

Caractérisation physiopathologique des syndromes myasthéniques congénitaux : l'exemple de mutations dans le gène *MUSK*

par Frédéric Chevessier¹, Brice Faraut¹, Aymeric Ravel-Chapuis², Pascale Richard^{1,3}, Karen Gaudon^{1,3}, Stéphanie Bauché¹, Cassandra Prioleau¹, Ruth Herbst⁴, Evelyne Goillot², Christine Ioos¹, Jean-Philippe Azulay⁵, Shahram Attarian⁵, Jean-Paul Leroy^{1,6}, Emmanuel Fournier⁷, Claire Legay⁸, Laurent Schaeffer², Jeanine Koenig^{1,9}, Michel Fardeau¹, Bruno Eymard^{1,10}, Jean Pouget⁵ & Daniel Hantai¹

¹INSERM U582 & IFR 14, Institut de Myologie, Hôpital de la Salpêtrière et Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; ²CNRS/ENS UMR 5161 & IFR128, École Normale Supérieure, Lyon, France; ³Unité Fonctionnelle de Cardiogénétique et Myogénétique, Service de Biochimie B & IFR 14, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France; ⁴Brain Research Institute, Medical University Vienna, Vienne, Autriche; ⁵Service de Neurologie et Maladies Neuromusculaires, Hôpital Universitaire La Timone & IFR 131, Marseille, France; ⁶CHU Morvan, Brest, France; ⁷Service d'Electrophysiologie & IFR 70, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France; ⁸CNRS UMR 8544, École Normale Supérieure, Paris, France; ⁹Université Bordeaux II, Bordeaux, France; ¹⁰Fédération de Neurologie Mazarin & IFR 70, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France.

Correspondance : Dr. Daniel Hantai, INSERM U582, Institut de Myologie, Hôpital de la Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13. Tél. : 01 42 16 57 06. Fax : 01 42 16 57 00.

E-mail : d.hantai@myologie.chups.jussieu.fr

Reçu le 28 janvier 2005

RÉSUMÉ

Les syndromes myasthéniques congénitaux (SMC) sont des maladies génétiques rares affectant la jonction neuromusculaire (JNM) et caractérisés par un dysfonctionnement de la neurotransmission. Ils forment un ensemble hétérogène sur le plan physiopathologique et peuvent être classés en trois groupes selon leur origine : présynaptique, synaptique ou postsynaptique.

Nous rapportons ici pour la première fois que des mutations dans le gène codant pour une molécule postsynaptique, le récepteur tyrosine kinase spécifique du muscle, MuSK, sont responsables d'un SMC postsynaptique. L'analyse génétique a permis d'identifier deux mutations hétéroalléliques, une mutation entraînant un décalage du cadre de lecture (c.220insC) et une mutation faux-sens (V790M). La biopsie musculaire a montré des anomalies importantes à la fois

pré et postsynaptiques de la structure de la jonction neuromusculaire et une diminution sévère de l'expression de la sous-unité ϵ du récepteur de l'acétylcholine (RACH) et de MuSK.

Des expériences *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées en utilisant des mutants de MuSK reproduisant les mutations humaines. La mutation décalant le cadre de lecture conduit à l'absence de l'expression de MuSK. La mutation faux sens n'affecte pas l'activité catalytique kinase de MuSK mais diminue son expression et sa stabilité conduisant à une diminution de l'agrégation du RACH sous la dépendance de l'agraine.

Ces résultats suggèrent fortement que la mutation faux sens, en présence de la mutation nulle sur l'autre allèle, est responsable des modifications synaptiques très importantes observées chez le patient.

SUMMARY Pathophysiological characterization of congenital myasthenic syndromes: the example of mutations in the *MUSK* gene

Congenital myasthenic syndromes (CMS) are rare genetic diseases affecting the neuromuscular junction (NMJ) and are characterized by a dysfunction of the neurotransmission. They are heterogeneous at their pathophysiological level and can be classified in three

categories according to their presynaptic, synaptic and postsynaptic origins.

We report here the first case of a human neuromuscular transmission dysfunction due to mutations in the gene encoding a postsynaptic molecule, the

muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK). Gene analysis identified two heteroallelic mutations, a frameshift mutation (c.220insC) and a missense mutation (V790M). The muscle biopsy showed dramatic pre- and postsynaptic structural abnormalities of the neuromuscular junction and severe decrease in acetylcholine receptor (AChR) ϵ -subunit and MuSK expression.

In vitro and *in vivo* expression experiments were performed using mutant MuSK reproducing the human mutations. The frameshift mutation led to the absence of MuSK expression. The missense mutation did not affect MuSK catalytic kinase activity but

diminished expression and stability of MuSK leading to decreased agrin-dependent AChR aggregation, a critical step in the formation of the neuromuscular junction. In electroporated mouse muscle, overexpression of the missense mutation induced, within a week, a phenotype similar to the patient muscle biopsy: a severe decrease in synaptic AChR and an aberrant axonal outgrowth.

These results strongly suggest that the missense mutation, in the presence of a null mutation on the other allele, is responsible for the dramatic synaptic changes observed in the patient.

Les syndromes myasthéniques congénitaux (SMC) constituent un groupe hétérogène d'affections génétiques responsables d'un dysfonctionnement de la transmission neuromusculaire. Ce dysfonctionnement est à l'origine d'une faiblesse musculaire qui est accentuée par l'effort et débute le plus souvent dans la petite enfance. Les SMC sont bien moins fréquents que la myasthénie auto-immune et leur prévalence est estimée en Europe à 1:500.000. Le développement des connaissances concernant les SMC s'est considérablement accéléré dans les 25 dernières années, à la suite des nombreux travaux menés par le groupe d'Engel *et al.* (1977). Le déficit en acétylcholinestérase (AChE) fut le premier SMC caractérisé sur le plan physiopathologique sur la base d'une absence de cette enzyme au niveau des jonctions neuromusculaires (Engel *et al.*, 1977). Progressivement, l'hétérogénéité des SMC a été démontrée : à côté des SMC synaptiques par déficit en AChE, il a été décrit des SMC pré et postsynaptiques, ces derniers étant liés à un déficit quantitatif ou à une anomalie cinétique du récepteur de l'acétylcholine (RACH). Dans les 15 dernières années, de nombreuses mutations responsables de SMC ont été identifiées dans différents gènes, affectant les sous-unités α , β , δ , ϵ du RACH et la queue collagénique (ColQ) de l'AChE (Shilitto *et al.*, 1993 ; Engel *et al.*, 2003). Des mutations dans les gènes de la choline acétyltransférase (ChAT) (Ohno *et al.*, 2001), de la rapsyne (Ohno *et al.*, 2002), du canal sodique SCN4A (Tsujino *et al.*, 2003) et récemment de MuSK (Chevessier *et al.*, 2004) ont également été décrites. Plusieurs revues ont été dédiées aux SMC, les deux plus récentes étant celles du groupe de Engel (Engel *et al.*, 2003) ou celle de notre groupe (Hantai *et al.*, 2004) et la classification actuelle des SMC est résumée dans le tableau I.

MuSK est un récepteur tyrosine kinase spécifique du muscle squelettique nécessaire à la différenciation synaptique puisque les souris déficientes en MuSK meurent à la naissance de défaillance respiratoire due à une innervation musculaire aberrante et à l'absence de différenciation postsynaptique (Gautam *et al.*, 1996 ; DeChiara *et al.*, 1996). Le mécanisme de différenciation de la jonction neuromusculaire le mieux étudié est celui de l'agrégation des récepteurs d'acétylcholine sous la terminaison nerveuse. Tout d'abord, le nerf libère de l'agrine, un

protéoglycane à sulfates d'héparane, qui active MuSK. L'activation de MuSK conduit à la phosphorylation de la sous-unité β du RACH et entraîne l'agrégation des RACH par l'intermédiaire d'un effecteur cytoplasmique, la rapsyne (Glass *et al.*, 1996 ; Herbst & Burden, 1990 ; Sanes & Lichtman, 2001 ; Bezakova & Rugg, 2003). La synthèse des RACH à la JNM résulte de la compartimentation de leur transcription par les noyaux sous-synaptiques. C'est particulièrement le cas de la sous-unité adulte ϵ qui remplace la sous-unité embryonnaire γ dans le pentamère formé par le RACH (Sanes & Lichtman, 2001). MuSK induit également l'agrégation dans la membrane postsynaptique des récepteurs tyrosine kinase de la famille des ErbB qui sont activés par la neuréguline-1, un facteur parfois contesté de la transcription du RACH (Woldeyesus *et al.*, 1999 ; Schaeffer *et al.*, 2001). La signalisation de MuSK est également indispensable à la différenciation présynaptique (DeChiara *et al.*, 1996). L'innervation anormale observée chez les souris déficientes en MuSK pourrait résulter de l'absence de composants de signalisation rétrograde dépendant de MuSK normalement exprimés par les noyaux synaptiques mais encore inconnus (DeChiara *et al.*, 1996 ; Nguyen *et al.*, 2000).

MuSK est codé par le gène *MUSK* qui est localisé sur le chromosome 9 en q31.3q32. Son ARNm se compose de 2666 paires de bases (NM005592) et comporte 14 exons codant une protéine de 869 acides aminés (NP005583, décembre 2003). Comme tous les récepteurs tyrosine kinase, cette protéine inclut un grand ectodomaine contenant des motifs de type IgG, une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique intracellulaire contenant entre les résidus (Q569 et V859) chez l'homme un domaine caractéristique d'une tyrosine kinase fonctionnelle. Les protéines MuSK humaine et de rat sont fortement homologues, tout particulièrement dans leurs domaines intracellulaires qui atteignent 97 % d'identité (Valenzuela *et al.*, 1995). Trois polymorphismes de l'ADNc de MuSK ont été récemment décrits chez un patient souffrant de myasthénie auto-immune séropositive pour MuSK (Selcen *et al.*, 2004).

L'objet du présent article est de donner un exemple de la stratégie qui mène à la caractérisation physiopathologique complète d'un SMC. Nous présentons, en effet, le

TABLEAU I. – Classification physiopathologique des SMC d'après la proposition du "European Neuromuscular Center" (ENMC) (Engel *et al.*, 2001) et mise à jour (Engel *et al.*, 2003; Hantaï *et al.*, 2004; Chevessier *et al.*, 2004). Les gènes connus à ce jour comme étant à l'origine de SMC quand ils sont porteurs de mutations sont indiqués ainsi que leur loci chromosomiques. Le type de transmission héréditaire habituellement rencontré est indiqué : autosomique récessif (AR) et autosomique dominant (AD).

Types de SMC	Gènes	Loci chromosomiques
Anomalies présynaptiques		
Déficit en choline acétyltransférase (AR) Rareté des vésicules synaptiques SMC de type Lambert-Eaton Autres défauts présynaptiques	<i>CHAT</i>	10q11.2
Anomalies associées à la lame basale synaptique		
Déficit synaptique en acétylcholinestérase (AR)	<i>COLQ</i>	3p24.2
Anomalies postsynaptiques		
Anomalies cinétiques du RACH		
Canal lent (AD) (sous-unité $\alpha > \epsilon, \beta, \delta$)	<i>CHRNA1</i>	2q24-q32
Canal rapide (AR)	<i>CHRNE</i>	17p13-p12
Déficit en RACH	<i>CHRNA1</i>	17p12-p11
RACH (AR) (sous-unité $\epsilon > \alpha, \beta, \delta$)	<i>CHRND</i>	2q33-q34
Rapsyne (AR)	<i>RAPSN</i>	11p11.2-p11.1
Myasthénie du canal sodium (AR) (sous-unité α)	<i>SCN4A</i>	17q23-q25
Déficit en MuSK (AR)	<i>MUSK</i>	9q31.3-q32
SMC incomplètement caractérisés		
SMC par déficit en plectine		
Myasthénie familiale affectant les ceintures (AR)		
SMC avec agrégats tubulaires		
Anomalies non identifiées		

cas d'une patiente dont l'examen clinique et électromyographique établit le diagnostic de SMC (Chevessier *et al.*, 2004). La biopsie musculaire pratiquée sur le muscle deltoïde oriente par l'étude des jonctions neuromusculaires vers une perturbation de l'expression d'une molécule de la jonction neuromusculaire, MuSK. Ces modifications nous ont conduits à rechercher et à identifier pour la première fois deux mutations hétérozygotes dans *MUSK*. Des constructions d'ADN complémentaire de MuSK contenant ces deux mutations ont été transfectées dans des cellules en culture et *in vivo* dans le muscle de souris et nous ont permis de montrer qu'elles étaient bien la cause du SMC.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Biopsie musculaire et identification des mutations chez la patiente

BIOPSIE MUSCULAIRE

Un prélèvement musculaire du muscle deltoïde a été réalisé par biopsie ouverte. La zone des JNM a été déterminée par stimulation à l'aide de la pointe d'un scalpel à la surface des fascicules musculaires. La présence de JNM a été confirmée sur une bande longitudinale de la biopsie en révélant l'activité des cholinestérases par la méthode classique de Koelle (Koelle & Friedenwald, 1949).

Analyse morphologique. Des spécimens *in toto* fixés avec 4 % de paraformaldéhyde ont été marqués pour les

RACH avec de l' α -bungarotoxine (α BGT) marquée au FITC ou TRITC (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas), et pour les neurofilaments avec un anticorps anti-neurofilament de 200 kDa (clone RT 97, Boehringer Ingelheim, Reims, France) puis ont été observés par microscopie confocale (LEICA TCS40, Heidelberg, Allemagne). Une partie de la biopsie musculaire a été également traitée par immunocytochimie sur des coupes au cryostat avec l' α -BGT-TRITC et avec un anticorps polyclonal anti-MuSK (don de Markus Ruegg, Bâle, Suisse) et observées par microscopie à fluorescence (Zeiss Axio-phot, Oberkochen, Allemagne). La quantification du niveau d'expression du RACH et de MuSK a été réalisée en mesurant l'intensité moyenne de fluorescence de l' α -BGT-TRITC et des anticorps anti-MuSK sur des images CCD avec le logiciel Metamorph (Universal Imaging, Westchester, PA, États-Unis).

Analyse par RT-PCR quantitative. L'ARN total a été extrait à partir de cinq à dix coupes consécutives au cryostat de 10 μ m d'épaisseur en utilisant le mini kit Qiagen RNAeasy (Qiagen, Courtaboeuf, France). La QRT-PCR a été réalisée selon les instructions du fabricant avec le kit de détection d'ADN Quantitect RT-PCR SYBRGreen (Qiagen) à l'aide d'un Light-Cycler (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les séquences des amorces étaient les suivantes: sous-unité ϵ du RACH : sens 5'-AGAAATG-CACGGTCTCCATC-3', antisens 5'-CGCAATTCAT-GACAATGAGC-3'; sous-unité γ du RACH : sens 5'-AACGAGACTCGGATGTGGTC-3', antisens 5'-GT CGCACCCTGCATCTCTA-3'; myogénine : sens 5'-TGGGCGTGTAAGGTGTGTAA-3', antisens 5'-

GGCCTCATTACCTTCTTGA-3'; actine : sens 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3', antisens 5'-AGCACTGTGTGGCGTACAG-3'; ErbB3 : sens 5'-GTCTGTGTGACCCACTGCAACT-3', antisens 5'-GGGTGGCAGGAGAAGCATT-3'.

Pour valider les niveaux de l'expression génique spécifique à la JNM, la quantification de l'expression des gènes de la sous-unité ϵ du RACH et d'ErbB3 qui ne sont jamais exprimés dans les régions extrasynaptiques, ont été comparés au nombre approximatif de JNM évalué en comptant les JNM visualisées par la méthode de Koelle dans les coupes bordant en dessus et en dessous les coupes utilisées pour l'extraction d'ARN. Comme prévu, les niveaux d'expression génique de la sous-unité ϵ du RACH et d'ErbB3 sont bien corrélés avec le nombre de NMJ.

IDENTIFICATION DES MUTATIONS

Les ADN de la patiente et des membres vivants de sa famille ont été extraits à partir des cellules lymphoblastoïdes du sang périphérique par des protocoles standard. Pour l'enfant décédé, l'ADN a été obtenu en grattant une coupe de biopsie musculaire réalisée et montée dans le baume du Canada il y a 24 ans. Quinze couples d'amorces ont été choisis en se basant sur la séquence publiée de MuSK (GenBank # AF006464) afin d'amplifier chacun des quatorze exons ainsi que leurs régions flanquantes introniques. Ces constructions peuvent être fournies sur demande. L'amplification par PCR a été effectuée avec : 100 ng d'ADN, 1 μ M dNTP, 0,5 μ M de chaque amorce, 1 X Enhancer (Tebu, Le Perray en Yvelines, France), 1,5 μ M de $MgCl_2$ et une unité d'Ampli Taq Gold (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Tous les fragments ont été amplifiés avec les mêmes conditions, à savoir un protocole de touch-down PCR comprenant une première étape d'hybridation de 10 cycles de 65° C à 55° C (décroissance de 1° C par cycle) suivie d'une deuxième étape de 25 cycles à 55° C. Les fragments de PCR ont été ensuite séquencés sur les deux brins par la technique du Big Dye Terminator (V3.1) Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) puis les réactions de séquences ont été séparées sur un analyseur ABI PRISM 3100 et analysés avec le logiciel Seqscape. Un variant n'est considéré comme une mutation pathogène qu'après analyse de coségrégation parmi les membres atteints de la famille, étant données la conservation du résidu parmi les espèces et les isoformes et son absence dans 200 chromosomes témoins provenant d'adultes sains.

Expression expérimentale de MuSK muté

MUTAGENÈSE DIRIGÉE

Dans le domaine intracellulaire, les séquences entre le rat et l'homme sont fortement homologues (Valenzuela *et al.*, 1995). Ceci nous a permis d'utiliser un vecteur pcDNA 3 contenant l'ADNc de MuSK de rat (don de Werner Hoch, Université de Houston, Houston, États-Unis). La mutagenèse a été réalisée selon la méthode de Kunkel *et al.* (1987) et nous a permis d'obtenir des cons-

tructions porteuses des mêmes mutations de MuSK que celles trouvées chez la patiente.

ÉTUDE D'EXPRESSION EN CELLULES COS

Les vecteurs d'expression pour MuSK muté et MuSK sauvage ont été co-transfectés dans des cellules COS-7 avec le vecteur pEGFP-N1 (Clontech, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) en utilisant le réactif Exgen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) et en suivant les recommandations du fabricant. Les cellules COS-7 ont été cultivées dans du milieu Dulbecco modifié Eagle (DMEM, Invitrogen) contenant du sérum de veau fœtal à 10 %. Les cellules ont été maintenues dans un incubateur à 5 % de CO_2 à 37° C. 24 h après transfection, les cellules COS-7 transfectées ont été lavées avec du PBS et homogénéisées dans du tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, leupeptine 10 μ g/ml, aprotinine 25 μ g/ml, pepstatine 10 μ g/ml et 2 % Triton X-100). Après centrifugation (8 minutes à 10 000 t/mn), les protéines solubilisées ont été récoltées et leur quantité a été estimée en utilisant le kit BCA (Pierce, Rockford, États-Unis).

Les échantillons ont été portés à ébullition pendant 3 minutes et séparés sur SDS-PAGE 10 % dans des conditions réductrices et puis transférés sur des membranes de nitrocellulose (Novex). Les membranes ont été saturées avec du lait à 10 % dans du PBS puis incubées avec l'anticorps polyclonal anti-MuSK C-terminal (Fuhrer *et al.*, 1997) ou avec l'anticorps anti-MuSK N-terminal (# AP7664a, Abgent, San Diego, CA, États-Unis) à 4° C pendant une nuit (Zhou *et al.*, 1999). Les membranes ont été également incubées avec un anticorps monoclonal anti-GFP (Clontech, Ozyme) pour vérifier l'efficacité de la transfection. Après marquage, les membranes ont été lavées et incubées avec anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris marqués à la peroxydase de raifort (Dako, Carpinteria, CA, États-Unis) puis développées par chemiluminescence en utilisant le kit ECL (Pierce, Rockford, États-Unis).

ÉTUDES FONCTIONNELLES UTILISANT LES CELLULES MUSCULAIRES $MuSK^{-/-}$

Infection rétrovirale des cellules musculaires $MuSK^{-/-}$. L'infection rétrovirale des myoblastes a été réalisée comme décrit précédemment (Herbst & Burden, 2000). Brièvement, des cellules Bosc 23 ont été transfectées avec pBabe/puro-MuSK sauvage et pBabe/puro-G \rightarrow A MuSK. Le milieu contenant les virus était prélevé 2 jours après transfection et utilisé immédiatement pour l'infection. Les myoblastes, à 50 % de confluence, ont été incubés avec le milieu contenant les virus, complété avec 2 μ g/ml de polybrene (Sigma), pendant 2 h à 33° C. Les myoblastes infectés ont été sélectionnés dans du milieu de croissance contenant de la puromycine (2 μ g/ml) et des clones cellulaires ont été isolés. Les clones ont été ensuite cultivés comme des myoblastes à 33° C et 10 % de CO_2 sur des boîtes de Pétri pré-traitées avec du Matrigel (Becton Dickinson France, Le Pont de Claix, France) dans du milieu de croissance (DMEM contenant 10 % de sérum

de veau fœtal inactivé par la chaleur (FBS), du sérum de cheval à 10 % (HS), glutamine 1 %, pénicilline, streptomycine, gentamicine) additionné de 20 U/ml d'Interféron- γ de recombinaison de souris (IFN- γ ; Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Pour induire la formation de myotubes, les cultures ont été transférées à 39°C/10 % CO₂ et le milieu a été remplacé par DMEM ne contenant que 10 % HS, glutamine de 1 %, et antibiotiques, mais pas de FBS ni IFN- γ .

Analyse de l'agrégation des RACH. Les myotubes exprimant de façon stable MuSK ont été stimulés avec de l'agraine recombinante de rat (50 ng/ml, R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, États-Unis) pendant 24 h. Les myotubes ont été lavés avec du PBS, fixés pendant 10 minutes à température ambiante dans du paraformaldéhyde à 4 % dans du PBS et puis lavés 3 fois avec de la glycine 0,1 M dans du PBS. Ils ont été ensuite incubés pendant 1 h avec de l' α -BGT-TRITC (Molecular Probes). L'agrégation des RACH a été mesurée en comptant le nombre d'agrégats de RACH > 3 μ m de longueur en utilisant un objectif 20 \times sur 15 champs pour chaque boîte de Pétri. Ce nombre a été divisé par le nombre de myotubes marqués qui croisaient le champ. Les boîtes de Pétri ont été observées sous un microscope à fluorescence inversé Olympus IX70 (Olympus Europa, Ham-bourg, Allemagne) en utilisant les filtres appropriés. Les images ont été enregistrées avec une caméra CCD (Princeton Cool Snap FX, Trenton, NJ, États-Unis) et traitées avec le logiciel Metamorph. Trois expériences indépendantes ont été réalisées avec trois clones différents exprimant MuSK G \rightarrow A à des niveaux comparables à ceux des cellules exprimant MuSK sauvage comme cela été vérifié par Western blot. Les myotubes ont été extraits dans 1 % Nonidet P40 dans le tampon de lyse (Fuhrer *et al.*, 1997) et l'immunoblot a été réalisé comme décrit ci-dessus pour les cellules COS. L'anticorps monoclonal anti-tubuline α (DM1A, Sigma) a été utilisé pour vérifier la charge en protéine.

Autophosphorylation de MuSK. Les myotubes exprimant de façon stable MuSK ont été stimulés par de l'agraine comme déjà décrit et extraites dans du tampon de lyse contenant 1 % Nodinet-P40 (Fuhrer *et al.*, 1997). Les lysats clarifiés ont été incubés avec un anticorps polyclonal anti-MuSK pour précipiter MuSK. Les protéines précipitées sur billes ont été éluées dans le tampon d'échantillon SDS, soumises à SDS-PAGE et analysées par immunopreinte des phosphotyrosines (mAb 4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placide, NY, États-Unis). Les membranes ont été marquées ensuite avec un anticorps polyclonal anti-MuSK (Fuhrer *et al.*, 1997).

STABILITÉ DU MUTANT MuSK DANS LES CELLULES C2C12

Constructions d'expression et transfection des cellules. Le cDNA complet codant MuSK sauvage et MuSK G \rightarrow A étiquetés HA ont été sous-clonés dans les sites *KpnI-XbaI* du vecteur pCDNA3 (Invitrogen). Les ADNc codant MuSK sauvage et MuSK G \rightarrow A étiquetés HA ont

été obtenus par PCR avec l'amorce de l'oligonucléotide T7 et 5'GATCTCTAGAGAATTCTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGT ATGCGACGCCTACCG TTCCCTCTGCTC 3' (amorce antisens contenant les 23 dernières pb de l'ADNc de MuSK à l'exclusion du codon stop et suivi de la séquence de l'étiquette HA, un codon stop et un site *XbaI*). Les transfections des cellules ont été réalisées avec le réactif Fugene (Roche Molecular Biochemicals) selon les instructions du fabricant.

Traitement par le cycloheximide. Les cellules C2C12 ont été transfectées avec le pcDNA3 contenant la construction MuSK mutant et sauvage étiquetée HA. 36 h après transfection, les cellules ont été traitées avec le cycloheximide (Sigma) à 15 μ g/ml pendant les temps indiqués et des lysats ont été préparés pour être analysés. La cotransfection avec un plasmide exprimant la GFP a permis l'évaluation de l'efficacité de transfection.

Les MuSK étiquetés HA mutant et sauvage ont été détectés par Western blot avec un anticorps polyclonal anti-HA (12CA5, Roche Molecular Biochemicals). La tubuline α a été utilisée comme contrôle interne et détectée avec un anticorps monoclonal anti-tubuline α (DM1A, Sigma). La GFP a été détectée avec un anticorps anti-GFP (sc-9996, Santa Cruz Biotechnology).

Analyses de l'activité kinase in vitro dans des cellules de COS. Les cellules COS ont été transfectées avec le pcDNA3 contenant la construction MuSK mutant et sauvage étiquetée HA. La cotransfection d'un plasmide exprimant GFP avec les plasmides d'expression de MuSK a permis d'évaluer l'efficacité de la transfection à 51-52 % par une quantification par FACS des cellules GFP-positives. 36 heures après la transfection, les cellules ont été lysées dans 1 % NP40, 20 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, inhibiteurs de protéases (Complete, Roche Molecular Biochemicals). Les concentrations en protéines dans les lysats ont été déterminées avec un kit DC (Biorad) et des quantités équivalentes de protéines totales ont été immunoprécipitées avec un anticorps monoclonal anti-HA (clone HA-11, Babco). Les billes ont été lavées trois fois avec le tampon de lyse et une fois avec le tampon kinase (20 mM HEPES pH 7,4, 10 mM MnCl₂ et 0,1 mM vanadate) puis incubées dans 40 μ l de tampon kinase contenant 5 μ Ci d'ATP(γ -P³²) (3 000 Ci/mM, Amersham), 0,1 mM vanadate pendant 30 minutes à 30°C. Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse SDS-PAGE et les protéines radioactives ont été détectées sur un phosphorimagur. Pour la phosphorylation exogène du substrat, 50 μ g d'un peptide de poly-glutamate/lysine/tyrosine, p(EKY) (Sigma) ont été ajoutés à la réaction kinase et incubées pendant 30 minutes à 30°C. Les réactions ont été arrêtées en ajoutant 40 μ l d'acide trichloracétique glacé (TCA) et les mélanges ont été alors centrifugés pendant deux minutes. Les surnageants ont été rassemblés et incubés pendant 10 minutes sur la glace avec 1 ml de TCA glacé à 10 %, 100 μ g BSA, 100 mM de pyrophosphate de sodium. Les précipités ont été collectés sur des filtres en fibres de verre et comptés à l'aide d'un compteur β .

EXPRESSION *IN VIVO* DANS LE MUSCLE TIBIAL ANTÉRIEUR DE SOURIS

Ces études ont été approuvées par les codes de procédure d'expérimentation sur les animaux adoptés par l'Inserm.

Plasmides et électroporation. Les souris Swiss Webster, âgées de 5 à 10 semaines, ont été anesthésiées avec 300 µl du mélange 0,05 % xylazine-1,7 % kétamine dans 0,9 % NaCl. 7 µg d'ADN contenant 5 µg de vecteurs exprimant MuSK muté ou MuSK sauvage et 2 µg du plasmide contenant un gène rapporteur ont été injectés dans le muscle tibial antérieur à l'aide d'une seringue de 1 ml avec une aiguille de 27. Des électrodes-plaques (Qbiogen, Illkirch, France) ont été alors appliquées de chaque côté du muscle, et des séries de huit impulsions électriques (2 Hz, 20 ms chacune) ont été délivrées avec un électroporateur standard à onde carrée (ECM 830, Qbiogen) (Mir *et al.*, 1999). Le contact électrique a été assuré par rasage et application de gel conducteur. La construction contenant le gène rapporteur se composait des vecteurs d'expression pour une CFP (cyan fluorescent protein) nucléaire (pECFPnuc, Clontech, Ozyme) et a permis l'identification des fibres électroporées (Duclert *et al.*, 1993).

Analyse morphologique. L'analyse morphologique des JNM a été réalisée par microscopie confocale comme décrit ci-dessus pour la biopsie musculaire de la patiente. Nous avons utilisé des anticorps anti-neurofilaments de 160 et 200 kDa. Pour les mesures quantitatives, nous avons employé seulement des préparations immunomarquées avec un anticorps anti-neurofilament de 160 kDa. Pour mesurer l'importance du bourgeonnement terminal, nous avons mesuré le rapport entre la longueur de la gouttière synaptique et la longueur du segment amyélinique de la terminaison nerveuse ainsi que de la portion ultraterminale sur au moins 15 JNM pour chaque situation expérimentale en utilisant le logiciel d'analyse d'image LUCIA.

RT-PCR quantitative. L'ARN total a été extrait à partir des fibres musculaires sélectionnées et disséquées et l'expression génique a été analysée par QRT-PCR comme pour les biopsies humaines. AChRe : sens 5'-CTTGGTGCTGCTCGCTTACTT-3', antisens 5'-CGTTGATAGAGACCGTGCATTTTC-3'; β-actine : sens 5'-CCCTGTATGCCTCTGGTCGT-3', antisens 5'-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA-3'; ErbB3 : sens 5'-CTTACGGGACACAATGCTGA-3', antisens 5'-GCATGGCTGGAGTTGGTATT-3'.

RÉSULTATS

Étude de la patiente

DONNÉES CLINIQUES

La patiente est une femme de 27 ans issue de parents non-consanguins. Les symptômes cliniques de ptosis et de détresse respiratoire sont apparus dans la période néonatale. Une trachéotomie s'est avérée nécessaire à l'âge de

45 jours et deux épisodes de détresse respiratoire sont survenus à 6 et 8 mois. À l'âge de 6 ans, elle a subi un traitement chirurgical pour son ptosis gauche. Le décours de la maladie pendant son enfance et son adolescence a été favorable. Les symptômes cliniques se sont améliorés et la patiente n'a pas eu d'autre épisode respiratoire grave. Elle s'est seulement plainte d'un léger ptosis des paupières, d'une fatigabilité à la marche, et de l'incapacité d'avoir une activité sportive. Les symptômes ont été fluctuants. À l'âge de 22 ans, à partir de son 3^{ème} mois de grossesse, la patiente a présenté une aggravation de ses symptômes avec une faiblesse généralisée des muscles des membres supérieurs et inférieurs avec des chutes. Elle a présenté des difficultés à la mastication, des troubles de la déglutition et une voix nasonnée. Le diagnostic de syndrome myasthénique a été alors établi. La recherche d'anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine et anti-MuSK dans le sérum s'est révélée négative. Les études électromyographiques ont révélé un décrétement après stimulation à 3-Hz du trapèze (-56 %) et des muscles orbiculaires de la paupière (-17 %). La patiente a été traitée avec des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (pyridostigmine jusqu'à 720 mg par jour) sans réelle efficacité. Plus tardivement, la 3,4-diaminopyridine (50 mg par jour) a été ajoutée et une amélioration notable des symptômes cliniques a été observée. À l'heure actuelle, la patiente présente un ptosis bilatéral, une limitation du regard vers le haut, une faiblesse des muscles extenseurs du cou et une faiblesse principalement proximale des membres supérieurs. Les symptômes sont fluctuants avec des épisodes de fatigabilité. La détresse respiratoire et les désordres bulbaires sont absents. Elle est traitée avec de la pyridostigmine (120 à 240 mg par jour) et de la 3,4-diaminopyridine (30 à 50 mg par jour). La transmission de la maladie est autosomique récessive. Basé sur l'interrogatoire de la patiente, son père qui est décédé et sa mère n'ont jamais présenté de signe d'atteinte neuromusculaire. Par contre, un des frères de la patiente, qui aurait été âgé aujourd'hui de 24 ans, a également présenté un SMC avec une hypotonie néonatale, une détresse respiratoire, une paralysie des cordes vocales, et a subi une trachéotomie. Une biopsie musculaire a été pratiquée et des coupes à visée anatomopathologique ont été réalisées avant qu'il ne meure à l'âge d'un an et demi. Ceci nous a permis d'extraire son ADN à partir de ces anciennes coupes afin de réaliser l'analyse génétique. Un autre frère âgé de 29 ans présente une anomalie génétique (syndrome de l'X fragile) mais sans aucun signe clinique ou électromyographique de bloc neuromusculaire.

ANALYSE IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE LA BIOPSIE MUSCULAIRE DE LA PATIENTE

Des préparations *in toto*, marquées pour le RACH et le neurofilament, ont montré que, dans une biopsie contrôle, la terminaison nerveuse en forme de fourche innerve une gouttière synaptique bien définie. A l'opposé, chez la patiente, la terminaison axonale bourgeonne et envoie des prolongements qui entrent en contact avec plusieurs petites cupules synaptiques séparées l'une de l'autre (Fig. 1A). Dans d'autres préparations, les terminaisons

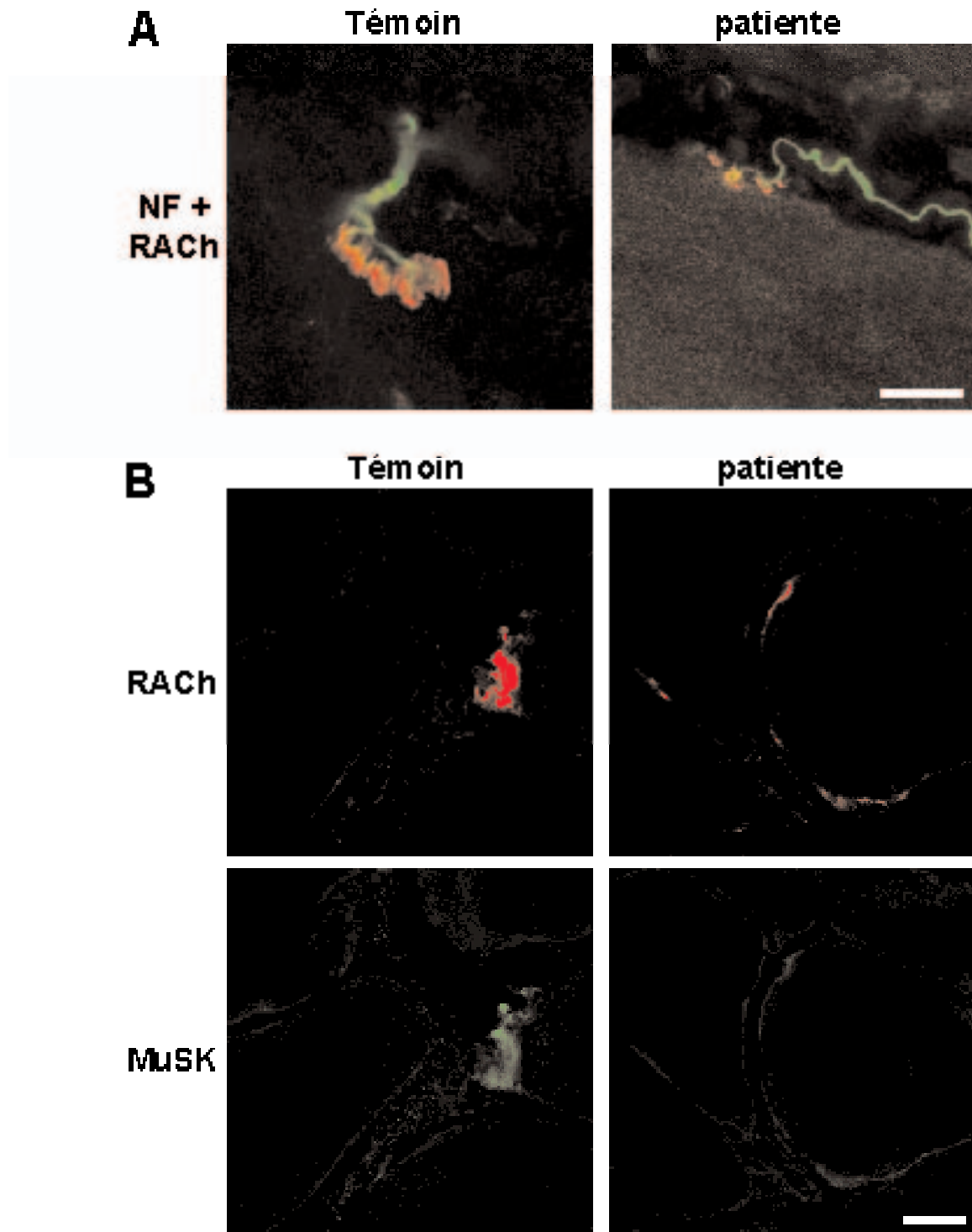


FIG. 1. – Les terminaisons axonales bourgeonnent et MuSK est délocalisé de la JNM dans la biopsie musculaire de la patiente.

(A) Préparations *in toto* marquées pour le RACH avec l' α -BGT marquée TRITC en rouge et pour les terminaisons axonales avec l'anticorps anti-neurofilament de 200 kDa (NF) marqué FITC en vert. Notez que la terminaison axonale envoie des bourgeonnements d'une petite cupule de JNM isolée à une autre chez la patiente alors qu'elle finit classiquement en forme de fourche et innerve une structure synaptique bien définie chez le témoin. Barre = 20 μ m, s'applique aux deux photographies.

(B) Des coupes au cryostat ont été doublement marquées pour le RACH en rouge et pour MuSK en vert. Notez que chez la patiente MuSK et le RACH sont clairement diminués. MuSK n'est pas strictement localisé à la JNM mais diffuse en dehors de la JNM autour de la fibre musculaire. Barre = 20 μ m et s'applique aux quatre photographies.

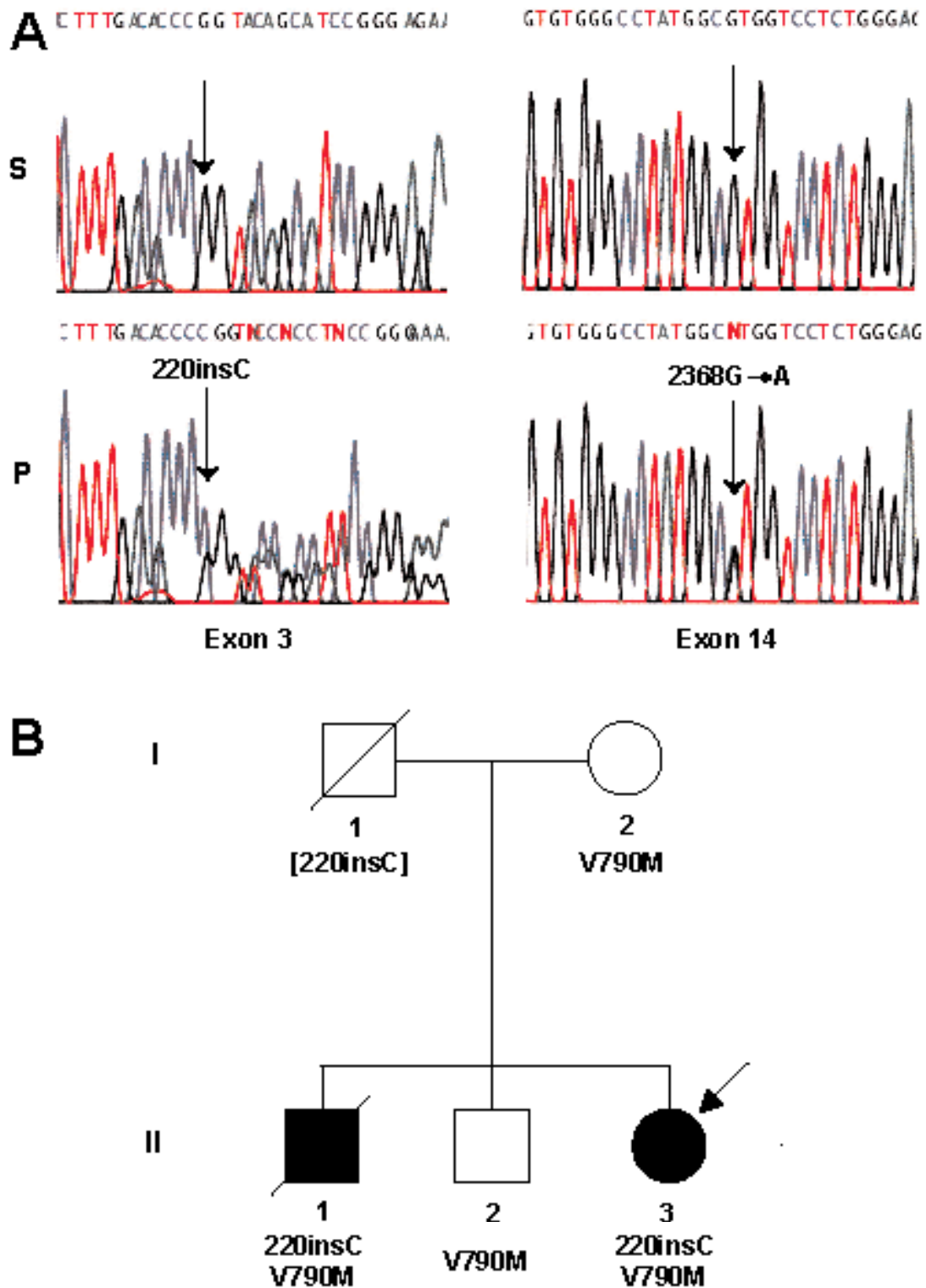


FIG. 2. – Identification des mutations dans MuSK et transmission héréditaire.

(A) Chromatogrammes de séquence d'un individu normal (sauvage, S) et d'un individu atteint (proband, P). Les changements de nucléotides déduits de la séquence sont indiqués et indiqués par une flèche. Chez le proband, un allèle porte la mutation décalant le cadre de lecture 220insC, l'autre porte la mutation faux-sens 2368 G → A qui induit V790M dans MuSK.

(B) Pedigree de la famille. Le proband est indiqué par une flèche. Les deux mutations transmises dans la famille sont indiquées au-dessous des symboles.

nerveuses se terminent par de gros cônes de croissance incapables d'entrer en contact avec des agrégats de RACH (non illustré).

Le double marquage du RACH et de MuSK sur des coupes au cryostat a montré que, chez le patient témoin, le RACH se présente comme un agrégat bien délimité à la surface de la fibre musculaire et colocalise bien avec MuSK (Fig. 1B). Chez la patiente, plusieurs agrégats sont souvent observés à la surface d'une seule fibre musculaire. Le marquage du RACH est moins intense que chez le témoin et a été quantifié sur 12 JNM à la fois chez le témoin et la patiente (45 ± 4 % par rapport au contrôle). Le marquage de MuSK est également nettement réduit au niveau des JNM (52 ± 6 % par rapport au contrôle) et diffuse de la zone synaptique à la zone extra-synaptique (Fig. 1B).

ANALYSE DE MUTATIONS ET IDENTIFICATION DE POLYMORPHISMES

Les deux gènes principaux (*CHRNE* et *RAPSN*) impliqués dans les SMC postsynaptiques ont tout d'abord été séquencés et aucune mutation n'a pu être identifiée. Puisque les études morphologiques avaient indiqué des modifications dans les niveaux d'expression et de localisation de MuSK, les 14 exons et leurs régions flanquantes ont été séquencés. Ceci nous a permis d'identifier deux mutations hétéroalléliques chez la patiente (Fig. 2A). La première mutation est une insertion d'un nucléotide C dans l'exon 3 à la position 220 (c.220insC) de la séquence codante. On peut prédire que cette insertion décale le cadre de lecture au niveau du codon 73-74 et entraîne la création d'un codon stop prématuré dans l'exon 3 (codon 92). La deuxième mutation est une transition de G → A au nucléotide 2368 de la séquence codante dans l'exon 14 (c.2368 G → A) entraînant une mutation de type faux sens transformant la Valine en position 790 en Méthionine (V790M). Cette mutation est située dans le domaine carboxy-terminal de la protéine qui correspond à son domaine catalytique tyrosine kinase très conservé (Valenzuela *et al.*, 1995) et la valine 790 est fortement conservée entre les espèces au cours de l'évolution (Ip *et al.*, 2000). Afin de confirmer le rôle pathogène des 2 variants que nous avons identifiés, nous avons déterminé le statut génétique du frère décédé pour lequel nous disposions de coupes histologiques. Nous avons constaté que le frère atteint était également porteur de ces deux mutations.

L'analyse génétique chez les apparentés disponibles a révélé, du fait du mode de transmission récessive du SMC dans cette famille, que l'insertion c.220insC a été transmise par l'individu II (père décédé sans ADN disponible) aux individus II-1 et II-3 et la mutation faux sens V790M a été transmise par l'individu I-2 (mère) aux individus atteints II-1 et II-3 et à l'individu non atteint II-2 (Fig. 2B).

Le criblage étendu de *MUSK* a révélé des variations fréquemment retrouvées qui ont été de ce fait considérées comme des polymorphismes. Ce sont IVS2 + 28: a → t, IVS3-20: t → c dans les séquences introniques flanquan-

tes et deux polymorphismes silencieux au niveau des résidus E134 (GAG-GAA) et N179 (AAC-AAT). Les polymorphismes E134 et N179 ont un pourcentage d'hétérozygotie de 30 % et 27 %, respectivement.

ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DANS LA BIOPSIE MUSCULAIRE

Puisqu'un marquage extra-synaptique par l' α -bungarotoxine (α -BGT) était détectable sur des sections de la biopsie, nous avons cherché à déterminer si la présence de RACH extra-synaptique pouvait être la conséquence d'une régulation positive compensatrice de la sous-unité embryonnaire γ du RACH, qui n'est normalement pas exprimée dans le muscle adulte. Le niveau d'expression de la sous-unité γ du RACH par rapport au niveau d'expression de la sous-unité ϵ du RACH d'adulte a été mesuré par PCR quantitative en temps réel (QRT-PCR). Les résultats ont été normalisés par rapport à la β -actine pour la sous-unité γ du RACH. Puisque la sous-unité ϵ du RACH est seulement exprimée à la JNM, les résultats des diverses coupes des biopsies ont dû être normalisés par rapport au nombre moyen de JNM par coupe et par rapport à l'expression d'un gène synaptique spécifique non affecté par le syndrome myasthénique. Considérant que des cellules de Schwann terminales présynaptiques sont présentes et que l'expression génique dans ces cellules devait être moins affectée que dans les noyaux postsynaptiques, ErbB3, un gène spécifique de la cellule de Schwann, a été utilisé (Trinidad *et al.*, 2000). Comme indiqué sur la figure 3, les niveaux synaptiques de l'ARNm de la sous-unité ϵ du RACH sont diminués dans les biopsies de la patiente, comparés aux biopsies contrôles, conduisant à un niveau d'expression diminué du RACH synaptique comme il a été montré en immunocytochimie. Réciproquement, les niveaux globaux de l'ARNm de la sous-unité γ du RACH étaient augmentés dans les biopsies de la patiente, comparés aux biopsies contrôles.

L'expression de la sous-unité γ du RACH pourrait être une compensation pour les changements de l'expression de la sous-unité ϵ du RACH mais pourrait alternativement être la conséquence directe des changements de l'activité électrique du muscle (Schaeffer *et al.*, 2001). Par conséquent, l'expression du gène de la myogénine qui est strictement régulé par l'activité électrique du muscle a été mesurée (Tang & Burden, 1994). Les niveaux d'ARNm de la myogénine normalisés à la β -actine sont augmentés dans les biopsies de la patiente, comparés aux niveaux dans les biopsies témoins, suggérant de ce fait que l'expression de la sous-unité γ du RACH est une conséquence de la perturbation de l'activité électrique du muscle, résultant d'une transmission synaptique altérée.

Évaluation fonctionnelle des mutations de MuSK

Afin d'étudier si les mutations détectées sont la cause du syndrome myasthénique observé chez la patiente, nous avons réalisé une mutagenèse dirigée de l'ADN complémentaire de MuSK de rat afin d'obtenir deux constructions de MuSK reproduisant les deux mutations :

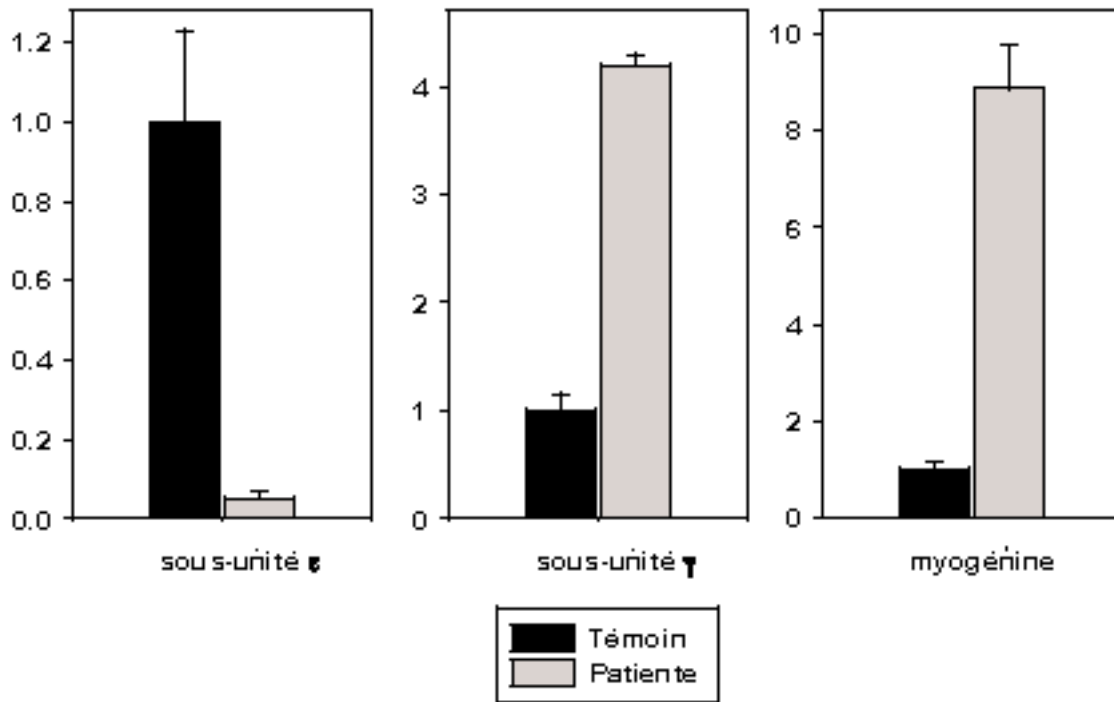


FIG. 3. – Mesures quantitatives de l'ARNm des sous-unités ϵ et γ du RACH ainsi que de la myogénine.

L'expression génique a été évaluée par RT-PCR quantitative sur l'ARN total extrait à partir des biopsies. Les niveaux des ARNm de la sous-unité ϵ du RACH ont été normalisés par rapport à ErbB3. Les niveaux des ARNm de la sous-unité γ du RACH et de la myogénine ont été normalisés par rapport à la β -actine. Les niveaux d'expression des gènes testés sont exprimés comme le rapport de leurs niveaux d'expression dans les biopsies contrôles. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type d'au moins 3 échantillons musculaires provenant d'individus témoins ou de la patiente.

c.220insC et c.2365G \rightarrow A (V789M) détectées chez la patiente. Les séquences de MuSK chez l'homme et chez le rat sont fortement homologues mais diffèrent dans leur numérotation. Ceci explique la différence observée entre la mutation observée chez l'homme (V790M) et la mutation correspondante chez le rat (V789M). Par souci de simplification, les symboles insC pour la construction correspondant à la mutation décalant le cadre de lecture et G \rightarrow A pour celle correspondant à la mutation faux sens seront employés dans toutes les expériences fonctionnelles suivantes.

PHÉNOTYPES DES MUTANTS MUSK EN CULTURE

Changements dans l'expression et la stabilité des protéines MuSK mutées

Les mutants de MuSK et la construction GFP ont été co-transfectés dans des cellules COS et des Western blots ont été réalisés sur des extraits de cellules grâce à des anticorps dirigés contre la GFP et la partie C-terminale de MuSK (Fuhrer *et al.*, 1997). Comme présenté sur la figure 4A, dans les cellules avec MuSK sauvage et dans le mutant G \rightarrow A, une bande correspondant à MuSK est détectée. La quantité de protéine MuSK dans les cellules exprimant le mutant G \rightarrow A est diminuée par rapport aux niveaux correspondants des cellules exprimant MuSK sauvage. Aucune bande n'est détectée avec les

cellules exprimant le vecteur pcDNA3 vide ou le mutant insC. Aucune bande de poids moléculaire inférieur, qui aurait reflété l'expression d'une protéine tronquée, n'a été détectée avec un anticorps polyclonal dirigé contre l'extrémité N-terminale de MuSK (non montré). La GFP a été utilisée pour déterminer les efficacités de transfection dans toutes les conditions. Afin de déterminer si la diminution de l'expression de MuSK due à la mutation G \rightarrow A était le résultat d'une instabilité de la molécule mutante dans les cellules musculaires, des cellules C2C12 ont été transfectées de façon transitoire avec des constructions de MuSK étiquetées par l'hémagglutinine (HA). L'efficacité des transfections a été vérifiée en co-transfectant un vecteur d'expression de la GFP. La stabilité de MuSK sauvage et mutante a été évaluée en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la traduction (Fig. 4B). Les différences entre les niveaux protéiques de MuSK sauvage et mutante ont également été observées ici. De plus, MuSK mutante a été dégradée beaucoup plus rapidement que MuSK sauvage, démontrant ainsi que la mutation G \rightarrow A déstabilise la protéine MuSK.

Le mutant de MuSK G \rightarrow A diminue l'agrégation du RACH et la phosphorylation de MuSK dépendant de l'agrine

Dans ces expériences, nous avons utilisé des lignées cellulaires MuSK^{-/-} infectées de façon stable par un virus

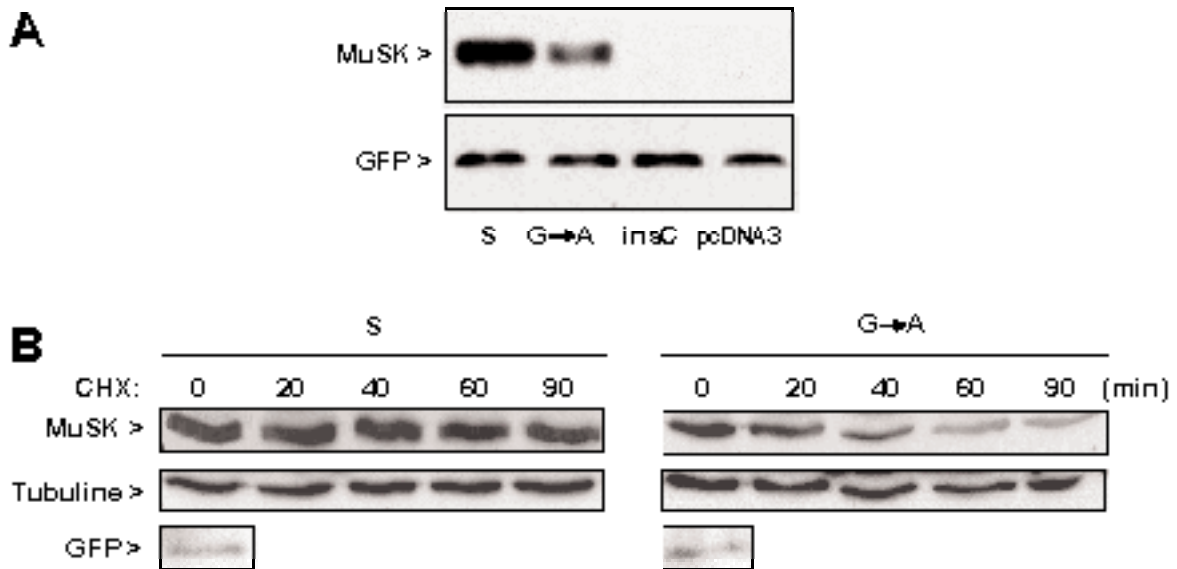


FIG. 4. Expression des cellules et stabilité des mutants de MuSK reproduisant les mutations humaines.

(A) Expression protéique de MuSK dans des extraits de cellules COS après transfection avec les constructions de MuSK et de la GFP. Un Western blot réalisé avec un anticorps polyclonal anti-MuSK et un anticorps monoclonal anti-GFP montre l'expression normale de la protéine MuSK sauvage (S), l'expression diminuée de MuSK mutant G → A et aucune expression dans le mutant insC ou le vecteur pcDNA3 seul dans les cellules COS. La cotransfection avec la GFP a été employée pour vérifier l'efficacité de la transfection.

(B) Des constructions de MuSK étiquetées HA et des constructions GFP ont été transfectées dans des cellules C2C12. Les cellules C2C12 transfectées ont été traitées avec du cycloheximide (CHX) et, à différentes heures après addition de CHX, des quantités de MuSK sauvage et muté ont été analysées par Western blot avec l'anticorps anti-HA. La tubuline α a été utilisée comme contrôle interne et l'efficacité de la transfection a été vérifiée avec un anticorps anti-GFP. Le niveau d'expression de la protéine MuSK mutante G → A a décliné de façon sensible 40 minutes après addition de CHX tandis qu'aucune diminution patente de la protéine MuSK sauvage n'a pu être observée durant les 90 minutes de l'expérience.

recombinant exprimant MuSK sauvage et MuSK muté G → A (Herbst & Burden, 2000). Nous avons utilisé trois clones G → A exprimant la même quantité de MuSK vérifiée par Western-blot (Fig. 5A). Comme décrit précédemment (Herbst & Burden, 2000; Zhou *et al.*, 1999), l'agrine n'induit pas d'agrégation du RACH dans les myotubes MuSK^{-/-}. L'expression de MuSK sauvage a restauré l'agrégation des RACH induite par l'agrine de RACH dans ces mêmes cellules. Les cellules exprimant le mutant de MuSK G → A ont formé environ la moitié des agrégats de RACH obtenus avec les cellules exprimant MuSK sauvage (Fig. 5B). D'autre part, en utilisant un immunoblot avec un anticorps anti-phosphotyrosine, nous avons observé que, en présence d'agrine, MuSK G → A est phosphorylé à un moindre degré que MuSK sauvage (Fig. 5B). Puisque des quantités équivalentes de MuSK sont présentes dans les cellules, ceci suggère que la mutation G → A affecte non seulement la stabilité de la protéine comme précédemment décrit mais modifie également la phosphorylation de MuSK induite par l'agrine et menant à l'agrégation des RACH.

Le mutant MuSK G → A n'affecte pas l'activité kinase catalytique

Puisque la mutation G → A est située dans le domaine kinase de MuSK, nous avons mesuré les capacités du mutant MuSK G → A à s'autophosphoryler et à transphosphoryler le peptide substrat EKY après stimulation

par l'ATP. Pour ces expériences, des quantités égales de MuSK sauvage et G → A étiquetées HA ont été obtenues à partir de cellules de COS transfectées. Les immunoprécipités ont été incubés en présence d'ATP radioactif. L'autophosphorylation de MuSK a été mesurée par analyse sur phosphoimageur. La mutation G → A n'induit aucun changement crucial d'autophosphorylation de MuSK (Fig. 6A). L'activité kinase exogène de MuSK a été mesurée en ajoutant le peptide EKY aux mêmes immunoprécipitats et n'a montré aucun changement notable de l'activité kinase du mutant G → A par rapport à la protéine sauvage (Fig. 6B).

EFFETS DES PROTÉINES MUTÉES DE MUSK *IN VIVO*

Pour préciser *in vivo* les conséquences de la mutation G → A de MuSK, les vecteurs d'expression de MuSK muté et sauvage ont été électroporés dans le muscle tibial antérieur de la souris pour évaluer leur effet sur l'expression de la sous-unité ϵ du RACH et sur la morphologie de la JNM. Les vecteurs d'expression du mutant de MuSK ont été co-électroporés avec un vecteur d'expression de CFP (cyan fluorescent protein) nucléaire (pECFPnuc) pour permettre la micro-dissection des fibres CFP-positive afin d'analyser la morphologie des JNM, d'extraire l'ARN et d'analyser l'expression génique par QRT-PCR. Le muscle contralatéral reçoit soit un vecteur vide soit un vecteur d'expression de MuSK sauvage avec pECFPnuc.

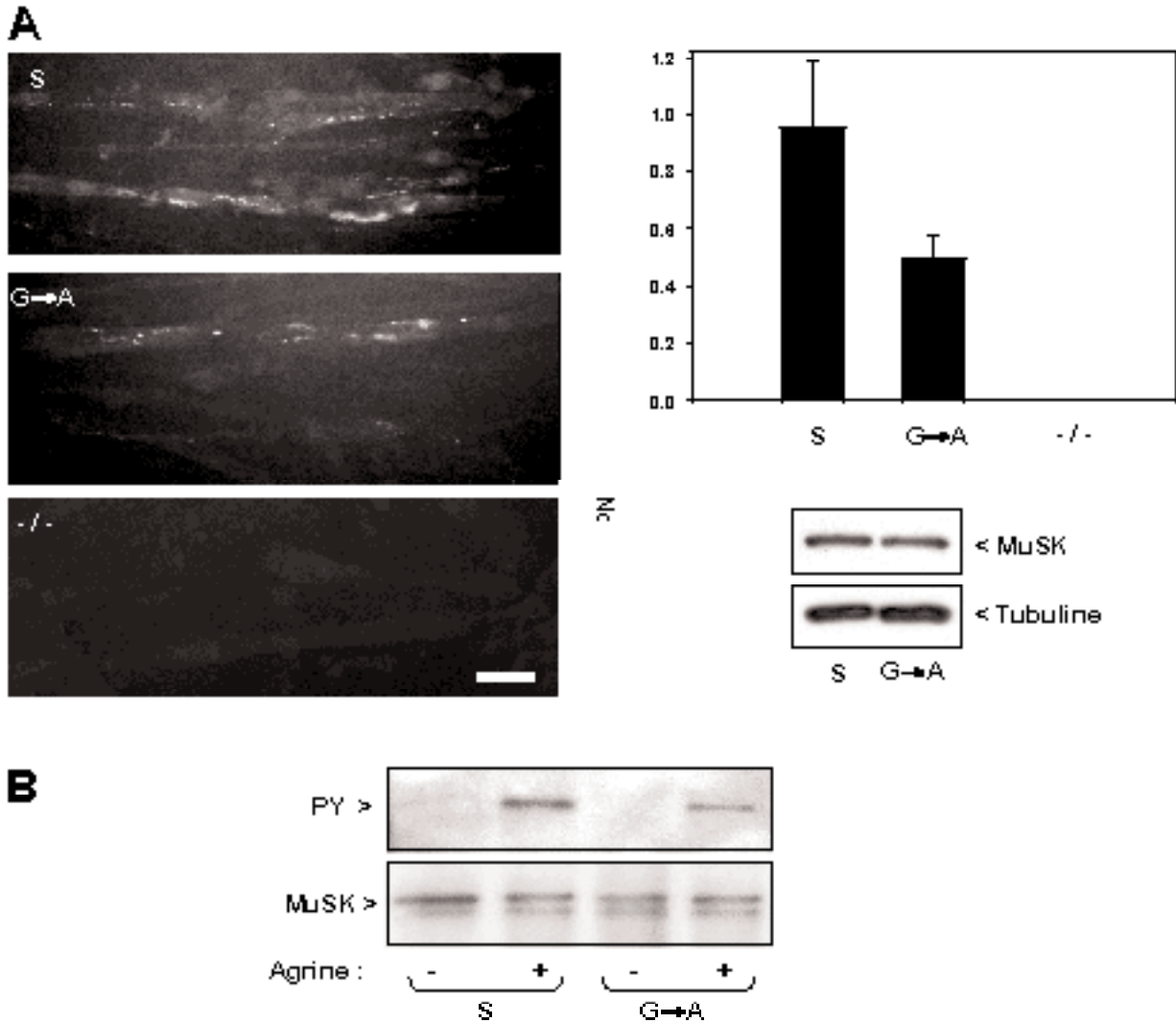


FIG. 5. – Effets de la mutation $G \rightarrow A$ sur l'agrégation du RACH et la phosphorylation de MuSK dépendantes de l'agrine.

(A) MuSK sauvage (S) rétablit l'agrégation des RACH induite par l'agrine dans les lignées cellulaires stables après infection virale. MuSK $G \rightarrow A$ la rétablit aussi mais à un moindre degré. Aucune agrégation de RACH induite par l'agrine n'a pu être mise en évidence dans les myotubes MuSK^{-/-} non transfectés. Barre = 50 μ m et s'applique aux 3 photographies.

Le graphique représente le nombre d'agrégats de RACH par myotube croisant le champ dans 3 expériences indépendantes (15 champs dans chaque boîte de Pétri ont été comptés de façon aléatoire pour chaque condition expérimentale et pour chaque expérience).

Le Western blot montre que des quantités égales de MuSK ont été exprimées par les lignées cellulaires exprimant MuSK sauvage et MuSK $G \rightarrow A$; la tubuline α a été utilisée pour vérifier les dépôts de protéine.

(B) Autophosphorylation de MuSK dépendante de l'agrine dans des cellules infectées par rétrovirus et exprimant MuSK sauvage et $G \rightarrow A$ dans les mêmes quantités. Après immunoprécipitation, MuSK a été visualisé par un immunoblot avec un anticorps anti-phosphotyrosine (PY). Le blot a été lavé et marqué à nouveau avec un anticorps anti-MuSK (MuSK). Cette expérience montre une diminution légère de la phosphorylation de MuSK dépendante de l'agrine.

La mutation $G \rightarrow A$ modifie la structure des JNM

Huit jours après électroporation, la taille et la morphologie des JNM (Fig. 7A) des fibres musculaires transfectées avec MuSK sauvage, pcDNA3 ou le mutant MuSK insC sont restées grossièrement normales. Par contre, quand le vecteur d'expression de MuSK $G \rightarrow A$ a été utilisé, la morphologie des JNM est nettement modifiée : les JNMs sont alors composées de petites cupules et de gout-

tières synaptiques courtes; les terminaisons nerveuses sont anormalement branchées et présentent un bourgeonnement terminal ou ultraterminal. Le rapport de la terminaison nerveuse et du bourgeonnement ultraterminal sur la gouttière synaptique a été mesuré sur 15 JNM au moins et s'avère être augmenté plus de deux fois en présence du mutant $G \rightarrow A$ en comparaison des autres conditions (Fig. 7B). En outre, de nombreuses terminaisons nerveuses sont observées avec des cônes de crois-

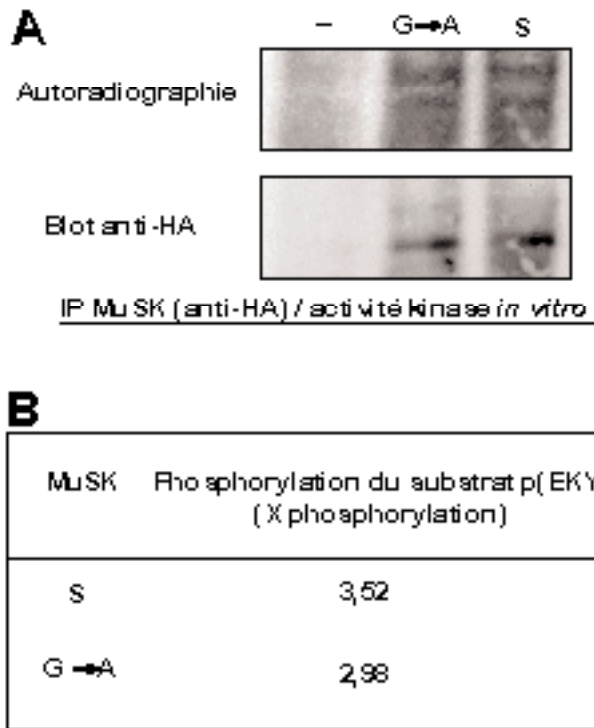


FIG. 6. – Autophosphorylation de MuSK G → A et activité kinase après stimulation par l'ATP.

(A) Phosphorylation *in vitro* de MuSK sauvage (S) et MuSK G → A étiquetés HA après transfection des constructions correspondantes dans des cellules COS. Les anticorps monoclonaux anti-HA-11 et anti-HA-12CA5 ont été utilisés pour l'immunoprécipitation et le Western blot, respectivement. «Témoin» (–) représente les cellules COS non transfectées. MuSK sauvage et MuSK G → A ont été phosphorylés *in vitro* à des niveaux équivalents.

(B) L'expérience d'activité kinase *in vitro* montre que le peptide p(EKY) est phosphorylé à la fois par MuSK sauvage (S) et MuSK G → A. Aucune différence significative dans l'activité kinase entre le mutant G → A et MuSK sauvage n'est détectable.

sance sans agrégats de RACH en regard. Les terminaisons nerveuses des JNM électroporées avec MuSK sauvage sont fortement marquées par un anticorps contre le neurofilament mature de 200 kDa (NF-H) mais faiblement par un anticorps contre le neurofilament immature de 160 kDa (NF-M), alors que chez la souris électroporée avec MuSK G → A seul l'anticorps anti-neurofilament immature de 160 kDa marque l'arborisation terminale et ses bourgeonnements ultraterminaux.

L'expression in vivo du gène de la sous-unité ε du RACH est affectée par MuSK muté (Fig. 7C)

Le gène de la sous-unité ε du RACH est exclusivement exprimé par les noyaux synaptiques. Aussi, quand l'expression de la sous-unité ε du RACH a été mesurée dans les fibres microdissectées 3 jours après électroporation, les résultats ont dû être normalisés par rapport au nombre de JNM présentes dans chaque coupe. Les niveaux d'ARNm de la sous-unité ε du RACH ont été normalisés par rapport aux niveaux de l'ARNm d'ErbB3, qui s'accumule essentiellement dans les cellules de Schwann terminales du com-

partiment présynaptique (Trinidad *et al.*, 2000). Comme attendu, quand le vecteur d'expression de MuSK sauvage est électroporé dans le muscle squelettique, les niveaux d'ARNm de la sous-unité ε du RACH sont augmentés. Par contre, quand le mutant MuSK G → A était exprimé, l'expression de la sous-unité ε du RACH est demeurée légèrement au-dessus du niveau de base observé avec les vecteurs vide ou mutant MuSK insC et clairement diminuée en comparaison de MuSK sauvage. Les modifications majeures de la morphologie des JNM et de l'induction d'une moindre expression de l'ARNm de la sous-unité ε du RACH suggèrent que la surexpression du mutant MuSK G → A induit une dysinnervation fonctionnelle.

DISCUSSION

Nous rapportons ici la description d'un cas de syndrome myasthénique congénital (SMC) lié à des mutations hétéroalléliques dans le gène de MuSK : une mutation décalant le cadre de lecture (220insC) et une mutation faux-sens (V790M). La mutation décalant le cadre de lecture mène à une absence de la protéine tandis que la mutation faux-sens induit l'expression d'un MuSK fonctionnellement anormal.

Ce SMC est de transmission autosomique récessive, les parents de la patiente sont donc hétérozygotes pour les mutations et n'expriment pas la maladie. Le père de la patiente transmet la mutation décalant le cadre de lecture et la mère de la patiente transmet la mutation faux-sens. L'allèle MuSK sauvage compense l'effet pathogène de l'allèle muté de MuSK. Chez la patiente ainsi que chez son frère décédé, l'effet pathogène des deux mutations est cumulé. Le frère et la sœur ont présenté une détresse respiratoire grave dans la période néonatale mais l'issue a été fatale chez le frère et favorable chez la sœur. Bien que portant les mêmes mutations, le frère et la sœur présentent une expression phénotypique différente, particulièrement dans l'évolution de la maladie. Ces variations phénotypiques ne sont pas spécifiques et peuvent être observées dans d'autres types de SMC (Hantäi *et al.*, 2004).

À la JNM, MuSK est connu pour être impliqué dans la régulation de l'agrégation du RACH chez l'embryon (Sanes & Lichtman, 2001) et de l'expression du RACH au cours du développement (Sanes & Lichtman, 2001) et chez l'adulte (Kong *et al.*, 2004). La démonstration est apportée ici que la mutation faux-sens diminue l'agrégation du RACH quand elle est exprimée dans des cellules musculaires en culture et diminue aussi l'expression du RACH dans la biopsie musculaire de la patiente et dans le muscle de souris transfecté. Chez la souris, l'expression forcée de la mutation faux-sens induit des changements synaptiques majeurs semblables à ceux observés dans la biopsie musculaire de la patiente.

Conséquences des mutations de MuSK sur l'agrégation des RACH dépendant de l'agraine

Comme attendu à partir de la mutagenèse de la séquence de l'ADNc, la mutation insC supprime l'expression de

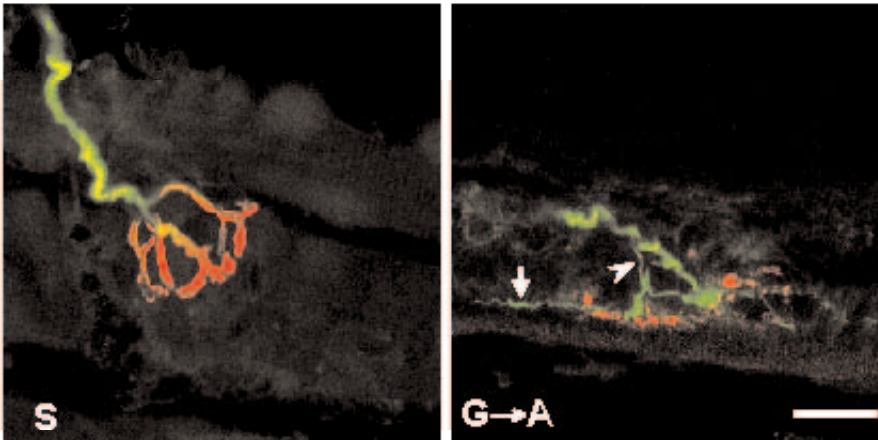
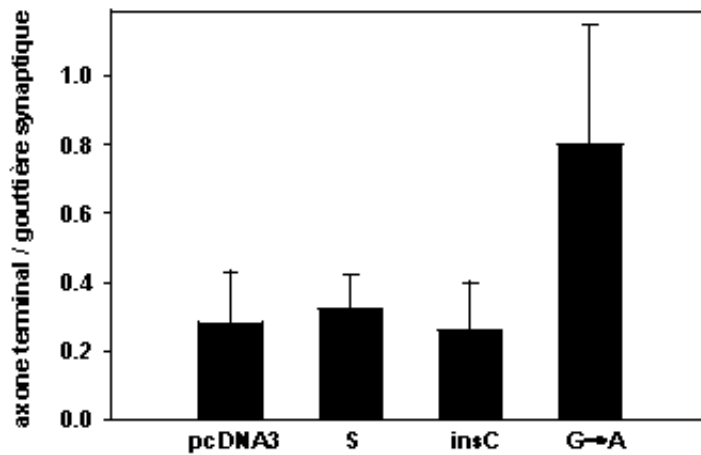
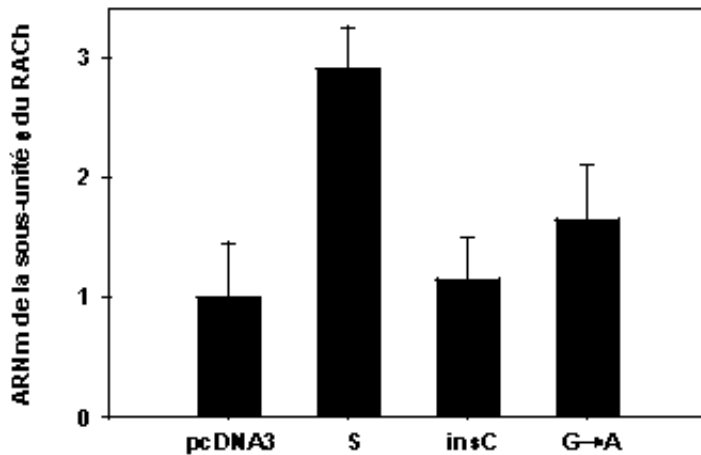
A**B****C**

FIG. 7. – Effets des recombinants MuSK $G \rightarrow A$ électroporés dans le muscle squelettique d'une souris sauvage.

(A) Un bourgeonnement de la terminaison axonale à la JNM a été induit 8 jours après électroporation avec MuSK mutant $G \rightarrow A$. Dans le muscle tibial antérieur de la souris électroporé avec MuSK sauvage (S), la terminaison axonale marquée par l'anticorps anti-neurofilament de 200 kDa (en vert) se termine en fourche avec plusieurs ramifications fines qui pénètrent dans les gouttières synaptiques marquées pour le RACH (en rouge). Dans le muscle tibial antérieur de la souris électroporé avec MuSK $G \rightarrow A$, la terminaison axonale (pointe de flèche) et ses bourgeonnements ultraterminaux (flèche) marqués par l'anticorps anti-neurofilament de 160 kDa (en vert) s'étendent le long de petites cupules synaptiques (en rouge). Barre = 20 μ m, s'applique aux deux photographies.

(B) Mesures quantitatives de la longueur de la terminaison axonale des JNM des muscles électroporés. Le rapport entre la longueur de la terminaison nerveuse et de ses prolongements ultraterminaux sur la longueur de la gouttière synaptique correspondante a été mesuré sur au moins 15 JNM dans chaque condition expérimentale, 8 jours après électroporation du muscle tibial antérieur de souris avec MuSK sauvage (S), MuSK mutant $G \rightarrow A$, MuSK mutant insC ou le vecteur vide (pcDNA3).

(C) Mesures quantitatives de l'ARNm de la sous-unité ϵ du RACH des muscles co-électroporés avec pECFP-nuc et MuSK sauvage (S), MuSK mutant $G \rightarrow A$, MuSK mutant insC ou le vecteur vide (pcDNA3). Trois jours après électroporation, les fibres CFP-positives étaient microdisséquées. L'expression du gène a été mesurée par RT-PCR quantitative sur l'ARN total extrait à partir des fibres musculaires CFP-positives. Les niveaux des ARNm de la sous-unité ϵ du RACH ont été normalisés par rapport à ErbB3. Les niveaux d'expression des gènes sont indiqués comme des pourcentages de leurs niveaux d'expression dans des muscles injectés avec le vecteur vide. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type de trois expériences indépendantes.

porés avec pECFP-nuc et MuSK sauvage (S), MuSK mutant $G \rightarrow A$, MuSK mutant insC ou le vecteur vide (pcDNA3). Trois jours après électroporation, les fibres CFP-positives étaient microdisséquées. L'expression du gène a été mesurée par RT-PCR quantitative sur l'ARN total extrait à partir des fibres musculaires CFP-positives. Les niveaux des ARNm de la sous-unité ϵ du RACH ont été normalisés par rapport à ErbB3. Les niveaux d'expression des gènes sont indiqués comme des pourcentages de leurs niveaux d'expression dans des muscles injectés avec le vecteur vide. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type de trois expériences indépendantes.

MuSK alors que la mutation $G \rightarrow A$ entraîne une réduction des niveaux protéiques de MuSK dans des cellules COS et C2C12 transfectées. Avec ces cellules, nous avons démontré en utilisant le cycloheximide que la réduction des niveaux du mutant MuSK était due à une dégradation accélérée. Afin de déterminer si cette diminution d'expression de MuSK ou si d'autres mécanismes étaient responsables du dysfonctionnement de MuSK, nous avons utilisé des cellules MuSK^{-/-} exprimant MuSK sauvage ou MuSK muté $G \rightarrow A$ afin d'étudier leur capacité à induire l'agrégation du RACH en réponse à l'agrine. Nous avons constaté que la mutation $G \rightarrow A$ réduit de moitié le nombre d'agrégats de RACH. De plus, la phosphorylation de MuSK dépendante de l'agrine a été affectée par la mutation $G \rightarrow A$. Ce changement et le fait que la mutation de $G \rightarrow A$ est située dans la partie carboxy-terminale de la protéine, qui contient le domaine kinase catalytique, nous ont incités à vérifier si la mutation MuSK $G \rightarrow A$ modifiait l'activité catalytique de MuSK en utilisant une analyse *in vitro* de l'activité kinase après stimulation par l'ATP (Herbst & Burden, 2000). Quand des quantités comparables de MuSK muté et MuSK sauvage ont été immunoprécipitées à partir des cellules COS transfectées, nous avons constaté que la mutation $G \rightarrow A$ n'affectait pas l'activité kinase catalytique de MuSK. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la diminution de l'agrégation des RACH dépendante de l'agrine observée avec le mutant MuSK $G \rightarrow A$ ne peut pas être le fait d'une diminution de l'activité kinase catalytique intrinsèque mais plutôt d'une diminution de l'expression de MuSK muté au niveau de la membrane musculaire.

Effets de la mutation $G \rightarrow A$ sur l'expression du RACH et sur la structure synaptique

L'analyse des biopsies de la patiente a montré que la mutation $G \rightarrow A$ affectait d'une façon ou d'une autre la stimulation du gène de la sous-unité ϵ du RACH et probablement de la plupart des gènes synaptiques, puisque leur activation est dépendante d'un mécanisme commun et initié par MuSK (Schaeffer *et al.*, 2001). L'importance de l'atteinte de la neurotransmission peut être suffisante pour avoir comme conséquence une activité électrique réduite dans les fibres musculaires, qui à son tour activerait le facteur myogénique qu'est la myogénine dans la zone extrasynaptique et stimulerait finalement l'expression du gène de la sous-unité γ du RACH. Au total, ces résultats suggèrent que le patient souffre d'une dysinnervation fonctionnelle partielle.

Dans les expériences d'électroporation du muscle squelettique chez la souris, où l'ADNc de MuSK était surexprimé, MuSK $G \rightarrow A$ s'est avéré beaucoup moins efficace dans l'activation de l'expression de l'ARNm de la sous-unité ϵ du RACH que MuSK sauvage. Ceci a pu être la conséquence des niveaux plus bas de MuSK $G \rightarrow A$ par rapport à MuSK sauvage du fait de la stabilité réduite de la protéine mutée comme nous l'avons observé dans les cellules C2C12 ou du fait d'une réduction de la capacité intrinsèque de MuSK $G \rightarrow A$ à activer la transcription sous-synaptique. Il est possible que

la mutation $G \rightarrow A$, en substituant une valine à une méthionine dans une boucle interne de MuSK (Till *et al.*, 2002), modifie la conformation spatiale de MuSK peut-être par un mécanisme néomorphique ou en altérant des sites importants d'interaction. Ceci pourrait interférer avec l'activation des cascades intracellulaires aboutissant à la différenciation postsynaptique (DeChiara *et al.*, 1996 ; Burden, 2002).

Dans le muscle de souris adulte, l'expression de MuSK mutant $G \rightarrow A$ pendant 8 jours a été suffisante pour induire des changements majeurs de la structure synaptique. Ces changements rappellent fortement ceux que nous avons observés chez la patiente. Chez la souris comme chez la patiente, les JNM sont formées de gouttières synaptiques courtes et de petites cupules synaptiques. Ces petites JNM ont donc une surface réduite qui pourrait refléter l'atteinte de la transmission neuromusculaire. Dans les deux cas également, les branches terminales des axones sont anormales: soit de grands boutons terminaux couvraient de petits agrégats de RACH, soit les bourgeonnements ultraterminaux ne trouvaient pas leur cible. Les modifications présynaptiques peuvent être simplement une conséquence de la dysinnervation fonctionnelle. En effet, la dysinnervation fonctionnelle par la toxine botulique (Tian *et al.*, 1995) ou l'extinction de MuSK (Kong *et al.*, 2004) peuvent causer un bourgeonnement. Cependant, dans le muscle de souris l'ampleur du bourgeonnement est plus importante que dans le muscle de la patiente. Par opposition aux axones terminaux de la patiente qui exprimaient le neurofilament mature de 200 kDa (NF-H), les axones terminaux de la souris exprimaient seulement le neurofilament immature de 160 kDa (Nf-M) indiquant que ces axones naissants se comportent comme des axones embryonnaires (Carden *et al.*, 1987 ; Julien, 1999). Ceci suggère que l'ampleur et l'immaturité du bourgeonnement pourraient être la conséquence de la dénervation fonctionnelle et/ou la résultante d'une signalisation rétrograde dépendante de MuSK et encore inconnue (DeChiara *et al.*, 1996 ; Nguyen *et al.*, 2000).

Dans les expériences chez la souris, MuSK muté a été exprimé en présence de MuSK endogène et a néanmoins induit les caractéristiques d'un SMC, ce qui pourrait suggérer que MuSK muté ait eu un effet dominant négatif sur MuSK sauvage. Ceci est en contradiction avec l'expression récessive de la mutation chez l'homme. L'explication la plus probable est que, en raison de l'efficacité d'électroporation, le nombre de molécules mutées de MuSK a suffisamment excédé celui de MuSK endogène pour déplacer cette dernière de tous ses partenaires cellulaires et, ainsi, seul MuSK muté devenait fonctionnel à la JNM. Donc, dans le modèle de souris, comme chez la patiente, la fonction de MuSK serait entièrement le fait du mutant $G \rightarrow A$. De fait, les caractéristiques des JNM étaient très semblables dans les deux cas. En d'autres termes, le fait que des niveaux élevés de MuSK muté aient produit le même effet que chez la patiente semble indiquer que le phénotype n'est pas seulement attribuable aux niveaux réduits de MuSK, mais aussi à l'altération de la capacité de MuSK muté à exécuter sa

fonction physiologique. Des travaux à venir sur la voie de signalisation qui pourrait être perturbée par la mutation serait très intéressants pour permettre l'identification des effecteurs en aval de MuSK.

Cet article illustre l'identification de mutations dans un nouveau gène et la démonstration de leur rôle pathogène dans la survenue d'un SMC. Au sein du réseau français, l'approche que nous utilisons pour la caractérisation physiopathologique des SMC est la suivante : après confirmation du diagnostic basé sur les signes cliniques, le type de transmission héréditaire et l'électromyographie, nous réalisons l'étude de la biopsie musculaire du patient à l'aide de marqueurs synaptiques, ce qui peut permettre de détecter des anomalies structurales ou de composition moléculaire des JNM et amener à l'identification d'un gène candidat (Hantaï *et al.*, 2004). Cette approche peut être fructueuse lorsque l'on est confronté à des cas isolés ou de petites familles alors que l'étude de grandes familles peut être menée par des approches plus classiques d'analyse de liaison.

Remerciements. – Les auteurs tiennent à remercier Markus RUEGG et Christian FUHRER pour le don d'anticorps anti-MuSK, Werner Hoch pour celui de vecteur portant l'ADNc de MuSK de rat, Steve BURDEN pour nous avoir laissé utiliser ses cellules musculaires MuSK^{-/-} et Hans Peter SEELIG pour avoir testé MuSK dans le sérum. Ce travail a été réalisé avec l'aide de l'Inserm (Réseau Inserm de Recherche Clinique), de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (PHRC AOM 1036 et Contrat d'Interface à DH), l'Association Française contre les Myopathies et le GIS-Institut des Maladies Rares.

BIBLIOGRAPHIE

- Bezakova G. & Ruegg M. A., New insights into the roles of agrin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, 4, 295-308.
- Burden S. J., Building the vertebrate neuromuscular synapse. *J. Neurobiol.*, 2002, 53, 501-511.
- Carden M. J., Trojanowski J. Q., Schlaepfer W. W. & Lee V. M.-Y., Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J. Neurosci.*, 1987, 7, 3489-3504.
- Chevessier F., Faraut B., Ravel-Chapuis A., Richard P., Gaudon K., Bauché S., Prioleau C., Herbst R., Goillot E., Ioos C., Azulay J. P., Attarian S., Leroy J. P., Fournier E., Legay C., Schaeffer L., Koenig J., Fardeau M., Eymard B., Pouget J. & Hantaï D., *MuSK*, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 2004, 13, 3229-3240.
- 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., The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation *in vivo*. *Cell*, 1996, 85, 501-512.
- Duclert A., Savatier N. & Changeux J. P., A 83-nucleotide promoter of the acetylcholine receptor epsilon-subunit gene confers preferential synaptic expression in mouse muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 3043-3047.
- Engel A. G., Lambert E. H. & Gomez M. R., A new myasthenic syndrome with endplate acetylcholinesterase deficiency, small nerve terminals, and reduced acetylcholine release. *Ann. Neurol.*, 1977, 1, 315-330.
- Engel A. G., Congenital myasthenic syndromes. In : 73rd European Neuromuscular Center (ENMC) International Workshop. Naarden, the Netherlands, 22-23 October 1999. *Neuromusc. Disord.*, 2001, 11, 315-321.
- Engel A. G., Ohno K. & Sine S. M., Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade. *Muscle Nerve*, 2003, 27, 4-25.
- Fuhrer C., Sugiyama J. E., Taylor R. G. & Hall Z. W., Association of muscle-specific kinase MuSK with the acetylcholine receptor in mammalian muscle. *EMBO J.*, 1997, 16, 4951-4960.
- Gautam M., Noakes P. G., Moscoso L., Rupp F., Scheller R. H., Merlie J. P. & Sanes J. R., Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*, 1996, 85, 525-535.
- Gautam M., Noakes P. G., Mudd J., Nichol M., Chu G. C., Sanes J. R. & Merlie J.P., Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*, 1995, 377, 232-236.
- Glass D. J., Bowen D. C., Stitt T. N., Radziejewski C., Bruno J., Ryan T. E., Gies D. R., Shah S., Mattsson K., Burden S. J., DiStefano P. S., Valenzuela D. M., DeChiara T. M. & Yancopoulos G. D., Agrin acts *via* a MuSK receptor complex. *Cell*, 1996, 85, 513-523.
- Hantaï D., Richard P., Koenig J. & Eymard B., Congenital myasthenic syndromes. *Curr. Opin. Neurol.*, 2004, 17, 539-551.
- Herbst R. & Burden S. J., The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling. *EMBO J.*, 2000, 19, 67-77.
- Ip F. C. F., Glass D. G., Gies D. R., Cheung J., Lai K. O., Fu A. K. Y., Yancopoulos G. D. & Ip N. Y., Cloning and characterization of muscle-specific kinase in chicken. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2000, 16, 661-673.
- Julien J. P., Neurofilament functions in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1999, 9, 554-560.
- Koelle G. B. & Friedenwald J. S., A histological method for localization of cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949, 70, 617-622.
- Kong X. C., Barzaghi P. & Ruegg M. A., Inhibition of synapse assembly in mammalian muscle *in vivo* by RNA interference. *EMBO Rep.*, 2004, 5, 1983-188.
- Kunkel T. A., Roberts J. D. & Zakour R. A., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.*, 1987, 154, 367-382.
- Mir L. M., Bureau M. F., Gehl J., Rangara R., Rouy D., Caillaud J.-M., Delaere P., Branellec D., Schwartz B. & Scherman D., High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 4262-4267.
- Nguyen Q. T., Son Y. J., Sanes J. R. & Lichtman J. W., Nerve terminals form but fail to mature when post-synaptic differentiation is blocked: *in vivo* analysis using mammalian nerve-muscle chimeras. *J. Neurosci.*, 2000, 20, 6077-6086.
- Ohno K., Tsujino A., Shen X. M. *et al.*, Choline acetyltransferase mutations cause congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 2017-2022.
- Ohno K., Engel A. G., Shen X. M., Selcen D., Brengman J., Harper C. M., Tsujino A. & Milone M., Rapsyn mutations in humans cause neuromuscular junction acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, 70, 875-885.
- Richard P., Gaudon K., Andreux F., Yasaki E., Prioleau C., Bauché S., Barois A., Ioos C., Mayer M., Routon M.C., Mokhtari M., Leroy J. P., Fournier E., Hainque B., Koenig J., Fardeau M., Eymard B. & Hantaï D., Possible founder effect of rapsyn-N88K mutation and identification of novel rapsyn mutations in congenital myasthenic syndromes. *J. Med. Genet.*, 2003, 40, e81.
- Sander A., Hesser B. A. & Witzemann V., MuSK induces *in vivo* acetylcholine receptor clusters in a ligand-independent manner. *J. Cell Biol.*, 2001, 155, 1287-1296.

- Sanes J. R. & Lichtman J. W., Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 2001, 791-805.
- Schaeffer L., de Kerchove d'Exaerde A. & Changeux J. P., Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron*, 2001, 31, 15-22.
- Selcen D., Fukuda T., Shen X.-M. & Engel A. G., Are MuSK antibodies the primary cause of myasthenic symptoms? *Neurology*, 2004, 62, 1945-1950.
- Shilitto P., Vincent A. & Newsom-Davis J., Congenital myasthenic syndromes. *Neuromusc Disord.*, 1993, 3, 183-190.
- Tang J., Jo A. J., & Burden S. J., Separate pathways for synapse-specific and electrical activity-dependent gene expression in skeletal muscle. *Development*, 1994, 120, 1799-1804.
- Tian W.-H., Festoff B. W., Blot S., Diaz J. & Hantaï D., Synaptic transmission blockade increases plasminogen activator activity in mouse skeletal muscle poisoned with botulinum toxin type A. *Synapse*, 1995, 20, 24-32.
- Till J. H., Becerra M., Watty A., Lu Y., Ma Y., Neubert T.A., Burden S. J. & Hubbard S. R., Crystal structure of the MuSK tyrosine kinase: insights into receptor autoregulation. *Structure*, 2002, 10, 1187-1196.
- Trinidad J. C., Fischbach G. D. & Cohen J. B., The Agrin/MuSK signaling pathway is spatially segregated from the neuregulin/ErbB receptor signaling pathway at the neuromuscular junction. *J. Neurosci.*, 2000, 20, 8762-8770.
- Tsujino A., Maertens C., Ohno K., Shen X. M., Fukuda T., Harper C. M., Cannon S. C. & Engel A. G., Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 7377-7382.
- Valenzuela D. M., Stitt T. N., DiStefano P. S., Rojas E., Mattsson K., Compton D. L., Nunez L., Park J. S., Stark J. L., Gies D. R. *et al.*, Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron*, 1995, 15, 573-584.
- Woldeyesus M. T., Britsch S., Riethmacher D., Xu L., Sonnenberg-Riethmacher E., Abou-Rebyeh F., Harvey R., Caroni P. & Birchmeier C., Peripheral nervous system defects in *erbB2* mutants following genetic rescue of heart development. *Genes Dev.*, 1999, 13, 2538-2548.
- Zhou H., Glass D. J., Yancopoulos G. D. & Sanes J. R., Distinct domains of MuSK mediate its abilities to induce and to associate with postsynaptic specializations. *J. Cell Biol.*, 1999, 146, 1133-1146.
-