



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

Remerciement

Table des matières

1	Introduction	2
1.1	Formation de la synapse	2
1.2	Récepteur MuSK	3
1.3	Protéines Wnt	3
1.4	But du stage	4
2	Matériel et Méthodes	5
2.1	Animaux et Prélèvements	5
2.2	qPCR	5
2.3	Marquages	5
2.4	Acquisition d'images et Statistiques	6
3	Résultats	7
4	Discussion	8
5	Conclusion	9
	Abbréviations	10
	Références	11

Chapitre 1: Introduction

1.1 Formation de la synapse

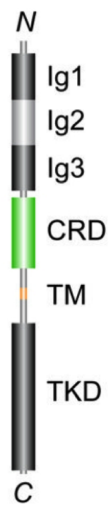
La formation de synapses, ou synaptogenèse, consiste en un rapprochement d'un élément pré-synaptique, le cône de croissance de l'axone, et d'un élément post-synaptique, généralement les dendrites d'un neurone, mais pouvant également être un muscle dans le cas de Jonction Neuro-Musculaire (JNM). Bien 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.

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* (RACHs) 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.

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 RACHs [8].

1.2 Récepteur MuSK



Cours C. LEGAY

Figure 1.
Récep-
teur
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 1).

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)). *Wingless-related Integration Site* (Wnt)2, 3a, 4, 6, 7b, 9a, et 11 [10].

MuSK possède trois ligand connu : l'Agrine (via LRP4), l'*Acetylcholinesterase-Associated Collagen* (ColQ) et les Wnt, 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 [11], [12]. 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 *cAMP Response Element-Binding Protein* (CREB) : l'absence de MuSK va empêché la phosphorylation CREB. De plus, MuSK est nécessaire à la formation de la Potentialisation à Long Terme (LTP) de l'hippocampe [11].

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 [13], [14]. 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 montrer que les Wnts étaient également impliqués dans la formation de la JNM [15]. On connaît actuellement 19 membres de cette famille chez la souris et chez l'humain. Classiquement, les Wnts se lie sur le récepteur *Frizzled* (Fz) avec les co-récepteur LRP5/6. Mais il existe d'autres récepteurs tels que : *Retinoic Acide Receptor-Related Oprhan Receptor* (ROR), *Récepteur Tyrosine Kinase* (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 [16]–[18], avec différents effets. Seules Wnt4, 9a et 11 vont conduire à une dimérisation de MuSK et à 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 Wnt pour induire l'agrégation de RACHs [2], [19]. De plus, LRP4 semble être également nécessaire à l'agrégation des RACHs médié par les Wnts [17].

Les protéines Wnt vont activer plusieurs voies de signalisation différentes dans la cellule : [la](#) a continuer

voie canonique/ β -catenin, la voie *Planar Cell Polarity* (PCP), et la voie Wnt/Calcium.

1.4 But du stage

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

2.1 Animaux et Prélèvements

Les souris utilisées sont issues d'une lignée hétérozygote issue d'une fond génétique C57BL/6 mixte [20], [21]. Les souris mutantes MuSK Δ 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 retiré 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 droits et gauches sont prélevés du cerveau et immédiatement plongés dans 800 μ l de TRIzol, broyés mécaniquement puis stockés à -20°C. L'extraction de l'Acide Ribonucléique (ARN) se fait grâce au RNeasy Protect Mini Kit de Qiagen®. Le traitement DNase, puis la Real Time PCR (RT-PCR), se font grâce au RT² 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.

Origine, acronyme

Comment ?

2.3 Marquages

Les cerveaux sont sectionnés à une épaisseur de 50 μ m au microtome. Une coloration de Nissl est réalisée sur une coupe sur 3, montée sur lame avec de la gélatine. Après séchage à l'air libre pendant 24 heures, les lames vont être déshydratées et dégraissées avec des bains successifs dans de l'éthanol 70°, 95°, 100° et de xylène. Les lames vont être ensuite réhydratées avec 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, une coupe sur 6 centrée sur l'hippocampe est choisie. Les coupes flottantes sont incubés 1 heure à températures ambiante dans un sérum de blocage (Phosphate Buffered Saline (PBS), Sérum de chèvre 5%, Bovine Serum Albumin (BSA) 3%, Triton 0.2%), puis sont incubés dans 500 μ l de solutions de blocage avec anticorps pendant une nuit à 4°C avec agitation. Le lendemain, les coupes sont rincées 3 fois 7 minutes dans une solution de rinçage/blocage (PBS, BSA 2,5 μ g/ μ l et Triton 1,5%), puis incubés 1h45 avec l'anticorps secondaire dans le noir à température ambiante, puis 10 minutes avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), avec agitation. Les lames sont à nouveau rincées 3 fois 7 minutes dans la solution précédente. Les lames sont montés dans du milieu de montage Mowiol.

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 pris avec une 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 données ont été mesurées sur images grâce au logiciel ImageJ [22].

Chapitre 3: Résultats

Chapitre 4: Discussion

Chapitre 5: Conclusion

Abbreviations

Ac	Anticorps
ACh	Acétylcholine
ARN	Acide Ribonucléique
BSA	Bovine Serum Albumin
ColQ	<i>Acetylcholinesterase-Associated Collagen</i>
CRD	<i>Cysteine-Rich Domain</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
Fz	<i>Frizzled</i>
HIS	Hybridation <i>In Situ</i>
Ig	Immunoglobuline
JNM	Jonction Neuro-Musculaire
LRP4	<i>Low density lipoprotein Receptor-related Protein 4</i>
LTP	Potentialisation à Long Terme
MuSK	<i>Muscle-Specific Kinase</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCP	<i>Planar Cell Polarity</i>
PFA	Paraformaldéhyde
PSMD13	<i>Proteasome 26S subunit, non-ATPase 13</i>
qPCR	Quantitative PCR
RACHs	<i>Recepteurs à l'Acétylcholine</i>
ROR	<i>Retinoic Acide Receptor-Related Orphan Receptor</i>
RT-PCR	Real Time PCR
RYK	<i>Récepteur Tyrosine Kinase</i>
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
Wnt	<i>Wingless-related Integration Site</i>
WT	Wild Type

Références

- [1] H. WU, W.-C. XIONG et L. MEI, « To build a synapse : signaling pathways in neuromuscular junction assembly, » *Development*, t. 137, n° 7, p. 1017–1033, (2010).
- [2] L. R. GORDON, K. D. GRIBBLE, C. M. SYRETT et M. GRANATO, « Initiation of synapse formation by Wnt-induced MuSK endocytosis, » *Development*, t. 139, n° 5, p. 1023–1033, (2012).
- [3] J. R. SANES et J. W. LICHTMAN, « Development of the Vertebrate Neuromuscular Junction, » *Annual Review of Neuroscience*, t. 22, n° 1, p. 389–442, (1999).
- [4] T. M. DECHIARA, D. C. BOWEN, D. M. VALENZUELA et al., « The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo., » *Cell*, t. 85, n° 4, p. 501–512, (1996).
- [5] D. J. GLASS, D. C. BOWEN, T. N. STITT et al., « Agrin acts via a MuSK receptor complex, » *Cell*, t. 85, n° 4, p. 513–523, (1996).
- [6] B. ZHANG, S. LUO, Q. WANG, T. SUZUKI, W.-C. XIONG et L. MEI, « LRP4 Serves as a Coreceptor of Agrin, » *Neuron*, t. 60, n° 2, p. 285–297, (2008).
- [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, « Lrp4 Is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK, » *Cell*, t. 135, n° 2, p. 334–342, (2008).
- [8] Y. ZONG, B. ZHANG, S. GU et al., « Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling, » *Genes and Development*, t. 26, n° 3, p. 247–258, (2012).
- [9] W. ZHANG, A. S. COLDEFY, S. R. HUBBARD et S. J. BURDEN, « 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), » *Journal of Biological Chemistry*, t. 286, n° 47, p. 40 624–40 630, (2011).
- [10] A. L. STIEGLER, S. J. BURDEN et S. R. HUBBARD, « Crystal Structure of the Frizzled-Like Cysteine-Rich Domain of the Receptor Tyrosine Kinase MuSK, » *Journal of Molecular Biology*, t. 393, n° 1, p. 1–9, (2009).
- [11] A. GARCIA-OSTA, P. TSOKAS, G. POLLONINI, E. M. LANDAU, R. BLITZER et C. M. ALBERINI, « MuSK Expressed in the Brain Mediates Cholinergic Responses, Synaptic Plasticity, and Memory Formation, » *Journal of Neuroscience*, t. 26, n° 30, p. 7919–7932, (2006).
- [12] I. KSIAZEK, C. BURKHARDT, S. LIN et al., « Synapse loss in cortex of agrin-deficient mice after genetic rescue of perinatal death., » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, t. 27, n° 27, p. 7183–95, (2007).
- [13] J. R. MILLER, « The Wnts., » *Genome biology*, t. 3, n° 1, REVIEWS3001, (2002).
- [14] K. WILLERT et R. NUSSE, « Wnt proteins., » *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, t. 4, n° 9, (2012).
- [15] A. C. HALL, F. R. LUCAS et P. C. SALINAS, « Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling, » *Cell*, t. 100, n° 5, p. 525–535, (2000).
- [16] L. STROCHLIC, J. FALK, E. GOILLOT et al., « Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction, » *PLoS ONE*, t. 7, n° 1, e29976, (2012).
- [17] B. ZHANG, C. LIANG, R. BATES, Y. YIN, W.-C. XIONG et L. MEI, « Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells, » *Molecular Brain*, t. 5, n° 1, p. 7, (2012).

- [18] A. BARIK, B. ZHANG, G. S. SOHAL, W.-C. XIONG et L. MEI, « Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction, » *Developmental Neurobiology*, t. 74, n° 8, p. 828–838, (2014).
- [19] L. JING, J. L. LEFEBVRE, L. R. GORDON et M. GRANATO, « Wnt Signals Organize Synaptic Prepatterning and Axon Guidance through the Zebrafish unplugged/MuSK Receptor, » *Neuron*, t. 61, n° 5, p. 721–733, (2009).
- [20] J. MESSÉANT, A. DOBBERTIN, E. GIRARD et al., « MuSK Frizzled-Like Domain Is Critical for Mammalian Neuromuscular Junction Formation and Maintenance, » *Journal of Neuroscience*, t. 35, n° 12, p. 4926–4941, (2015).
- [21] J. MESSÉANT, J. EZAN, P. DELERS et al., « Wnt proteins contribute to neuromuscular junction formation through distinct signaling pathways, » *Development*, t. 144, n° 9, p. 1712–1724, (2017).
- [22] C. A. SCHNEIDER, W. S. RASBAND et K. W. ELICEIRI, « NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis., » *Nature methods*, t. 9, n° 7, p. 671–675, (2012).