

**Développement
et vieillissement**

**Tout ce que vous avez toujours
voulu savoir
sur la jonction neuromusculaire...**

La synapse est une structure de communication hautement spécialisée connectant les neurones essentiellement entre eux mais également à d'autres types cellulaires. La jonction neuromusculaire, seul contact entre neurones moteurs et muscle, constitue une des synapses les plus étudiées. On peut schématiquement la diviser en trois compartiments (figure 1): (1) la terminaison présynaptique contenant notamment des vésicules spécialisées capables de libérer des neurotransmetteurs comme l'acétylcholine dans la fente synaptique; (2) la fente synaptique qui est constituée d'une matrice extracellulaire composée, notamment, de glycoprotéines, de glycosami-

noglycanes et protéoglycanes et dont une des fonctions essentielles est d'assurer un stockage d'information des molécules sécrétées par le nerf et par le muscle et donc de permettre la communication entre ces deux cellules; (3) enfin, la membrane postsynaptique qui est constituée de replis membranaires organisés contenant une accumulation de canaux: récepteurs nicotiques de l'acétylcholine et canaux sodiques dépendants du potentiel.

Formation de la jonction neuromusculaire

Deux types de signaux dérivés du nerf sont indispensables à la forma-

tion d'une jonction neuromusculaire: (1) l'induction par l'agrine d'une redistribution spécifiquement sous la synapse de molécules qui sont normalement localisées sur toute la surface du muscle, et notamment le recrutement du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (AChR) qui est alors agrégé avec d'autres composants comme la rapsyne, l'acétylcholinestérase ou les héparane sulfate protéoglycanes; (2) l'induction par les hérégulines ou ARIA (*acetylcholine receptor inducing activity*) d'une transcription spécifique restreinte aux noyaux sous-synaptiques du muscle qui, rappelons-le, est un tissu multinucléé, de gènes codant pour les sous-unités du récepteur de l'acétylcholine et d'autres protéines synaptiques.

Lorsque les constituants du puzzle de cette spécialisation membranaire ont été mis en place, l'agrine est d'emblée apparue comme un élément important pour l'accumulation des AChR à la jonction neuromusculaire. Il s'agit d'une protéine fortement glycosylée, isolée dans les années 1980 à partir de l'organe électrique de torpille, constitué d'électrocytes dont l'une des faces est une sorte de superjonction neuromusculaire. Son domaine carboxy-terminal est capable d'induire l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine *ex vivo*, en culture cellulaire. Cinq formes issues d'épissages alternatifs modulent probablement la fonction de cette protéine. Les agrines ayant, par exemple, une insertion de 8 acides aminés en une position déterminée appelée Z, sont exprimées par le motoneuron et possèdent une activité 10 000 fois supérieure pour l'induction de l'agrégation des AChR

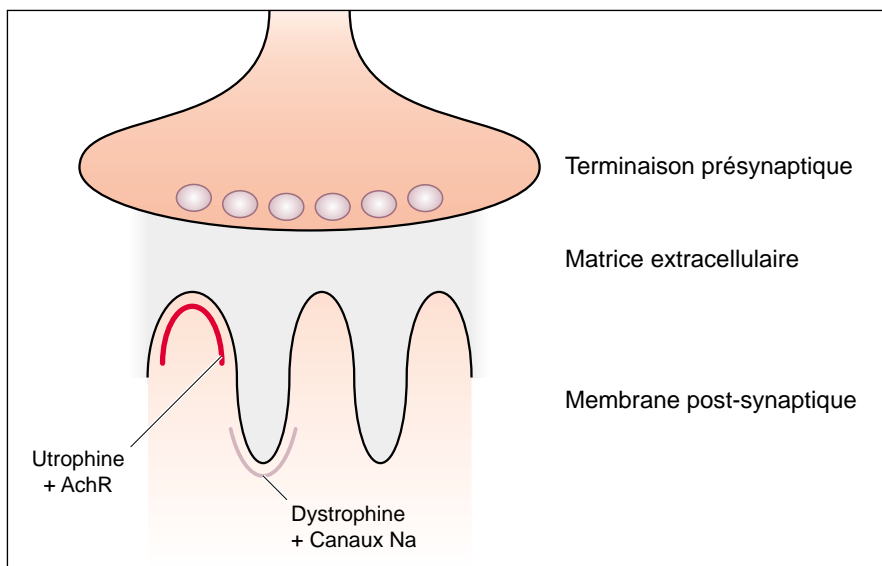


Figure 1. Représentation schématique de la jonction neuromusculaire avec la terminaison présynaptique et ses vésicules contenant des neurotransmetteurs, la matrice extracellulaire et la membrane post-synaptique. La localisation de l'utrophine et de son complexe, et de la dystrophine et de son complexe, est mentionnée sur les replis de la membrane postsynaptique.

aux formes qui en sont dépourvues, et notamment aux formes non neuronales. Cette agrégation est concomitante de la phosphorylation de la sous-unité β des AchR, mettant donc en jeu des tyrosine-kinases.

Le récepteur de l'agrine

L'agrine est longtemps restée orpheline de récepteur jusqu'à la mise en évidence d'un membre du complexe de protéines associées à la dystroglycane qui est co-localisé avec elle : l' α -dystroglycane (*m/s n° 10, vol. 10, p. 1042*). Cette protéine extracellulaire est en effet capable de lier directement la laminine ainsi que le domaine de type laminine de l'agrine *ex vivo* [1-4]. Il était alors tentant de supposer qu'on disposait là du récepteur physiologique de l'agrine. Cependant, différents arguments sont rapidement venus infirmer cette hypothèse. En effet, un fragment carboxy-terminal incapable de lier l' α -dystroglycane purifiée conserve sa capacité d'induire l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine dans des myotubes de poulet. *A contrario*, un mutant incapable d'agrégation ces récepteurs mais liant toujours l' α -dystroglycane a pu être construit. Par conséquent, l' α -dystroglycane fait peut-être partie du complexe liant l'agrine à son récepteur mais elle n'est pas indispensable à la formation de ce complexe. C'est encore la puissance de l'outil d'inactivation génique qui a permis d'identifier un récepteur de ce ligand, ou du moins une partie de celui-ci, par la similitude des phénotypes observés entre le *knock out* du gène de l'agrine et celui du gène d'un récepteur tyrosine-kinase appelé MuSK (pour *muscle-specific kinase*). La protéine MuSK est localisée au niveau synaptique mais, après dénervation, on la retrouve aussi en dehors de la synapse. Les souris *MuSK*^{-/-} comme les souris *agrine*^{-/-} meurent à la naissance par incapacité de respirer du fait de l'absence de jonction neuromusculaire, notamment dans le diaphragme (*m/s n° 8/9, vol. 12, p. 1003*). Chez la souris *MuSK*^{-/-}, il n'existe ni différenciation présynaptique ni différenciation postsynaptique [5-7]. Chez la souris *agrine*^{-/-}, de petits regroupements de récepteurs de l'acétylcholine ont

pu être observés mais ceux-ci sont moins nombreux et ne sont pas associés aux terminaisons nerveuses. L'absence de spécialisation terminale présynaptique des neurones moteurs était assez inattendue mais elle est sans doute le reflet du défaut de signaux rétrogrades, ceux-ci n'ayant pu être fournis du fait de l'absence de formation synaptique. Il fut cependant impossible de démontrer la liaison directe d'agrine marquée à la protéine MuSK purifiée alors qu'*ex vivo*, sur des myotubes en culture, la liaison était clairement démontrée. Il est alors apparu vraisemblable qu'une protéine accessoire soit impliquée dans cette liaison et que MuSK ne représente qu'une partie d'un récepteur multimérique. Cette protéine a été appelée MASC pour *muscle accessory specific component*. La nécessité d'un facteur accessoire rappelle la situation d'un autre récepteur tyrosine-kinase, la protéine Ret, qui requiert un troisième partenaire pour se lier et être activée par le GDNF [8-10] (*glial cell line-derived neurotrophic factor*). Le traitement par l'agrine d'une culture de myotubes induit l'activation de MuSK ainsi que la phosphorylation transitoire de la sous-unité β de l'AChR qui est indispensable à leur agrégation. Dans des myotubes murins en culture, la protéine MuSK est associée aux AChR, même en l'absence d'agrine, mais elle est rapidement phosphorylée après ajout d'agrine neurale. Le domaine-kinase du récepteur MuSK est insuffisant pour assurer le rassemblement des AChR [11] qui requiert en fait l'ectodomaine, ce qui fait de cette protéine un récepteur tyrosine-kinase très particulier puisque son activité-kinase ne suffit pas à rendre compte de toute son activité biologique. Parmi les membres impliqués dans l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine figure également la rapsyne, protéine de 43 kDa exclusivement localisée à la jonction neuromusculaire, co-localisée avec le récepteur de l'acétylcholine et capable d'induire l'accumulation de ces AChR indépendamment de l'agrine [12]. Les souris dépourvues de rapsyne par invalidation de leur gène ne présentent, en effet, aucun agrégat de récepteurs alors que MuSK est normalement présente et

regroupée au niveau de la membrane postsynaptique, suggérant que cette dernière agit en amont dans la cascade d'événements impliqués dans la synaptogenèse (*m/s n° 12, vol. 11, p. 1741*) [13]. Chez ces mutants, la différenciation présynaptique est tout à fait normale et la transcription spécifiquement synaptique subsiste. L'ectodomaine de MuSK est nécessaire et suffisant pour son association à la rapsyne, ce qui suggère, puisque la rapsyne est une protéine associée à la face cytoplasmique de la membrane postsynaptique, l'existence d'une protéine transmembranaire capable de faire le lien entre MuSK à l'extérieur de la cellule et rapsyne à l'intérieur. En attendant d'être isolée, cette protéine a été appelée RATL pour *rapsyne associated transmembrane linker* (figure 2).

La jonction neuromusculaire : un puzzle

Comment ces différents éléments s'articulent-ils au cours de la formation de la synapse ? Si l'on tente d'établir un modèle (figure 2), on pourrait imaginer que l'agrine lie le complexe MuSK/MASC, induisant le rassemblement des MuSK à la membrane postsynaptique et activant le complexe. Ainsi un premier réseau serait formé sur lequel viendrait se fixer la rapsyne capable alors de recruter d'autres composants postsynaptiques comme les récepteurs de l'acétylcholine, les dystroglycane et le complexe liant l'utrophine. Le premier réseau serait en réalité suffisant pour assurer la transcription spécifique des noyaux sous-synaptiques ainsi que la promotion de signaux rétrogrades comme l'arrêt de croissance axonale et la différenciation terminale présynaptique [14]. Cependant, il reste des pièces qui n'ont pas encore trouvé de place dans le puzzle de la jonction neuromusculaire. En effet, il était connu de longue date que l'agrine est présente dans le muscle avant l'innervation et que cette forme musculaire se trouve co-localisée avec les agrégats d'AChR dans le muscle en développement, en l'absence de motoneurons. En étudiant la différenciation de l'organe électrique de torpille, on a proposé que l'agrine non neuronale

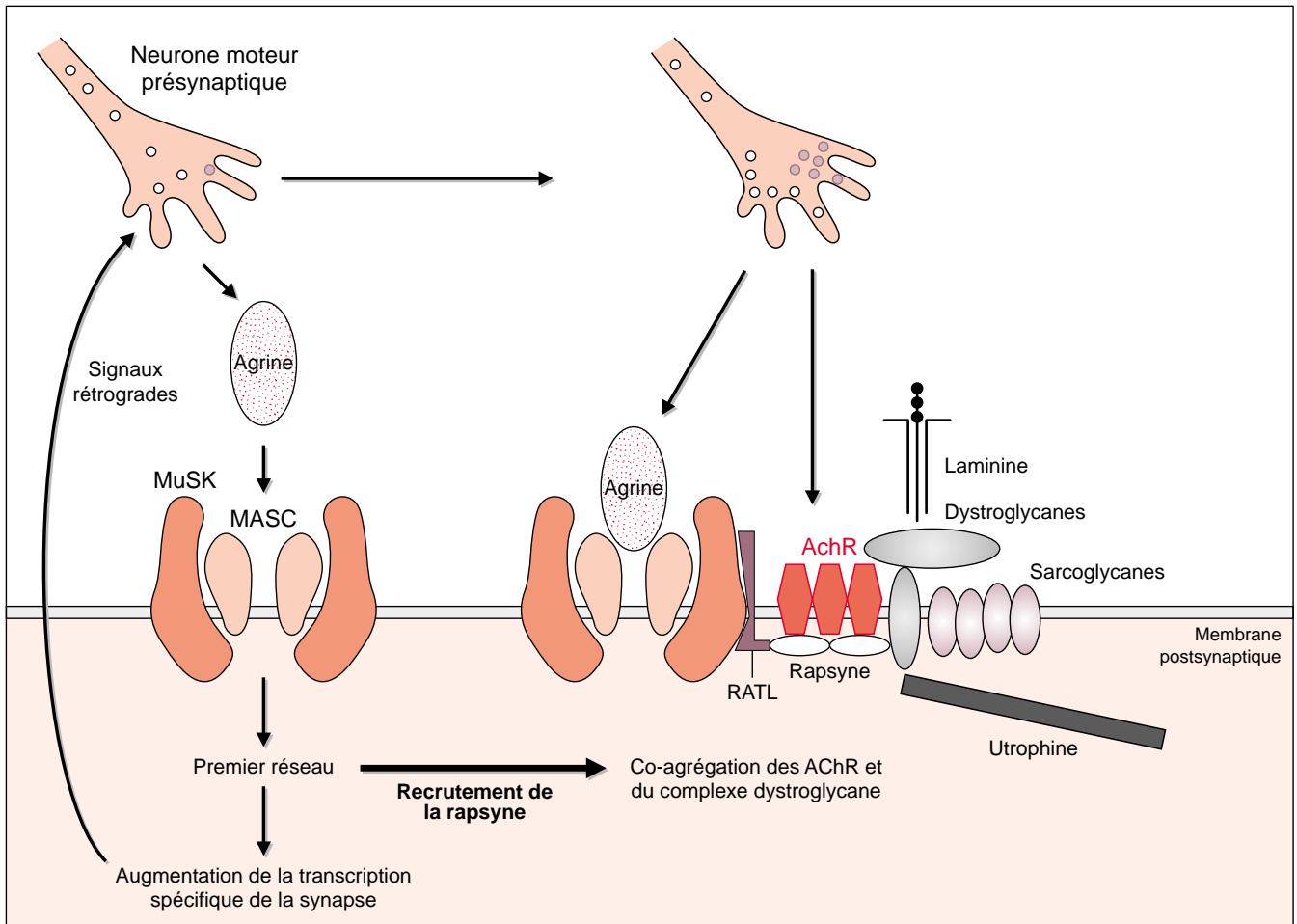


Figure 2. **Représentation schématique des rôles joués par les protéines de la jonction neuromusculaire dans la synaptogenèse.** (D'après [14].) En réponse à une stimulation par l'agrine, MuSK active une cascade de signalisation. Ce premier réseau est suffisant pour assurer la transcription spécifique sous-synaptique ainsi que la différenciation pré-synaptique. Des signaux rétrogrades sont émis pour induire l'arrêt de la croissance et la maturation axonale. L'agrine requiert le facteur MASC pour se lier et activer MuSK qui se lie à la rapsyne probablement par un intermédiaire membranaire, RATL. Par la suite la rapsyne est requise et recrute d'autres composants de la membrane postsynaptique comme notamment les récepteurs de l'acétylcholine, la β -dystroglycane et tout le complexe protéique lié à l'utrophine (dystroglycannes, sarcoglycannes).

jouerait également un rôle important dans cet échafaudage membranaire et que l'agrine neurale ne serait requise qu'après innervation intervenant alors dans la maturation et la stabilisation de cet assemblage moléculaire [15]. Plus récemment, il a été montré que la laminine de type 1 induit également le rassemblement des AChR par une voie qui semble différente de celle de MuSK puisque active même dans des myotubes *MuSK*^{-/-} en culture [16]. Toutefois, la laminine ne saurait remplacer le système agrine/rapsyne/MuSK, ainsi qu'en témoigne le phénotype des

souris *MuSK*^{-/-} mais elle pourrait néanmoins accroître la taille ou maintenir l'organisation des agrégats d'AChR induits par l'agrine. La laminine, dont il existe de nombreuses isoformes, est également capable d'entraîner le rassemblement de l' α -dystroglycane [17]. Le rôle joué par tout le complexe de protéines associé à la dystrophine (DAP), ou à son homologue spécialisé dans la jonction neuromusculaire, l'utrophine (*m/s* n° 10, vol. 7, p. 1090) qui, comme tant d'autres gènes, subit une régulation transcriptionnelle spécifique sous-synaptique [18], est

encore totalement incompris. Ni l'invalidation du gène de l' α -dystroglycane, qui est précocement létale au cours de l'embryogenèse du fait de son rôle au cours de l'implantation de l'œuf (*m/s* n° 10, vol. 13, p. 1187), ni de celui de l'utrophine, qui n'aboutit qu'à une diminution du nombre de replis de la membrane postsynaptique (*m/s* n° 12, vol. 13, p. 1483), n'ont permis de compléter ce schéma. Cependant, certains travaux permettent d'entrevoir un ou plutôt des liens étroits entre ces deux grands systèmes agrine/MuSK/rapsyne, d'une part, et complexe DAP,

d'autre part. En effet, la dystrophine, est localisée au niveau des cryptes de la membrane postsynaptique, tout comme les canaux sodiques dépendants du potentiel. Or, il a été récemment montré que ces derniers s'agrégeaient sous la dépendance d'une isoforme de l'agrine [19]. D'autre part, le groupe de J. Cartaud a montré, par des expériences menées à la fois *in vitro* et *in situ*, la liaison entre la queue cytoplasmique de la β -dystroglycane et la rapsyne. Voici donc quelques éléments supplémentaires pour compléter ce schéma de la jonction neuromusculaire. Il manque encore quelques clés mais les éléments connus ont, néanmoins, le mérite de révéler le jeu complexe joué par la rapsyne et par MuSK, tant sur le plan structural que fonctionnel, dans la cascade de signalisation nécessaire pour le rassemblement des récepteurs de l'acétylcholine ■

RÉFÉRENCES

1. Bowe MA, Deyst KA, Leszyk JD, Fallon JR. Identification and purification of an agrin receptor from torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron* 1994; 12: 1173-80.
2. Gee SH, Montanaro F, Lindenbaum MH, Carbonetto S. Dystroglycan-alpha, a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell* 1994; 77: 675-86.
3. Campanelli JT, Roberds ST, Campbell KP, Scheller RH. Role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell* 1994; 77: 663-74.
4. Sugiyama J, Bowen DC, Hall ZW. Dystroglycan binds nerve and muscle agrin. *Neuron* 1994; 13: 103-15.
5. DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation *in vivo*. *Cell* 1996; 85: 501-12.
6. Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattson K, Burden SJ. Agrin acts *via* a MuSK receptor complex. *Cell* 1996; 85: 513-23.
7. Gautram M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, Sanes JR. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 1996; 85: 525-35.
8. Treanor J, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996; 382: 80-3.
9. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst P, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996; 85: 1113-23.
10. Chappuis S, Geneste O, Pasini P, Lenoir G, Billaud B. RET et GDNF: un récepteur orphelin trouve une famille nourricière. *Med Sci* 1996; 12: 1408-13.
11. Apel ED, Roberds SL, Campbell KP, Merlie JP. Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. *Neuron* 1995; 15: 115-26.
12. Apel ED, Glass DJ, Moscoso LM, Yancopoulos GD, Sanes JR. Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron* 1997; 18: 623-35.
13. Glass DJ, Apel ED, Shah S, Bowen DC, DeChiara TM, Stitt TN, Sanes JR, Yancopoulos GD. Kinase domain of the muscle-specific receptor tyrosine kinase is sufficient for phosphorylation but not clustering of acetylcholine receptors: required role for MuSK ectodomain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 16: 8848-53.
14. Glass DJ, Yancopoulos GD. Sequential roles of agrin, MuSK and rapsyn during neuromuscular junction formation. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 379-84.
15. Sugiyama JE, Glass DJ, Yancopoulos GD, Hall ZW. Laminin-induced acetylcholine receptor clustering: an alternative pathway. *J Cell Biol* 1997; 139: 181-91.
16. Cohen MW, Jacobson C, Yurchenco PD, Morris GE, Carbonetto S. Laminin-induced clustering of dystroglycan. *J Cell Biol* 1997; 136: 1047-58.
17. Cartaud A, Ludosky MA, Haasemann M, Jung D, Campbell K, Cartaud J. Non neural agrin codistributes with acetylcholine receptors during early differentiation of Torpedo electrocytes. *J Cell Sci* 1996; 109: 1837-46.
18. Gramolini AO, Dennis CL, Tinsley JM, Robertson GS, Cartaud J, Davies KE, Jasmin BJ. Local transcription control of utrophin expression at the neuromuscular synapses. *J Biol Chem* 1997; 272: 8117-20.
19. Sharp AA, Caldwell JH. Aggregation of sodium channels induced by postnatally upregulated isoform of agrin. *J Neurosci* 1996; 16: 6775-83.

Hélène Gilgenkrantz

Chargée de recherche à l'Inserm, Inserm U. 129, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

Jean Cartaud

Directeur de recherche au Cnrs, Institut Jacques-Monod, 2, place Jussieu, 75005 Paris, France.

TIRÉS À PART

H. Gilgenkrantz.

Deuxième conférence Louis Pasteur sur les maladies infectieuses SIGNAUX MOLÉCULAIRES ET MALADIES INFECTIEUSES 8-10 octobre 1988 • Institut Pasteur, Paris, France

La conférence portera sur la pathogénie des maladies infectieuses (parasites, bactéries, virus) dans le cadre des développements récents en biologie cellulaire. L'accent sera placé sur les voies de signalisation intracellulaires et les signaux solubles produits par les microbes et leurs hôtes

Organisateurs
Organizers

J.L. Virelizier
(Institut Pasteur, coordinateur)
R.R. Kiberg
K. Joiner
(Yale University)

S. Pellegrin
(Institut Pasteur)

INSTITUT PASTEUR
Centre d'Information Scientifique
28, rue du Docteur-Roux
75015 Paris, France

Conférence inaugurale : Peter C. Doherty (États-Unis)

Signalisation et invasion par les micro-organismes (adhésion, entrée, fusion, événements précoces)

Norma Andrews (États-Unis), Joan Brugge (États-Unis), Pascale Cossart (France), Jorge E. Calan (États-Unis), Keith Joiner (États-Unis), Dan Littman (États-Unis), Robert Menard (États-Unis), Philippe Samsonetti (France), John Skehel (Royaume-Uni).

Vie et mort des cellules infectées (immortalisation, apoptose, transmission des signaux, influences réciproques sur la survie)

Guy Cornelis (Belgique), Michael Donnenberg (États-Unis), Paul Farrell (Royaume-Uni), Alan Hall (Royaume-Uni), Gordon Langley (France), Thomas Meyer (Allemagne), David Russel (USA), Jürg Tschopp (Suisse), Samuel Toreo (États-Unis).

Signaux solubles (cytokines, chimiokines, récepteurs solubles, leurres, mécanismes de protection et d'échappement)

Fernando Arenzana (France), Marco Baggiolini (Suisse), James X. (États-Unis), David Sacks (États-Unis), Louis Scheffeld (Australie), Geoffrey Smith (Royaume-Uni)

Présentation des affiches sélectionnées

Conférences de clôture : Daniel Louvard (France), Stanley Falkow (États-Unis)