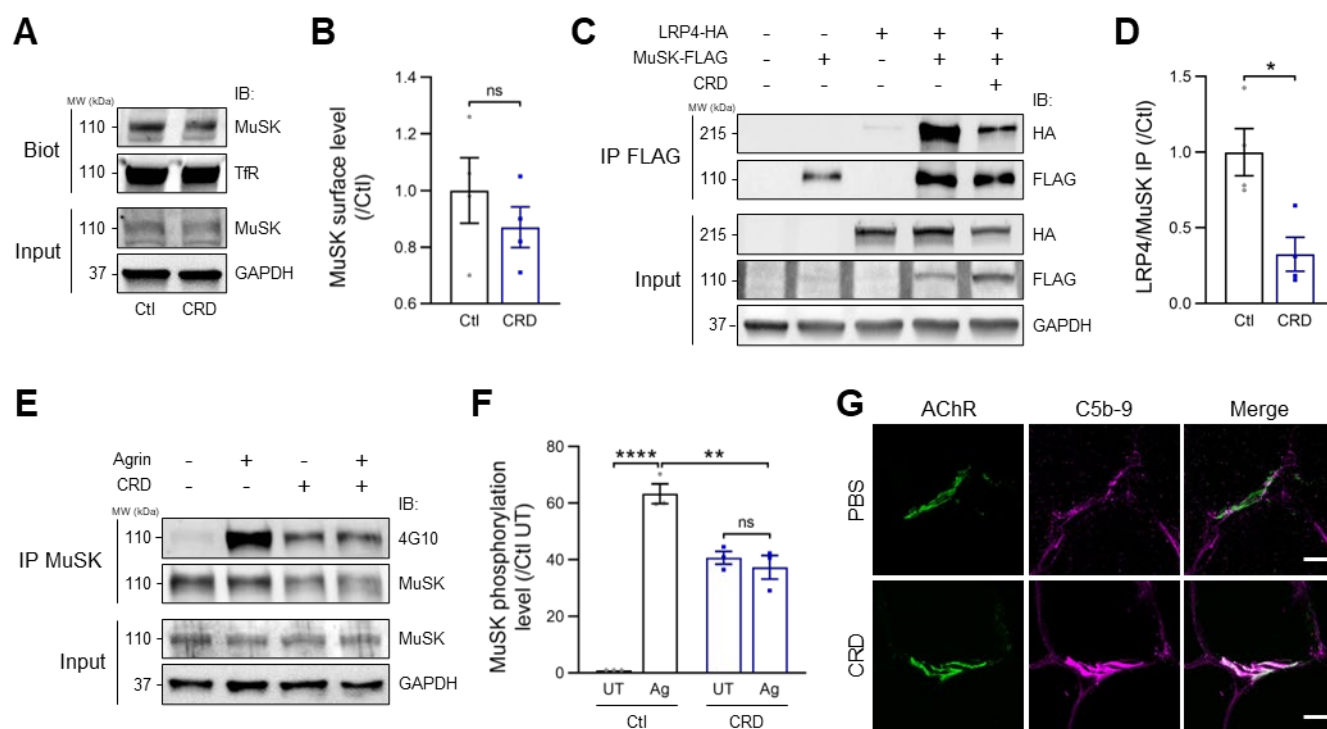
terminal and the area labeled for AChR (G) and the percentage of pre- and post-synaptic overlap corresponding to the ratio of G to C (H). The data shown are the mean  $\pm$  SEM.  $N=5$  animals for each group. At least 25 NMJ were analyzed for each muscle.  $*p<0.05$ ;  $****p<0.0001$ . Mann-Whitney  $U$ -test (B-E), two-way ANOVA with Sidak post-hoc test (F) and Student  $t$ -test (G, H).



**Figure 4. Anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies specifically inhibit Agrin-induced AChR clustering *in vitro*.** **A, D.** WT primary myotubes were treated with Agrin (Ag) together with increasing concentrations of MuSK<sup>CRD</sup>-immunized rabbit serum (CRD, %) or were left untreated (UT) for 16 hours (A). MuSKΔCRD primary myotubes were subjected to similar treatment, with the optimal immunized rabbit serum concentration (1%, D). Cells were stained with  $\alpha$ -bungarotoxin to label AChR clusters. Scale bar, 10  $\mu$ m. **B, E.** Quantitative analysis of the number of AChR clusters per mm<sup>2</sup> of myotube for A and D. The mean value is shown above each bar in B. **C.** Lysates from WT and MuSKΔCRD primary cultures were subjected to immunoprecipitation (IP) with control IgG or anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies. Whole-lysate western

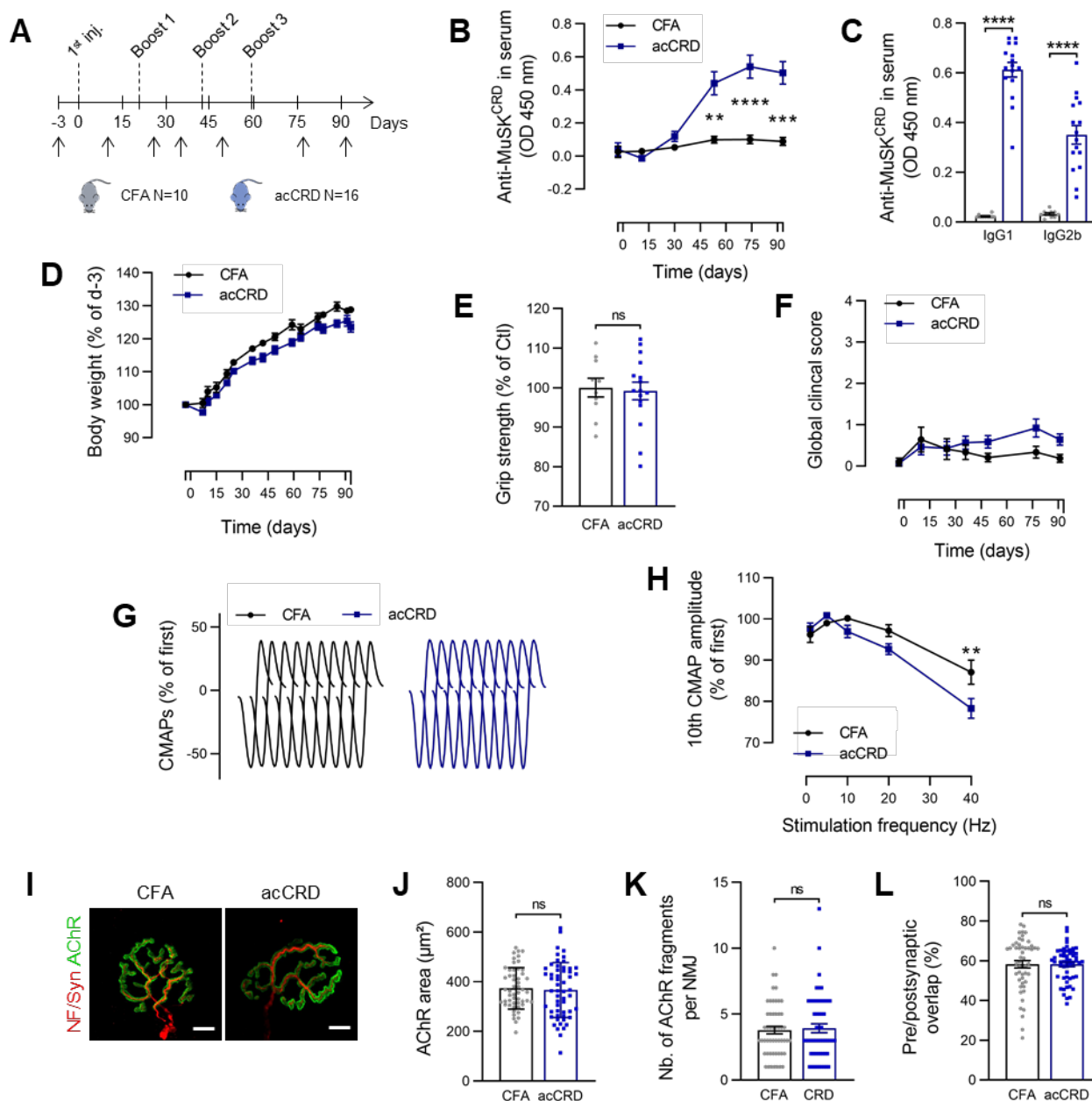


blots (Input) were performed to demonstrate the presence of the proteins of interest. The specific MuSK $\Delta$ CRD (85 kDa) band overlaps with a non-specific signal observed in all lanes. IB, immunoblot; GAPDH, loading control; MW, molecular weight. The data shown are the mean  $\pm$  SEM.  $N=3$  independent experiments, at least 50 myotubes were analyzed for each treatment in each experiment. ns, not significant; \*\*\*\* $p<0.0001$ . Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test (B), Two-way ANOVA with Tukey post-hoc test (E).



**Figure 5. Molecular mechanisms of anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies *in vitro*.** **A.** Western blot of surface-biotinylated proteins (Biot) in C2C12 myotubes with and without (Ctl) treatment with anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies (CRD) for 16 hours. Whole-lysate western blots (input) were performed to demonstrate the presence of the proteins of interest. IB, immunoblot; TfR, transferrin receptor; GAPDH, loading control; MW, molecular weight. **B.** Quantitative analysis of A showing the ratio of biotinylated MuSK to TfR normalized relative to control (Ctl) conditions. **C.** MuSK-FLAG and Lrp4-HA co-immunoprecipitation assay with FLAG Fab-Trap agarose in transfected COS7 cells. Cells were left untreated (Ctl) or were subjected to pretreatment with anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies (CRD) for 16 hours. **D.** Quantitative analysis of C, corresponding to the ratio of immunoprecipitated Lrp4-HA to MuSK-FLAG normalized against the control condition (Ctl, lane 4 in C). **E.** MuSK immunoprecipitation in C2C12 myotubes left untreated or treated with Agrin after three hours of pretreatment with anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibodies (CRD). The 4G10 anti-phosphotyrosine antibody was used to assess MuSK phosphorylation. **F.** Quantitative analysis of E corresponding to the 4G10 signal divided by the

immunoprecipitated MuSK signal normalized against control conditions (Ctl UT). UT, untreated; Ag, treated with Agrin. **G.** Representative confocal images of gastrocnemius cryosections from PBS or CRD mice after passive transfer. Sections were stained with  $\alpha$ -bungarotoxin for the detection of the acetylcholine receptor (AChR, green) and with antibodies against the complement terminal C5b-9 complex (C5b-9, magenta). Scale bar, 10  $\mu$ m. The data shown are the mean  $\pm$  SEM.  $N=4$  (B, D) and  $N=3$  (F) independent experiments. ns, not significant; \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\*\* $p<0.0001$ . Mann-Whitney  $U$ -test (B, D) or two-way ANOVA with Tukey post-hoc test (F).



**Figure 6. Animals immunized with MuSK<sup>CRD</sup> peptide do not display myasthenia-like characteristics.** **A.** EAMG active transfer protocol. Black arrows indicate the days on which clinical tests were performed. **B.** ELISA for total anti-MuSK<sup>CRD</sup> antibody dosing in control (CFA) and immunized (acCRD) animal serum (1:1000) during the protocol. **C.** ELISA for anti-MuSK<sup>CRD</sup> Ig1 and Ig2b antibody dosing in mouse serum (1:500) at the end of the immunization protocol. **D.** Body weight measurement during the protocol. Body weight was normalized to the value obtained during the pre-immunization clinical tests (day -3). **E.** Forelimb muscle

strength in the grip test in CFA and acCRD animals on day 91 of the protocol. Data are normalized relative to the CFA group. **F.** Global clinical score (GCS) for control and immunized animals during the protocol. **G.** Representative traces of CMAPs from a CFA and a acCRD animal. CMAPs were recorded in the TA muscle during a train of 10 sciatic nerve stimulations at 10 Hz. **H.** Quantitative analysis of the amplitude of the 10th CMAP after trains of sciatic nerve stimulation at 1, 5, 10, 20 and 40 Hz. Data are expressed relative to the amplitude of the first CMAP of the train. **I.** Representative confocal images of isolated TA muscle fibers from CFA or immunized acCRD mice. Muscles were stained with  $\alpha$ -bungarotoxin to label the acetylcholine receptor (AChR, green) and antibodies directed against neurofilament and synaptophysin (NF/Syn, red) to label nerve terminals. Scale bar, 10  $\mu$ m. **J-L.** Quantitative analysis of the area labeled for AChR (J), the number of AChR fragments per NMJ (K) and the percentage pre-and postsynaptic overlap (L). The data shown are the mean  $\pm$  SEM.  $N=10$  CFA &  $N=16$  acCRD for A to H.  $N=3$  for each group for J to L with at least 20 NMJ analyzed for each muscle. \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ; \*\*\*\* $p<0.0001$ . Two-way ANOVA with Sidak post-hoc test (B, D, F and H), Mann-Whitney  $U$ -test (C, E, K and L) and Student  $t$ -test (J).

## **Acknowledgments and funding**

We thank F. Rau, S. Lefebvre and J. Lainé for scientific input and technical advice. We thank Y. Rufin, J.M. Blanc and A. Barranger for technical assistance with MuSK<sup>CRD</sup> peptide purification. We also thank L. Mei and S. Bauché for the MuSK-FLAG and Lrp4-HA plasmids, respectively. We thank M. Iguerdane (Agro-Bio, La Ferté Saint-Aubin, France) for the rabbit immunization protocol and rabbit IgG purification. This work was supported by grants from the ANR (*Agence Nationale de la Recherche*, “Modcom”, grant awarded to L.S), AFM (*Association Française contre les Myopathies*) and *Association Institut de Myologie*. M. H was supported by the *Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie* (MENRT). Imaging was performed at the SCM imaging platform of *Paris City Université* (*Plateforme Imagerie du Vivant*), with support from the Ile-de-France Region research program SESAME.

## **Author contributions**

L.S., R.L.P., N.S., M.M. and J.M. conceived the study and designed the methodology. L.S. and M.H. wrote the manuscript. M.H. performed most of the experiments and analyzed all the data. S.C. and A.Y. contributed to animal experimentation and biochemistry. M.L. performed the electrophysiological recordings. J.E., N.S. and M.M. conceived and performed MuSK<sup>CRD</sup> peptide purification. C.B. and A.G. contributed to cell culture. All authors read, proof-read and accepted the manuscript.

## **Competing interests**

The authors have no competing interests to declare.

## References

1. Li L, Xiong W-C, Mei L. Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annu. Rev. Physiol.* 2018;80:159–188.
2. Rodríguez Cruz PM, Cossins J, Beeson D, Vincent A. The Neuromuscular Junction in Health and Disease: Molecular Mechanisms Governing Synaptic Formation and Homeostasis [Internet]. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2020;13. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2020.610964>. cited June 15, 2022
3. Tintignac LA, Brenner H-R, Rüegg MA. Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol. Rev.* 2015;95(3):809–852.
4. DeChiara TM et al. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 1996;85(4):501–512.
5. Weatherbee SD, Anderson KV, Niswander LA. LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 2006;133(24):4993–5000.
6. Zhang B et al. LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 2008;60(2):285–297.
7. Kim N et al. Lrp4 is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK. *Cell* 2008;135(2):334–342.
8. Zhang W, Coldefy A-S, Hubbard SR, Burden SJ. Agrin Binds to the N-terminal Region of Lrp4 Protein and Stimulates Association between Lrp4 and the First Immunoglobulin-like Domain in Muscle-specific Kinase (MuSK). *J Biol Chem* 2011;286(47):40624–40630.
9. Zhang B et al. Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *Mol Brain* 2012;5:7.
10. Strohlic L et al. Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction. *PLoS ONE* 2012;7(1):e29976.
11. Messéant J et al. Wnt proteins contribute to neuromuscular junction formation through distinct signaling pathways. *Development* 2017;144(9):1712–1724.
12. Boëx M et al. Regulation of mammalian neuromuscular junction formation and maintenance by Wnt signaling. *Current Opinion in Physiology* 2018;4:88–95.
13. Barik A, Zhang B, Sohal GS, Xiong W-C, Mei L. Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction. *Dev Neurobiol* 2014;74(8):828–838.
14. Messéant J et al. MuSK frizzled-like domain is critical for mammalian neuromuscular junction formation and maintenance. *J. Neurosci.* 2015;35(12):4926–4941.
15. Cao M, Koneczny I, Vincent A. Myasthenia Gravis With Antibodies Against Muscle Specific Kinase: An Update on Clinical Features, Pathophysiology and Treatment. *Front Mol Neurosci* 2020;13:159.
16. Evoli A et al. Myasthenia gravis with antibodies to MuSK: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2018;1412(1):82–89.

17. Rodolico C, Bonanno C, Toscano A, Vita G. MuSK-Associated Myasthenia Gravis: Clinical Features and Management [Internet]. *Frontiers in Neurology* 2020;11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2020.00660>. cited November 24, 2022
18. Gilhus NE, Verschuuren JJ. Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 2015;14(10):1023–1036.
19. Gilhus NE et al. Myasthenia gravis. *Nat Rev Dis Primers* 2019;5(1):1–19.
20. Takamori M, Nakamura T, Motomura M. Antibodies against Wnt receptor of muscle-specific tyrosine kinase in myasthenia gravis. *Journal of Neuroimmunology* 2013;254(1):183–186.
21. Otsuka K et al. Collagen Q and anti-MuSK autoantibody competitively suppress agrin/LRP4/MuSK signaling. *Scientific Reports* 2015;5:13928.
22. Huijbers MG et al. Longitudinal epitope mapping in MuSK myasthenia gravis: implications for disease severity. *Journal of Neuroimmunology* 2016;291:82–88.
23. Weiss JM et al. Novel CXCL13 transgenic mouse: inflammation drives pathogenic effect of CXCL13 in experimental myasthenia gravis. *Oncotarget* 2016;7(7):7550–7562.
24. Boëx M et al. The cell polarity protein Vangl2 in the muscle shapes the neuromuscular synapse by binding to and regulating the tyrosine kinase MuSK. *Science Signaling* 2022;15(734):eabg4982.
25. Pollari E, Prior R, Robberecht W, Van Damme P, Van Den Bosch L. In Vivo Electrophysiological Measurement of Compound Muscle Action Potential from the Forelimbs in Mouse Models of Motor Neuron Degeneration. *J Vis Exp* [published online ahead of print: June 15, 2018];(136). doi:10.3791/57741
26. Sigoillot SM, Bourgeois F, Lambergeon M, Strohlic L, Legay C. ColQ Controls Postsynaptic Differentiation at the Neuromuscular Junction. *J. Neurosci.* 2010;30(1):13–23.
27. Shen C et al. Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis. *J. Clin. Invest.* 2013;123(12):5190–5202.
28. Jones RA et al. NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure-function relationships at the neuromuscular junction. *Open Biol* 2016;6(12). doi:10.1098/rsob.160240
29. Vergoossen DLE, Augustinus R, Huijbers MG. MuSK antibodies, lessons learned from poly- and monoclonality. *J Autoimmun* 2020;112:102488.
30. Jha S et al. Myasthenia gravis induced in mice by immunization with the recombinant extracellular domain of rat muscle-specific kinase (MuSK). *J Neuroimmunol* 2006;175(1–2):107–117.
31. Ulusoy C et al. Preferential production of IgG1, IL-4 and IL-10 in MuSK-immunized mice. *Clin Immunol* 2014;151(2):155–163.
32. Huijbers MG et al. MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(51):20783–20788.



33. Budayeva HG et al. Phosphoproteome Profiling of the Receptor Tyrosine Kinase MuSK Identifies Tyrosine Phosphorylation of Rab GTPases [Internet]. *Molecular & Cellular Proteomics* 2022;21(4). doi:10.1016/j.mcpro.2022.100221
34. Takata K et al. Characterization of pathogenic monoclonal autoantibodies derived from muscle-specific kinase myasthenia gravis patients [Internet]. *JCI Insight* 2019;4(12). doi:10.1172/jci.insight.127167
35. Watty A et al. The in vitro and in vivo phosphotyrosine map of activated MuSK. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;97(9):4585–4590.
36. Herbst R, Burden SJ. The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling. *EMBO J* 2000;19(1):67–77.
37. Prömer J, Barresi C, Herbst R. From phosphorylation to phenotype – Recent key findings on kinase regulation, downstream signaling and disease surrounding the receptor tyrosine kinase MuSK. *Cellular Signalling* 2023;110584.
38. McConville J et al. Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2004;55(4):580–584.
39. Klooster R et al. Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain* 2012;135(4):1081–1101.
40. Rayner LE et al. The Solution Structure of Rabbit IgG Accounts for Its Interactions with the Fc Receptor and Complement C1q and Its Conformational Stability. *Journal of Molecular Biology* 2013;425(3):506–523.
41. Mori S et al. Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol* 2012;180(2):798–810.
42. Küçükerden M et al. MuSK induced experimental autoimmune myasthenia gravis does not require IgG1 antibody to MuSK. *J Neuroimmunol* 2016;295–296:84–92.
43. Koneczny I et al. IgG4 autoantibodies against muscle-specific kinase undergo Fab-arm exchange in myasthenia gravis patients. *J Autoimmun* 2017;77:104–115.
44. Huijbers MG et al. MuSK myasthenia gravis monoclonal antibodies: Valency dictates pathogenicity [Internet]. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation* 2019;6(3). doi:10.1212/NXI.0000000000000547
45. Cantor S et al. Preserving neuromuscular synapses in ALS by stimulating MuSK with a therapeutic agonist antibody. *eLife* 2018;7:e34375.
46. Oury J et al. Mechanism of disease and therapeutic rescue of Dok7 congenital myasthenia. *Nature* 2021;595(7867):404–408.
47. Vergoossen DLE et al. Functional monovalency amplifies the pathogenicity of anti-MuSK IgG4 in myasthenia gravis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021;118(13):e2020635118.

# DISCUSSION GENERALE

Les résultats de cette étude indiquent clairement que l'immunoréactivité contre le domaine CRD de MuSK dans un contexte de myasthénie auto-immune induite est pathogénique. L'immunisation de souris avec des anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup> produits chez le lapin est à l'origine d'un profil clinique typique de celui retrouvé chez les autres modèles murins de myasthénie anti-MuSK. Les symptômes développés comprennent notamment une perte de masse corporelle ainsi qu'une diminution de la force musculaire et de l'activité locomotrice. Nos résultats d'analyses électrophysiologiques et en immunofluorescence dévoilent de graves défauts fonctionnels et morphologiques des JNM chez les animaux immunisés. La neurotransmission apparaît altérée avec une fatigabilité neuromusculaire progressive et les plaques motrices présentent une déstructuration de l'appareil post-synaptique accompagnée d'une diminution de la qualité d'innervation. L'étude mécanistique des impacts pathologiques des anti-MuSK<sup>CRD</sup> réalisée *in vitro* et sur des tissus murins a mis en évidence une inhibition de l'activité de MuSK suite à la rupture partielle de son interaction avec Lrp4. De ceci résulte une perte de l'agrégation des RACH initialement dépendante de l'activateur principal de cette signalisation, l'Agrine. Ces défauts sont accompagnés d'un mécanisme inhabituel à la myasthénie anti-MuSK ; en effet les synapses neuromusculaires des animaux immunisés présentaient un fort enrichissement en complexe d'attaque membranaire, suggérant ainsi que la déstabilisation des JNM fait intervenir la cascade du complément dans notre modèle. Ensemble, ces données nous laissent penser que les défauts morphologiques et fonctionnels des JNM sont issus d'une multiplicité de mécanismes pathologiques plutôt que de la rupture de l'interaction Lrp4-MuSK seule. Nos résultats constituent une première preuve de l'implication du domaine CRD de MuSK dans la myasthénie auto-immune et contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques survenant dans cette pathologie. Il est critique de pouvoir préciser ces mécanismes en vue du développement de thérapies innovantes et personnalisées dans le cadre du traitement de la MG.

Ce chapitre vise à discuter des résultats obtenus dans cette étude et à proposer des hypothèses qui pourraient expliquer les disparités entre les deux modèles générés. La place du domaine CRD de MuSK dans le contexte de la synaptogenèse neuromusculaire est reprécisée et les potentiels impacts extérieurs au système neuromusculaire issus de l'immunoréactivité contre le CRD de MuSK sont évoqués.

## I. La difficulté de génération des modèles animaux de MG anti-MuSK

L'absence de symptômes et d'altérations de la JNM chez notre modèle de transfert actif injecté avec le peptide MuSK<sup>CRD</sup> va en opposition avec l'important phénotype observé dans notre modèle de transfert passif. Cette dualité soulève une problématique retrouvée dans l'étude d'un grand nombre de pathologies humaines quand il s'agit de les modéliser chez l'animal. La mise en place de modèles animaux présentant des phénotypes ou des altérations de la physiologie fidèles à ce qui est retrouvé dans les pathologies humaines est critique afin de comprendre les mécanismes sous-jacents et mettre en place les traitements adaptés. Dans le cadre de la MG anti-MuSK, de nombreuses études ont étudié l'impact et les mécanismes des anticorps dirigés contre MuSK (Cao et al., 2020; Verschuuren et al., 2018). Contrairement à l'ensemble des systèmes *in vitro*, les modèles animaux permettent l'évaluation d'un grand nombre de paramètres pathophysiologiques qui sont aussi mesurables chez l'Homme. Par exemple, la mesure des potentiels d'action musculaires composés est souvent réalisée afin de mettre en évidence une fatigabilité neuromusculaire chez la souris ; cet examen est aussi utilisé dans la mise en place du diagnostic chez l'Homme dans les pathologies neuromusculaires comme la MG. Malheureusement, la conception des protocoles aboutissant à des modèles reproduisant la pathologie humaine n'est pas toujours aisée, certains protocoles faisant appel à des moyens détournés pour faire apparaître le phénotype et d'autres ne menant simplement pas à la genèse de la maladie (Vergoossen et al., 2020). Les données de la littérature ont montré l'importance du fond génétique des animaux utilisés dans le grand nombre de modèles de MG anti-MuSK générés en utilisant le domaine extracellulaire de MuSK en tant que peptide immunogène. De manière analogue à notre modèle, l'étude comparative des symptômes de MG chez différentes lignées murines immunisées avec le domaine extracellulaire de MuSK délété de son domaine Ig3 a mis en évidence un rôle critique du fond génétique sur l'efficacité du protocole. Alors que la quasi-totalité des animaux de fond B6, A/J et bm12 est atteinte de MG après 2 boosts, aucun animal BALB/c ne présente de symptômes suite à 3 boosts (Jha et al., 2006). De même, la quantité de protéine injectée constitue un paramètre important. L'augmentation de la dose d'ectodomaine de MuSK injecté de 10 à 30 µg a permis dans une étude d'améliorer grandement l'incidence de la pathologie, passant ainsi de 14,3 à 83,3% d'animaux malades (Ulusoy et al., 2014).

L'étude que j'ai réalisée afin de mettre en évidence la pathogénicité des anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup> est un exemple adéquat afin d'illustrer ces difficultés. La mise en place du modèle de transfert passif par injection d'anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup> a mené à un ensemble de symptômes

cohérents avec ce qui est déjà décrit dans la littérature au sujet des transferts passif avec immunoglobulines humaines anti-MuSK. Ceci se traduit par l'apparition de faiblesse musculaire, de perte de poids, de décrétement des PAMC et d'une déstructuration morphologique des JNM. La génération des anti-MuSK<sup>CRD</sup> utilisés pour ce protocole a été permise par l'immunisation de lapins avec la protéine recombinante correspondant au CRD de MuSK de souris (peptide MuSK<sup>CRD</sup>). De manière intéressante, même si l'ensemble des lapins ont développé des anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup>, seulement la moitié présentait une diminution d'activité locomotrice et un ralentissement de la prise de poids avant le sacrifice. Ces observations témoignent d'une variabilité dans la capacité du peptide à faire apparaître des symptômes mais aussi de l'existence d'un rôle pathogène attendu de l'injection du peptide MuSK<sup>CRD</sup>. L'immunisation de souris avec la protéine recombinante MuSK<sup>CRD</sup> n'a cependant pas mené à l'apparition d'un phénotype analogue à celui observé chez les animaux injectés avec les anticorps. Aucun des 16 animaux injectés n'a présenté une perte de poids ou des difficultés locomotrices au cours du protocole pourtant, on retrouve dans le sérum de chaque animal, des anticorps spécifiques du CRD de MuSK. Il est important de noter que pour obtenir un signal correspondant au titre en anti-MuSK<sup>CRD</sup> suffisant chez les animaux immunisés avec la protéine recombinante, le sérum a dû être 500 fois moins dilué que pour les souris injectées avec les anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup>. Pour expliquer cette absence de symptômes de MG, il est possible de remettre en cause le protocole d'injection établi initialement, le fond génétique des animaux utilisés ou encore de suggérer que la quantité de protéine recombinante utilisée était trop faible. En effet, comme précédemment évoqué, dans la MG anti-MuSK, la quantité de protéine immunogène et le titre en anticorps pathogènes sont proportionnels à l'intensité des symptômes myasthénique (Huijbers et al., 2016). On note qu'en fonction du mécanisme d'action des anticorps pour mener à une déstructuration de la JNM, les titres d'anticorps nécessaires sont très variables cependant la corrélation entre la quantité d'anticorps dans le sérum et la gravité des symptômes reste valide.

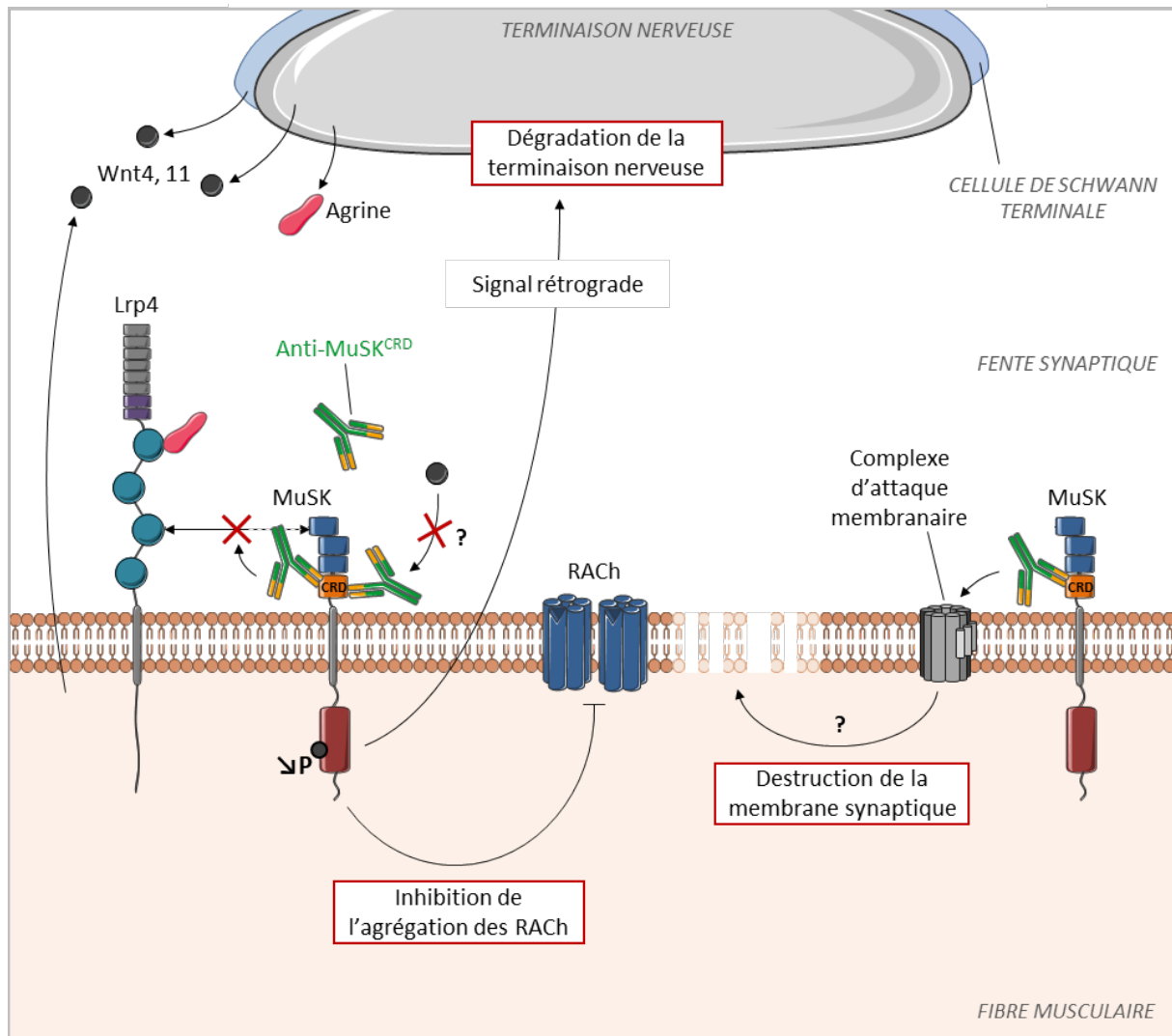
La MG anti-MuSK chez l'Homme est caractérisée par des anticorps IgG4 fonctionnellement monovalents ne recrutant pas le complément. De manière surprenante, l'immunisation active de souris ou de lapins avec des protéines recombinantes constituées du domaine extracellulaire de MuSK mène à la génération d'une grande majorité d'IgG1 qui sont, chez ces animaux, considérées comme analogues aux IgG4 humaines. Ce phénomène, dont l'origine est encore inconnue, permet une plus grande proximité entre l'humain et les modèles animaux concernant les mécanismes pathogéniques des anticorps. Cependant, interpréter et

transposer les résultats obtenus chez les animaux vers l'Homme reste difficile : les IgG1 de souris sont tout de même capables d'interagir faiblement avec les protéines du complément. Elles sont aussi bivalentes monospécifiques et incapables de mettre en place l'échange de bras Fab contrairement aux IgG4 humaines qui sont, elles, fonctionnellement monovalentes. Ces propriétés des IgG4 participent fortement à l'impact de ces immunoglobulines sur la JNM de fait, il est impossible de garantir une fidélité absolue des IgG1 murines sur le plan mécanistique (Huijbers et al., 2019). De plus, l'induction de la maladie chez les animaux lors du transfert actif est réalisée sous forme d'injections multiples de protéine recombinante émulsifiée dans du CFA. Ce mode d'administration est commun aux modèles de transfert actifs pour la MG mais cause des atteintes secondaires non négligeables, comme le gonflement des pattes postérieures, qui peuvent biaiser les résultats cliniques. Même si, chez l'Homme, les causes de l'immunoréactivité contre MuSK sont encore largement inconnues, il est certain qu'elles sont médiées par un ou des processus différents.

Comme évoqué en introduction, même si les IgG4 semblent être les principaux acteurs à l'origine de la MG anti-MuSK, plusieurs études suggèrent un rôle de la fraction IgG1-3 dans la maladie. La possible implication d'un large spectre d'isotypes accompagnés de leurs propriétés immunologiques respectives suggère que les altérations morpho-fonctionnelles de la JNM sont dues à un ensemble de mécanismes pathologiques plutôt qu'à la seule interruption de l'interaction Lrp4-MuSK causée par les IgG4. Ces inconnues retrouvées à la fois chez l'Homme et les modèles animaux représentent une vaste zone d'ombre et des études plus approfondies sont nécessaires pour (i) confirmer chez l'Homme l'implication des IgG1-3 dans la MG et (ii) établir des modèles animaux prenant en compte ces disparités d'isotypes malgré les variations des propriétés des anticorps inter-espèces. Il est possible que les impacts différentiels des divers isotypes d'anticorps participent à l'hétérogénéité des symptômes et de la réponse aux traitements retrouvées dans la MG anti-MuSK.

Notre étude suggère néanmoins l'existence de rôles pathogènes des anticorps ciblant le CRD de MuSK, ces derniers étant résumés dans un schéma fonctionnel (Figure 17). On note par ailleurs que, généralement, l'injection d'immunoglobulines menant à un phénotype constitue une preuve directe du pouvoir pathogène des anticorps contrairement à l'immunisation avec une protéine recombinante qui permet de mettre en évidence indirectement l'impact des anticorps généré par l'animal injecté (Huijbers et al., 2022). Il nous est pourtant impossible de garantir que les mécanismes d'action des anti-MuSK<sup>CRD</sup> mis en évidence dans ce manuscrit sont ceux qui se produisent chez l'Homme. L'injection d'anticorps purifiés à partir

d'échantillons de sérum de patients présentant une immunoréactivité contre le CRD de MuSK renforcera notre message. Malheureusement, la faible proportion de malades positifs uniquement pour ces anticorps rend la mise en place de ce protocole délicate, la majorité des patients avec anticorps anti-CRD présentant de plus des immunoglobulines contre d'autres domaines de MuSK (Huijbers et al., 2016; Otsuka et al., 2015; Takamori et al., 2013). L'utilisation d'anticorps polyclonaux fonctionnellement monovalents ciblant différents épitopes du CRD de MuSK à partir de l'isolement d'un pool de cellules B prélevés chez des patients constitue une alternative fastidieuse mais à considérer.



**Figure 17. Schéma fonctionnel des impacts des anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup> à la JNM.** La terminaison motoneuronale sécrète de l'Agrine neurale qui se lie à Lrp4. La liaison des anti-MuSK<sup>CRD</sup> sur MuSK inhibe l'interaction Lrp4-MuSK menant ainsi à une diminution de l'activation de MuSK par phosphorylation. De ceci découle la perte de l'agrégation des RACH dans la membrane post-synaptique. Les Wnts sont sécrétés par la terminaison du motoneurone, la cellule de Schwann terminale et la fibre musculaire. L'anticorps empêche potentiellement la liaison de Wnt4 et 11 sur MuSK, altérant ainsi leur effet d'agrégation des RACH et de différenciation pré-synaptique. La fixation des anti-MuSK<sup>CRD</sup> semble induire le recrutement du complexe d'attaque membranaire participant hypothétiquement à la destruction du compartiment post-synaptique de la JNM.



## II. Focus sur le CRD de MuSK et son rôle à la JNM

Les glycoprotéines Wnt ont récemment émergé comme facteurs diffusibles participant activement à la formation et la maintenance de la JNM. Parmi les 19 Wnts présents chez la souris, au moins Wnt4, 9a et 11 sont capables de se lier au CRD de MuSK et d'induire l'agrégation des RACH sur des cellules musculaires en culture (B. Zhang et al., 2012). L'étude des animaux mutants chez lesquels l'expression de Wnt4 ou Wnt11 est abolie a confirmé leur implication dans la synaptogenèse neuromusculaire (Messéant et al., 2017; Strochlic et al., 2012). C'est principalement la génération et l'étude du modèle murin mutant MuSK $\Delta$ CRD chez lequel le domaine CRD de MuSK est absent qui a contribué à ces observations. Au stade embryonnaire E14, le diaphragme de ces embryons présente un défaut de prepatterning musculaire, les agrégats de RACH étant moins nombreux et répartis dans une zone plus grande que chez les embryons WT. Aux stades concomitants avec l'innervation, la différenciation et le guidage pré-synaptique semblent très perturbés, ceci notamment témoigné par des branchements neuritiques qui innervent mais dépassent largement le faible nombre d'agrégats existants (Figure 14A). Les JNM des animaux MuSK $\Delta$ CRD au stade P60 apparaissent fragmentées et plus petites que chez les animaux contrôle (Messéant et al., 2015). Initialement, le projet évaluant la pathogénicité d'anticorps contre le CRD de MuSK visait en outre à contribuer aux travaux préexistants de l'équipe sur ce domaine et aux articles mentionnant des mutations dans le domaine CRD de MuSK responsables de syndromes myasthéniques congénitaux (SMC) (Mihaylova et al., 2009; Rodríguez Cruz et al., 2019).

Les défauts attendus suite à l'exposition des animaux avec les anti-MuSK<sup>CRD</sup> devaient être similaires à ceux retrouvés chez les animaux MuSK $\Delta$ CRD, la communication entre les Wnt et MuSK étant interrompue dans ces deux modèles. Cependant et comme évoqué précédemment, en plus de potentiellement altérer la signalisation Wnt-MuSK à la JNM, nos résultats montrent une inhibition de la signalisation Agrine/Lrp4/MuSK chez les animaux immunisés qui n'est pas observée chez les mutants MuSK $\Delta$ CRD. De fait, le phénotype observé chez les animaux immunisés avec les anti-MuSK<sup>CRD</sup> est plus grave que celui des animaux mutants MuSK $\Delta$ CRD. Ceci se traduit au niveau morphologique notamment, avec par exemple une forte diminution de la surface de recouvrement des RACH par la terminaison nerveuse, phénomène totalement absent au niveau des JNM des animaux MuSK $\Delta$ CRD. On note que les défauts observés chez les animaux immunisés sont apparus suite à un protocole de durée restreinte de 20 jours alors que chez les animaux MuSK $\Delta$ CRD, la communication Wnt-MuSK est altérée depuis l'embryogenèse. Un protocole d'immunisation plus long aurait donc exacerbé

l'écart phénotypique existant entre ces deux modèles, insistant ainsi sur la multiplicité des signalisations critiques pour la JNM affectées chez les animaux injectés avec les anti-MuSK<sup>CRD</sup>.

De récentes études ont contribué à prouver que les signalisations Wnt à la JNM sont multiples et s'entrecroisent. La voie Wnt canonique se retrouve fortement inhibée en absence du domaine CRD de MuSK ; cependant, l'inhibition de tous les rôles des Wnts par injection de l'antagoniste Sfrp4 est à l'origine d'un phénotype plus marqué que celui des animaux MuSK $\Delta$ CRD suggérant ainsi que les Wnts participent à la synaptogenèse neuromusculaire par une ou des voies alternatives à la signalisation canonique. En 2017, l'équipe se concentre sur l'une des protéines clés de la voie Wnt de polarité planaire cellulaire (PCP), Van Gogh-like 2 (Vangl2), qui se retrouve accumulée à la JNM murine pendant l'embryogenèse (Messéant et al., 2017). La présence de défauts morphologiques retrouvés pendant les étapes précoces de la synaptogenèse neuromusculaire au niveau du diaphragme des embryons *Vangl2*<sup>-/-</sup> confirme son implication dans la formation de la JNM. Vangl2 étant exprimé à la fois dans la terminaison du motoneurone et dans les fibres musculaires striées squelettiques, l'étude ultérieure de mutants conditionnels tissus-spécifiques a permis de mettre en évidence que seul Vangl2 musculaire joue un rôle à la JNM. En effet, les embryons délétés pour Vangl2 dans le muscle (*HSA-Vangl2*<sup>-/-</sup>) phénotypent les mutants *Vangl2*<sup>-/-</sup> et ceux pour lesquels Vangl2 est délété dans le motoneurone ne présentent quasiment pas de phénotype. Cette étude met de plus en évidence qu'à l'instar de MuSK, Vangl2 est capable d'interagir avec Wnt4 et Wnt11 mais aussi avec MuSK lui-même. Une élégante expérience d'analyse d'embryons transhétérozygotes *MuSK*<sup>+/-</sup>; *HSA-Vangl2*<sup>+/-</sup> dévoile une interaction génétique entre ces deux partenaires impliquant leur participation dans une signalisation commune. L'étude des transhétérozygotes *MuSK*<sup>+/ $\Delta$ CRD</sup>; *HSA-Vangl2*<sup>+/-</sup> montre une exacerbation des défauts retrouvés chez les embryons *MuSK*<sup>+/-</sup>; *HSA-Vangl2*<sup>+/-</sup> suggérant ainsi que cette nouvelle voie de signalisation MuSK-Vangl2 PCP est en partie médiée par le CRD de MuSK (Boëx et al., 2022). En plus de se lier à MuSK, les Wnts se lient aux récepteurs Frizzled et à leurs corécepteurs Lrp5 et 6. Une étude récente a mis en évidence l'implication de Lrp5 et 6 dans le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la JNM chez la souris adulte, ceci passant notamment par la régulation de l'expression de gènes cibles de la signalisation Wnt canonique (Gessler et al., 2022). L'accumulation de ces nouveaux acteurs à la JNM est encore à prouver cependant nous pouvons suggérer que Lrp5 et 6 pourraient agir en tant que corécepteur des Wnts avec MuSK et participer à la signalisation canonique via son CRD. En résumé, les signaux Wnt médiés par le CRD de

MuSK apparaissent diversifiés et de nouvelles voies de signalisation sous-jacentes sont encore certainement inconnues.

Au regard de l'impact pathogénique des anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup>, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'ensemble des voies Wnt médiées par le CRD de MuSK, existantes et inconnues, soient inhibées par l'immunoréactivité contre ce domaine. Les défauts observés chez les animaux immunisés résulteraient donc de la rupture d'un large éventail de signaux plutôt que de l'unique inhibition de la voie médiée par l'Agrine. Cependant, la dissection de tous ces messages de manière individuelle semble laborieuse. Même si l'altération des signalisations médiées par le CRD de MuSK par les anti-MuSK<sup>CRD</sup> est facilement proposable, il serait difficile (i) de montrer à quelle hauteur elles participent dans le phénotype développé par les souris, (ii) d'expliquer sur le plan mécanistique comment chacune d'entre elles est affectée individuellement et (iii) de mettre au point des protocoles expérimentaux qui permettraient l'étude détaillée et individuelle de ces messages. Il est tout de même critique de souligner le caractère secondaire des signalisations Wnt à la JNM par rapport à la signalisation Agrine. Cette dernière permet *in vitro* d'initier l'agrégation d'un nombre bien plus important d'agrégats de RACH que les Wnt sur des myotubes en culture (Barik, Zhang, et al., 2014; Henriquez et al., 2008; B. Zhang et al., 2012). Cette force d'induction des RACH supérieure de l'Agrine est traduite *in vivo* par une absence de JNM chez les animaux mutants pour les partenaires intervenant dans la signalisation Agrine/Lrp4/MuSK/DOK7 comme précisé en introduction. Comparativement, les animaux chez lesquels les signalisations Wnt à la JNM sont génétiquement affectées présentent des altérations synaptiques compatibles avec la vie comme en attestent les mutants chez lesquels la sécrétion musculaire ou motoneuronale des Wnt est inhibée (*Pax3<sup>Cre</sup>;Wls<sup>fl/fl</sup>*, *HSA-Wls<sup>-/-</sup>* et *HB9-Wls<sup>-/-</sup>*; (Remédio et al., 2016; Shen et al., 2018)), le domaine CRD de MuSK est délété (Messéant et al., 2015), l'expression de Wnt4 ou Wnt11 est abolie (*Wnt4<sup>-/-</sup>* et *Wnt11<sup>-/-</sup>*, (Messéant et al., 2017; Strochlic et al., 2012)) ou encore l'expression musculaire de Vangl2 est abolie (*HSA-Vangl2<sup>-/-</sup>*, (Boëx et al., 2022)).

Même si les travaux visant à étudier le rôle du CRD de MuSK à la JNM sont de plus en plus nombreux, son rôle et son degré d'implication dans la synaptogenèse neuromusculaire sont encore discutés. Comme évoqué en introduction, l'étude des lignées de souris chez lesquelles le CRD est délété par recombinaison homologe et par Crispr Cas9 a révélé de grandes différences phénotypiques à tel point que les animaux de l'équipe de SJ Burden ne semblaient pas présenter de défauts de formation de la JNM (Figure 14, (Remédio et al., 2016)). En suivant les hypothèses selon lesquelles le CRD de MuSK n'est pas essentiel dans son activité et

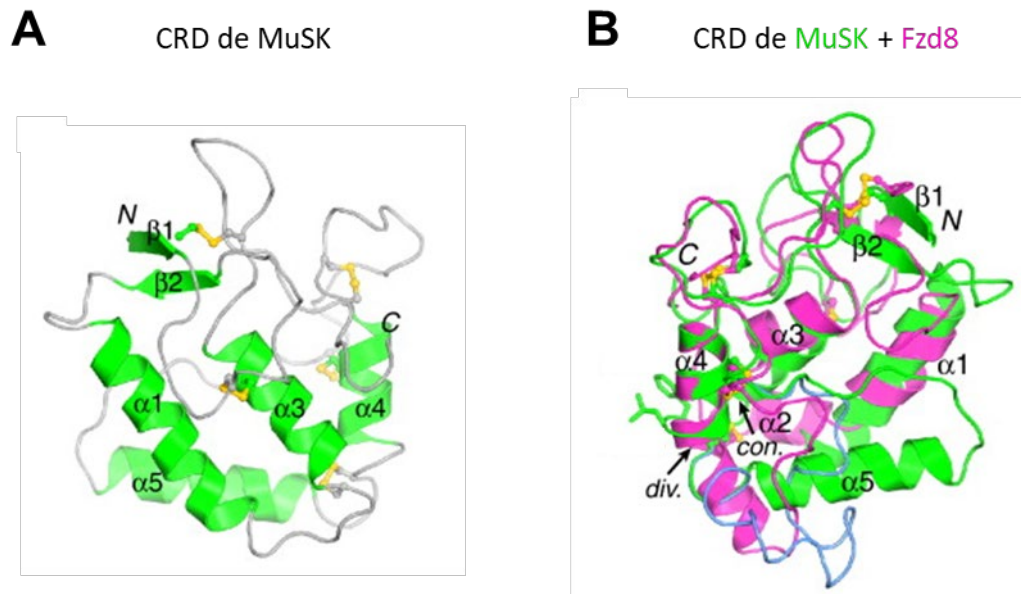
l'immunoréactivité contre ce domaine n'est pas délétère, le même groupe a entrepris l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le CRD de MuSK dans le but de rétablir la connectivité neuromusculaire dans plusieurs modèles. De fait, l'administration post-symptomatique d'un anticorps monoclonal ciblant le CRD de MuSK à des animaux modèles de sclérose latérale amyotrophique (ALS) *SOD1-G93A* a permis de diminuer la dénervation et de préserver la qualité de neurotransmission de la JNM (Cantor et al., 2018). De même, l'injection d'un anticorps aux propriétés similaires a permis d'augmenter fortement la survie d'animaux présentant une mutation dans *DOK7* à l'origine d'un syndrome myasthénique congénital ; ceci étant corrélé avec une augmentation de l'activité de MuSK due au caractère agoniste et non bloquant de l'anticorps utilisé (Oury et al., 2021). Inversement à ces études, on note que l'injection d'anticorps monoclonaux ciblant par exemple le domaine Ig1 de MuSK sont à l'origine de graves symptômes de MG (Vergoossen et al., 2021). Le rôle d'un anticorps, qu'il soit bénéfique ou délétère sur l'activité de MuSK, varie donc largement en fonction de la clonalité, de l'isotype, de sa valence fonctionnelle, des épitopes ciblés et du titre. La différence observée entre le rôle agoniste de l'anticorps monoclonal utilisé pour restaurer le phénotype dû à la perte de fonction de *DOK7* et l'impact pathogénique des anti-MuSK<sup>CRD</sup> polyclonaux menant à la MG mis en évidence dans notre étude réside donc principalement dans des variations de plusieurs paramètres évoqués ci-dessus alors que le domaine ciblé est le même dans ces deux études.

### III. Les potentielles cibles collatérales des anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup>

Les signalisations Wnt sont critiques pour un grand nombre de phénomènes biologiques à la fois pendant le développement mais aussi chez les être-vivants adultes. Ainsi, de nombreuses découvertes ont été réalisées au sujet de l'implication des voies Wnt dans la polarité, la prolifération et la migration cellulaire, la mise en place des axes morphologiques du corps, l'organogenèse et la synaptogenèse centrale et périphérique (Clevers & Nusse, 2012; Dickins & Salinas, 2013; Mittermeier & Virshup, 2022; Wiese et al., 2018). Dans la physiologie des animaux matures, les Wnts ont été montrés comme participants au fonctionnement des synapses dans le système nerveux central (SNC). Ils jouent ainsi un rôle dans la plasticité synaptique des circuits sensoriels dans l'hippocampe mais aussi dans la maintenance des synapses du cerveau mature, 70 à 90% d'entre elles étant conservées pendant de longues périodes de la vie (Dickins & Salinas, 2013). L'ensemble des signaux Wnt sont médiés par la liaison de ces morphogènes sur leurs récepteurs. Les récepteurs conventionnels des Wnts sont

les Frizzled (Fzd), des protéines à 7 domaines transmembranaires présentes sous 10 isoformes différentes chez l'Homme et la souris (Fzd1-10). Etant exprimés dans la majorité des tissus des mammifères, c'est notamment l'étude de mutations dans les gènes codant ces récepteurs qui ont permis de dévoiler la myriade de processus dans lesquels les Wnts interviennent (Huang & Klein, 2004; Wang et al., 2016). Les récepteurs Fzd sont accompagnés des co-récepteurs Lrp5 et 6 afin de transduire le signal notamment pour l'initiation de la voie Wnt-canonique. A cette liste s'ajoutent les récepteurs ROR1 et 2 (*Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 et 2*), PTK7 (*Protein tyrosine kinase 7*), RYK (*Receptor-like tyrosine kinase*) et MuSK (Niehrs, 2012).

Les récepteurs Fzd et les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) participants aux signalisations Wnt présentent une région commune permettant le recrutement des Wnts : un domaine *Frizzled-like* riche en cystéine (Fz-CRD) caractérisé par la très haute conservation de 10 résidus cystéine impliqués dans 5 ponts disulfure distincts (Xu & Nusse, 1998). Le CRD de MuSK contient en effet ces cystéines malgré une faible homologie d'environ 20% avec les CRD des récepteurs Fzd. La cristallisation du CRD de MuSK chez le rat a permis cependant de mettre en évidence une structure tridimensionnelle analogue en de nombreux points à celle de Fzd8 chez la souris. Quelques différences persistent : le CRD de MuSK présente une hélice  $\alpha 5$  due à l'insertion de 11 résidus dans la partie C-terminale qui n'est pas retrouvée dans Fzd8. De plus, alors que le CRD de Fzd8 contient les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , celui de MuSK ne comporte qu'une seule hélice  $\alpha 1$  plus étendue (Stiegler et al., 2009). Chez les mammifères, les RTK qui sont connus pour lier les Wnts présentent tous un domaine Kringle à proximité de leur Fz-CRD sauf MuSK (Guarino et al., 2022). Ces variations en composition et en structure n'empêchent cependant pas l'interaction des Wnts sur MuSK ; nous pouvons donc supposer que des changements de caractéristiques du domaine CRD des Fzd ou des RTK participent à la sélection des ligands Wnt capables de s'y fixer.



**Figure 18. Représentations de la structure cristallographique du CRD de MuSK et de Frizzled 8. (A)** Représentation en rubans du CRD de MuSK. Les hélices alpha sont numérotées  $\alpha 1$  à  $5$ , les feuillets  $\beta 1$  et  $\beta 2$ , les domaines N et C-terminaux par les lettres N et C respectivement. Les chaînes latérales des cystéines engagées dans des ponts disulfure sont représentées en boules et bâtonnets et les atomes de soufre sont colorés en jaune. **(B)** Superposition des représentations en rubans du CRD de MuSK (vert) et de Frizzled 8 (Fzd8 - magenta). Le CRD de MuSK est représenté avec une rotation de  $180^\circ$  par rapport à la représentation en (A). Les flèches indiquent des régions de convergence (con.) et de divergence (div.) au sein des domaines C-terminaux des deux peptides (Stiegler et al., 2009).

La rupture des processus à l'origine des signaux Wnt mène à des altérations variées dans de nombreux systèmes du corps humain. Par exemple, des mutations dans le gène codant Wnt10b sont à l'origine d'oligodontie, matérialisée par l'absence de certaines dents, ou encore de malformations des pieds et des mains (Ugur & Tolun, 2008; Yu et al., 2016). De même, la diminution d'expression du récepteur Fzd9 semble impliquée dans l'apparition du syndrome de Williams responsable de défauts cognitifs et linguistiques (Chailangkarn et al., 2016). De manière intéressante, les souris délétées pour Wnt4 et Wnt11 présentent, elles, des défauts de développement du système rénal (Moon et al., 2004; Perantoni, 2003). Ces deux Wnts sont aussi capables de se lier à MuSK au niveau de la JNM, permettant ainsi de supposer une proximité structurelle et séquentielle entre les domaines CRD de MuSK et ceux des Fzd liant Wnt4 et 11. A la vue d'une potentielle similitude de ces domaines et du caractère polyclonal de l'anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup> utilisé dans notre modèle de transfert passif, nous pouvons envisager un impact de cet anticorps sur d'autres signalisation Wnt que celles ayant lieux via le CRD de MuSK à la JNM. Nos résultats suggèrent que l'anticorps se lie de manière spécifique au CRD de MuSK et à aucun autre de ses domaines cependant, nous ne pouvons pas exclure qu'il soit capable de cibler les CRD des autres récepteurs Fzd. Ainsi, l'étude de l'intégrité du système rénal des souris injectées avec l'anti-MuSK<sup>CRD</sup> aurait pu mettre en évidence des altérations due à une *cross*-réactivité avec le CRD d'autres Frizzled. Nous pouvons extrapoler cette hypothèse pour la grande variété des processus dans lesquels les signaux Wnt sont impliqués. Afin de tester cette hypothèse, l'anti-MuSK<sup>CRD</sup> pourrait être utilisé en immunoprécipitation sur des lysats protéiques individuels provenant d'un large éventail de tissus au sein desquels les Wnts ont des rôles connus. Les protéines immunoprécipitées pourraient ensuite être identifiées par spectrométrie de masse. Ces expériences seraient accompagnées par l'étude du potentiel impact fonctionnel de l'anticorps sur différents organes en utilisant les protocoles adaptés aux tissus correspondants.

Même si son rôle dans le SNC est peu étudié comparativement à sa position centrale dans la synaptogenèse neuromusculaire, MuSK est accumulé dans différentes aires du cerveau comme le cortex, l'hippocampe et le cervelet (Garcia-Osta et al., 2006; Herbst, 2020). La rupture de l'interaction des Wnts avec MuSK au niveau du CRD serait à l'origine, en plus des défauts observés à la JNM, d'altérations comportementales comme en témoignent les actes de mutilations des animaux MuSK $\Delta$ CRD (communication personnelle, J. Messéant). Une étude comportementale plus approfondie est à considérer chez les animaux immunisés avec les anti-MuSK<sup>CRD</sup> afin de mettre en évidence un potentiel impact comportemental, en supposant bien

entendu que ces anticorps sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique afin d'accéder aux circuits neuronaux centraux.

Nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle les anticorps anti-MuSK<sup>CRD</sup>, en ciblant les CRD d'autres frizzled ou en affectant les signalisations Wnt-MuSK dans le SNC, pourraient impacter un ensemble d'organes et de systèmes biologiques plutôt que d'avoir un impact sur la connectivité neuromusculaire uniquement. L'ensemble de ces informations et expériences pourraient mettre en lumière l'existence de troubles encore inconnus au niveau d'autres systèmes que le muscle chez les patients atteints de MG avec anticorps contre le CRD de MuSK. Ces observations ont pu rester encore occultées jusqu'à aujourd'hui suite à (i) la très faible proportion de patients présentant cette sous-catégorie d'anticorps et (ii) la prédominance du phénotype neuromusculaire menant à une concentration des soins sur le rétablissement de la motricité. On note par ailleurs que certains indices sont déjà existants au regard de la modulation des messages Wnt par des anticorps. L'utilisation d'anticorps monoclonaux contre Wnt1 et 2 a permis d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses, positionnant ainsi ces Wnts comme cibles thérapeutiques d'intérêt pour le traitement de certains cancers (He et al., 2004; You et al., 2004). De même, des anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de Lrp6 sont capables d'inhiber ou de potentialiser l'expression de gènes Wnt-cibles induits par un traitement avec Wnt3a dans des cellules cancéreuses (Gong et al., 2010). En somme, la rupture des messages cellulaires médiés par les Wnts représente une menace pour un grand nombre de processus physiologiques. L'atteinte de ces signalisations, à la JNM et dans d'autres organes, est à mesurer pour pouvoir traiter dans la globalité les symptômes connus et non explorés dont souffrent ces patients. Il faut néanmoins rappeler que dans la MG anti-MuSK, le mécanisme pathologique principal est l'inhibition de la voie Agrine/MuSK par interruption de l'interaction entre Lrp4 et MuSK et qu'il est encore aujourd'hui difficile de traiter efficacement ces patients afin de restaurer cette signalisation. L'étude extensive des impacts des anticorps en fonction de leurs propriétés intrinsèques est indispensable afin de mieux orienter et personnaliser les soins.





# BIBLIOGRAPHIE

**A**

- Akaaboune, M., Grady, R. M., Turney, S., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2002). Neurotransmitter receptor dynamics studied in vivo by reversible photo-unbinding of fluorescent ligands. *Neuron*, *34*(6), 865-876. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00739-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00739-0)
- Alabi, A. A., & Tsien, R. W. (2012). Synaptic Vesicle Pools and Dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(8), a013680. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013680>
- Alahgholi-Hajibehzad, M., Yilmaz, V., Gülsen-Parman, Y., Aysal, F., Oflazer, P., Deymeer, F., & Saruhan-Direskeneli, G. (2013). Association of HLA-DRB1\*14, -DRB1\*16 and -DQB1\*05 with MuSK-myasthenia gravis in patients from Turkey. *Human Immunology*, *74*(12), 1633-1635. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.08.271>
- AL-Bulushi, A., Al Salmi, I., Al Rahbi, F., Farsi, A. A., & Hannawi, S. (2021). The role of thymectomy in myasthenia gravis: A programmatic approach to thymectomy and perioperative management of myasthenia gravis. *Asian Journal of Surgery*, *44*(6), 819-828. <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2020.12.013>
- Andruşca, A. (2022, août 15). *Corticonuclear and corticospinal tracts*. Kenhub. <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/corticobulbar-corticospinal-pathways>
- Arber, S., Burden, S. J., & Harris, A. J. (2002). Patterning of skeletal muscle. *Current Opinion in Neurobiology*, *12*(1), 100-103. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00296-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00296-9)
- Avilés, E. C., Pinto, C., Hanna, P., Ojeda, J., Pérez, V., De Ferrari, G. V., Zamorano, P., Albistur, M., Sandoval, D., & Henríquez, J. P. (2014). Frizzled-9 impairs acetylcholine receptor clustering in skeletal muscle cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00110>

**B**

- Barik, A., Li, L., Sathyamurthy, A., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2016). Schwann Cells in Neuromuscular Junction Formation and Maintenance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *36*(38), 9770-9781. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0174-16.2016>
- Barik, A., Lu, Y., Sathyamurthy, A., Bowman, A., Shen, C., Li, L., Xiong, W., & Mei, L. (2014). LRP4 is critical for neuromuscular junction maintenance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(42), 13892-13905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1733-14.2014>
- Barik, A., Zhang, B., Sohal, G. S., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2014). Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction. *Developmental Neurobiology*, *74*(8), 828-838. <https://doi.org/10.1002/dneu.22190>
- Bartoccioni, E., Scuderi, F., Augugliaro, A., Ranieri, S. C., Sauchelli, D., Alboino, P., Marino, M., & Evoli, A. (2009). HLA class II allele analysis in MuSK-positive myasthenia gravis suggests a role for DQ5. *Neurology*, *72*(2), 195-197. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000339103.08830.86>
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., & Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of  $\beta$ -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, *382*(6592), Art. 6592. <https://doi.org/10.1038/382638a0>

- Bergamin, E., Hallock, P. T., Burden, S. J., & Hubbard, S. R. (2010). The Cytoplasmic Adapter-Protein Dok7 Activates the Receptor Tyrosine Kinase MuSK via Dimerization. *Molecular cell*, *39*(1), 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.007>
- Binks, S., Vincent, A., & Palace, J. (2016). Myasthenia gravis: A clinical-immunological update. *Journal of Neurology*, *263*(4), 826-834. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7963-5>
- Birks, R., Huxley, H. E., & Katz, B. (1960). The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of Physiology*, *150*(1), 134-144.6.
- Bishop, D. L., Misgeld, T., Walsh, M. K., Gan, W.-B., & Lichtman, J. W. (2004). Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron*, *44*(4), 651-661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.026>
- Boehm, I., Alhindi, A., Leite, A. S., Logie, C., Gibbs, A., Murray, O., Farrukh, R., Pirie, R., Proudfoot, C., Clutton, R., Wishart, T. M., Jones, R. A., & Gillingwater, T. H. (2020). Comparative anatomy of the mammalian neuromuscular junction. *Journal of Anatomy*, *237*(5), 827-836. <https://doi.org/10.1111/joa.13260>
- Boëx, M., Cottin, S., Halliez, M., Bauché, S., Buon, C., Sans, N., Montcouquiol, M., Molgó, J., Amar, M., Ferry, A., Lemaitre, M., Rouche, A., Langui, D., Baskaran, A., Fontaine, B., Messéant, J., & Strohlic, L. (2022). The cell polarity protein Vangl2 in the muscle shapes the neuromuscular synapse by binding to and regulating the tyrosine kinase MuSK. *Science Signaling*, *15*(734), eabg4982. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abg4982>
- Boëx, M., Messéant, J., Bauché, S., Fontaine, B., Legay, C., & Strohlic, L. (2018). Regulation of mammalian neuromuscular junction formation and maintenance by Wnt signaling. *Current Opinion in Physiology*, *4*, 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.07.002>
- Bonanomi, D., & Pfaff, S. L. (2010). Motor Axon Pathfinding. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(3), a001735. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001735>
- Borges, L. S., Yechikhov, S., Lee, Y. I., Rudell, J. B., Friese, M. B., Burden, S. J., & Ferns, M. J. (2008). Identification of a motif in the acetylcholine receptor beta subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(45), 11468-11476. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2508-08.2008>
- Bosch-Bouju, C., Hyland, B., & Parr-Brownlie, L. (2013). Motor thalamus integration of cortical, cerebellar and basal ganglia information: Implications for normal and parkinsonian conditions. *Frontiers in Computational Neuroscience*, *7*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncom.2013.00163>
- Bowen, D. C., Park, J. S., Bodine, S., Stark, J. L., Valenzuela, D. M., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., Lindsay, R. M., Glass, D. J., & DiStefano, P. S. (1998). Localization and regulation of MuSK at the neuromuscular junction. *Developmental Biology*, *199*(2), 309-319. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8936>
- Bruneau, E. G., & Akaaboune, M. (2006). The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo. *Development (Cambridge, England)*, *133*(22), 4485-4493. <https://doi.org/10.1242/dev.02619>
- Bruneau, E., Sutter, D., Hume, R. I., & Akaaboune, M. (2005). Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(43), 9949-9959. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3169-05.2005>

Burgess, R. W., Nguyen, Q. T., Son, Y. J., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. (1999). Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle-derived agrin : Their roles at the neuromuscular junction. *Neuron*, 23(1), 33-44. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80751-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80751-5)

Buyan, A., Kalli, A. C., & Sansom, M. S. P. (2016). Multiscale Simulations Suggest a Mechanism for the Association of the Dok7 PH Domain with PIP-Containing Membranes. *PLoS Computational Biology*, 12(7), e1005028. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005028>

## C

Cantor, S., Zhang, W., Delestrée, N., Remédio, L., Mentis, G. Z., & Burden, S. J. (2018). Preserving neuromuscular synapses in ALS by stimulating MuSK with a therapeutic agonist antibody. *eLife*, 7, e34375. <https://doi.org/10.7554/eLife.34375>

Cao, M., Koneczny, I., & Vincent, A. (2020). Myasthenia Gravis With Antibodies Against Muscle Specific Kinase : An Update on Clinical Features, Pathophysiology and Treatment. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 159. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00159>

Carr, A. S., Cardwell, C. R., McCarron, P. O., & McConville, J. (2010). A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. *BMC Neurology*, 10(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-10-46>

Cetin, H., Beeson, D., Vincent, A., & Webster, R. (2020). The Structure, Function, and Physiology of the Fetal and Adult Acetylcholine Receptor in Muscle. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.581097>

Chailangkarn, T., Trujillo, C. A., Freitas, B. C., Hrvovj-Mihic, B., Herai, R. H., Yu, D. X., Brown, T. T., Marchetto, M. C., Bardy, C., McHenry, L., Stefanacci, L., Järvinen, A., Searcy, Y. M., DeWitt, M., Wong, W., Lai, P., Ard, M. C., Hanson, K. L., Romero, S., ... Muotri, A. R. (2016). A human neurodevelopmental model for Williams syndrome. *Nature*, 536(7616), 338-343. <https://doi.org/10.1038/nature19067>

Chen, A., Bai, L., Zhong, K., Shu, X., Wang, A., Xiao, Y., Zhang, K., & Shen, C. (2020). APC2CDH1 negatively regulates agrin signaling by promoting the ubiquitination and proteolytic degradation of DOK7. *The FASEB Journal*, 34(9), 12009-12023. <https://doi.org/10.1096/fj.202000485R>

Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease. *Cell*, 149(6), 1192-1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>

Clifford, K. M., Hobson-Webb, L. D., Benatar, M., Burns, T. M., Barnett, C., Silvestri, N. J., Howard, J. F., Visser, A., Crum, B. A., Nowak, R., Beekman, R., Kumar, A., Ruzhansky, K., Chen, I.-H. A., Pulley, M. T., Laboy, S. M., Fellman, M. A., Howard, D. B., Kolb, N. A., ... Hehir, M. K. (2019). Thymectomy may not be associated with clinical improvement in MuSK myasthenia gravis. *Muscle & Nerve*, 59(4), 404-410. <https://doi.org/10.1002/mus.26404>

Cole, R. N., Ghazanfari, N., Ngo, S. T., Gervásio, O. L., Reddel, S. W., & Phillips, W. D. (2010). Patient autoantibodies deplete postsynaptic muscle-specific kinase leading to disassembly of the ACh receptor scaffold and myasthenia gravis in mice. *The Journal of Physiology*, 588(17), 3217-3229. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.190298>

Cole, R. N., Reddel, S. W., Gervásio, O. L., & Phillips, W. D. (2008). Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction. *Annals of Neurology*, 63(6), 782-789. <https://doi.org/10.1002/ana.21371>

Cornish, T., Chi, J., Johnson, S., Lu, Y., & Campanelli, J. T. (1999). Globular domains of agrin are functional units that collaborate to induce acetylcholine receptor clustering. *Journal of Cell Science*, *112*(8), 1213-1223. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.8.1213>

Cossu, G., & Biressi, S. (2005). Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors : Possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *16*(4), 623-631. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.07.003>

## D

Darabid, H., Arbour, D., & Robitaille, R. (2013). Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(4), 1297-1313. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2935-12.2013>

Darabid, H., Perez-Gonzalez, A. P., & Robitaille, R. (2014). Neuromuscular synaptogenesis : Coordinating partners with multiple functions. *Nature Reviews. Neuroscience*, *15*(11), 703-718.

De Robertis, E. D. P., & Bennett, H. S. (1955). SOME FEATURES OF THE SUBMICROSCOPIC MORPHOLOGY OF SYNAPSES IN FROG AND EARTHWORM. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *1*(1), 47-58. <https://doi.org/10.1083/jcb.1.1.47>

DeChiara, T. M., Bowen, D. C., Valenzuela, D. M., Simmons, M. V., Poueymirou, W. T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D. L., Rojas, E., Park, J. S., Smith, C., DiStefano, P. S., Glass, D. J., Burden, S. J., & Yancopoulos, G. D. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell*, *85*(4), 501-512.

Díaz-Manera, J., Martínez-Hernández, E., Querol, L., Klooster, R., Rojas-García, R., Suárez-Calvet, X., Muñoz-Blanco, J. L., Mazia, C., Straasheijm, K. R., Gallardo, E., Juárez, C., Verschuuren, J. J., & Illa, I. (2012). Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia. *Neurology*, *78*(3), 189-193. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182407982>

Dickins, E. M., & Salinas, P. C. (2013). Wnts in action : From synapse formation to synaptic maintenance. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 162. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00162>

## E

Eguchi, T., Tezuka, T., Miyoshi, S., & Yamanashi, Y. (2016). Postnatal knockdown of dok-7 gene expression in mice causes structural defects in neuromuscular synapses and myasthenic pathology. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, *21*(6), 670-676. <https://doi.org/10.1111/gtc.12370>

El-Salem, K., Yassin, A., Al-Hayk, K., Yahya, S., Al-Shorafat, D., & Dahbour, S. S. (2014). Treatment of MuSK-Associated Myasthenia Gravis. *Current Treatment Options in Neurology*, *16*(4), 283. <https://doi.org/10.1007/s11940-014-0283-8>

Evoli, A., Alboini, P. E., Damato, V., Iorio, R., Provenzano, C., Bartoccioni, E., & Marino, M. (2018). Myasthenia gravis with antibodies to MuSK : An update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1412*(1), 82-89. <https://doi.org/10.1111/nyas.13518>

Evoli, A., & Padua, L. (2013). Diagnosis and therapy of myasthenia gravis with antibodies to muscle-specific kinase. *Autoimmunity Reviews*, *12*(9), 931-935. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.03.004>

Evoli, A., Tonali, P. A., Padua, L., Monaco, M. L., Scuderi, F., Batocchi, A. P., Marino, M., & Bartoccioni, E. (2003). Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain: A Journal of Neurology*, *126*(Pt 10), 2304-2311. <https://doi.org/10.1093/brain/awg223>

**F**

- Favero, M., Buffelli, M., Cangiano, A., & Busetto, G. (2010). The timing of impulse activity shapes the process of synaptic competition at the neuromuscular junction. *Neuroscience*, *167*(2), 343-353. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.055>
- Favero, M., Busetto, G., & Cangiano, A. (2012). Spike timing plays a key role in synapse elimination at the neuromuscular junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(25), E1667-1675. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201147109>
- Favero, M., Cangiano, A., & Busetto, G. (2015). Lesson from the neuromuscular junction: Role of pattern and timing of nerve activity in synaptic development. *Neural Regeneration Research*, *10*(5), 686-688. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.156944>
- Fejtova, A., & Gundelfinger, E. D. (2006). Molecular organization and assembly of the presynaptic active zone of neurotransmitter release. *Results and Problems in Cell Differentiation*, *43*, 49-68. [https://doi.org/10.1007/400\\_012](https://doi.org/10.1007/400_012)
- Feng, Z., Koirala, S., & Ko, C.-P. (2005). Synapse-glia interactions at the vertebrate neuromuscular junction. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, *11*(5), 503-513. <https://doi.org/10.1177/1073858405277409>
- Ferns, M., Hoch, W., Campanelli, J. T., Rupp, F., Hall, Z. W., & Scheller, R. H. (1992). RNA splicing regulates agrin-mediated acetylcholine receptor clustering activity on cultured myotubes. *Neuron*, *8*(6), 1079-1086. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90129-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90129-2)
- Ferns, M. J., Campanelli, J. T., Hoch, W., Scheller, R. H., & Hall, Z. (1993). The ability of agrin to cluster AChRs depends on alternative splicing and on cell surface proteoglycans. *Neuron*, *11*(3), 491-502. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90153-I](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90153-I)
- Fichtner, M. L., Vieni, C., Redler, R. L., Kolich, L., Jiang, R., Takata, K., Stathopoulos, P., Suarez, P. A., Nowak, R. J., Burden, S. J., Ekiert, D. C., & O'Connor, K. C. (2020). Affinity maturation is required for pathogenic monovalent IgG4 autoantibody development in myasthenia gravis. *Journal of Experimental Medicine*, *217*(12), e20200513. <https://doi.org/10.1084/jem.20200513>
- Fontana, X., Hristova, M., Da Costa, C., Patodia, S., Thei, L., Makwana, M., Spencer-Dene, B., Latouche, M., Mirsky, R., Jessen, K. R., Klein, R., Raivich, G., & Behrens, A. (2012). C-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. *The Journal of Cell Biology*, *198*(1), 127-141. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205025>
- Fox, M. A., Sanes, J. R., Borza, D.-B., Eswarakumar, V. P., Fässler, R., Hudson, B. G., John, S. W. M., Ninomiya, Y., Pedchenko, V., Pfaff, S. L., Rheault, M. N., Sado, Y., Segal, Y., Werle, M. J., & Umemori, H. (2007). Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell*, *129*(1), 179-193. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.035>

**G**

- Garcia-Osta, A., Tsokas, P., Pollonini, G., Landau, E. M., Blitzer, R., & Alberini, C. M. (2006). MuSK expressed in the brain mediates cholinergic responses, synaptic plasticity, and memory formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(30), 7919-7932. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1674-06.2006>
- Garner, C. C., Kindler, S., & Gundelfinger, E. D. (2000). Molecular determinants of presynaptic active zones. *Current Opinion in Neurobiology*, *10*(3), 321-327. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00093-3)

- Gautam, M., Noakes, P. G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G. C., Sanes, J. R., & Merlie, J. P. (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*, *377*(6546), 232-236. <https://doi.org/10.1038/377232a0>
- Gemza, A., Barresi, C., Proemer, J., Hatami, J., Lazaridis, M., & Herbst, R. (2022). Internalization of Muscle-Specific Kinase Is Increased by Agrin and Independent of Kinase-Activity, Lrp4 and Dynamin. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*, 780659. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.780659>
- Gesemann, M., Denzer, A. J., & Ruegg, M. A. (1995). Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *Journal of Cell Biology*, *128*(4), 625-636. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.4.625>
- Gessler, L., Kurtek, C., Merholz, M., Jian, Y., & Hashemolhosseini, S. (2022). In Adult Skeletal Muscles, the Co-Receptors of Canonical Wnt Signaling, Lrp5 and Lrp6, Determine the Distribution and Size of Fiber Types, and Structure and Function of Neuromuscular Junctions. *Cells*, *11*(24), Art. 24. <https://doi.org/10.3390/cells11243968>
- Ghazanfari, N., Morsch, M., Reddel, S. W., Liang, S. X., & Phillips, W. D. (2014). Muscle-specific kinase (MuSK) autoantibodies suppress the MuSK pathway and ACh receptor retention at the mouse neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, *592*(13), 2881-2897. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.270207>
- Ghazanfari, N., Morsch, M., Tse, N., Reddel, S. W., & Phillips, W. D. (2014). Effects of the  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist, albuterol, in a mouse model of anti-MuSK myasthenia gravis. *PloS One*, *9*(2), e87840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087840>
- Gilhus, N. E. (2017). Eculizumab : A treatment option for myasthenia gravis? *The Lancet. Neurology*, *16*(12), 947-948. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30363-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30363-0)
- Gilhus, N. E., Skeie, G. O., Romi, F., Lazaridis, K., Zisimopoulou, P., & Tzartos, S. (2016). Myasthenia gravis—Autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nature Reviews. Neurology*, *12*(5), 259-268. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.44>
- Gilhus, N. E., Tzartos, S., Evoli, A., Palace, J., Burns, T. M., & Verschuuren, J. J. G. M. (2019). Myasthenia gravis. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0079-y>
- Gilhus, N. E., & Verschuuren, J. J. (2015). Myasthenia gravis : Subgroup classification and therapeutic strategies. *The Lancet. Neurology*, *14*(10), 1023-1036. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00145-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00145-3)
- Glass, D. J., Apel, E. D., Shah, S., Bowen, D. C., DeChiara, T. M., Stitt, T. N., Sanes, J. R., & Yancopoulos, G. D. (1997). Kinase domain of the muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) is sufficient for phosphorylation but not clustering of acetylcholine receptors : Required role for the MuSK ectodomain? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(16), 8848-8853. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8848>
- Gomez, A. M., & Burden, S. J. (2011). The extracellular region of Lrp4 is sufficient to mediate neuromuscular synapse formation. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *240*(12), 2626-2633. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22772>
- Gong, Y., Bourhis, E., Chiu, C., Stawicki, S., DeAlmeida, V. I., Liu, B. Y., Phamluong, K., Cao, T. C., Carano, R. A. D., Ernst, J. A., Solloway, M., Rubinfeld, B., Hannoush, R. N., Wu, Y., Polakis, P., & Costa, M. (2010). Wnt isoform-specific interactions with coreceptor specify inhibition or potentiation of signaling by LRP6 antibodies. *PloS One*, *5*(9), e12682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012682>



Guarino, S. R., Di Bello, A., Palamini, M., Capillo, M. C., & Forneris, F. (2022). Crystal structure of the kringle domain of human receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (hROR1). *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 78(Pt 5), 185-192. <https://doi.org/10.1107/S2053230X22003855>

Guiheneuc, P. (2003). Synapse neuromusculaire : Mécanismes moléculaires de la libération vésiculaire de l'acétylcholine. *Annales de Réadaptation et de Médecine Physique*, 46(6), 276-280. [https://doi.org/10.1016/S0168-6054\(03\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6054(03)00110-7)

Guptill, J. T., Sanders, D. B., & Evoli, A. (2011). Anti-MuSK antibody myasthenia gravis : Clinical findings and response to treatment in two large cohorts. *Muscle & Nerve*, 44(1), 36-40. <https://doi.org/10.1002/mus.22006>

## H

Haase, G., Dessaud, E., Garcès, A., de Bovis, B., Birling, M., Filippi, P., Schmalbruch, H., Arber, S., & deLapeyrière, O. (2002). GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron*, 35(5), 893-905. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00864-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00864-4)

Hallock, P. T., Chin, S., Blais, S., Neubert, T. A., & Glass, D. J. (2016). Sorbs1 and -2 Interact with CrkL and Are Required for Acetylcholine Receptor Cluster Formation. *Molecular and Cellular Biology*, 36(2), 262-270. <https://doi.org/10.1128/MCB.00775-15>

Hallock, P. T., Xu, C.-F., Park, T.-J., Neubert, T. A., Curran, T., & Burden, S. J. (2010). Dok-7 regulates neuromuscular synapse formation by recruiting Crk and Crk-L. *Genes & Development*, 24(21), 2451-2461. <https://doi.org/10.1101/gad.1977710>

He, B., You, L., Uematsu, K., Xu, Z., Lee, A. Y., Matsangou, M., McCormick, F., & Jablons, D. M. (2004). A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 6(1), 7-14. [https://doi.org/10.1016/s1476-5586\(04\)80048-4](https://doi.org/10.1016/s1476-5586(04)80048-4)

Henriquez, J. P., Webb, A., Bence, M., Bildsoe, H., Sahores, M., Hughes, S. M., & Salinas, P. C. (2008). Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18812-18817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806300105>

Herbst, R. (2020). MuSK function during health and disease. *Neuroscience Letters*, 716, 134676. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134676>

Herbst, R., & Burden, S. J. (2000). The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling. *The EMBO Journal*, 19(1), 67-77. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.67>

Hesser, B. A., Henschel, O., & Witzemann, V. (2006). Synapse disassembly and formation of new synapses in postnatal muscle upon conditional inactivation of MuSK. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 31(3), 470-480. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.10.020>

Hong, Y., Li, H.-F., Romi, F., Skeie, G. O., & Gilhus, N. E. (2018). HLA and MuSK-positive myasthenia gravis : A systemic review and meta-analysis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 138(3), 219-226. <https://doi.org/10.1111/ane.12951>

Huang, H.-C., & Klein, P. S. (2004). The Frizzled family : Receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biology*, 5(7), 234. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-7-234>

Hubbard, S. R., & Gnanasambandan, K. (2013). Structure and activation of MuSK, a receptor tyrosine kinase central to neuromuscular junction formation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1834(10), 2166-2169. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.02.034>

Huijbers, M. G., Marx, A., Plomp, J. J., Le Panse, R., & Phillips, W. D. (2022). Advances in the understanding of disease mechanisms of autoimmune neuromuscular junction disorders. *The Lancet. Neurology*, 21(2), 163-175. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00357-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00357-4)

Huijbers, M. G., Vergoossen, D. L., Fillié-Grijpma, Y. E., Es, I. E. van, Koning, M. T., Slot, L. M., Veelken, H., Plomp, J. J., Maarel, S. M. van der, & Verschuuren, J. J. (2019). MuSK myasthenia gravis monoclonal antibodies: Valency dictates pathogenicity. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 6(3). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000547>

Huijbers, M. G., Vink, A.-F. D., Niks, E. H., Westhuis, R. H., van Zwet, E. W., de Meel, R. H., Rojas-García, R., Díaz-Manera, J., Kuks, J. B., Klooster, R., Straasheijm, K., Evoli, A., Illa, I., van der Maarel, S. M., & Verschuuren, J. J. (2016). Longitudinal epitope mapping in MuSK myasthenia gravis: Implications for disease severity. *Journal of Neuroimmunology*, 291, 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.12.016>

Huijbers, M. G., Zhang, W., Klooster, R., Niks, E. H., Friese, M. B., Straasheijm, K. R., Thijssen, P. E., Vrolijk, H., Plomp, J. J., Vogels, P., Losen, M., Van der Maarel, S. M., Burden, S. J., & Verschuuren, J. J. (2013). MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), 20783-20788. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313944110>

## I

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. *Science Signaling*, 2(59), ra7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000113>

## J

Je, H. S., Yang, F., Ji, Y., Potluri, S., Fu, X.-Q., Luo, Z.-G., Nagappan, G., Chan, J. P., Hempstead, B., Son, Y.-J., & Lu, B. (2013). ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(24), 9957-9962. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0163-13.2013>

Jha, S., Xu, K., Maruta, T., Oshima, M., Mosier, D. R., Atassi, M. Z., & Hoch, W. (2006). Myasthenia gravis induced in mice by immunization with the recombinant extracellular domain of rat muscle-specific kinase (MuSK). *Journal of Neuroimmunology*, 175(1-2), 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.03.016>

Jing, L., Lefebvre, J. L., Gordon, L. R., & Granato, M. (2009). Wnt Signals Organize Synaptic Prepattern and Axon Guidance through the Zebrafish unplugged/MuSK Receptor. *Neuron*, 61(5), 721-733. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.025>

Jones, G., Moore, C., Hashemolhosseini, S., & Brenner, H. R. (1999). Constitutively active MuSK is clustered in the absence of agrin and induces ectopic postsynaptic-like membranes in skeletal muscle fibers. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(9), 3376-3383.

Jones, R. A., Reich, C. D., Dissanayake, K. N., Kristmundsdottir, F., Findlater, G. S., Ribchester, R. R., Simmen, M. W., & Gillingwater, T. H. (2016). NMJ-morph reveals principal components of synaptic

morphology influencing structure-function relationships at the neuromuscular junction. *Open Biology*, 6(12). <https://doi.org/10.1098/rsob.160240>

## K

Karlin, A. (2002). Emerging structure of the Nicotinic Acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1038/nrn731>

Kawakami, Y., Ito, M., Hirayama, M., Sahashi, K., Ohkawara, B., Masuda, A., Nishida, H., Mabuchi, N., Engel, A. G., & Ohno, K. (2011). Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology*, 77(20), 1819-1826. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318237f660>

Kim, N., & Burden, S. J. (2008). MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nature Neuroscience*, 11(1), 19-27. <https://doi.org/10.1038/nn2026>

Kim, N., Stiegler, A. L., Cameron, T. O., Hallock, P. T., Gomez, A. M., Huang, J. H., Hubbard, S. R., Dustin, M. L., & Burden, S. J. (2008). Lrp4 is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK. *Cell*, 135(2), 334-342. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.002>

Klooster, R., Plomp, J. J., Huijbers, M. G., Niks, E. H., Straasheijm, K. R., Detmers, F. J., Hermans, P. W., Sleijpen, K., Verrips, A., Losen, M., Martinez-Martinez, P., De Baets, M. H., van der Maarel, S. M., & Verschuuren, J. J. (2012). Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain*, 135(4), 1081-1101. <https://doi.org/10.1093/brain/aws025>

Knierim, J. (2020, octobre 20). *Motor Cortex (Section 3, Chapter 3) Neuroscience Online : An Electronic Textbook for the Neurosciences | Department of Neurobiology and Anatomy—The University of Texas Medical School at Houston*. <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s3/chapter03.html>

Kolodkin, A. L., & Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and Molecules of Neuronal Wiring : A Primer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), a001727. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001727>

Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68-75.

Koneczny, I., Cossins, J., Waters, P., Beeson, D., & Vincent, A. (2013). MuSK Myasthenia Gravis IgG4 Disrupts the Interaction of LRP4 with MuSK but Both IgG4 and IgG1-3 Can Disperse Preformed Agrin-Independent AChR Clusters. *PLOS ONE*, 8(11), e80695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080695>

Koneczny, I., Stevens, J. A. A., De Rosa, A., Huda, S., Huijbers, M. G., Saxena, A., Maestri, M., Lazaridis, K., Zisimopoulou, P., Tzartos, S., Verschuuren, J., van der Maarel, S. M., van Damme, P., De Baets, M. H., Molenaar, P. C., Vincent, A., Ricciardi, R., Martinez-Martinez, P., & Losen, M. (2017). IgG4 autoantibodies against muscle-specific kinase undergo Fab-arm exchange in myasthenia gravis patients. *Journal of Autoimmunity*, 77, 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.11.005>

Kong, X. C., Barzaghi, P., & Ruegg, M. A. (2004). Inhibition of synapse assembly in mammalian muscle in vivo by RNA interference. *EMBO reports*, 5(2), 183-188. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400065>

Küçükerden, M., Huda, R., Tüzün, E., Yılmaz, A., Skriapa, L., Trakas, N., Strait, R. T., Finkelman, F. D., Kabadayı, S., Zisimopoulou, P., Tzartos, S., & Christadoss, P. (2016). MuSK induced experimental autoimmune myasthenia gravis does not require IgG1 antibody to MuSK. *Journal of Neuroimmunology*, 295-296, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.04.003>

Kummer, T. T., Misgeld, T., & Sanes, J. R. (2006). Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: Paradigm lost. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(1), 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.12.003>

## L

- Lacazette, E., Le Calvez, S., Gajendran, N., & Brenner, H. R. (2003). A novel pathway for MuSK to induce key genes in neuromuscular synapse formation. *Journal of Cell Biology*, *161*(4), 727-736. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210156>
- Lee, Y. I., Li, Y., Mikesch, M., Smith, I., Nave, K.-A., Schwab, M. H., & Thompson, W. J. (2016). Neuregulin1 displayed on motor axons regulates terminal Schwann cell-mediated synapse elimination at developing neuromuscular junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(4), E479-487. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519156113>
- Leite, M. I., Jacob, S., Viegas, S., Cossins, J., Clover, L., Morgan, B. P., Beeson, D., Willcox, N., & Vincent, A. (2008). IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis†. *Brain*, *131*(7), 1940-1952. <https://doi.org/10.1093/brain/awn092>
- Li, L., Cao, Y., Wu, H., Ye, X., Zhu, Z., Xing, G., Shen, C., Barik, A., Zhang, B., Xie, X., Zhi, W., Gan, L., Su, H., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2016). Enzymatic Activity of the Scaffold Protein Rapsyn for Synapse Formation. *Neuron*, *92*(5), 1007-1019. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.023>
- Li, L., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2018). Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annual Review of Physiology*, *80*, 159-188. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034255>
- Li, X.-M., Dong, X.-P., Luo, S.-W., Zhang, B., Lee, D.-H., Ting, A. K. L., Neiswender, H., Kim, C.-H., Carpenter-Hyland, E., Gao, T.-M., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2008). Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle beta-catenin. *Nature Neuroscience*, *11*(3), 262-268. <https://doi.org/10.1038/nn2053>
- Liddell, E. G. T., & Sherrington, C. S. (1925). Recruitment and some other features of reflex inhibition. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, *97*(686), 488-518. <https://doi.org/10.1098/rspb.1925.0016>
- Liik, M., & Punga, A. R. (2016). Repetitive nerve stimulation often fails to detect abnormal decrement in acute severe generalized Myasthenia Gravis. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, *127*(11), 3480-3484. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2016.09.012>
- Lin, S., Landmann, L., Ruegg, M. A., & Brenner, H. R. (2008). The Role of Nerve- versus Muscle-Derived Factors in Mammalian Neuromuscular Junction Formation. *Journal of Neuroscience*, *28*(13), 3333-3340. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5590-07.2008>
- Lin, W., Burgess, R. W., Dominguez, B., Pfaff, S. L., Sanes, J. R., & Lee, K. F. (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature*, *410*(6832), 1057-1064. <https://doi.org/10.1038/35074025>
- Lin, W., Sanchez, H. B., Deerinck, T., Morris, J. K., Ellisman, M., & Lee, K. F. (2000). Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(3), 1299-1304. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1299>
- Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *20*, 781-810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>
- Luisandl, S., Woller, B., Schlauf, M., Schmid, J. A., & Herbst, R. (2013). Endosomal trafficking of the receptor tyrosine kinase MuSK proceeds via clathrin-dependent pathways, Arf6 and actin. *The FEBS Journal*, *280*(14), 3281-3297. <https://doi.org/10.1111/febs.12309>

Luo, Z. G., Wang, Q., Zhou, J. Z., Wang, J., Luo, Z., Liu, M., He, X., Wynshaw-Boris, A., Xiong, W. C., Lu, B., & Mei, L. (2002). Regulation of AChR clustering by Dishevelled interacting with MuSK and PAK1. *Neuron*, *35*(3), 489-505. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00783-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00783-3)

## M

Marinello, M., Cosette, J., Bogni, C., Denard, J., Stockholm, D., & Buj-Bello, A. (2021). Characterization of Neuromuscular Junctions in Mice by Combined Confocal and Super-Resolution Microscopy. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *178*. <https://doi.org/10.3791/63032>

Martinez-Pena y Valenzuela, I., Mouslim, C., Pires-Oliveira, M., Adams, M. E., Froehner, S. C., & Akaaboune, M. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor stability at the NMJ deficient in  $\alpha$ -syntrophin in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(43), 15586-15596. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4038-11.2011>

Masiakowski, P., & Yancopoulos, G. D. (1998). The Wnt receptor CRD domain is also found in MuSK and related orphan receptor tyrosine kinases. *Current Biology*, *8*(12), R407. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70263-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70263-5)

Matsuo, A., Bellier, J.-P., Nishimura, M., Yasuhara, O., Saito, N., & Kimura, H. (2011). Nuclear Choline Acetyltransferase Activates Transcription of a High-affinity Choline Transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(7), 5836-5845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.147611>

McColgan, P., Joubert, J., Tabrizi, S. J., & Rees, G. (2020). The human motor cortex microcircuit : Insights for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *21*(8), Art. 8. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0315-1>

Mejia Maza, A., Jarvis, S., Lee, W. C., Cunningham, T. J., Schiavo, G., Secrier, M., Fratta, P., Sleight, J. N., Fisher, E. M. C., & Sudre, C. H. (2021). NMJ-Analyser identifies subtle early changes in mouse models of neuromuscular disease. *Scientific Reports*, *11*(1), 12251. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91094-6>

Messéant, J., Dobbertin, A., Girard, E., Delers, P., Manuel, M., Mangione, F., Schmitt, A., Le Denmat, D., Molgó, J., Zytnicki, D., Schaeffer, L., Legay, C., & Strohlic, L. (2015). MuSK frizzled-like domain is critical for mammalian neuromuscular junction formation and maintenance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *35*(12), 4926-4941. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3381-14.2015>

Messéant, J., Ezan, J., Delers, P., Glebov, K., Marchiol, C., Lager, F., Renault, G., Tissir, F., Montcouquiol, M., Sans, N., Legay, C., & Strohlic, L. (2017). Wnt proteins contribute to neuromuscular junction formation through distinct signaling pathways. *Development (Cambridge, England)*, *144*(9), 1712-1724. <https://doi.org/10.1242/dev.146167>

Mihaylova, V., Salih, M. a. M., Mukhtar, M. M., Abuzeid, H. A., El-Sadig, S. M., von der Hagen, M., Huebner, A., Nürnberg, G., Abicht, A., Müller, J. S., Lochmüller, H., & Guerguelcheva, V. (2009). Refinement of the clinical phenotype in musk-related congenital myasthenic syndromes. *Neurology*, *73*(22), 1926-1928. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c3fce9>

Minty, G., Hoppen, A., Boehm, I., Alhindi, A., Gibb, L., Potter, E., Wagner, B. C., Miller, J., Skipworth, R. J. E., Gillingwater, T. H., & Jones, R. A. (s. d.). aNMJ-morph : A simple macro for rapid analysis of neuromuscular junction morphology. *Royal Society Open Science*, *7*(4), 200128. <https://doi.org/10.1098/rsos.200128>

- Misgeld, T., Burgess, R. W., Lewis, R. M., Cunningham, J. M., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. (2002). Roles of neurotransmitter in synapse formation: Development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron*, *36*(4), 635-648. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01020-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01020-6)
- Misgeld, T., Kummer, T. T., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. (2005). Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(31), 11088-11093. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504806102>
- Missias, A. C., Chu, G. C., Klocke, B. J., Sanes, J. R., & Merlie, J. P. (1996). Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: Regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch. *Developmental Biology*, *179*(1), 223-238. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0253>
- Mittermeier, L., & Virshup, D. M. (2022). Chapter Three - An itch for things remote: The journey of Wnts. In T. Kornberg (Éd.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 150, p. 91-128). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2022.03.007>
- Moon, R. T., Kohn, A. D., Ferrari, G. V. D., & Kaykas, A. (2004). WNT and  $\beta$ -catenin signalling: Diseases and therapies. *Nature Reviews Genetics*, *5*(9), Art. 9. <https://doi.org/10.1038/nrg1427>
- Moransard, M., Borges, L. S., Willmann, R., Marangi, P. A., Brenner, H. R., Ferns, M. J., & Fuhrer, C. (2003). Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(9), 7350-7359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210865200>
- Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Nishino, Y., Miyazawa, A., Maruyama, N., & Shigemoto, K. (2012). Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *The American Journal of Pathology*, *180*(2), 798-810. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.031>
- Morsch, M., Reddel, S. W., Ghazanfari, N., Toyka, K. V., & Phillips, W. D. (2012). Muscle specific kinase autoantibodies cause synaptic failure through progressive wastage of postsynaptic acetylcholine receptors. *Experimental Neurology*, *237*(2), 286-295. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.034>
- Morsch, M., Reddel, S. W., Ghazanfari, N., Toyka, K. V., & Phillips, W. D. (2013). Pyridostigmine but not 3,4-diaminopyridine exacerbates ACh receptor loss and myasthenia induced in mice by muscle-specific kinase autoantibody. *The Journal of Physiology*, *591*(10), 2747-2762. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.251827>
- Müller-Hermelink, H. K., Marx, A., Geuder, K., & Kirchner, T. (1993). The pathological basis of thymoma-associated myasthenia gravis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *681*, 56-65. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb22869.x>

## N

- Nayak, T. K., Bruhova, I., Chakraborty, S., Gupta, S., Zheng, W., & Auerbach, A. (2014). Functional differences between neurotransmitter binding sites of muscle acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(49), 17660-17665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414378111>
- Nicole, S., & Lory, P. (2021). New Challenges Resulting From the Loss of Function of Nav1.4 in Neuromuscular Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *12*, 751095. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.751095>

- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12), Art. 12. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>
- Nikolic, A., Basta, I., Stojanovic, V. R., Stevic, Z., & Lavrnic, D. (2014). Electrophysiological profile of the patients with MuSK positive myasthenia gravis. *Neurological Research*, 36(11), 945-949. <https://doi.org/10.1179/1743132814Y.0000000387>
- Niks, E. H., Kuks, J. B. M., Roep, B. O., Haasnoot, G. W., Verduijn, W., Ballieux, B. E. P. B., De Baets, M. H., Vincent, A., & Verschuuren, J. J. G. M. (2006). Strong association of MuSK antibody-positive myasthenia gravis and HLA-DR14-DQ5. *Neurology*, 66(11), 1772-1774. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000218159.79769.5c>
- Niks, E. H., Kuks, J. B. M., & Verschuuren, J. J. G. M. (2007). Epidemiology of myasthenia gravis with anti-muscle specific kinase antibodies in The Netherlands. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 78(4), 417-418. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.102517>
- Nishimune, H., Sanes, J. R., & Carlson, S. S. (2004). A synaptic laminin–calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature*, 432(7017), Art. 7017. <https://doi.org/10.1038/nature03112>
- Nocera, G., & Jacob, C. (2020). Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 77(20), 3977-3989. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03516-9>

## O

- Ohno, K., Otsuka, K., & Ito, M. (2016). Roles of collagen Q in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Chemico-Biological Interactions*, 259, 266-270. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.019>
- Ojiakor, O. A., & Rylett, R. J. (2020). Modulation of sodium-coupled choline transporter CHT function in health and disease. *Neurochemistry International*, 140, 104810. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104810>
- 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 (New York, N.Y.)*, 312(5781), 1802-1805. <https://doi.org/10.1126/science.1127142>
- Otsuka, K., Ito, M., Ohkawara, B., Masuda, A., Kawakami, Y., Sahashi, K., Nishida, H., Mabuchi, N., Takano, A., Engel, A. G., & Ohno, K. (2015). Collagen Q and anti-MuSK autoantibody competitively suppress agrin/LRP4/MuSK signaling. *Scientific Reports*, 5, 13928. <https://doi.org/10.1038/srep13928>
- Oury, J., Liu, Y., Töpf, A., Todorovic, S., Hoedt, E., Preethish-Kumar, V., Neubert, T. A., Lin, W., Lochmüller, H., & Burden, S. J. (2019). MACF1 links Rapsyn to microtubule- and actin-binding proteins to maintain neuromuscular synapses. *J Cell Biol*, 218(5), 1686-1705. <https://doi.org/10.1083/jcb.201810023>
- Oury, J., Zhang, W., Leloup, N., Koide, A., Corrado, A. D., Ketavarapu, G., Hattori, T., Koide, S., & Burden, S. J. (2021). Mechanism of disease and therapeutic rescue of Dok7 congenital myasthenia. *Nature*, 595(7867), 404-408. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03672-3>

## P

- Patel, V., Oh, A., Voit, A., Sultatos, L. G., Babu, G. J., Wilson, B. A., Ho, M., & McArdle, J. J. (2014). Altered active zones, vesicle pools, nerve terminal conductivity, and morphology during experimental MuSK myasthenia gravis. *PloS One*, 9(12), e110571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110571>

Patton, B. L., Cunningham, J. M., Thyboll, J., Kortessmaa, J., Westerblad, H., Edström, L., Tryggvason, K., & Sanes, J. R. (2001). Properly formed but improperly localized synaptic specializations in the absence of laminin  $\alpha 4$ . *Nature Neuroscience*, 4(6), Art. 6. <https://doi.org/10.1038/88414>

Perantoni, A. O. (2003). Renal development : Perspectives on a Wnt-dependent process. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 14(4), 201-208. [https://doi.org/10.1016/s1084-9521\(03\)00022-3](https://doi.org/10.1016/s1084-9521(03)00022-3)

Poliak, S., Morales, D., Croteau, L.-P., Krawchuk, D., Palmesino, E., Morton, S., Cloutier, J.-F., Charron, F., Dalva, M. B., Ackerman, S. L., Kao, T.-J., & Kania, A. (2015). Synergistic integration of Netrin and ephrin axon guidance signals by spinal motor neurons. *eLife*, 4, e10841. <https://doi.org/10.7554/eLife.10841>

Punga, A. R., Lin, S., Oliveri, F., Meinen, S., & Rüegg, M. A. (2011). Muscle-selective synaptic disassembly and reorganization in MuSK antibody positive MG mice. *Experimental Neurology*, 230(2), 207-217. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.04.018>

## R

Reddy, L. V., Koirala, S., Sugiura, Y., Herrera, A. A., & Ko, C. P. (2003). Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron*, 40(3), 563-580. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00682-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00682-2)

Remédio, L., Gribble, K. D., Lee, J. K., Kim, N., Hallock, P. T., Delestrée, N., Mentis, G. Z., Froemke, R. C., Granato, M., & Burden, S. J. (2016). Diverging roles for Lrp4 and Wnt signaling in neuromuscular synapse development during evolution. *Genes & Development*, 30(9), 1058-1069. <https://doi.org/10.1101/gad.279745.116>

Roche, S. L., Sherman, D. L., Dissanayake, K., Soucy, G., Desmazieres, A., Lamont, D. J., Peles, E., Julien, J.-P., Wishart, T. M., Ribchester, R. R., Brophy, P. J., & Gillingwater, T. H. (2014). Loss of Glial Neurofascin155 Delays Developmental Synapse Elimination at the Neuromuscular Junction. *Journal of Neuroscience*, 34(38), 12904-12918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1725-14.2014>

Rodolico, C., Bonanno, C., Toscano, A., & Vita, G. (2020). MuSK-Associated Myasthenia Gravis : Clinical Features and Management. *Frontiers in Neurology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2020.00660>

Rodríguez Cruz, P. M., Cossins, J., Beeson, D., & Vincent, A. (2020). The Neuromuscular Junction in Health and Disease : Molecular Mechanisms Governing Synaptic Formation and Homeostasis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.610964>

Rodríguez Cruz, P. M., Cossins, J., Cheung, J., Maxwell, S., Jayawant, S., Herbst, R., Waithe, D., Kornev, A. P., Palace, J., & Beeson, D. (2019). Congenital myasthenic syndrome due to mutations in MUSK suggests that the level of MuSK phosphorylation is crucial for governing synaptic structure. *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.23949>

Ruff, R. L., & Lennon, V. A. (2008). How myasthenia gravis alters the safety factor for neuromuscular transmission. *Journal of Neuroimmunology*, 201-202, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.038>

## S

Sabre, L., Evoli, A., & Punga, A. R. (2019). Cognitive dysfunction in mice with passively induced MuSK antibody seropositive myasthenia gravis. *Journal of the Neurological Sciences*, 399, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.02.001>



- Sander, A., Hesser, B. A., & Witzemann, V. (2001). MuSK induces in vivo acetylcholine receptor clusters in a ligand-independent manner. *Journal of Cell Biology*, *155*(7), 1287-1296. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105034>
- Sanders, D. B., Wolfe, G. I., Benatar, M., Evoli, A., Gilhus, N. E., Illa, I., Kuntz, N., Massey, J. M., Melms, A., Murai, H., Nicolle, M., Palace, J., Richman, D. P., Verschuuren, J., & Narayanaswami, P. (2016). International consensus guidance for management of myasthenia gravis : Executive summary. *Neurology*, *87*(4), 419-425. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002790>
- Schaeffer, L., d'Exaerde, A. de K., & Changeux, J.-P. (2001). Targeting Transcription to the Neuromuscular Synapse. *Neuron*, *31*(1), 15-22. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00353-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00353-1)
- Scotton, P., Bleckmann, D., Stebler, M., Sciandra, F., Brancaccio, A., Meier, T., Stetefeld, J., & Ruegg, M. A. (2006). Activation of Muscle-specific Receptor Tyrosine Kinase and Binding to Dystroglycan Are Regulated by Alternative mRNA Splicing of Agrin\*. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(48), 36835-36845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607887200>
- Shen, C., Li, L., Zhao, K., Bai, L., Wang, A., Shu, X., Xiao, Y., Zhang, J., Zhang, K., Hui, T., Chen, W., Zhang, B., Hsu, W., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2018). Motoneuron Wnts regulate neuromuscular junction development. *ELife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/eLife.34625>
- Shi, L., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2012). Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. *Trends in Neurosciences*, *35*(7), 441-453. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.04.005>
- Silvestri, N. J., & Wolfe, G. I. (2014). Treatment-Refractory Myasthenia Gravis. *Journal of Clinical Neuromuscular Disease*, *15*(4), 167-178. <https://doi.org/10.1097/CND.0000000000000034>
- Slater, C. R. (1982). Postnatal maturation of nerve-muscle junctions in hindlimb muscles of the mouse. *Developmental Biology*, *94*(1), 11-22. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90063-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90063-X)
- Slater, C. R. (2017). The Structure of Human Neuromuscular Junctions : Some Unanswered Molecular Questions. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(10), E2183. <https://doi.org/10.3390/ijms18102183>
- Smith, I. W., Mikesh, M., Lee, Y. il, & Thompson, W. J. (2013). Terminal Schwann cells participate in the competition underlying neuromuscular synapse elimination. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(45), 17724-17736. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3339-13.2013>
- Son, Y. J., & Thompson, W. J. (1995). Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron*, *14*(1), 133-141. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90247-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90247-3)
- Stiegler, A. L., Burden, S. J., & Hubbard, S. R. (2006). Crystal Structure of the Agrin-responsive Immunoglobulin-like Domains 1 and 2 of the Receptor Tyrosine Kinase MuSK. *Journal of Molecular Biology*, *364*(3), 424-433. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.019>
- Stiegler, A. L., Burden, S. J., & Hubbard, S. R. (2009). Crystal structure of the frizzled-like cysteine-rich domain of the receptor tyrosine kinase MuSK. *Journal of Molecular Biology*, *393*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.091>
- Strochlic, L., Falk, J., Goillot, E., Sigoillot, S., Bourgeois, F., Delers, P., Rouvière, J., Swain, A., Castellani, V., Schaeffer, L., & Legay, C. (2012). Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction. *PLoS One*, *7*(1), e29976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029976>
- Sudulagunta, S. R., Sepehrar, M., Sodalagunta, M. B., Settikere Nataraju, A., Bangalore Raja, S. K., Sathyanarayana, D., Gummadi, S., & Burra, H. K. (2016). Refractory myasthenia gravis—Clinical

profile, comorbidities and response to rituximab. *German Medical Science: GMS e-Journal*, 14, Doc12. <https://doi.org/10.3205/000239>

Suh, J., Goldstein, J. M., & Nowak, R. J. (2013). Clinical characteristics of refractory myasthenia gravis patients. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 86(2), 255-260.

## T

Takamori, M., Nakamura, T., & Motomura, M. (2013). Antibodies against Wnt receptor of muscle-specific tyrosine kinase in myasthenia gravis. *Journal of Neuroimmunology*, 254(1), 183-186. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.09.001>

Tapia, J. C., Wylie, J. D., Kasthuri, N., Hayworth, K. J., Schalek, R., Berger, D. R., Guatimosim, C., Seung, H. S., & Lichtman, J. W. (2012). Pervasive Synaptic Branch Removal in the Mammalian Neuromuscular System at Birth. *Neuron*, 74(5), 816-829. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.017>

Tatu, L. (2018). *Anatomie des voies de la motricité volontaire. 2.*

Tetruashvily, M. M., McDonald, M. A., Frieze, K. K., & Boulanger, L. M. (2016). MHCI promotes developmental synapse elimination and aging-related synapse loss at the vertebrate neuromuscular junction. *Brain, Behavior, and Immunity*, 56, 197-208. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.01.008>

Tezuka, T., Inoue, A., Hoshi, T., Weatherbee, S. D., Burgess, R. W., Ueta, R., & Yamanashi, Y. (2014). The MuSK activator agrin has a separate role essential for postnatal maintenance of neuromuscular synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(46), 16556-16561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408409111>

Till, J. H., Becerra, M., Watty, A., Lu, Y., Ma, Y., Neubert, T. A., Burden, S. J., & Hubbard, S. R. (2002). Crystal Structure of the MuSK Tyrosine Kinase: Insights into Receptor Autoregulation. *Structure*, 10(9), 1187-1196. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00814-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00814-6)

Tintignac, L. A., Brenner, H.-R., & Rüegg, M. A. (2015). Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiological Reviews*, 95(3), 809-852. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2014>

Tsiamalos, P., Kordas, G., Kokla, A., Poulas, K., & Tzartos, S. J. (2009). Epidemiological and immunological profile of muscle-specific kinase myasthenia gravis in Greece. *European Journal of Neurology*, 16(8), 925-930. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02624.x>

Tsonis, A. I., Zisimopoulou, P., Lazaridis, K., Tzartos, J., Matsigkou, E., Zouvelou, V., Mantegazza, R., Antozzi, C., Andretta, F., Evoli, A., Deymeer, F., Saruhan-Direskeneli, G., Durmus, H., Brenner, T., Vaknin, A., Berrih-Aknin, S., Behin, A., Sharshar, T., De Baets, M., ... Tzartos, S. J. (2015). MuSK autoantibodies in myasthenia gravis detected by cell based assay—A multinational study. *Journal of Neuroimmunology*, 284, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.04.015>

Turney, S. G., & Lichtman, J. W. (2012). Reversing the Outcome of Synapse Elimination at Developing Neuromuscular Junctions In Vivo: Evidence for Synaptic Competition and Its Mechanism. *PLOS Biology*, 10(6), e1001352. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001352>

## U

Ugur, S. A., & Tolun, A. (2008). Homozygous WNT10b mutation and complex inheritance in Split-Hand/Foot Malformation. *Human Molecular Genetics*, 17(17), 2644-2653. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn164>

Ulusoy, C., Kim, E., Tüzün, E., Huda, R., Yılmaz, V., Poulas, K., Trakas, N., Skriapa, L., Niarchos, A., Strait, R. T., Finkelman, F. D., Turan, S., Zisimopoulou, P., Tzartos, S., Saruhan-Direskeneli, G., & Christadoss, P. (2014). Preferential production of IgG1, IL-4 and IL-10 in MuSK-immunized mice. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, *151*(2), 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.02.012>

## V

Valenzuela, D. M., Stitt, T. N., DiStefano, P. S., Rojas, E., Mattsson, K., Compton, D. L., Nuñez, L., Park, J. S., Stark, J. L., & Gies, D. R. (1995). Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: Expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron*, *15*(3), 573-584. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90146-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90146-9)

Vergoossen, D. L. E., Augustinus, R., & Huijbers, M. G. (2020). MuSK antibodies, lessons learned from poly- and monoclonality. *Journal of Autoimmunity*, *112*, 102488. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102488>

Vergoossen, D. L. E., Plomp, J. J., Gstöttner, C., Fillié-Grijpma, Y. E., Augustinus, R., Verpalen, R., Wuhler, M., Parren, P. W. H. I., Dominguez-Vega, E., van der Maarel, S. M., Verschuuren, J. J., & Huijbers, M. G. (2021). Functional monovalency amplifies the pathogenicity of anti-MuSK IgG4 in myasthenia gravis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(13), e2020635118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020635118>

Verschuuren, J. J. G. M., Plomp, J. J., Burden, S. J., Zhang, W., Fillié-Grijpma, Y. E., Stienstra-van Es, I. E., Niks, E. H., Losen, M., van der Maarel, S. M., & Huijbers, M. G. (2018). Passive transfer models of myasthenia gravis with muscle-specific kinase antibodies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1413*(1), 111-118. <https://doi.org/10.1111/nyas.13543>

Viegas, S., Jacobson, L., Waters, P., Cossins, J., Jacob, S., Leite, M. I., Webster, R., & Vincent, A. (2012). Passive and active immunization models of MuSK-Ab positive myasthenia: Electrophysiological evidence for pre and postsynaptic defects. *Experimental Neurology*, *234*(2), 506-512. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.025>

Vock, V. M., Ponomareva, O. N., & Rimer, M. (2008). Evidence for Muscle-Dependent Neuromuscular Synaptic Site Determination in Mammals. *Journal of Neuroscience*, *28*(12), 3123-3130. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-07.2008>

## W

Walsh, M. K., & Lichtman, J. W. (2003). In Vivo Time-Lapse Imaging of Synaptic Takeover Associated with Naturally Occurring Synapse Elimination. *Neuron*, *37*(1), 67-73. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01142-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01142-X)

Wang, Y., Chang, H., Rattner, A., & Nathans, J. (2016). Frizzled Receptors in Development and Disease. *Current Topics in Developmental Biology*, *117*, 113-139. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.11.028>

Watty, A., Neubauer, G., Dreger, M., Zimmer, M., Wilm, M., & Burden, S. J. (2000). The in vitro and in vivo phosphotyrosine map of activated MuSK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(9), 4585-4590. <https://doi.org/10.1073/pnas.080061997>

Weatherbee, S. D., Anderson, K. V., & Niswander, L. A. (2006). LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development (Cambridge, England)*, *133*(24), 4993-5000. <https://doi.org/10.1242/dev.02696>

Wiese, K. E., Nusse, R., & van Amerongen, R. (2018). Wnt signalling: Conquering complexity. *Development (Cambridge, England)*, *145*(12). <https://doi.org/10.1242/dev.165902>

Wood, S. J., & Slater, C. R. (2001). Safety factor at the neuromuscular junction. *Progress in Neurobiology*, *64*(4), 393-429. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00055-1](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00055-1)

Wu, H., Lu, Y., Barik, A., Joseph, A., Taketo, M. M., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2012).  $\beta$ -Catenin gain of function in muscles impairs neuromuscular junction formation. *Development (Cambridge, England)*, *139*(13), 2392-2404. <https://doi.org/10.1242/dev.080705>

Wu, H., Lu, Y., Shen, C., Patel, N., Gan, L., Xiong, W. C., & Mei, L. (2012). Distinct roles of muscle and motoneuron LRP4 in neuromuscular junction formation. *Neuron*, *75*(1), 94-107. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.033>

Wu, H., Xiong, W. C., & Mei, L. (2010). To build a synapse: Signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development (Cambridge, England)*, *137*(7), 1017-1033. <https://doi.org/10.1242/dev.038711>

## X

Xie, M. H., Yuan, J., Adams, C., & Gurney, A. (1997). Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv. *Nature Biotechnology*, *15*(8), 768-771. <https://doi.org/10.1038/nbt0897-768>

Xu, Y. K., & Nusse, R. (1998). The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases. *Current Biology*, *8*(12), R405-R406. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70262-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70262-3)

## Y

Yamada, C., Teener, J. W., Davenport, R. D., & Cooling, L. (2015). Maintenance plasma exchange treatment for muscle specific kinase antibody positive myasthenia gravis patients. *Journal of Clinical Apheresis*, *30*(5), 314-319. <https://doi.org/10.1002/jca.21377>

Yang, X., Arber, S., William, C., Li, L., Tanabe, Y., Jessell, T. M., Birchmeier, C., & Burden, S. J. (2001). Patterning of Muscle Acetylcholine Receptor Gene Expression in the Absence of Motor Innervation. *Neuron*, *30*(2), 399-410. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00287-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00287-2)

You, L., He, B., Xu, Z., Uematsu, K., Mazieres, J., Mikami, I., Reguart, N., Moody, T. W., Kitajewski, J., McCormick, F., & Jablons, D. M. (2004). Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene*, *23*(36), 6170-6174. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207844>

Yu, P., Yang, W., Han, D., Wang, X., Guo, S., Li, J., Li, F., Zhang, X., Wong, S.-W., Bai, B., Liu, Y., Du, J., Sun, Z. S., Shi, S., Feng, H., & Cai, T. (2016). Mutations in WNT10B Are Identified in Individuals with Oligodontia. *American Journal of Human Genetics*, *99*(1), 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.012>

Yumoto, N., Kim, N., & Burden, S. J. (2012). Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature*, *489*(7416), 438-442. <https://doi.org/10.1038/nature11348>

## Z

Zhang, B., Liang, C., Bates, R., Yin, Y., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2012). Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *Molecular Brain*, *5*, 7. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-7>

- Zhang, B., Luo, S., Dong, X.-P., Zhang, X., Liu, C., Luo, Z., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2007). Beta-catenin regulates acetylcholine receptor clustering in muscle cells through interaction with rapsyn. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(15), 3968-3973. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4691-06.2007>
- Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W. C., & Mei, L. (2008). LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron*, 60(2), 285-297. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.006>
- Zhang, W., Coldefy, A.-S., Hubbard, S. R., & Burden, S. J. (2011). Agrin Binds to the N-terminal Region of Lrp4 Protein and Stimulates Association between Lrp4 and the First Immunoglobulin-like Domain in Muscle-specific Kinase (MuSK). *The Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 40624-40630. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279307>
- Zhu, D., Yang, Z., Luo, Z., Luo, S., Xiong, W. C., & Mei, L. (2008). Muscle-specific receptor tyrosine kinase endocytosis in acetylcholine receptor clustering in response to agrin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(7), 1688-1696. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4130-07.2008>
- Zong, Y., Zhang, B., Gu, S., Lee, K., Zhou, J., Yao, G., Figueiredo, D., Perry, K., Mei, L., & Jin, R. (2012). Structural basis of agrin–LRP4–MuSK signaling. *Genes & Development*, 26(3), 247-258. <https://doi.org/10.1101/gad.180885.111>

## Résumé

La synapse périphérique établie entre la terminaison d'un axone moteur et une fibre musculaire striée squelettique est appelée jonction neuromusculaire (JNM). La formation, la maturation ainsi que la maintenance de la JNM sont des processus finement régulés dans le temps et l'espace. L'ensemble de ces phénomènes nécessite une communication dynamique entre les différents compartiments cellulaires qui composent la JNM. La rupture totale ou partielle de ces signalisations trans-synaptiques mène à des altérations morpho-fonctionnelles de la JNM à l'origine des pathologies neuromusculaires. Ces maladies graves, parmi lesquelles, les syndromes myasthéniques congénitaux ou la myasthénie grave (MG), impactent fortement les fonctions motrices et menacent la vie des patients. Même si les outils de diagnostic de ces pathologies sont bien connus, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impactés est encore incomplète et les traitements disponibles limités. Afin de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques, il est nécessaire de mieux caractériser les signalisations impliquées dans la connectivité neuromusculaire. L'ensemble des étapes de mise en place de la JNM nécessite la présence et l'activité d'un complexe de récepteurs clés ancrés dans la membrane musculaire. Il est composé du récepteur à activité tyrosine kinase MuSK (Muscle Specific Kinase) et de son co-récepteur Lrp4 (Low density lipoprotein receptor-related 4). Ce complexe est activé par plusieurs ligands parmi lesquels, l'Agrine libérée par la terminaison motoneuronale ainsi que les glycoprotéines Wnt. De cette activation découle l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine (RACH) dans la zone synaptique de la cellule musculaire, un phénomène caractéristique de la différenciation post-synaptique. Les précédents travaux réalisés par l'équipe ont permis de mettre en évidence l'implication d'un réseau de signalisations Wnt à la JNM, notamment médiées par le domaine riche en cystéine (CRD) de MuSK correspondant au domaine de liaison des Wnt. Même si l'étude des animaux chez lesquels le CRD de MuSK est absent (MuSK $\Delta$ CRD) a révélé des défauts morphologiques et fonctionnels importants de la JNM, cette mutation ne menace pas la survie des animaux contrairement à la délétion de Lrp4, de MuSK ou de l'Agrine. La MG est une maladie auto-immune causée par la présence d'anticorps qui ciblent, dans 85% des cas, le RACH. On retrouve dans une faible proportion de patients, des anticorps dirigés contre MuSK, ciblant habituellement le domaine Ig1 impliqué dans la signalisation Agrine. Cependant, trois études ont mis en évidence la présence d'anticorps se liant spécifiquement au CRD de MuSK chez des patients atteints de MG sans que l'on sache si ces anticorps sont pathogéniques et capables d'induire la maladie. La caractérisation de ces anticorps et la démonstration de leur potentiel pathogène représente donc un élément important dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la myasthénie. Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont porté sur la démonstration de la pathogénicité des anticorps anti-CRD de MuSK. Mes résultats ont montré que l'injection d'anticorps ciblant le CRD de MuSK mène à l'apparition d'un phénotype myasthénique chez la souris. Via un large éventail d'expériences de biologie cellulaire, biochimie et d'électrophysiologie, j'ai montré que les symptômes cliniques étaient accompagnés de graves défauts de structure de la JNM et de neurotransmission. Sur le plan mécanistique, mes travaux ont prouvé que la présence de ces anticorps mène à la rupture de l'interaction entre Lrp4 et MuSK inhibant ainsi l'agrégation des RACH induite par l'Agrine. L'ensemble de cette étude permet de mettre en évidence une nouvelle signalisation impactée dans un contexte de MG, de mieux comprendre la pathogénicité du CRD de MuSK et participe à l'adaptation des traitements alloués aux patients en fonction de leur étiologie.

Mots clés : jonction neuromusculaire (JNM), MuSK, domaine riche en cystéine (CRD), myasthénie auto-immune

## Abstract

The peripheral synapse established between the end terminal of a motor neuron and a skeletal muscle fiber is the neuromuscular junction (NMJ). Formation, maturation and maintenance of the NMJ are finely tuned in time and space. These processes require a dynamic communication between all the cellular compartments of the NMJ. Total or partial disruption of this trans-synaptic signaling result in morpho-functional defects responsible for neuromuscular disorders. These pathologies, including the congenital myasthenic syndromes and the auto-immune myasthenia gravis (MG), deeply impact motor function in patients and threaten their life. Even though diagnostic tools are well established, the cellular and molecular mechanisms are yet poorly understood and available treatments are limited. In order to develop new promising therapeutic strategies, it is critical to better characterize all the signaling pathways involved in neuromuscular connectivity. NMJ formation relies on the presence and activity of a complex of key receptors anchored in the muscle membrane. This complex is composed of the tyrosine kinase receptor MuSK (Muscle Specific Kinase) and its co-receptor Lrp4 (Low density lipoprotein receptor-related 4) and is activated by different ligands including the nerve-derived Agrin and Wnt glycoproteins. Activation of this complex leads to acetylcholine receptor (AChR) clustering in the muscle synaptic area, a hallmark of post-synaptic differentiation. Previous studies from our group showed the implication of a network of Wnt pathways at the NMJ, partly signaling through the Wnt-binding cysteine rich domain (CRD) of MuSK. Even if mouse model in which MuSK is deleted from its CRD (MuSK $\Delta$ CRD) display important morphological and functional defects, this mutation is compatible with life as opposed to Lrp4, MuSK or Agrin deletion. MG is an auto-immune disorder caused by antibodies targeting, in 85% of cases, the AChR. A small percentage of patient harbor antibodies against MuSK, usually against its Ig1 domain, involved in Agrin signaling. Three recent studies revealed MG patients carrying MuSK CRD targeting antibodies but whether these antibodies are pathogenic remains unknown. Characterization of their pathogenicity remains crucial to better understand the pathophysiological mechanisms leading to MG. In this context, my thesis work aims at demonstrating the pathogenicity of CRD MuSK antibodies. My results showed that injection of antibodies targeting MuSK CRD leads to a myasthenic-like phenotype in mouse. Using a large array of cell biology, biochemistry and electrophysiological experiments, I showed that the clinical symptoms were accompanied by important structural and neurotransmission defects at the NMJ. Mechanistically, my work proved that antibodies against MuSK CRD are responsible for Lrp4-MuSK interaction disruption ultimately leading to inhibition of Agrin-induced AChR clustering. Altogether, this study unravels a new pathway affected in MG, participates to a better understanding of MuSK CRD implication in this pathology and helps treatment adaptation regarding patients etiology.

Key words: neuromuscular junction (NMJ), MuSK, cystein rich domain (CRD), Myasthenia Gravis