



UNIVERSITÉ  
**PARIS  
DESCARTES**



Rapport de stage  
Master 2 Neurosciences  
Année 2017-2018

---

# **Rôles de Wnts et MuSK, un récepteur tyrosine kinase dans le cerveau**

---

CNRS - UMR8119  
Equipe Développement et Pathologies de la Jonction Neuromusculaire  
Université Paris Descartes  
Encadrante : Claire LEGAY

Auteur : Florent KLEE

Ajout image



## **Remerciements**

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1.1	Formation de la synapse . . . . .	1
1.2	Récepteur MuSK . . . . .	2
1.3	Protéines <i>Wingless-related Integration Site</i> (Wnt) . . . . .	2
1.4	Contexte . . . . .	3
1.5	But du stage . . . . .	3
<b>2</b>	<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>4</b>
2.1	Animaux et Prélèvements . . . . .	4
2.2	qPCR . . . . .	4
2.3	Marquages . . . . .	4
2.4	Acquisition d'images et Statistiques . . . . .	5
<b>3</b>	<b>Résultats</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>Conclusion</b>	<b>8</b>
	<b>Références</b>	<b>9</b>



# Chapitre 1: Introduction

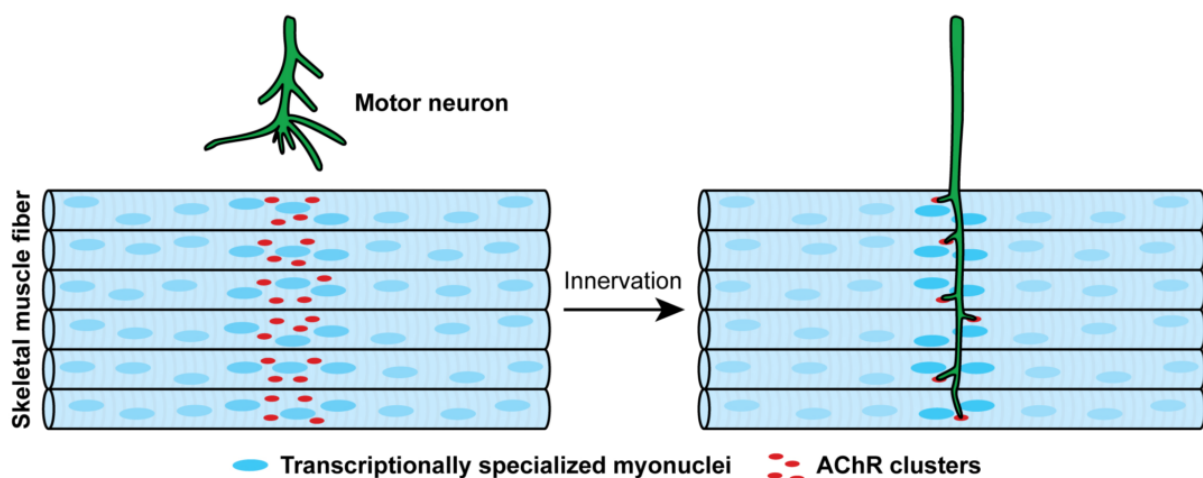
## 1.1 Formation de la synapse

La formation de synapses, ou synaptogenèse, consiste en un rapprochement d'un élément pré-synaptique, le cône de croissance de l'axone, et d'un élément post-synaptique, généralement les dendrites d'un neurone, mais pouvant également être un muscle dans le cas de Jonction Neuro-Musculaire (JNM). Bien que la synaptogenèse survient tout au long de la vie d'un individu, la majorité de celle-ci survient dans le Système Nerveux Central (SNC) lors du développement précoce. On estime que dans un cerveau adulte se trouve environ  $10^{15}$  synapses. Ces synapses sont des structures asymétriques, permettant généralement le passage d'un neurotransmetteur de l'élément pré-synaptique pour aller activer un récepteur au niveau de l'élément post-synaptique. Les synapses sont donc des structures nécessaires au bon fonctionnement du cerveau.

Pas forcément utile

La JNM est une structure appartenant au Système Nerveux Périphérique (SNP), et qui fait le lien entre le motoneurone et la fibre musculaire squelettique. De part sa grande taille et sa facilité d'accès, la JNM est depuis longtemps le modèle préférentiel pour étudier les synapses. Chez les vertébrés, le neurotransmetteur utilisé à la JNM est l'Acétylcholine (ACh). La mise en place de l'élément pré-synaptique requiert un alignement correct des agrégats de *Recepteurs à l'Acétylcholine* (RACH) au milieu de la fibre musculaire, agrégats qui commencent à se former avant l'arrivée de l'axone [1], [2]. Cette étape qui se déroule avant la venue de l'axone se nomme "pré-patterning".

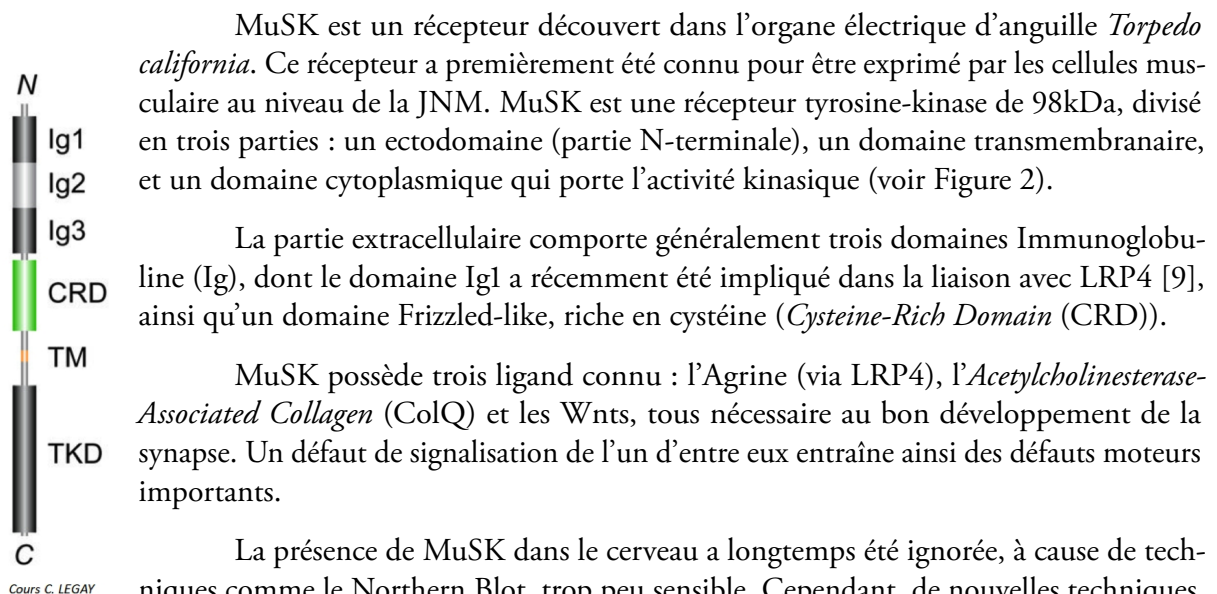
Lors du développement, le cône de croissance de l'axone va se diriger vers l'élément post-synaptique. Quand les deux éléments entrent en contacts (après environ 2 semaines de gestation chez la souris), des cascades de signalisation sont initiées, ce qui résulte en la différenciation des parties pré- et post-synaptiques [3], avec notamment une redistribution des clusters de RACHs, qui ne sont plus présents dans les régions extrasynaptiques.



**Figure 1.** Formation de la JNM (issue de Burden *et al.* 2018).

Cette accumulation de RACHs est due à un récepteur particulier : *Muscle-Specific Kinase* (MuSK). Ce dernier joue un rôle clef dans la formation de la synapse, sa position déterminant la position de cette dernière [4], [5]. Le ligand activateur de MuSK est historiquement l'Agrine [5], qui est sécrété par l'axone approchant. Plus récemment, des travaux ont montré que l'Agrine se fixait sur le co-récepteur de MuSK : le récepteur *Low density lipoprotein Receptor-related Protein 4* (LRP4) [6], [7]. Suite à l'activation par l'Agrine de LRP4, deux complexes MuSK/LRP4 vont s'assembler, et l'assemblage tétramérique permettrait une meilleure phosphorylation de MuSK, et donc une meilleure différenciation de la synapse et de l'agrégation des RACH [8].

## 1.2 Récepteur MuSK



MuSK est un récepteur découvert dans l'organe électrique d'anguille *Torpedo californica*. Ce récepteur a premièrement été connu pour être exprimé par les cellules musculaire au niveau de la JNM. MuSK est une récepteur tyrosine-kinase de 98kDa, divisé en trois parties : un ectodomaine (partie N-terminale), un domaine transmembranaire, et un domaine cytoplasmique qui porte l'activité kinasique (voir Figure 2).

La partie extracellulaire comporte généralement trois domaines Immunoglobuline (Ig), dont le domaine Ig1 a récemment été impliqué dans la liaison avec LRP4 [9], ainsi qu'un domaine Frizzled-like, riche en cystéine (*Cysteine-Rich Domain* (CRD)).

MuSK possède trois ligand connu : l'Agrine (via LRP4), l'*Acetylcholinesterase-Associated Collagen* (ColQ) et les Wnts, tous nécessaire au bon développement de la synapse. Un défaut de signalisation de l'un d'entre eux entraîne ainsi des défauts moteurs importants.

La présence de MuSK dans le cerveau a longtemps été ignorée, à cause de techniques comme le Northern Blot, trop peu sensible. Cependant, de nouvelles techniques, telle que l'Hybridation *In Situ* (HIS) ou bien la Quantitative PCR (qPCR), ont permis de montrer que le récepteur se trouvait bien dans le tissu cérébral, bien qu'exprimé en faible quantité, principalement au niveau du cortex, du cervelet, et de l'hippocampe [10], [11]. Deux isoformes seraient présentes dans le cerveau : une isoforme de la protéines ayant l'intégralité des domaines, mais une mutation en .

On sait désormais, grâce à des techniques de Knockdown du gène, que la présence de MuSK dans le cerveau est nécessaire à la formation de la mémoire, au travers de la voie CREB : l'absence de MuSK va empêché la phosphorylation de *cAMP Response Element-Binding Protein* (CREB). De plus, MuSK est nécessaire à la formation de la Potentialisation à Long Terme (LTP) de l'hippocampe [10].

## 1.3 Protéines Wnt

Les protéines Wnt sont des glycoprotéines sécrétées, de 40kDa, et impliquées dans de nombreux processus développementaux tel que l'embryogenèse, la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire, ou encore l'apoptose [12], [13]. En plus de leur rôles durant le développement, les Wnts jouent également un rôle à l'âge adulte dans la maintenance des tissus adultes. Des travaux ont pu montré que les Wnts étaient également impliquées dans la formation de la JNM [14]. On connaît

actuellement 19 membres de cette famille de protéine chez la souris et chez l'humain. Classiquement, les Wnts se lie sur le récepteur *Frizzled* (Fz) avec ses co-récepteur LRP5/6, mais il existe d'autres récepteurs tels que : ROR, RYK, ou bien encore MuSK, grâce à son CRD.

Il a été montré *in vitro* que plusieurs Wnts interagissaient avec MuSK : Wnt2, 3a, 4, 6, 7b, 9a, et 11 [15]–[17], avec différents effets. Seules Wnt4, 9a et 11 vont conduire à une dimérisation de MuSK et a son activation (*in vitro*). Ceci est cohérent avec le fait que chez le Poisson-zèbre, l'orthologue de MuSK, *unplugged*, le CRD allait interagir avec des protéines Wnts pour induire l'agrégation de RACH [2], [18]. De plus, LRP4 semble être également nécessaire à l'agrégation des RACH médié par les Wnts [16].

Les protéines Wnt vont activer plusieurs voies de signalisation différentes dans la cellule : la [voie canonique/β-catenin](#), la voie *Planar Cell Polarity* (PCP), et la voie Wnt/Calcium. a continuer

## 1.4 Contexte

Dans le but d'étudier le rôle de l'interaction des protéines Wnts et du domaine CRD de MuSK, l'équipe de C. LEGAY à crée une souris transgénique dont le CRD était supprimé (MuSKΔCRD) [19], [20]. Il a ainsi été montré que le CRD était nécessaire à la JNM à la fois pour sa formation et pour son maintien à l'âge adulte, et que Wnt4 et 11 participaient activement à la formation de cette dernière. De plus, un traitement au chlorure de lithium (LiCl) (inhibiteur de la *Glycogen synthase kinase 3* (GSK3)) permettait à la JNM un retour vers un phénotype sauvage.

En plus de leurs problèmes musculaires, les souris MuSKΔCRD exhibaient des problèmes centraux : durant son stage, une étudiante à montrée que les mutants mâles avaient des blessures importantes au niveau du dos, blessures qui n'étaient cependant pas dues à des problèmes d'agressivité. De plus, une analyse comportementale a été réalisée en collaboration avec le groupe du Dr LANFUMEY (Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Paris), et le Novel Object Recognition Test (NOR) a révélé que les souris mutantes souffraient d'une modification de la mémoire intermédiaire.

## 1.5 But du stage

Comme MuSK est exprimé dans le cerveau adulte, principalement au niveau de l'hippocampe [10], et que ce lieu joue un rôle prépondérant dans la formation de la mémoire intermédiaire, l'objectif de mon stage va être d'explorer le rôle de l'interaction de MuSK et des Wnts dans le cerveau, utilisant pour cela les souris MuSKΔCRD.

Cela se fera au travers de 5 axes :

1. Quelle est l'origine des blessures chez le mâle ?
2. La structure du cerveau est-elle affectée chez le mutant ?
3. Quelles sont les cellules exprimant MuSK ?
4. Quel est le niveau d'expression de MuSK/MuSKΔCRD dans le cerveau ?
5. Un traitement au LiCl peut-il permettre un retour du mutant à un phénotype sauvage au niveau du comportement ?



## Chapitre 2: Matériel et Méthodes

### 2.1 Animaux et Prélèvements

Les souris utilisées sont issues d'une lignée hétérozygote venant d'un fond génétique mixte [19], [20]. Les souris mutantes  $\text{MuSK}\Delta\text{CRD}$  et Wild Type (WT) testées sont issues de même portée. Afin de prélever les cerveaux, les souris ont été euthanasiées à l'aide d'une injection péritonéale de Pentorbital. Une injection péristaltique de Paraformaldéhyde (PFA) 4% est réalisée pour fixer les tissus. Le cerveau est prélevé et post-fixé dans du PFA 4% pendant 1 heure, puis transféré dans une solution de sucre 30% à 4°C jusqu'à utilisation.

### 2.2 qPCR

Les hippocampes droit et gauche sont prélevés du cerveau et immédiatement plongés dans 800µl de TRIzol®, broyés mécaniquement puis stockés à -20°C. L'extraction de l'ARN se fait grâce au RNeasy Protect Mini Kit de Qiagen®. Le traitement DNase, puis la Real Time PCR (RT-PCR), sont réalisées avec RT<sup>2</sup> First Strand Kit de Qiagen®. La qPCR se réalise avec SYBR Green/ROX qPCR MM (ThermoFisher®). Les primers utilisés sont dirigés contre MuSK et PSMD13.

### 2.3 Marquages

Les cerveaux sont sectionnés à une épaisseur de 50µm au microtome puis les coupes sont montées sur lame avec de la gélatine. Après séchage à l'air libre pendant 24 heures, les lames vont être déshydratées et dégraissées dans des bains successifs d'éthanol 70°, 95°, 100° et de xylène. Les lames vont être ensuite réhydratées dans des bains d'éthanol de concentration décroissante avant d'être plongées dans le colorant de Nissl (solution de Crésyl Violet). Les lames sont ensuite à nouveau déshydratées et immergées dans un bain de xylène. Le montage se fera dans du milieu Eukitt®.

Pour l'immunomarquage, des coupes de 40µm sont réalisées au cryostat, et récupérés dans des puits avec du PBS 0,1M. Lors du marquage, les coupes sont incubées 1 heure à température ambiante dans un sérum de blocage (PBS, Sérum de chèvre 5%, BSA 3%, Triton 0.2%), puis incubées dans 500µl de solution de blocage avec les anticorps pendant une nuit à 4°C avec agitation. Le lendemain, les coupes sont rincées dans la solution de blocage diluée, incubées 1h45 avec l'anticorps secondaire dans le noir à température ambiante, puis 10 minutes avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), sous agitation. Les lames sont à nouveau rincées dans la solution précédente, et sont montées dans du milieu de montage Mowiol ou FluoroMount-G.

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : Anti-MuSK (polyclonal de lapin, ABS549, Millipore-Merck), Anti-NeuN (polyclonal de lapin, ab104225, Abcam), Anti-GFAP (polyclonal de souris, MAB360, Millipore-Merck). Pour les anticorps secondaires, les suivants ont été utilisés : Anti-rabbit-AlexaFluor®488 (polyclonal de chèvre, A11008, InVitroGen), Anti-mouse-Cy3 (polyclonal de

chèvre, 115-165-003, Jackson ImmunoResearch).

## **2.4 Acquisition d'images et Statistiques**

Les images ont été prises avec un microscope Epifluo Nikon Eclipse TE-2000E équipé d'une caméra Photometrics CoolSNAP HQ2 (Fluorescence) et d'une caméra Qimaging Color Retiga 2000R (Lumière blanche). Les images ont été traitées sur le logiciel ImageJ [21].

## **Chapitre 3: Résultats**

## **Chapitre 4: Discussion**

## **Chapitre 5: Conclusion**

## Références

- [1] H. WU, W.-C. XIONG et L. MEI. (2010). To build a synapse : signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development*. **137**, 1017–1033. PMID : [20215342](#).
- [2] L. R. GORDON, K. D. GRIBBLE, C. M. SYRETT et M. GRANATO. (2012). Initiation of synapse formation by Wnt-induced MuSK endocytosis. *Development*. **139**, 1023–1033. PMID : [22318632](#).
- [3] J. R. SANES et J. W. LICHTMAN. (1999). Development of the Vertebrate Neuromuscular Junction. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 389–442. PMID : [10202544](#).
- [4] T. M. DECHIARA, D. C. BOWEN, D. M. VALENZUELA et al. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell*. **85**, 501–512. PMID : [8653786](#).
- [5] D. J. GLASS, D. C. BOWEN, T. N. STITT et al. (1996). Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell*. **85**, 513–523. PMID : [8653787](#).
- [6] B. ZHANG, S. LUO, Q. WANG, T. SUZUKI, W.-C. XIONG et L. MEI. (2008). LRP4 Serves as a Coreceptor of Agrin. *Neuron*. **60**, 285–297. PMID : [18957220](#).
- [7] N. KIM, A. L. STIEGLER, T. O. CAMERON, P. T. HALLOCK, A. M. GOMEZ, J. H. HUANG, S. R. HUBBARD, M. L. DUSTIN et S. J. BURDEN. (2008). Lrp4 Is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK. *Cell*. **135**, 334–342. PMID : [18848351](#).
- [8] Y. ZONG, B. ZHANG, S. GU et al. (2012). Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling. *Genes Dev.* **26**, 247–258. PMID : [22302937](#).
- [9] W. ZHANG, A. S. COLDEFY, S. R. HUBBARD et S. J. BURDEN. (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). *J. Biol. Chem.* **286**, 40624–40630. PMID : [21969364](#).
- [10] A. GARCIA-OSTA, P. TSOKAS, G. POLLONINI, E. M. LANDAU, R. BLITZER et C. M. ALBERINI. (2006). MuSK Expressed in the Brain Mediates Cholinergic Responses, Synaptic Plasticity, and Memory Formation. *J. Neurosci.* **26**, 7919–7932. PMID : [16870737](#).
- [11] I. KSIAZEK, C. BURKHARDT, S. LIN et al. (2007). Synapse loss in cortex of agrin-deficient mice after genetic rescue of perinatal death. *J. Neurosci.* **27**, 7183–95. PMID : [17611272](#).
- [12] J. R. MILLER. (2002). The Wnts. *Genome Biol.* **3**. PMID : [11806834](#).
- [13] K. WILLERT et R. NUSSE. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**. PMID : [22952392](#).
- [14] A. C. HALL, F. R. LUCAS et P. C. SALINAS. (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell*. **100**, 525–535. PMID : [10721990](#).
- [15] L. STROCHLIC, J. FALK, E. GOILLOT et al. (2012). Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction. *PLoS One*. **7**, e29976. PMID : [22253844](#).
- [16] B. ZHANG, C. LIANG, R. BATES, Y. YIN, W.-C. XIONG et L. MEI. (2012). Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *Mol. Brain*. **5**, 7. PMID : [22309736](#).
- [17] A. BARIK, B. ZHANG, G. S. SOHAL, W.-C. XIONG et L. MEI. (2014). Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction. *Dev. Neurobiol.* **74**, 828–838. PMID : [24838312](#).
- [18] L. JING, J. L. LEFEBVRE, L. R. GORDON et M. GRANATO. (2009). Wnt Signals Organize Synaptic Prepattern and Axon Guidance through the Zebrafish unplugged/MuSK Receptor. *Neuron*. **61**, 721–733. PMID : [19285469](#).
- [19] J. MESSÉANT, A. DOBBERTIN, E. GIRARD et al. (2015). MuSK Frizzled-Like Domain Is Critical for Mammalian Neuromuscular Junction Formation and Maintenance. *J. Neurosci.* **35**, 4926–4941. PMID : [25810523](#).
- [20] J. MESSÉANT, J. EZAN, P. DELERS et al. (2017). Wnt proteins contribute to neuromuscular junction formation through distinct signaling pathways. *Development*. **144**, 1712–1724. PMID : [28348167](#).

- [21] C. A. SCHNEIDER, W. S. RASBAND et K. W. ELICEIRI. (2012). NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* **9**, 671–675. PMID : [22930834](#).