

U272

SESSION 2007

SECOND CONCOURS  
ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE

**BIOLOGIE-BIOCHIMIE**

Durée : 4 heures

L'usage des calculatrices électroniques de poche à alimentation autonome, sans imprimante et sans document d'accompagnement est autorisé.

Cependant, une seule calculatrice à la fois est admise sur la table ou le poste de travail.  
Aucun échange n'est permis entre les candidats.

**Consignes générales**

L'épreuve est constituée de 7 parties qui peuvent être traitées de façon indépendante. Toutefois, l'attention des candidats est attirée sur le fait que des informations données dans une partie peuvent être nécessaires dans des parties postérieures.

*Il est rappelé aux candidats que la notation prendra en compte non seulement la clarté et la précision de leurs réponses, mais également la qualité de leur expression et de leur présentation.*

*Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.*

**Tournez la page S.V.P.**

## L'agrégation des récepteurs cholinergiques nicotiniques : un processus essentiel dans la mise en place de la jonction neuromusculaire

La mise en place des synapses constitue un problème central de la neurobiologie qui peut être étudié au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM) des vertébrés où, suite au contact avec le motoneurone pré-synaptique, la fibre musculaire squelettique se spécialise dans la région synaptique. Cette spécialisation se caractérise en particulier par une agrégation des récepteurs cholinergiques nicotiniques (AChR) au sein de la membrane post-synaptique. Tous les signaux nécessaires à l'induction de cette agrégation ne sont pas encore identifiés, mais l'un d'entre-eux est l'agrine, un protéoglycane à héparane sulfate sécrété par le motoneurone pré-synaptique. Le but de ces expériences est d'étudier d'autres molécules impliquées dans la spécialisation post-synaptique.

### I- Identification de la tyrosine kinase MuSK

1 – L'observation que de nombreux signaux extracellulaires sont convertis par des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) conduit à rechercher si un tel récepteur qui serait spécifique du muscle squelettique peut être identifié. Tous les RTK se caractérisent par la présence dans leur séquence d'un domaine kinase intracellulaire homologue à celui trouvé dans différentes enzymes à activité tyrosine kinase (TK) (**Figure 1**).

**Figure 1** – Alignement du domaine kinase de quatre membres de la famille TK. Les résidus identiques dans toutes les séquences sont indiqués en rouge, les résidus présentant des propriétés similaires sont indiqués en vert. Les pointillés indiquent des lacunes insérées pour optimiser l'alignement.

La recherche d'un RTK spécifique du muscle squelettique est réalisée par PCR. Dans ce but, une banque d'ADNc est construite en utilisant tous les ARNm purifiés à partir d'un muscle squelettique. Les ADNc codant pour des protéines à activité TK sont recherchés dans cette banque par PCR en utilisant les oligodésoxynucléotides **dégénérés** suivants :

amorce 5' (sens) : 5' - TCTTGACTCGAGA (T/C) (T/C) T (N) GC (N) AC (N) (C/A) G (N) - 3'

amorce 3' (antisens) : 5' - GAATTCGAGCTCCC (A/G) (A/T) A (N) GACCA (N) AC (A/G) TC - 3'

Un oligodésoxynucléotide est dit dégénéré si au moins une de ses positions correspond à plusieurs bases. (N) indique l'inclusion des 4 bases en proportions équivalentes à une position donnée, (T/C), (C/A), (A/G) ou (A/T) indiquent respectivement l'insertion des bases T et C, C et A, A et G ou A et T en proportions équivalentes à une position donnée. Les séquences soulignées ne s'hybrident pas avec les ADNc et sont utilisées pour cloner les produits de PCR obtenus dans un plasmide et réaliser une nouvelle banque.

Cette nouvelle banque est alors criblée dans le but d'éliminer les séquences codant des protéines à activité TK déjà connues et le séquençage des clones restants révèle une unique séquence nucléotidique codant une partie de domaine kinase. Cette nouvelle séquence permet d'isoler l'ADNc complet correspondant dans la banque initiale construite à partir des ARNm totaux. Cet ADNc complet code une protéine d'environ 100 kDa appelée MuSK (Muscle-Specific Kinase). L'analyse de l'expression de MuSK révèle que cette protéine est bien exprimée uniquement dans le muscle squelettique.

**Rappelez le principe de la PCR.**

**En vous appuyant sur les annexes 1 & 2, ainsi que sur la Figure 1, justifiez le choix des oligodésoxynucléotides employés.**

## II- Etude du phénotype de souris invalidées pour le gène *MuSK*

2 – Afin d'étudier la fonction de la protéine MuSK au cours du développement du muscle squelettique, des souris invalidées pour le gène *MuSK* sont construites (**Figure 2**). Le domaine kinase de la protéine MuSK comprend 11 sous-domaines (SD1-11) codés par 3 exons. Le sous-domaine 1, comprenant le domaine de liaison de l'ATP, est codé par l'exon 1. Les sous-domaines 5-11, comprenant la région catalytique, sont codés par l'exon 3.

**Figure 2** – (A) Représentation schématique de l'allèle sauvage du gène *MuSK* et de l'allèle mutant correspondant obtenu après recombinaison homologe avec le vecteur de ciblage au niveau des zones encadrées par les pointillés. Les 3 exons codant le domaine TK de la protéine MuSK sont figurés par des boîtes noires. Les cassettes de résistance (*neo* : néomycine & *tk* : thymidine kinase) qui servent à la sélection des cellules souches embryonnaires ayant recombiné l'allèle sont représentées par des boîtes blanches. La taille des fragments de restriction obtenus après digestion EcoRI (R) ou NcoI (N) des ADN génomiques est précisée dans chaque cas. Les positions d'hybridation de la sonde 5' et de la sonde kinase employées pour détecter les ADN génomiques sauvages et mutants sont indiquées. (B) Transfert de type Southern (*Southern blot*) représentatif obtenu avec les ADN génomiques de trois souris différentes digérés par EcoRI ou NcoI et hybridés avec la sonde 5' ou la sonde kinase.

**Quelle région du domaine kinase est supprimée lors de la construction des souris invalidées pour le gène *MuSK* ?**

**Déduisez les génotypes des souris 1, 2 & 3 en utilisant le schéma expliquant la construction réalisée. Indiquez ces génotypes en utilisant la convention classique : +/+ : sauvage, +/- : hétérozygote, -/- : homozygote invalidé.**

3 – Les souris mutantes *MuSK* *-/-* sont **immobiles à la naissance** et meurent immédiatement après. Différentes analyses histologiques sont conduites sur ces mutants. (**Figure 3**)

**Figure 3** – Analyses histologiques *post mortem* de poumons (A,B) et de muscles des membres inférieurs (C,D) de souriceaux nouveaux-nés de génotypes *MuSK* *-/-* et *MuSK* *+/+*. La coloration employée est un rouge-éosine qui permet de colorer respectivement noyau et cytoplasme.

**Comparez ces analyses histologiques.**

**L'analyse histologique des poumons permet-elle d'expliquer la mort des souriceaux mutants *MuSK* *-/-* ?**

4 – La localisation de différentes protéines caractéristiques de la JNM est analysée ensuite sur des diaphragmes entiers pour étudier l'organisation des synapses chez les souris mutantes *MuSK* *-/-* (**Figure 4**). Le choix du diaphragme se justifie en raison de son organisation simple et de sa structure fine permettant de visualiser les synapses dans des préparations de muscles entiers. Le nerf phrénique est orienté perpendiculairement au long axe des fibres musculaires et s'étend à travers la région centrale du muscle.

**Figure 4** – Des diaphragmes entiers de souris sauvages (A,C) ou de souris mutantes *MuSK* *-/-* (B,D) sont marqués simultanément avec des anticorps anti-synaptophysine (SYN) couplés à la fluorescéine et avec de l' $\alpha$ -bungarotoxine ( $\alpha$ -BGT) couplée à la rhodamine. Les flèches en A et B indiquent la position du nerf phrénique. **Une fluorescence est présente en D, mais elle est diffuse.** Echelle : 100  $\mu$ m, identique pour tous les clichés.

La synaptophysine est une protéine transmembranaire majeure des vésicules synaptiques considérée comme un marqueur de la terminaison nerveuse.

**Quelle est la molécule marquée avec l' $\alpha$ -bungarotoxine ?**

**Que pouvez-vous conclure de vos observations quant au rôle de *MuSK* ?**

**Pouvez-vous faire un lien entre vos conclusions et les analyses histologiques précédentes pour expliquer la mort des souriceaux mutants *MuSK* *-/-* ?**

### III- La tyrosine kinase MuSK : un récepteur de l'agrine ?

5 – L'agrégation des AChR induite par l'agrine est étudiée *in vitro* sur des myotubes. Les myotubes sont des cellules plurinucléées qui résultent de la fusion de cellules embryonnaires mononucléées, les myoblastes. **Cette fusion s'accompagne de l'acquisition par les myotubes des marqueurs moléculaires caractéristiques de la différenciation musculaire.** Les fusions successives entre myoblastes et myotubes permettent la croissance progressive des myotubes et leur différenciation en fibres musculaires responsables de la contraction musculaire. Les expériences qui suivent cherchent à préciser le rôle joué par le RTK MuSK dans le processus d'agrégation des AChR (**Figure 5**).

**Figure 5** – Des myotubes prélevés à partir de souris sauvages ou mutantes *MuSK*<sup>-/-</sup> sont traités avec des concentrations croissantes d'agrine (0,01 – 100 nM). Après marquage avec de l' $\alpha$ -BGT couplée à la rhodamine ils sont photographiés (**A**: traitement avec 100 nM agrine, grossissement ~250 x) et l'agrégation des AChR présents à leur surface est quantifiée en fonction de la concentration d'agrine (**B**). Parallèlement, la quantité totale des AChR présents à la surface des myotubes est déterminée **avant traitement par l'agrine** par liaison de l' $\alpha$ -BGT radiomarquée ( $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BGT}$ ) (**C**).

**Commentez et interprétez ces différents résultats. Que suggèrent-ils ?**

6 - Sachant que les RTK s'auto-phosphorylent rapidement sur des résidus Tyr après interaction avec leurs ligands respectifs, l'état de phosphorylation de la protéine MuSK est étudié sur des myotubes en culture stimulés par l'agrine (**Figure 6**).

**Figure 6** – Des myotubes sont stimulés par 10 nM des différentes molécules indiquées ou ne sont pas stimulés (contrôle). Les cellules sont ensuite lysées et les extraits protéiques obtenus sont analysés par transfert de type Western (*Western blot*) avec des anticorps dirigés spécifiquement contre les résidus Tyr phosphorylés de MuSK (**A**) ou d'un autre RTK, ErbB (**B**).

La neuréguline, le bFGF et l'insuline sont des facteurs de croissance connus pour avoir des récepteurs sur le muscle squelettique. La protéine ErbB est un RTK exprimé par le muscle squelettique.

**Quel est l'effet induit par l'agrine sur MuSK ?**

**Ces expériences permettent-elles d'identifier le ligand du RTK ErbB ?**

**L'effet induit par l'agrine sur MuSK est-il spécifique ? Justifiez.**

**Que semblent confirmer ces résultats ?**

7 – Les expériences suivantes ont pour but d'étudier l'interaction entre MuSK et agrine.

La technologie BIAcore est employée dans un premier temps. Cette technologie permet une mesure directe et quantitative de la liaison entre deux molécules. Elle utilise un phénomène optique, la résonance plasmonique de surface, pour détecter des variations de masse à la surface d'un biocapteur sur lequel un de deux interactants (le récepteur) est immobilisé. L'autre interactant (le ligand) est injecté par un système microfluidique dans un flux continu à la surface du biocapteur. Les récepteurs étudiés dans l'expérience suivante sont soit un anticorps monoclonal spécifique de l'agrine (mAc), soit la protéine de fusion MuSK-Fc. Cette protéine recombinante est constituée de l'ectodomaine (*i.e.* le domaine extracellulaire) de MuSK fusionné à la région constante Fc d'immunoglobulines de type G. La protéine de fusion MuSK-Fc mime ainsi le domaine extracellulaire de MuSK. Le ligand utilisé dans les deux cas est l'agrine (**Figure 7A**).

**Figure 7A** – Liaison de l'agrine à la protéine de fusion MuSK-Fc ou à un anticorps monoclonal spécifique de l'agrine (mAc) immobilisés à la surface d'un biocapteur. Selon le cas, cette liaison est étudiée en présence des seuls récepteurs, ou en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM), d'héparine (0,01 mg/mL), de mAc libre (25  $\mu\text{g/mL}$ ) ou de MuSK-Fc libre (25  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Analysez ces résultats.**

**Pourquoi, selon vous, certaines des expériences sont-elles réalisées en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et d'héparine ?**

**Qu'apportent les expériences réalisées en présence de mAc libre et de MuSK-Fc libre ?**

**Que démontrent ces résultats ? Sont-ils cohérents avec ceux obtenus précédemment ?**

Dans un deuxième temps, l'agrégation des AChR induite par l'agrine est quantifiée sur des myotubes en présence de la protéine de fusion MuSK-Fc (**Figure 7B**).

**Figure 7B** – Des myotubes en culture sont pré-incubés avec différentes concentrations de protéines MuSK-Fc ou Ret-Fc, **puis** incubés en présence de 10 nM agrine. A l'issue de ce traitement, les cellules sont marquées par de l' $\alpha$ -BGT couplée à la rhodamine avant d'être examinées en microscopie de fluorescence.

La protéine Ret est un RTK. La protéine recombinante Ret-Fc est constituée de l'ectodomaine de Ret fusionné à la région Fc d'immunoglobulines de type G.

**Que pouvez-vous déduire de ces dernières expériences ? Justifiez.**

**Les résultats obtenus sur les myotubes vous semblent-ils conforter ceux obtenus avec la technologie BIAcore ?**

**Quelle hypothèse pouvez-vous formuler quant à l'interaction entre MuSK et agrine pour expliquer cet ensemble de résultats ?**

#### **IV- La signalisation de MuSK : rôle de la rapsyne et des phosphorylations de tyrosines**

8 - La rapsyne (*receptor-associated protein to the synapse*) est une protéine musculaire **cytoplasmique** associée aux AChR de la membrane post-synaptique. Des souris invalidées pour le gène rapsyne (*Rapsyne*  $-/-$ ) meurent à la naissance et leurs AChR ne s'agrègent pas au niveau de la membrane post-synaptique, y compris en présence de concentrations saturantes d'agrine. Afin de comprendre les relations existant entre agrine, MuSK et rapsyne, la phosphorylation de la sous-unité  $\beta$  du AChR (MM~46kDa) est étudiée sur des myotubes, provenant de souris sauvages, de souris mutantes *MuSK*  $-/-$  et de souris *Rapsyne*  $-/-$  (**Figure 8**).

**Figure 8** – Des myotubes de souris sauvages, mutantes *MuSK*  $-/-$  (**A**) ou mutantes *Rapsyne*  $-/-$  (**B**) sont stimulés par l'agrine puis lysés. Les extraits protéiques obtenus sont ensuite soumis à une immunoprécipitation (IP) avec des anticorps anti-MuSK ou anti-AChR $\beta$ . Le résultat de cette immunoprécipitation est ensuite analysé par *Western blot* (Blot) avec des anticorps anti-tyrosine phosphorylée (P-tyr), anti-MuSK ou anti-AChR $\beta$  (**A,B**).

**Décrivez brièvement le principe de l'immunoprécipitation.**

**Les résultats présentés vous permettent-ils de vérifier que les protéines MuSK et AChR ont bien été immunoprécipitées ?**

**Analysez l'ensemble des résultats obtenus. Qu'en déduisez-vous ?**

9 – La localisation de MuSK, de la rapsyne et de AChR est étudiée dans des cellules non musculaires. Pour cela, des fibroblastes sont transfectés avec des ADNc codant pour MuSK, pour la rapsyne et pour les différentes sous-unités de AChR pour permettre l'expression hétérologue de ces différentes protéines (**Figure 9**).

**Figure 9** – Des fibroblastes sont transfectés avec des ADNc codant pour MuSK, pour la rapsyne et/ou pour les différentes sous-unités de AChR. Deux jours après transfection, les cultures cellulaires sont fixées et soumises à un double marquage fluorescent pour permettre de localiser, dans une même cellule, MuSK et soit la rapsyne, soit AChR. Echelle : 10  $\mu$ m, identique pour tous les clichés.

**Que déduisez-vous de ces résultats ? Que suggèrent-ils quant au rôle joué par la rapsyne ?**

10 - Ce même système est utilisé pour préciser le domaine de MuSK qui serait responsable d'une interaction supposée avec la rapsyne.

Dans un premier temps, des fibroblastes sont co-transfectés avec des ADNc codant pour la rapsyne, pour les différentes sous-unités de AChR et soit pour une forme tronquée de MuSK, soit pour une protéine MuSK chimère (**Figure 10 A&B**).

Dans un deuxième temps, des fibroblastes sont co-transfectés avec des ADNc codant pour la rapsyne et pour différentes protéines MuSK chimères (**Figure 10 C&D**).

**Figure 10** – (A) Schémas de la protéine MuSK sauvage, de la protéine MuSK tronquée et de la protéine chimère TrkA-MuSK utilisées dans les expériences présentées en (B). (B) Des fibroblastes sont co-transfectés avec des ADNc codant la rapsyne, les différentes sous-unités de AChR et l'une des protéines décrites en (A). Après transfection, les cellules sont marquées avec de anticorps fluorescents anti-AChR ( $\alpha$ -AChR) ou anti-MuSK ( $\alpha$ -MuSK). (C) Schémas des protéines chimères MuSK-TrkA utilisées dans les expériences présentées en (D). Les positions des domaines Ig (Ig I-IV) présents dans l'ectodomaine de MuSK sont précisées. Les séquences supprimées dans les chimères sont indiquées par des traits simples. (D) Des fibroblastes sont co-transfectés avec des ADNc codant la rapsyne et l'une des protéines décrites en (C). Après transfection, les cellules sont marquées avec de anticorps fluorescents anti-MuSK ou anti-rapsyne. Echelle : 10  $\mu$ m, identique pour tous les clichés.

La protéine TrkA est un RTK.

**Analysez cette série d'expériences. Quel(s) domaine(s) de MuSK semble(nt) impliqué(s) dans l'interaction supposée avec la rapsyne ?**

**Ce résultat vous paraît-il compatible avec la localisation cellulaire de la rapsyne ? Proposez une hypothèse pour expliquer ce résultat.**

11 – L'activation d'un RTK par fixation de son ligand se caractérise par la phosphorylation de résidus Tyr situés dans différentes régions de son endodomaine (*i.e.* le domaine intracellulaire). La phosphorylation des résidus Tyr présents dans la boucle d'activation du domaine kinase provoque un changement conformationnel indispensable à l'activation de l'activité kinase. D'autres régions de l'endodomaine du RTK, une fois leurs résidus Tyr phosphorylés, servent de sites d'amarrage à de nombreuses protéines de signalisation, permettant ainsi de coupler l'activation du RTK à différentes voies de signalisation en aval du RTK.

Le domaine cytoplasmique de MuSK comprend au total 17 résidus Tyr (Y) dans le domaine kinase et 1 résidu Tyr dans la région juxtamembranaire. Une analyse par spectrométrie de masse révèle, qu'après activation *in vitro*, MuSK est phosphorylée au niveau des résidus Y553 (dans la région juxtamembranaire), Y754 & Y755 (dans la boucle d'activation du domaine kinase) et Y576 & Y812 (dans le domaine kinase) (**Figure 11A**).

Pour déterminer l'importance de ces résidus Tyr dans l'activité de MuSK, chacun d'entre-eux est muté et la capacité de chaque mutant à restaurer l'agrégation de AChR induite par l'agrine est quantifiée dans des myotubes *MuSK*<sup>-/-</sup> (**Figure 11B**).

Le résidu Y553 fait partie d'une séquence consensus NPXY reconnue par les protéines de signalisation possédant un domaine PTB (*phosphotyrosine binding*). X indique que cette position dans le motif peut être occupée par tous les acides aminés. Dans la protéine MuSK la séquence de ce motif consensus est NPMY. Afin d'identifier les acides aminés de ce motif qui sont nécessaires à l'agrégation des AChR induite par l'agrine, les mutants N550A, P551A et Y553A sont exprimés dans des myotubes *MuSK*<sup>-/-</sup> (**Figure 11C**).

**Figure 11** – (A) Schéma de la protéine MuSK présentant la position de l'unique résidu Tyr (Y553) situé dans sa région juxtamembranaire, ainsi que celles des 17 résidus Tyr situés dans son domaine kinase ; les 5 résidus Tyr (Y 553, Y576, Y754, Y755 et Y812) qui sont phosphorylés *in vitro* sont indiqués. Le résidu Y750 appartient également à la boucle d'activation du domaine kinase. (B) Des myotubes *MuSK*<sup>-/-</sup> sont transfectés avec des plasmides codant la protéine MuSK sauvage (WT) ou différentes protéines MuSK mutantes dans lesquelles les résidus Y présentés en (A) sont remplacés par des résidus F. Après transfection les myotubes sont incubés une nuit en présence d'agrine, puis marqués avec de l' $\alpha$ -BGT couplée à la rhodamine avant d'être observés en microscopie de fluorescence. (C) Des myotubes *MuSK*<sup>-/-</sup> sont transfectés avec des plasmides codant la protéine MuSK sauvage (WT) ou différentes protéines MuSK mutantes dans lesquelles les résidus du motif NPXY sont remplacés par des résidus A. L'agrégation de AChR est quantifiée comme en (B).

**Quels résidus semblent essentiels à l'agrégation de AChR ?**

**Le résultats obtenu avec le triple mutant Y750,754,755F était-il attendu ? Justifiez.**

**Pourquoi ne pas avoir muté le résidu M de la séquence NPXY de MuSK ?**

12 - Pour caractériser plus précisément l'importance du motif NPMY présent dans MuSK, des protéines chimères MuSK-TrkA sont exprimés dans des myotubes *MuSK*<sup>-/-</sup> et l'agrégation des AChR induite par l'agraine est quantifiée sur les différents myotubes transfectés (Figure 12).

La protéine TrkA, un RTK d'environ 100 kDa, a été choisie, car son domaine cytoplasmique présente de fortes homologies de séquence avec celui de MuSK. Il contient en particulier un motif NPXY critique pour son activité de signalisation. Toutefois, les séquences au voisinage de ce motif NPXY diffèrent dans les deux protéines.

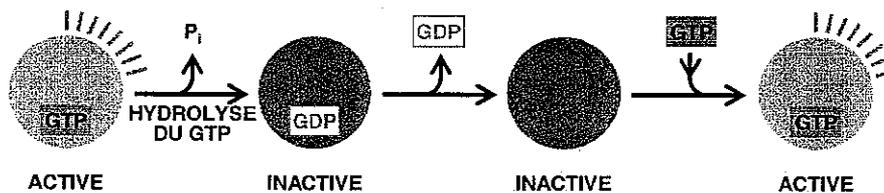
**Figure 12** – (A) Schéma de la protéine MuSK sauvage (MMM), d'une protéine chimère MuSK-TrkA (MTT) comprenant la région juxtamembranaire (TrkA NPXY) et le domaine kinase (TrkA dk) de TrkA et d'une protéine chimère MuSK-TrkA (MMT) comprenant 13 acides aminés de la région juxtamembranaire de MuSK (MuSK NPXY) et le domaine kinase de TrkA (TrkA dk). (B,C) Des myotubes *MuSK*<sup>-/-</sup> sont transfectés avec des plasmides codant l'une des protéines décrites en (A), puis sont stimulés par l'agraine avant d'être lysés. Les extraits protéiques obtenus sont ensuite soumis à une immunoprécipitation (IP) anti-MuSK ou anti-TrkA, suivie par un *Western blot* (Blot) anti-P-tyr, anti-MuSK ou anti-TrkA (B). Alternativement, les extraits protéiques sont soumis à une immunoprécipitation (IP) anti-AChR $\beta$ , suivie par un *Western blot* (Blot) anti-P-tyr et anti-AChR $\beta$  (C). (D) L'agrégation des AChR présents à la surface de myotubes transfectés avec des plasmides codant l'une des protéines décrites en (A) est quantifiée après marquage avec de l' $\alpha$ -BGT couplée à la rhodamine en absence ou en présence d'agraine.

**Analysez cette série d'expériences. Qu'en concluez-vous ?**

#### V- La signalisation de MuSK : rôle des GTPases monomériques

Différentes expériences soulignent la participation du cytosquelette d'actine dans le processus d'agrégation de AChR. Par ailleurs, les GTPases monomériques de la famille Rho sont connues pour participer à la réorganisation du cytosquelette d'actine en réponse à des signaux extracellulaires. Les expériences suivantes ont donc pour objectif de mettre en évidence une éventuelle contribution de ces GTPases monomériques à l'agrégation de AChR faisant suite à l'activation de MuSK par l'agraine.

Rho et Rac sont des GTPases monomériques. Ces protéines jouent le rôle d'interrupteurs moléculaires pour contrôler différents processus cellulaires en passant d'un état actif, lié au GTP, à un état inactif, lié au GDP. L'activité d'une GTPase nécessite la présence d'une molécule de GTP étroitement liée (interrupteur "on"). L'hydrolyse de cette molécule de GTP par la GTPase produit du GDP et du phosphate inorganique ( $P_i$ ) et entraîne la conversion de la protéine en une conformation différente inactive (interrupteur "off"). La réinitialisation de l'interrupteur nécessite la dissociation du GDP étroitement lié. Une fois le GDP dissocié, une nouvelle molécule de GTP se lie rapidement.



Une mutation dominante négative est une mutation qui produit une protéine qui, en interférant avec la fonction de la protéine sauvage dans la même cellule, supprime son effet.

Un mutant constitutivement actif est un mutant qui reste en permanence sous sa forme active.

13 – Les expériences suivantes cherchent à déterminer le rôle des GTPases monomériques Rac et Rho dans l'agrégation de AChR. Dans cette série d'expériences, des myotubes sont transfectés soit avec une forme mutante dominante négative de Rac (N17, GDP lié) (Figure 13A), soit avec une forme mutante constitutivement active de Rac (V12, GTP lié) (Figure 13B), soit avec une forme mutante constitutivement active de Rac (V12, GTP lié) et/ou une forme mutante constitutivement active de Rho (V14, GTP lié) (Figure 13C).

**Figure 13** – (A) Des myotubes sont transfectés avec un plasmide vide (contrôle) ou avec un plasmide codant la protéine RacN17. Ils sont ensuite traités ou non par l'agrine, puis l'agrégation de AChR est quantifiée par immunofluorescence. (B) Des myotubes sont transfectés avec un plasmide vide (contrôle) ou avec un plasmide codant la protéine RacV12, puis l'agrégation de AChR est quantifiée par immunofluorescence. (C) Des myotubes sont transfectés avec un plasmide codant la protéine RhoV14 et/ou avec un plasmide codant la protéine RacV12, puis l'agrégation de AChR est quantifiée par immunofluorescence.

**Analysez ces résultats.**

**Que déduisez-vous des expériences réalisées en présence des protéines RacN17 et RacV12 ?**

**Quelle est la chronologie d'intervention des GTPases Rac et Rho ? Justifiez.**

14 – Afin de déterminer si les GTPases **endogènes** Rac et Rho présentes dans les myoblastes et les myotubes sont directement impliquées dans l'agrégation des AChR induite par l'agrine, l'effet de l'agrine sur l'activité de ces GTPases est étudiée sur ces deux types cellulaires (**Figure 14**).

**Figure 14** – Des myoblastes et des myotubes sont traités par l'agrine, puis sont lysés. Les extraits protéiques obtenus sont alors centrifugés, puis les surnageants sont purifiés sur une colonne d'affinité GST-PBD (A) ou GST-TRBD (B). Les extraits protéiques obtenus après élution sont analysés par *Western blot* avec des anticorps anti-Rac (A) ou anti-Rho (B), parallèlement à des extraits protéiques non purifiés (total, A & B).

La protéine GST (glutathion S-transférase) est utilisée comme étiquette pour purifier des protéines. PBD et TRBD sont des domaines protéiques interagissant respectivement avec les protéines Rac et Rho **actives**.

**Ces expériences vous permettent-elles de déduire quand est exprimée la protéine MuSK au cours de la différenciation musculaire ?**

**Commentez ces résultats et concluez quant au rôle joué in vivo par les GTPases Rac et Rho.**

## **VI- La régulation transcriptionnelle du gène MuSK**

---

Au cours de la formation de la JNM, les gènes codant les protéines MuSK et rapsyne, ainsi que les différentes sous-unités de AChR, sont sélectivement transcrits au niveau des noyaux sous-synaptiques. Les expériences qui suivent ont pour objectif d'étudier une des voies de signalisation impliquée dans ce processus.

15 – La voie de signalisation classiquement décrite en aval de Rac conduit à l'activation par phosphorylation du facteur de transcription c-Jun après activation de la MAP kinase JNK (*c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase*) via la voie des MAP kinase kinases (MKK). L'activité de la MAP kinase JNK est étudiée d'abord (**Figure 15**).

**Figure 15** – Des myoblastes, des myotubes et des cellules épithéliales de la lignée HEK sont traités ou non par l'agrine et l'anisomycine, puis sont lysés. Les extraits protéiques obtenus sont ensuite incubés en présence de la protéine de fusion GST-c-Jun et d'ATP, puis purifiés sur une colonne d'affinité greffée glutathion. Les extraits protéiques obtenus après élution sont analysés par *Western blot* avec un anticorps dirigé contre la protéine c-Jun phosphorylée.

L'anisomycine est un antibiotique activateur de la MAP kinase JNK.

**Que démontrent ces expériences ? Justifiez votre réponse.**

16 – Ensuite, le promoteur du gène MuSK est cloné en amont du gène de la luciférase, puis le plasmide obtenu est transfecté dans des myotubes, seul ou avec un plasmide codant pour différentes protéines impliquées dans la voie de signalisation induite par l'agrine (**Figure 16**).

Le gène de la luciférase est employé en biologie moléculaire en tant que gène rapporteur. Il est en particulier souvent utilisé pour analyser et préciser le fonctionnement d'éléments régulateurs du génome comme les activateurs ou les promoteurs. Ce gène, une fois transcrit, est traduit en une enzyme, la luciférase, qui oxyde son substrat en un produit luminescent. La lumière émise par ce produit est quantifiée par un appareil de mesure très sensible, le luminomètre. La quantification de l'expression du gène de la luciférase peut donc être indirectement suivie par simple mesure d'une intensité lumineuse.

**Figure 16** – Des myotubes sont transfectés avec le plasmide codant pour la luciférase, clonée en aval du promoteur du gène MuSK, tout seul (contrôle) ou avec un des plasmides suivants : pJNK-APF code une forme mutante dominante négative de la MAP kinase JNK, pMKK7D code une forme mutante constitutivement active de la MAP kinase kinase MKK7, pRacV12 code une forme mutante constitutivement active de Rac. Une semaine après transfection, les myotubes sont traités ou non par l'agrine, puis leur activité luciférase est quantifiée.

*Analysez ces expériences. Qu'en concluez-vous ?*

**Résumez en un schéma synthétique les principaux résultats obtenus dans les 6 parties précédentes.**

## VII- MuSK : une nouvelle cible pour une maladie auto-immune

---

La myasthénie grave (MG) est une maladie neuromusculaire chronique qui se manifeste cliniquement par une atteinte de la musculature volontaire. Elle se traduit en particulier par une fatigabilité à l'effort et par une insuffisance respiratoire qui peut engager le pronostic vital. La myasthénie grave est une maladie auto-immune. En effet, 80% des sujets myasthéniques sont porteurs d'auto-anticorps se fixant sur les récepteurs de l'acétylcholine situés sur la membrane post-synaptique de la JNM. De tels auto-anticorps Ac- $\alpha$ -AChR ne peuvent toutefois pas être mis en évidence chez les 20% de sujets myasthéniques restants, mais différents résultats cliniques indiquent que certains de ces sujets sont également atteints d'une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'auto-anticorps dirigés contre une autre cible présente au niveau de la JNM. Les expériences suivantes ont pour objectif de caractériser cette cible.

17 – Une première série d'expériences a pour objectif d'étudier si les auto-anticorps présents dans les plasmas de sujets MG-Ac- $\alpha$ -AChR **séronégatifs** (i.e. des sujets atteints de myasthénie grave, mais non porteurs d'auto-anticorps se fixant sur les récepteurs de l'acétylcholine) interfèrent avec l'agrégation de AChR induite par l'agrine (**Figure 17**).

**Figure 17** – L'agrégation de AChR induite par l'agrine est étudiée sur des myotubes en présence de plasma provenant d'un sujet sain ou d'un sujet MG-Ac- $\alpha$ -AChR séronégatif. Les AChR présents à la surface des myotubes sont visualisés avec de l' $\alpha$ -BGT couplée à la rhodamine (**A**). L'agrégation de AChR est ensuite quantifiée sur des myotubes incubés en présence de plasmas provenant d'un sujet contrôle sain (HC), d'un sujet MG-Ac- $\alpha$ -AChR séropositif (Pos) et de sujets MG-Ac- $\alpha$ -AChR séronégatifs (1-5) en absence (**B**) ou en présence (**C**) d'agrine (Ag).

**D'après l'ensemble des résultats précédents, quelle pourrait être la cible contre laquelle sont dirigés les auto-anticorps présents chez les sujets MG-Ac- $\alpha$ -AChR séronégatifs ? Justifiez votre réponse.**

18 - Dans le but d'identifier cette cible, des extraits de myotubes sont immunoprécipités par des plasmas de différents sujets myasthéniques (**Figure 18**).

**Figure 18** – Des extraits protéiques de myotubes sont immunoprécipités soit avec un plasma contrôle provenant d'un sujet sain (HC), soit avec des plasmas provenant de sujets MG-Ac- $\alpha$ -AChR séronégatifs (Nég A-C) ou de sujets MG-Ac- $\alpha$ -AChR séropositifs (Pos 1-2), soit avec des anticorps provenant de lapins immunisés par la protéine MuSK humaine (Rb). Les immunoprécipités obtenus sont ensuite analysés par *Western blot*.

**Quel type d'anticorps est utilisé lors du Western blot ?  
Que déduisez-vous de ces résultats ?**

**Expliquez la fatigabilité observée chez les sujets myasthéniques.  
Quelles analyses proposeriez-vous pour diagnostiquer une myasthénie grave chez un patient ?  
Quel(s) traitement(s) proposeriez-vous pour traiter une myasthénie grave ?**

## Annexes

### Annexe 1 - Tableau du code génétique

Première lettre (extrémité 5')	Deuxième lettre				Troisième lettre (extrémité 3')
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

### Annexe 2 - Code à une lettre des acides aminés

A : alanine	G : glycine	M : méthionine	S : sérine
C : cystéine	H : histidine	N : asparagine	T : thréonine
D : acide aspartique	I : isoleucine	P : proline	V : valine
E : acide glutamique	K : lysine	Q : glutamine	W : tryptophane
F : phénylalanine	L : leucine	R : arginine	Y : tyrosine

## Figures

Figure 1 - adapté d'après Jennings et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993)

TK1	RRDIVLKWELGEGAFGKVF <del>LA</del> E-CHNLL--PEQ-----DKMLVAVKALK	541
TK2	RHNIVLKRELGEGAFGKVF <del>LA</del> E-CYNLC--PEQ-----DKILVAVKILK	574
TK3	RRDIVLKRELGEGAFGKVF <del>LA</del> E-CYNLS--PTK-----VKMLVAVKALK	575
TK4	RSGLS <del>ELIQ</del> IGRGEFGDV <del>FV</del> GK <del>LK</del> ATLV <del>TS</del> PSD-[60 AA]-LVLVKALN	789
TK1	E-ASESARQDFQREAE <del>LL</del> TMLQH <del>Q</del> HIVRFFGVCTEGRPLLMVFEYMRHGD	590
TK2	D-ASDNARKDFHREAE <del>LL</del> TNLQHEHIVK <del>FY</del> GV <del>CV</del> EGDPLIMVFEYMKHGD	623
TK3	D-PTLAARKDFQREAE <del>LL</del> TNLQHEHIVK <del>FY</del> GV <del>CG</del> GDPLIMVFEYMKHGD	624
TK4	KVKDEQACQEFRRQLD <del>LL</del> RAISHKGV <del>VRL</del> FGLCREKDPHYMVLE <del>Y</del> TDWGD	839
TK1	LNREFLRSHGP-DAKLLAGE-----DV-APG--PLGLGQLLAVASQVAAG	631
TK2	LNKFLRAHGP-DAVLM <del>AE</del> GN-----PP---T--ELTQSQMLHIAQQIAAG	662
TK3	LNKFLRAHGP-DAMILVDGQ-----PRQAKG--ELGLSQMLHIASQICSG	666
TK4	LNQ <del>FL</del> LATAG-KVNTATAGS-----SS--PP--PLTTSQVLAVAYQIARG	879
TK1	MVYL <del>AG</del> LHFVHRDLATRNC <del>LV</del> GQGLVVKIGDFGMSRDIYSTDY <del>Y</del> RVGGRT	681
TK2	MVYL <del>AS</del> QH <del>FV</del> HRDLATRNC <del>LV</del> GENLLVKIGDFGMSRDVYSTDY <del>Y</del> RVGGHT	712
TK3	MVYL <del>AS</del> QH <del>FV</del> HRDLATRNC <del>LV</del> GANLLVKIGDFGMSRDVYSTDY <del>Y</del> RVGGHT	716
TK4	MDAIYRARFVHRDLATRNC <del>VIS</del> SEFIVKISYPALCKDKYSREYHK-HRNT	928
TK1	MLPIRWMPPE <del>SILY</del> RKFTTESDVWSFGVVLWEIF <del>T</del> -YGRQPWYQLSNTEA	730
TK2	MLPIRWMPPE <del>SIMY</del> RKFTTESDVWSYGVVLWEIF <del>T</del> -YGRQPWYQLSNNEV	761
TK3	MLPIRWMPPE <del>SIMY</del> RKFTTESDVWSFGVILWEIF <del>T</del> -YGRQPWFQLSNTEV	765
TK4	LLPIRWLAPECIQ <del>E</del> DEYTTKSDVWSYGVVVWELFNQATKLPHEELTNEQV	978
TK1	IEDCITQGRE-LERPRAC <del>PE</del> VYA <del>IM</del> RGCWQRE <del>PQ</del> QRHSIKDVHARLQALA	779
TK2	IECITQGRV-LQRPRTCPQ <del>EV</del> YELMLGCWQREPH <del>TR</del> KNIKS <del>I</del> HTLLQNLA	810
TK3	IECITQGRV-LERPRVC <del>PE</del> EVYD <del>VM</del> LGCWQRE <del>PQ</del> RLNIKE <del>I</del> YKILHALG	814
TK4	VQRSQAGSLEWSVAEATPDSLR <del>E</del> ILLSCWVSNPKERPSFSQLGAALSKAM	1028
TK1	QAPPVYLDVLG	790
TK2	KASPVYLDILG	821
TK3	KATPIYLDILG	825
TK4	QSAEK	1033

Figure 2 - d'après DeChiara et al. *Cell* 85 (1996)

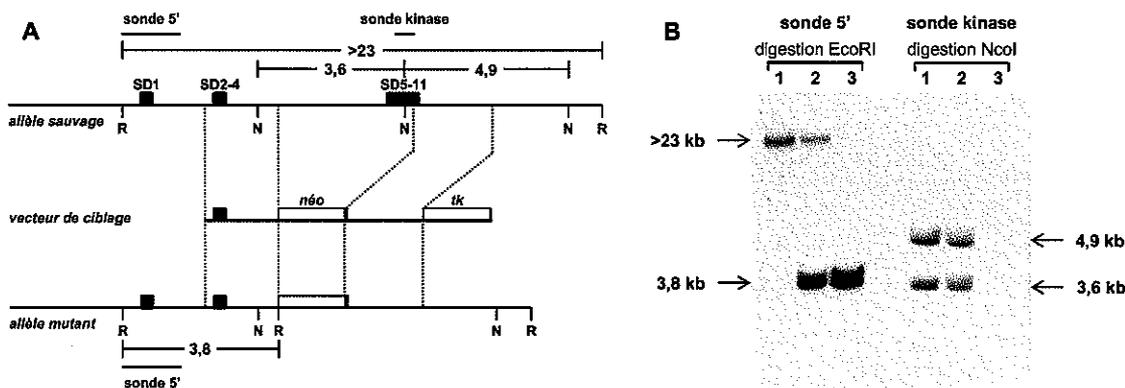


Figure 3 – d'après DeChiara et al. *Cell* 85 (1996)

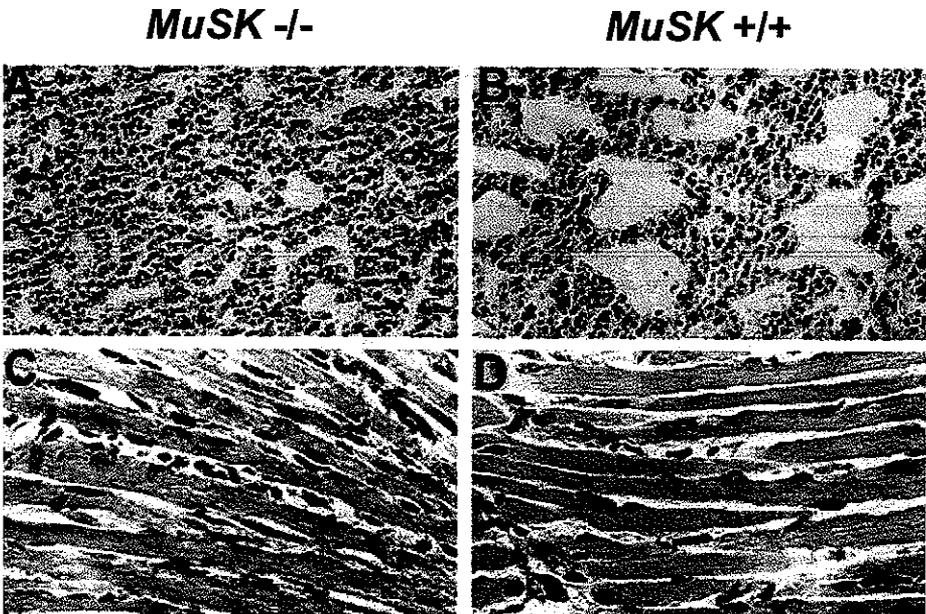


Figure 4 – d'après DeChiara et al. *Cell* 85 (1996)

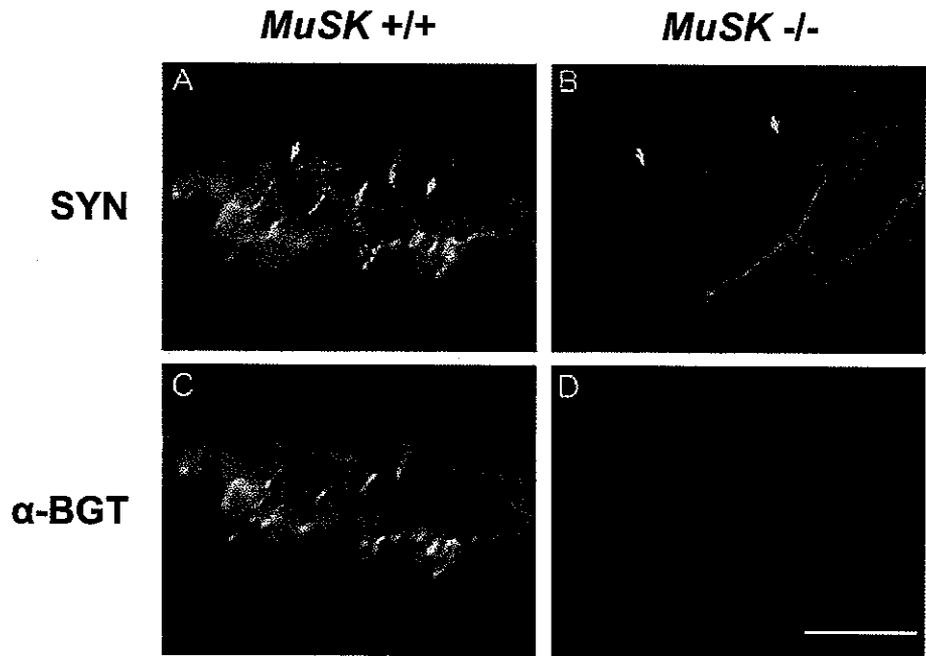
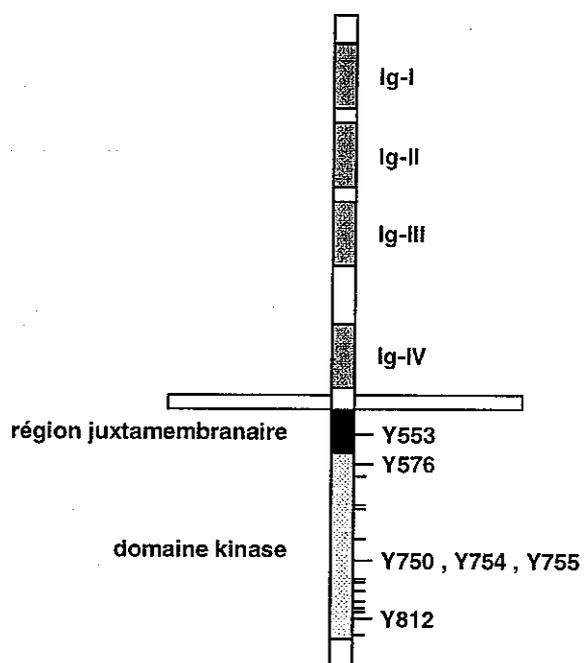
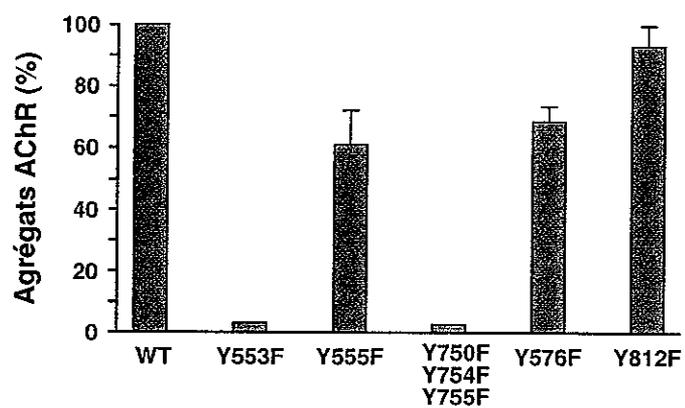


Figure 11 – d'après Herbst et al. *EMBO J.* 19 (2000)

**A**



**B**



**C**

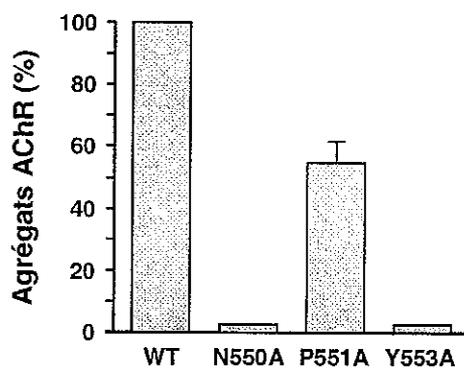
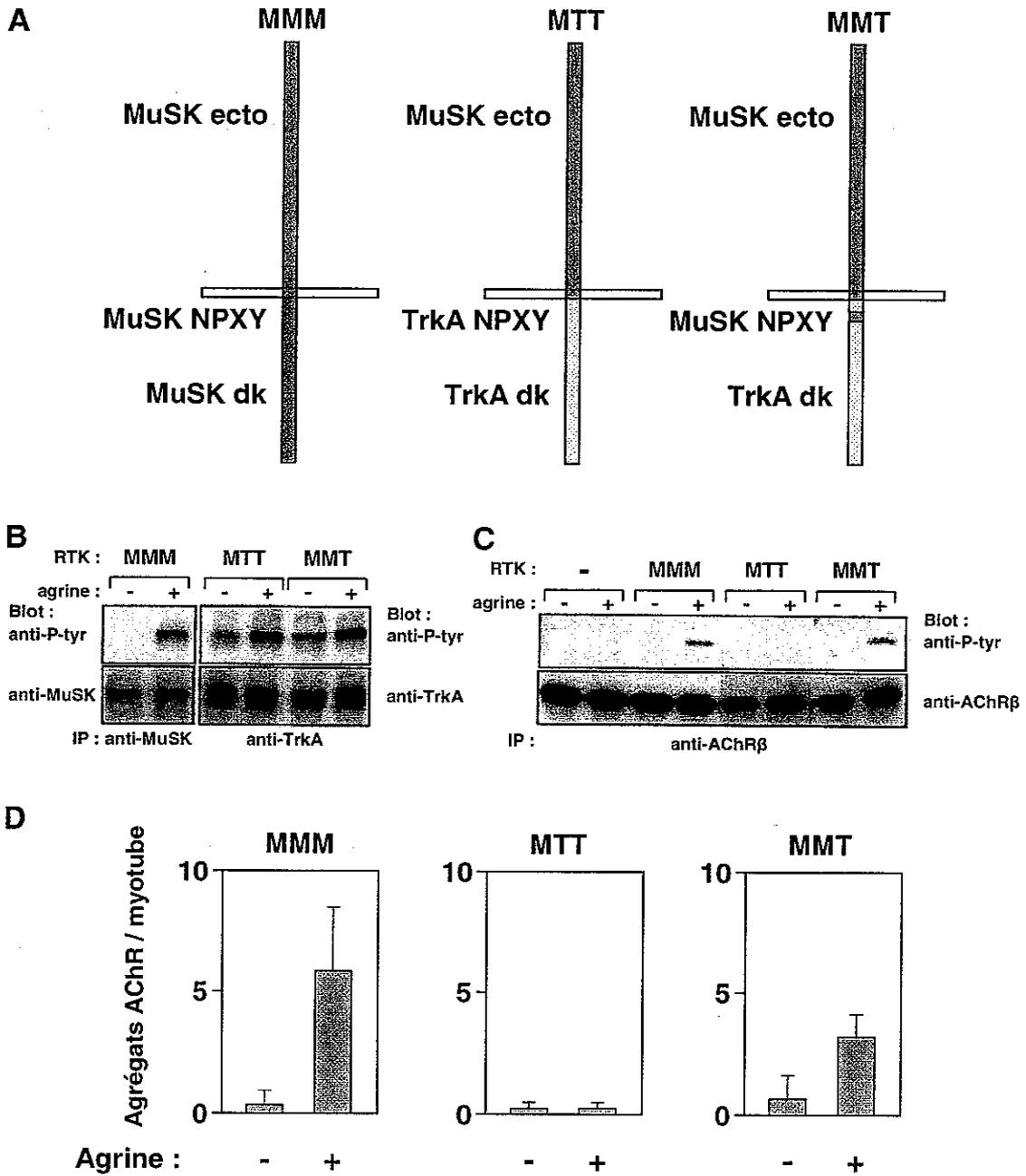
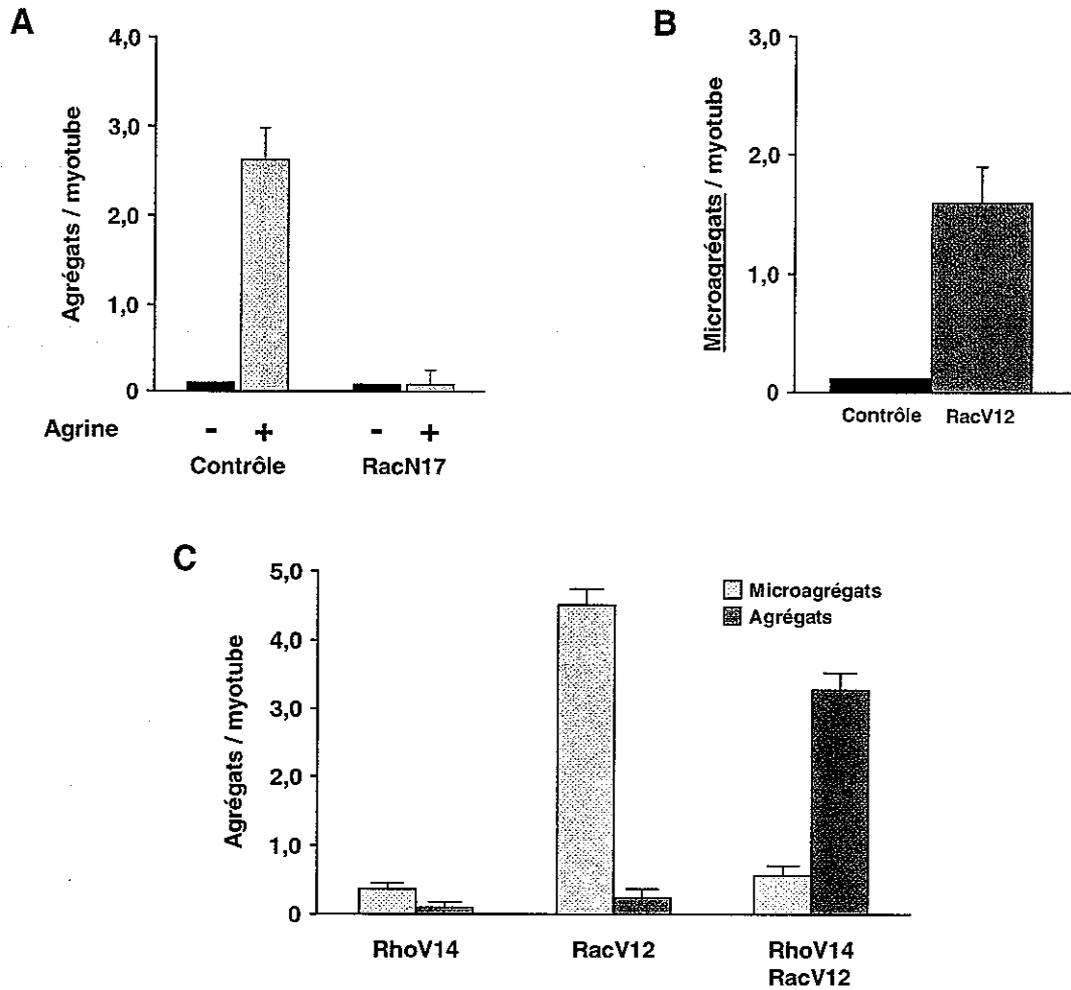


Figure 12 – d'après Herbst et al. *EMBO J.* 19 (2000)



**Figure 13** – d'après Weston et al. *J. Cell Biol.* 150 (2000) & Weston et al. *J. Biol. Chem.* 278 (2003)



**Figure 14** – adapté d'après Weston et al. *J. Cell Biol.* 150 (2000) & Weston et al. *J. Biol. Chem.* 278 (2003)

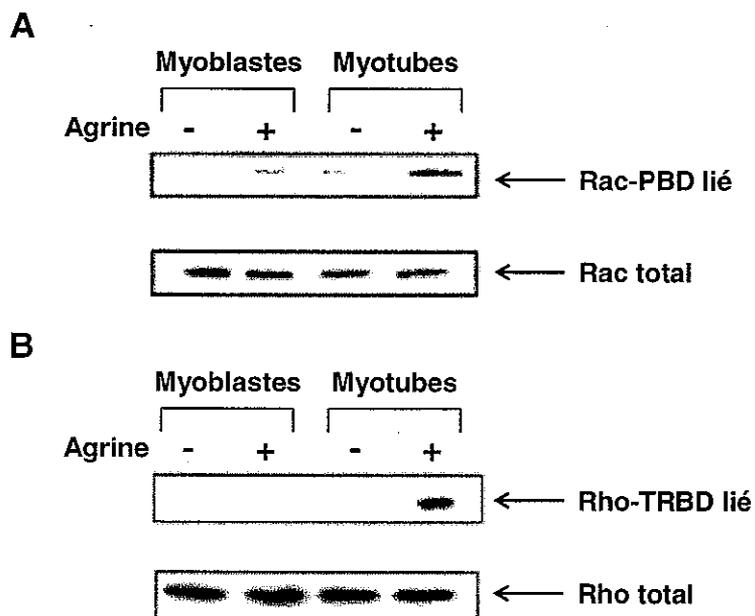


Figure 15 – d'après Weston et al. *J. Cell Biol.* 150 (2000)

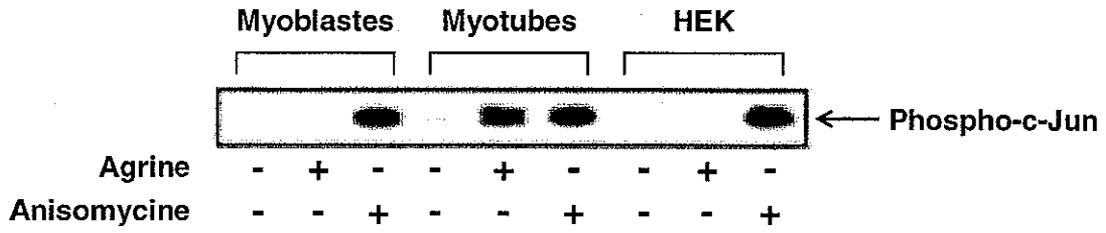


Figure 16 – adapté d'après Lacazette et al. *J. Cell Biol.* 161 (2003)

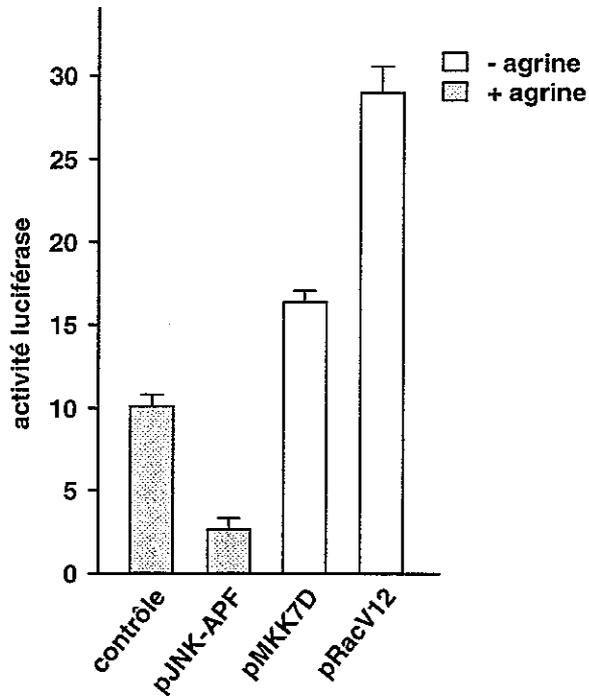


Figure 17 – adapté d'après Hoch et al. *Nature Medicine* 7 (2001)

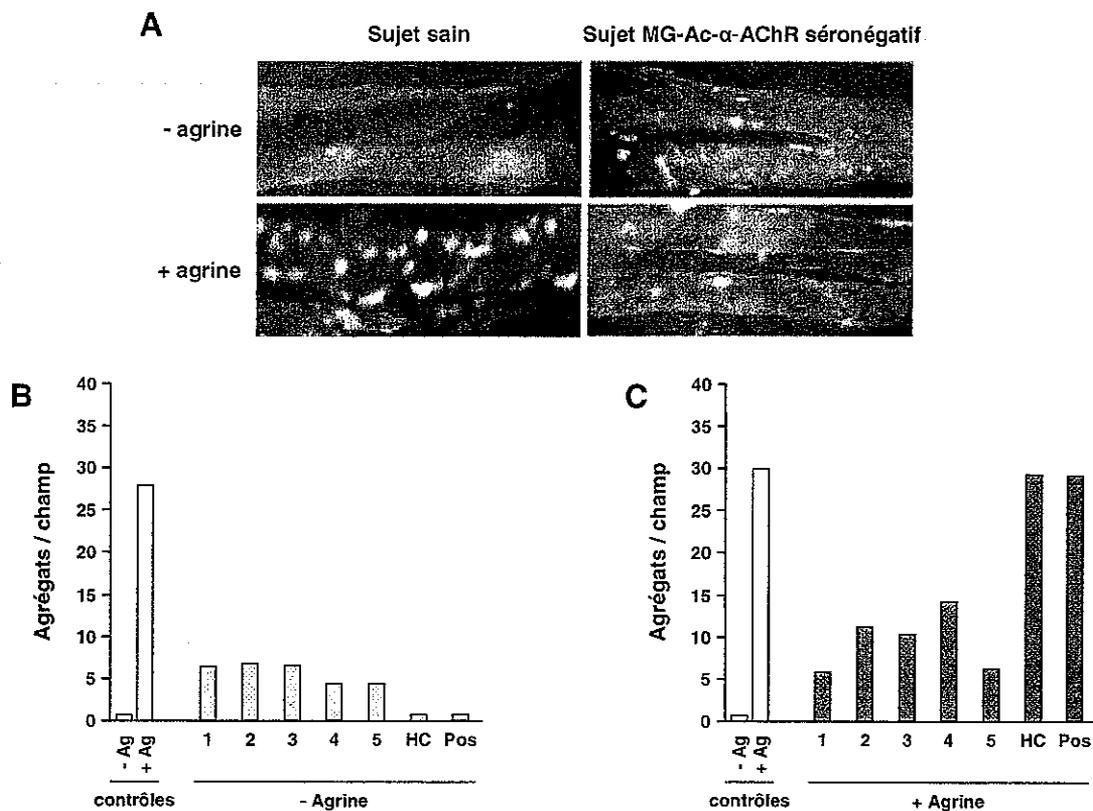


Figure 18 – adapté d'après Hoch et al. *Nature Medicine* 7 (2001)

