



HAL
open science

Vers la compréhension des mécanismes moléculaires et physiopathologiques à l'origine de l'hyperactivité neuromusculaire dans le syndrome de Schwartz-Jampel

Morgane Stum

► **To cite this version:**

Morgane Stum. Vers la compréhension des mécanismes moléculaires et physiopathologiques à l'origine de l'hyperactivité neuromusculaire dans le syndrome de Schwartz-Jampel. Neurosciences. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : 2007PA066266 . tel-00810521

HAL Id: tel-00810521

<https://theses.hal.science/tel-00810521>

Submitted on 10 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Neurosciences

Présentée par :

Morgane STUM

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Vers la compréhension des mécanismes moléculaires et
physiopathologiques à l'origine de l'hyperactivité
neuromusculaire dans le syndrome de Schwartz-Jampel**

Soutenue publiquement le 19 Septembre 2007

JURY

| | |
|---------------------------|---------------|
| Alexis BRICE | Président |
| Anne JOUTEL | Rapporteur |
| Laurent SCHAEFFER | Rapporteur |
| Claire LEGAY | Examineur |
| Georg HAASE | Examineur |
| Sophie NICOLE | Co-directrice |
| Bertrand FONTAINE | Co-directeur |
| Anne BARON-VAN-EVERCOOREN | Co-directrice |

Ce manuscrit résume mes trois années de recherche et de travail, mais la thèse est bien plus que cela. Elle représente l'aboutissement d'un parcours de longue haleine, durant lequel j'ai appris énormément de choses et beaucoup évolué. Dans ces quelques lignes, je tiens à remercier tous ceux qui ont été présents.

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Bertrand FONTAINE et le docteur Anne BARON-VAN EVERCOOREN pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et m'avoir permis de mener à bien mes travaux de recherches. Merci pour vos précieux conseils tout au long de ma thèse. Un grand merci au docteur Sophie NICOLE pour son encadrement scientifique de qualité, pour la rigueur qu'elle m'a transmise et pour son investissement dans le travail.

Je souhaite remercier Alexis BRICE pour avoir accepté d'être le président de mon jury, et également Anne JOUTEL et Laurent SCHAEFFER pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail en ayant accepté d'en être les rapporteurs. Merci à Claire LEGAY et Georg HAASE d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai eu l'honneur de collaborer et qui m'ont permis d'élargir mon champ de vision. Un grand merci à Eric KREJCI pour ses conseils avisés durant tout mon travail, et notamment dans mon choix de post-doc.

Merci à tous les membres de l'U546 pour la bonne ambiance qu'ils ont pu faire régner dans le laboratoire tout au long de ces trois années. Merci à Estelle d'avoir pris soin de mes petites souris ! Merci à mes deux co-thésards Benoît et Cécile, alias GCM et Olig, pour avoir partagé cette galère. Merci à Claire-Sophie de son aide si précieuse dans les manips, à Heidi et Marie qui m'ont rejointe quelques temps sur ce projet, j'ai eu plaisir à travailler avec vous. Merci à Isabelle pour son soutien, ses conseils et ses soirées karaoké. Merci à Christophe d'avoir partagé la nostalgie de notre belle Bretagne.

Merci à celles qui sont devenues plus que des collègues : merci à Cécile pour avoir parcouru ce chemin en même temps que moi, partagé les déprime des manip ratées... à deux c'était plus facile, et ne t'inquiètes pas, la vie nous tend les bras ! Merci à Céline, toi aussi tu y arrivera ! Merci à Corinne pour ses bons gâteaux et pour ses mails véhéments, merci à Violetta pour tous ses conseils de « grande ». Merci de m'avoir initié à la folie du ciné et de la carte UGC, pour les soirées biblio-« *desperate housewives* », les soirées jeux et les week-ends évasion. Merci à Séverine qui est partie de l'U546, mais que l'on n'oublie pas, merci pour les randos rollers du dimanche.

Merci à tous mes amis qui m'ont suivi dans mon parcours depuis mes débuts à l'école et jusqu'à aujourd'hui, merci pour leur aide, leur soutien, leurs encouragements et leur compréhension. Merci à Alexandra qui était présente malgré la distance.

Merci à Cédric, qui est devenu lui aussi beaucoup plus qu'un collègue, qui est entré dans ma vie et dans mon cœur. Merci d'avoir été là pour moi quand j'en ai eu le plus besoin, d'avoir supporté mes humeurs et mes crises de larmes, merci pour tes bras consolateurs. Merci pour ta patience, ton dévouement et ta joie de vivre qui me redonne toujours le sourire. Et merci pour toutes ces autres choses qui rendent notre vie plus belle à deux.

Merci enfin à ma famille, à mes parents sans qui je n'aurais jamais pu arriver jusque là, merci pour votre soutien, votre fierté et tout l'amour que vous me donnez chaque jour. Merci à ma petite sœur Nolwenn, saches que je serai toujours là pour toi, même si je ne vis plus sous le même toit.

SOMMAIRE

Le syndrome de Schwartz-Jampel (SJS) est une pathologie autosomique récessive rare car seulement plus de 100 cas ont été décrits dans la littérature. Elle est caractérisée par une raideur musculaire permanente et généralisée associée à une chondrodystrophie. Elle est due à des mutations perte de fonction dans le gène *HSPG2* codant pour le perlecan, un héparane sulfate protéoglycane ubiquitaire présent dans les membranes basales et les matrices extracellulaires. Une autre pathologie, la dysplasie dissegmentaire de type Silvermann-Handmaker (DDSH) est due à des mutations perte de fonction dans ce gène, et est caractérisée par une chondrodysplasie très sévère menant à la mort du patient dès les premiers jours de vie. Dans une première partie de mon introduction, je décrirai les signes cliniques de ces deux pathologies et les mutations du gène *HSPG2* actuellement connues pour chacune.

Le perlecan est une des plus grandes protéines connues. Avec une séquence protéique de plus de 4300 acides aminés et un poids moléculaire de plus de 450kDa, il subit des modifications post-traductionnelles et peut alors atteindre un poids moléculaire de 800kDa. Cette protéine immense assure de multiples interactions et fonctions dans les membranes basales dans lesquelles elle est ubiquitairement présente. Afin de mieux comprendre quel rôle cette protéine peut jouer dans la détermination du phénotype dans le SJS, je détaillerai dans une seconde partie les différentes molécules avec lesquelles le perlecan interagit et les fonctions qu'il assume dans les deux principaux tissus d'intérêt de la pathologie : le cartilage et le muscle. Enfin, je décrirai le phénotype de mutants d'orthologues de gène *HSPG2* dans les trois organismes modèles que sont la drosophile, le nématode et la souris.

Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée au phénotype neuromusculaire du SJS. Pour une meilleure compréhension de mes travaux, je rappellerai dans une troisième et dernière partie de mon introduction, la structure, le développement et le fonctionnement de la jonction neuromusculaire, ainsi que les pathologies humaines congénitales associées.

| | |
|---|-----------|
| SOMMAIRE | 4 |
| INTRODUCTION..... | 8 |
| I. Le syndrome de Schwartz-Jampel | 9 |
| IA. Clinique..... | 9 |
| IA1. Les anomalies musculaires..... | 10 |
| IA1a. La raideur musculaire..... | 10 |
| IA1b. L'électromyogramme (EMG) | 10 |
| IA1c. L'histologie musculaire..... | 11 |
| IA2. Les déformations ostéoarticulaires..... | 11 |
| IB. Génétique | 12 |
| IC. La dysplasie dissegmentaire de type Silverman-Handmaker..... | 12 |
| IC1. Clinique | 13 |
| IC2. Génétique | 13 |
| ID. Différence SJS / DDSH..... | 14 |
| II. Le perlecan | 14 |
| IIA. Structure du perlecan | 14 |
| IIA1. Le domaine I..... | 14 |
| IIA2. Le domaine II..... | 14 |
| IIA3. Le domaine III | 15 |
| IIA4. Le domaine IV | 15 |
| IIA5. Le domaine V | 15 |
| IIA6. Les modifications post-traductionnelles | 16 |
| IIA6a. Chaînes glycosaminoglycanes (GAG)..... | 16 |
| IIA6b. Glycosylations | 16 |
| IIB. Expression..... | 17 |
| IIC. Interactions..... | 17 |
| IIC1. Les composants des membranes basales..... | 18 |
| IIC1a. Les collagènes | 18 |
| IIC1b. Les laminines et les nidogènes..... | 19 |
| IIC1c. Fibronectine – Fibuline – Fibrilline | 20 |
| IIC1d. Les protéines spécifiques de la matrice cartilagineuse | 21 |
| IIC1e. Les autres protéines des membranes basales et matrices extracellulaires..... | 21 |
| IIC2. Les récepteurs cellulaires | 22 |
| IIC2a. Le dystroglycan..... | 22 |
| IIC2b. Les intégrines | 22 |
| IIC3. Les facteurs de croissance..... | 23 |
| IIC3a. Les FGFs | 23 |
| IIC3b. TGF – INF – PDGF – PF4..... | 23 |
| IIC3c. Les facteurs de croissance chondrogéniques..... | 24 |
| IIC3d. Les facteurs de croissance tumorigéniques..... | 24 |
| IID. Fonctions du perlecan | 25 |
| IID1. Dans le cartilage | 25 |
| IID1a. La chondrogenèse | 25 |
| IID1b. Composition du cartilage..... | 26 |
| IID1c. Rôles du perlecan..... | 26 |
| IID2. Dans le muscle..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| IID2a. La myogenèse | 27 |
| IID2b. L'organisation d'une fibre musculaire..... | 28 |
| IID2c. Rappel sur le mécanisme de contraction..... | 29 |
| IID2d. Rôle du perlecan | 29 |
| II E. Modèles animaux | 30 |
| II E1. La drosophile <i>Drosophila melanogaster</i>..... | 30 |
| II E1a. La structure de Trol | 30 |
| II E1b. Expression | 31 |
| II E1c. Phénotype des mutants | 31 |
| II E1d. Fonctions de Trol | 32 |
| II E2. Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>..... | 32 |
| II E2a. Structure et régulation de Unc-52 | 32 |
| II E2b. Expression | 33 |
| II E2c. Phénotype des mutants | 34 |
| II E2d. Fonctions de UNC-52 | 35 |
| II E3. La souris <i>Mus musculus</i> | 35 |
| II E3a. Structure du perlecan murin | 35 |
| II E3b. Invalidation du gène Hspg2 | 36 |
| II E3c. Modèles hypomorphes | 37 |
| III. La jonction neuromusculaire (JNM) et pathologies associées | 38 |
| III A. Le développement de la JNM..... | 39 |
| III A1. La différenciation présynaptique..... | 39 |
| III A2. La différenciation post synaptique | 40 |
| III B. La transmission du potentiel d'action synaptique | 41 |
| III C. Les composants de la JNM adulte | 42 |
| III C1. Le nerf terminal | 42 |
| III C2. La cellule de Schwann terminale (CST)..... | 42 |
| III C3. La membrane basale synaptique..... | 43 |
| III C3a. Agrine | 43 |
| III C3b. Collagènes | 44 |
| III C3c. Laminines..... | 44 |
| III C3d. Nidogène..... | 45 |
| III C3e. Les neuréglines et leurs récepteurs ErbB..... | 45 |
| III C4. La fibre musculaire | 46 |
| III C4a. Structure de l'élément post-synaptique..... | 46 |
| III C4b. Protéines du complexe post-synaptique | 47 |
| III D. Le complexe acétylcholinestérase-ColQ | 49 |
| III D1. L'acétylcholinestérase (AChE) | 49 |
| III D1a. Les différents isoformes | 49 |
| III D1b. Rôles de l'AChE..... | 50 |
| III D1c. Phénotype des mutants AChE | 50 |
| III D2. ColQ | 51 |
| III D2a. Structure..... | 51 |
| III D2b. Phénotype des mutants ColQ | 51 |
| III D2c. Le complexe perlecan-ColQ-MuSK | 52 |
| III E. Hypothèse perlecan et SJS | 52 |
| III F. Les syndromes myasthéniques congénitaux (SMC) | 53 |
| III F1. Syndrome myasthénique pré-synaptique | 53 |
| III F2. Syndrome myasthénique synaptique..... | 54 |

| | |
|---|-----|
| IIIF3. Syndromes myasthéniques post-synaptiques | 54 |
| IIIF3a. Altérations des RACHs | 54 |
| IIIF3b. Altérations des canaux sodiques | 55 |
| IIIF3c. Altérations de MuSK et Rapsyne | 56 |
| IIIF3d. Altérations de DOK-7 | 57 |
| OBJECTIFS DE LA THESE | 58 |
| RESULTATS ET DISCUSSION | 59 |
| I. Article I publié | 60 |
| IA. Article..... | 62 |
| IB. Résultats complémentaires | 63 |
| IC. Mécanismes responsables du déficit en perlecan | 65 |
| IC1. Contrôle qualité pour les mutations faux-sens | 65 |
| IC2. NMD pour les mutations tronquantes | 66 |
| II. Article II en préparation | 68 |
| IIA. Article | 70 |
| IIB. Résultats complémentaires: lignée <i>Hspg2</i> ^{C1532Y} | 71 |
| IIB1. Phénotype et génétique | 71 |
| IIB2. Expression du perlecan | 72 |
| IIB3. Phénotype musculaire | 73 |
| IIC. Perspectives..... | 78 |
| CONCLUSION | 80 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 81 |
| ANNEXES | 101 |
| I. Article III en préparation | 103 |
| II. Revue I..... | 104 |
| III. Revue II..... | 105 |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Le syndrome de Schwartz-Jampel

Le syndrome de Schwartz-Jampel (SJS, OMIM 255800) fut décrit la première fois par Oscar Schwartz et Robert Jampel en 1962 (Schwartz and Jampel 1962). Ces deux ophtalmologistes présentèrent le cas d'un frère et d'une sœur atteints d'un syndrome jusqu'à ce jour jamais décrit dans la littérature, associant de petites fentes palpébrales à une mobilité réduite du visage avec des lèvres pincées. Alberfeld rapporta par la suite chez ces deux patients une myotonie généralisée, des contractures au niveau des articulations et une chondrodystrophie (Aberfeld *et al.* 1965; Aberfeld *et al.* 1970).

Depuis lors, plus d'une centaine de cas ont été décrits, ce qui a permis une description plus détaillée des signes cliniques du syndrome. En 1997, une classification du syndrome de Schwartz-Jampel selon le phénotype a identifié 3 types (Giedion *et al.* 1997):

- le SJS de type 1A, avec un début dans l'enfance et une chondrodystrophie modérée.
- le SJS de type 1B, avec un début dans la petite enfance et des anomalies chondrodystrophiques plus marquées. La raideur musculaire est présente dans ces deux types.
- le SJS de type 2. Ce type se caractérise par de nombreuses anomalies squelettiques, des os longs arqués, des épisodes d'hyperthermie et de détresse respiratoire qui mènent généralement à la mort du patient pendant l'enfance. Il a été rapproché du syndrome de Stüve-Wiedemann (SWS, OMIM #601559) selon des critères cliniques (Cormier-Daire *et al.* 1998), puis génétiques (Dagoneau *et al.* 2004). En effet, des mutations dans le gène *LIFR* (Leukemia Inhibitory Factor Receptor), codant pour un récepteur de cytokines impliqué dans la voie JAK/STAT3, ont été identifiées dans le SJS2 et le SWS (Dagoneau *et al.* 2004). L'ensemble de ces résultats fait de ce type 2 une entité différente du syndrome de Schwartz-Jampel.

IA. Clinique

Les deux signes cliniques principaux du SJS sont une chondrodystrophie et une raideur musculaire, résultant notamment en un faciès particulier (figure 1). Ces signes apparaissent durant la petite enfance, sont peu progressifs jusqu'à l'adolescence, puis se stabilisent chez l'adulte, n'affectant pas la durée de vie (Brown *et al.* 1975).

IA1. Les anomalies musculaires

IA1a. La raideur musculaire

La raideur musculaire, qui s'apparente à une myotonie, c'est-à-dire une difficulté à la décontraction des muscles, est constante et généralisée chez les patients atteints de SJS. Des cas d'hypertrophie musculaire (Mereu *et al.* 1969), donnant l'aspect extérieur d'une musculature très développée, dure et ferme, ayant conduit au surnom « d'enfant herculéen » chez quelques patients, mais également des cas d'atrophie musculaire (Cordeiro-Ferreira *et al.* 1973) ont été décrits. Les réflexes tendineux sont diminués. La démarche est raide et hésitante et les mouvements sont généralement lents et difficiles.

Cette raideur musculaire permanente donne un aspect particulier au visage (figure 2): l'expression figée et immobile donne un air de tristesse aux patients. Les fentes palpébrales sont rétrécies, avec un blépharospasme (contraction involontaire des muscles des paupières), un blépharophimosi (longueur réduite de la fente palpébrale) et un ptosis (hauteur réduite de la fente palpébrale). L'ouverture des yeux est difficile. La contraction des muscles du visage est marquée par des plis au niveau du front et du menton. Le cou est court et l'implantation des oreilles est basse. La voix est aigüe et nasillarde. Le palais est arqué en ogive. Les lèvres sont pincées et on observe une microstomie (petite ouverture de la bouche) et une micrognathie (sous développement des os des mâchoires), entraînant des manifestations orthodontiques (mauvais placement des dents, racines déformées) (Diaz-Serrano *et al.* 2006).

IA1b. L'électromyogramme (EMG)

La raideur musculaire observée dans le SJS est causée par une hyperactivité constante du muscle. Le silence électromyographique n'est pratiquement jamais obtenu, même au repos ou sous anesthésie générale. Deux types de salves ont été rapportées, qui peuvent se retrouver chez un seul patient (Cadilhac *et al.* 1975):

- des salves myotoniques classiques avec des sons de « piquées d'avion », qui augmentent et diminuent en amplitude et fréquence, et qui peuvent toujours être provoquées en présence de curare, un inhibiteur de la transmission synaptique

- des décharges répétitives complexes ou pseudomyotoniques, très longues, d'amplitude et de fréquence constante et élevée, qui commencent et s'arrêtent brutalement. Elles sont présentes spontanément au repos et fortement diminuées avec un traitement au curare. (Taylor *et al.* 1972) (figure 3).

La myotonie classique, résultant d'une difficulté à la décontraction musculaire, est caractérisée par des salves de fréquence et d'amplitude variables qui ne sont pas abolies par un blocage de la transmission synaptique. De plus, cette difficulté à la décontraction musculaire se produit après une contraction volontaire, et non pas spontanément comme on peut le voir chez les patients SJS. La neuromyotonie, quant à elle, est caractérisée par des décharges de fréquence et d'amplitude constante, mais le silence électrique peut être obtenu et on ne retrouve pas de sensibilité excessive de la membrane musculaire, comme ce qui est le cas chez les patients SJS. L'origine myogénique ou neurogénique de l'hyperactivité musculaire dans le SJS n'est donc aujourd'hui toujours pas clairement établie.

IA1c. L'histologie musculaire

L'analyse du muscle en histologie et microscopie électronique révèle des anomalies de type dystrophique. Une variabilité de la taille des fibres est notée, avec des fibres de gros calibre ou au contraire une diminution du diamètre. Une prédominance du nombre de fibres de type I par rapport à celui des fibres de type II, regroupées en faisceau, est observée (Desbois *et al.* 1977), signe d'une réinnervation. On peut voir des fibres en dégénérescence avec des images en tourbillon, du splitting (scission de la cellule) ou des vacuolisations. Des noyaux centraux sont également visibles, qui peuvent être le signe d'une régénération musculaire (Huttenlocher *et al.* 1969). Des infiltrats de tissu adipeux ou conjonctif ont été répertoriés, signe d'une perte de fibres musculaires. Ces lésions ne sont pas spécifiques du SJS car on les retrouve dans différentes myopathies ou dystrophies, mais sont le signe d'un muscle en souffrance (figure 4).

IA2. Les déformations ostéoarticulaires

Les déformations osseuses sont multiples et de sévérité très variable. Elles sont particulièrement marquées par un retard staturo-pondéral, de -1 à -5 déviation standard. Une dysplasie ou dislocation des hanches de type coxa vara (hanches rentrées vers l'intérieur) (Huttenlocher *et al.* 1969) ou coxa valga (hanches sorties vers l'extérieur) (Schwartz and Jampel 1962) est souvent présente. Les articulations sont raides, surtout au niveau des hanches et des genoux, donnant des mouvements difficiles et limités. Les pieds et les chevilles sont déformés, évasés (Taylor *et al.* 1972; Horan and Beighton 1975). On peut noter une cyphose (Desbois *et al.* 1977), associée ou non à une scoliose. L'abdomen est proéminent et le sternum projeté en avant. Des hernies discales avec platyspondylie (aplatissement et élargissement des vertèbres) sont présentes. Les diaphyses sont fines et arquées (Cadilhac *et*

al. 1975), alors que les épiphyses sont irrégulières, élargies et parfois fragmentées (Aberfeld *et al.* 1970). Une ostéoporose est parfois notée (Giedion *et al.* 1997). Une biopsie du cartilage chez un patient SJS de 6 ans a montré une désorganisation de la structure en colonnes des chondrocytes, cellules à l'origine du cartilage (Aberfeld *et al.* 1965).

IB. Génétique

La transmission génétique du SJS, de type autosomique récessif, ne faisait aucun doute au vu de l'affection de fratries. En 1995, une analyse de liaison génétique entre la maladie et des marqueurs microsatellites a été effectuée par cartographie d'homozygotie chez 12 patients SJS issus de cinq familles (originaires de Tunisie, d'Algérie et d'Afrique du Sud) (Nicole *et al.* 1995). Le locus du SJS fût alors localisé en 1p34-p36.1, sur le bras court du chromosome 1, dans un intervalle génétique de 8cM. En 1996, cet intervalle fût réduit à 3cM grâce à l'étude de huit familles supplémentaires (originaires de Turquie, de France, du Mexique mexicaine et hollandaise) (Fontaine *et al.* 1996).

En 2000 des mutations du gène *HSPG2* codant pour le perlecan ont été identifiées chez sept patients issus de trois familles consanguines (Nicole *et al.* 2000). Chez l'homme, ce gène est composé de 97 exons (Cohen *et al.* 1993; Nicole *et al.* 2000), et code pour un cadre ouvert de lecture de 13,2kb (Kallunki and Tryggvason 1992; Murdoch *et al.* 1992). Au début de mon travail de thèse, dix mutations du gène *HSPG2* associées au SJS étaient publiées dans huit familles ([tableau 1](#)): quatre substitutions nucléotidiques touchant des sites d'excision épissage (c.4741-10T>G dans le site accepteur de l'intron 37; c.4740G>A dans l'exon 37; c.7294+4A>G dans le site donneur de l'intron 56; c.8464+4A>G dans le site donneur de l'intron 64), deux mutations faux-sens (c.4595G>A dans l'exon 36; c.8464G>A dans l'exon 64) et quatre délétions (c.720_1654del, grande délétion des exons 8 à 13; délétion de l'intron 60; c.8759-3_8764del9 du site accepteur de l'intron 66; c.12920_3'del7108 des exons 96 et 97 et d'une partie de la région non codante 3') (Nicole *et al.* 2000; Nicole *et al.* 2001; Arikawa-Hirasawa *et al.* 2002). Un immunomarquage sur fibroblastes en culture établis à partir de biopsies de peau de deux patients avait révélé une diminution de la quantité de perlecan sécrété dans la matrice extracellulaire (Arikawa-Hirasawa *et al.* 2002).

IC. La dysplasie dissegmentaire de type Silverman-Handmaker

La dysplasie dissegmentaire de type Silverman-Handmaker (DDSH, OMIM 224410) est allélique au SJS. Le premier patient a été décrit en 1969 par Silverman qui utilisa le terme de

nanisme dysostotique, puis en 1977, Handmaker décrit un autre patient et utilisa le terme dysplasie dissegmentaire (Handmaker *et al.* 1977).

IC1. Clinique

Les anomalies osseuses de la DDSH sont très sévères (Fasanelli *et al.* 1985; Aleck *et al.* 1987) (figure 5). Elles incluent notamment un nanisme, une micromélie (raccourcissement des membres), un thorax étroit et court, des côtes courtes et horizontales, des clavicules allongées, des fémurs et tibias arqués, des hernies. On observe un défaut de segmentation des vertèbres qui sont élargies, voire une anispondylie (colonne sous forme de bloc osseux non différencié), et des fissures dans les zones thoracique et lombaire (Westvik and Lachman 1998). Les mouvements sont limités par des contractures des hanches, genoux et poignets. Les mains et les pieds sont déformés avec une camptodactylie (anomalie de flexion des doigts). On observe aussi des déformations du crâne : encéphalocèle, hydrocéphale ou microcéphale. Les nouveau-nés ont un visage très particulier, complètement plat, avec un palais arqué, une petite bouche, des yeux proéminents, des oreilles implantées bas et un cou court. On peut retrouver un hirsutisme. Une détresse respiratoire entraîne la mort du patient dans les quelques heures ou jours qui suivent la naissance. L'étude histologique du cartilage a montré une désorganisation de la structure en colonne des chondrocytes et des zones où la matrice cartilagineuse n'est plus présente. Aucune étude des muscles de ces patients n'a été réalisée.

IC2. Génétique

La DDSH se transmet selon un mode autosomique récessif. La souris invalidée pour le perlecan est létale *in utero* et montre une morphologie clinique et radiographique, ainsi que des défauts osseux (Arikawa-Hirasawa *et al.* 1999) similaires à ceux observés dans la DDSH. Cette similitude de phénotype a amené à considérer le gène *HSPG2* comme candidat (Arikawa-Hirasawa *et al.* 2001). Trois mutations ont été décrites chez deux patients (tableau 1): une duplication homozygote de 89pb (nucléotides 4515 à 4603) insérée entre les résidus 4603 et 4604 dans l'exon 36 (c.4603_4604ins89), et deux substitutions nucléotidiques localisées dans des sites d'excision-épissage (c.7006+5G>A dans le site donneur de l'intron 54 ; c.10248C>T dans l'exon 75). Ces trois mutations mènent à un décalage du cadre de lecture introduisant un codon stop prématuré dans les exons 36, 55 et 77, respectivement. Un immunomarquage sur fibroblastes en culture issus de ces deux patients DDSHa montré une absence de perlecan sécrété dans la matrice extracellulaire (Arikawa-Hirasawa *et al.* 2001).

ID. Différence SJS / DDSH

Bien que le SJS et la DDSH résultent de mutations autosomiques récessives dans gène codant pour le perlecan, les caractéristiques phénotypiques de ces deux pathologies sont différentes : les patients DDSH meurent à la naissance avec des défauts chondrodystrophiques sévères, alors que les patients SJS survivent et montrent des déformations ostéoarticulaires plus modérées, associées à une raideur musculaire permanente et généralisée. L'hypothèse proposée pour expliquer cette différence phénotypique est une corrélation inverse entre la sévérité du phénotype et le taux de perlecan fonctionnel encore présent (Arikawa-Hirasawa *et al.* 2001). Les signes ostéoarticulaires dans le SJS englobant un large éventail s'étendant de manifestations néonatales avec scoliose et membres arqués jusqu'à l'absence de déformations (Spranger *et al.* 2000), une corrélation génotype – phénotype a été suggéré dans ce syndrome (Arikawa-Hirasawa *et al.* 2001).

II. Le perlecan

IIA. Structure du perlecan

L'aspect le plus frappant du perlecan est son gigantisme, tant par sa taille et sa structure protéique élaborée, que par ses nombreuses interactions. Le gène *HSPG2* code pour une protéine de 4391 acides aminés chez l'Homme (Kallunki and Tryggvason 1992; Murdoch *et al.* 1992), auxquels il faut déduire un peptide signal de 21 acides aminés (résidus 1 à 21). Son poids moléculaire s'élève à 466kDa. De multiples modifications post-traductionnelles s'y ajoutent, donnant à la protéine une taille totale d'environ 800kDa. Sa structure semble résulter de l'assemblage de différents modules. Ainsi, le perlecan a été divisé en 5 domaines, selon des homologies de structure avec d'autres protéines (figure 6) (Iozzo 1998).

IIA1. Le domaine I

Le domaine I est unique au perlecan, il ne comporte aucune homologie avec d'autres protéines. Le domaine I contient un module SEA (Bork and Patthy 1995), nommé ainsi selon les trois premières molécules dans lesquelles il a été identifié : protéine de Spermé de l'Oursin, l'enzyme digestive Enterokinase et l'héparane sulfate protéoglycane Agrine. Ce module commence au résidu Gln80 et s'étend sur 120 acides aminés (Costell *et al.* 1997).

IIA2. Le domaine II

Le domaine II montre des similarités de séquence avec les récepteurs aux LDL. Il contient quatre modules LA (récepteur aux LDL de classe A, LA1 à 4), chacun composé de 40 acides

aminés dont six résidus Cys (Costell *et al.* 1996). Les modules LA1 et LA2 sont séparés par une région de liaison de 44 acides aminés, riche en résidus Pro, Ser et Thr. On peut noter la présence d'une séquence Asp-Gly-Ser-Asp-Glu dans le module LA2, ce motif étant responsable de la liaison des LDL avec leurs récepteurs. De plus, le domaine II contient un premier module Immunoglobuline (IgG) homologue aux modules des molécules d'adhésion NCAM. D'autres modules de ce type composent le domaine IV. Enfin, une région supplémentaire contenant deux Cys formant un pont disulfure termine ce domaine.

IIA3. Le domaine III

Le domaine III montre des analogies de structure avec le bras court des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des laminines. Il commence en N-terminal par une petite région de 14 résidus dont deux Cys qui forment un pont disulfure. Il contient ensuite trois motifs globulaires L4 (L4-1 à 3) et huit motifs LE (LE1 à 8) de type EGF (Schulze *et al.* 1996). Ces domaines sont composés de huit résidus Cys formant quatre ponts disulfures selon les appariements C1-C3, C2-C4, C5-C6, C7-C8, sauf pour le domaine LE3 qui ne contient que six Cys. La taille des modules L4 et LE est de 250 et 50 à 60 acides aminés respectivement, les 200 acides aminés supplémentaires des modules L4 étant situés entre les cystéines C3 et C4 et formant une structure globulaire (Schulze *et al.* 1995) (figure 7). Le domaine III peut être subdivisé en trois sous-domaines : III-1 (L4-1, LE1 à 3) ; III-2 (L4-2, LE4 à 6) et III-3 (L4-3, LE 7 et 8).

IIA4. Le domaine IV

Le domaine IV est le plus grand domaine du perlecan. Il consiste en une répétition en tandem de 21 motifs immunoglobulines IgG, similaires à ceux observés dans les molécules d'adhésion NCAM (Murdoch *et al.* 1992). Chaque motif est long d'environ 100 acides aminés, et contient deux résidus Cys et un Trp. On retrouve également plusieurs résidus Gly conservés dans chaque motif IgG, et un résidu Cys supplémentaire dans les motifs IgG1 et IgG19 qui permettent la formation d'un pont disulfure et d'une forme globulaire. Chaque domaine est composé de sept brins β (A à G) et six boucles, formant deux feuillets β (A, B, E, D et G, F, C) (Hopf *et al.* 2001) (figure 8).

IIA5. Le domaine V

Le domaine V a une structure similaire à l'agrine, un HSPG essentiel à la formation de la jonction neuromusculaire. Il contient trois domaines globulaires de type laminin G (LG) d'environ 180 résidus dont deux Cys, et quatre modules de type EGF 1 (EG) de 40 résidus

dont six Cys. Il est important de noter la présence de deux séquences Leu-Arg-Glu (Iozzo *et al.* 1994), présentes également dans la laminine $\beta 2$ anciennement appelée laminine S (Hunter *et al.* 1989), qui est un isoforme de laminine spécifiquement exprimée à la jonction neuromusculaire et ayant des propriétés adhésives pour les motoneurones, agissant comme un signal « stop » dans la croissance axonale (Porter *et al.* 1995).

IIA6. Les modifications post-traductionnelles

IIA6a. Chaînes glycosaminoglycanes (GAG)

Le domaine I est le domaine qui subit le plus de modifications post-traductionnelles. Il comporte tout d'abord trois séquences Ser-Gly-Asp en position 65, 71 et 76, qui sont les sites principaux d'attachement des chaînes glycosaminoglycanes (GAG). Il s'agit de chaînes héparane sulfate (HS) dans environ 80% des cas, mais on peut également trouver des chaînes chondroïtine (CS), dermatane (DS) et kératane (KS) sulfate, voire un mélange selon les tissus et le stade développemental. Les résidus acides Asn en position 55, 56, 58, 62, 63 et Gln en position 57 sont des déterminants essentiels pour l'attachement spécifique de ces chaînes GAG, tant par leur nombre que par leur position (Dolan *et al.* 1997). Le module SEA joue également un rôle dans l'attachement de ces chaînes : il favorise leur attachement sur les séquences Ser-Gly-Asp (Dolan *et al.* 1997). Le domaine I contient en plus deux séquences Glu-Gly-Ser-Gly et Gly-Ser-Gly-Glu en C-terminal, qui sont des sites potentiels d'attachement de chaînes GAG (Murdoch *et al.* 1992). On trouve aussi dans le domaine IV une séquence Ser-Gly-Pro-Gly et neuf séquences Asp-Ser-Gly-Glu, sites potentiels d'attachement de chaînes GAG. Le domaine V contient deux séquences Ser-Gly-x-Gly et deux séquences Gly-Ser-Gly, sites potentiels d'attachement de chaînes GAG (aussi bien héparane, que chondroïtine ou dermatan sulfate). En tout 52 séquences Ser-Gly, sites potentiels d'attachement de chaînes GAG, sont présentes tout le long de la protéine.

IIA6b. Glycosylations

Le domaine I subit des modifications post-traductionnelles de type O-glycosylation sur les résidus Thr23, 40, 42, 49 et Ser33 et 51, et une N-glycosylation sur le résidu Asn89 (Costell *et al.* 1997). Le domaine II comporte un site Asn-Cys-Ser de N-glycosylation dans le module LA3 et six sites de O-glycosylation dans la région de liaison entre les modules LA1 et LA2 sur les résidus Ser243, 252, Thr262, 263, 245 et 269. Le domaine III subit également des N-glycosylations en LG1 et LE5 et trois à cinq O-glycosylations par sous-domaine (DIII-1 à 3). Le domaine V possède trois sites de N-glycosylation en position 3098, 3154 dans le module

LG1 et 3386 dans le module LG2 (Noonan *et al.* 1991; Friedrich *et al.* 1999) mais aussi des sites d'O-glycosylations (Brown *et al.* 1997).

IIB. Expression

Le perlecan est une protéine ubiquitaire, exprimée précocement au cours du développement. Par immunomarquage chez l'embryon de souris, le perlecan a été détectée dès le stade 2 à 4 cellules (Timpl 1993). Dès le jour embryonnaire 10 (E10), il est présent dans les somites, les membres, la région de la queue, les poumons, l'intestin, le système vasculaire et le cœur (Joseph *et al.* 1996). Il est également présent dans le placenta. Dans les tissus humains adultes, le perlecan a une distribution ubiquitaire dans les membranes basales de nombreux organes vascularisés : glomérules du rein et tubes rénaux, prostate, utérus, ovaires, tissu conjonctif du sein, pancréas, rate, intestin, alvéoles du poumon, thyroïde, nerfs (Murdoch *et al.* 1994). Dans ces organes, l'hybridation *in situ* a révélé que le perlecan était généralement exprimé par les cellules endothéliales et épithéliales. Le perlecan est présent dans le foie, mais n'est pas exprimé par les hépatocytes. De même, il est présent à la jonction derme-épiderme de la peau, mais n'est pas exprimé par les kératynocytes. Dans les muscles cardiaques et squelettiques, le perlecan étudié par immunofluorescence chez des souris adultes est présent dans les membranes basales entourant chaque cellule musculaire (endomysium) mais pas dans la membrane basale entourant des groupes de fibres (périmysium) (Casar *et al.* 2004). Le perlecan est exprimé par les myoblastes C2C12 en culture, mais son expression diminue fortement au cours de la différenciation musculaire, et il n'est plus exprimé par les cardiomyocytes et les cellules musculaires matures (Larrain *et al.* 1997).

On le trouve également dans les tissus mésenchymateux tel que le cartilage (Iozzo 1998). Il est présent dans les cartilages des différentes parties du corps : nez, sternum, disques intervertébraux, articulations des doigts, orteils, genoux et coudes (SundarRaj *et al.* 1995; Melrose *et al.* 2004). Dans les os longs comme le tibia, il se situe au niveau de la plaque de croissance (Melrose *et al.* 2002; Melrose *et al.* 2005). Des techniques d'immunohistochimie, d'immunoprécipitation et de Northern Blot ont montré que le perlecan est secrété par les chondrocytes, notamment les chondrocytes hypertrophiques et reste confiné dans la zone péri-cellulaire (SundarRaj *et al.* 1995; Melrose *et al.* 2003).

IIC. Interactions

Les différentes interactions du perlecan avec d'autres protéines ont depuis longtemps été étudiées, essentiellement par des approches partenaires candidats. Le perlecan interagit avec

différents groupes de protéines : des protéines des membranes basales et des matrices extracellulaires, des récepteurs cellulaires et des facteurs de croissance (figure 9). Les interactions du perlecan avec nombre de ces molécules et les conséquences fonctionnelles de ces interactions vont être détaillées dans ce chapitre, afin de mieux appréhender les rôles possibles du perlecan.

II C1. Les composants des membranes basales

Les membranes basales sont de fines couches de matrice extracellulaire hautement organisées, présentes à l'interface mésenchyme/épithélium de la plupart des tissus. Elles sont constituées de trois couches : la *lamina rara*, la *lamina densa* et la *lamina reticulata*. Leur composition moléculaire en terme d'isoformes varie selon les types cellulaires. Elles étaient au départ considérées comme de simples échafaudages sur lesquels les cellules adhéraient, mais on sait aujourd'hui que ses composants possèdent des activités biologiques beaucoup plus larges, telles que la croissance, la différenciation et la migration cellulaire, et qu'ils sont impliqués dans le développement et la réparation des tissus (Erickson and Couchman 2000). Toutes les membranes basales contiennent des collagènes, des laminines, des nidogènes et des HSPGs, dont les interactions forment un réseau protéique dense (figure 10) (Yurchenco *et al.* 2004).

II C1a. Les collagènes

Les collagènes sont des composants quasi-ubiquitaires des membranes basales et jouent un rôle dans leur stabilisation durant les épisodes de pression mécanique. Les collagènes sont divisés en trois groupes :

- Les collagènes fibrillaires forment un réseau de fibres. Chaque fibre de collagène est un homotrimère. Un monomère est une chaîne composée d'un domaine N-terminal riche en cystéines, d'un domaine central collagénique consistant en une suite de répétitions Gly-x-y qui permettent la formation et le maintien d'une triple hélice rigide et inextensible, et d'un domaine C-terminal impliqué dans la trimérisation (figure 11). Ce groupe comprend les collagènes de type I, II, III, V et XI.

- Les collagènes non fibrillaires ont des interruptions dans la suite de répétitions Gly-x-y, ce qui les empêchent de former des triple hélices stables. Il s'agit des collagènes de type IV, VI, VII à X et XII à XIX.

- Les collagènes multiplexin (multiple triple helix domains and interruptions) forment un groupe récemment décrit qui comprend les collagènes XV et XVIII. Leurs fragments C-terminaux peuvent être clivés et générer ainsi la restine et l'endostatine, respectivement.

Le perlecan interagit avec différentes fibres de collagènes : les types I (Yang *et al.* 2005), II (Yang *et al.* 2006), III et V (Whitelock *et al.* 1999). Il interagit également avec le collagène de type IV via ses chaînes HS et son domaine IV (Laurie *et al.* 1986; Battaglia *et al.* 1992; Hopf *et al.* 1999) et le collagène de type XIII (Tu *et al.* 2002). Enfin, le perlecan interagit via le module LG2 de son domaine V avec l'endostatine (Sasaki *et al.* 2000; Mongiat *et al.* 2003).

La PRELP (proline rich end leucine rich repeat protein) est exprimée dans les membranes basales de plusieurs organes. Elle est composée d'un domaine central et de deux boucles formées par des ponts disulfure de chaque côté. Son domaine N-terminal est riche en Pro et interagit avec les chaînes HS situées sur les domaines I et V du perlecan (Bengtsson *et al.* 2002). Cette molécule interagit également avec le collagène via son domaine central, et pourrait donc jouer un rôle dans la formation du complexe collagène-perlecan, renforçant ainsi la structure des membranes basales.

HC1b. Les laminines et les nidogènes

Les laminines sont des hétérotrimères composées de trois chaînes $\alpha\beta\gamma$ parmi les 5 chaînes α , 3 chaînes β et 3 chaînes γ actuellement identifiées, donnant naissance à 15 isoformes de laminine différentes d'expression spatiale ou temporelle spécifique. Les chaînes se trimérisent grâce à leurs domaines C-terminaux qui forment le bras long des laminines. Les bras courts des laminines sont constitués des domaines N-terminaux libres des trois chaînes et sont nécessaires à la polymérisation des laminines dans la membrane basale (figure 11). Le bras long des laminines (Laurie *et al.* 1986), plus précisément le module E3 C-terminal de la chaîne $\alpha 1$ (Battaglia *et al.* 1992) interagit avec les chaînes HS du domaine I (Sasaki *et al.* 1998) ou du domaine V du perlecan (Friedrich *et al.* 1999). Une affinité plus faible est observée entre les chaînes HS du perlecan et le fragment N-terminal V/VI de la chaîne $\alpha 1$ des laminines.

Il existe deux types de nidogènes 1 et 2, également appelés entactines 1 et 2. Ces nidogènes sont présents dans de nombreux tissus : cœur, muscle squelettique, nerfs, cerveau, vaisseaux, poumon, rein, pancréas et rate. Ils favorisent l'attachement cellulaire, l'angiogenèse et jouent un rôle important dans la formation des membranes basales. Malgré la faible homologie de séquence protéique entre les nidogènes 1 et 2 (de seulement 27% chez la souris), les nidogènes conservent la même structure. Ils sont composés de trois modules globulaires (G1 à

G3), avec une région de liaison entre chaque module (figure 11). Les nidogènes, via le module G3, interagissent avec la laminine $\gamma 1$, avec une affinité beaucoup plus forte pour le nidogène 1 que le nidogène 2. Le perlecan, via son domaine IV ou V, interagit très fortement avec le domaine G2, et plus faiblement avec le domaine G3 des nidogènes 1 et 2 (Battaglia *et al.* 1992; Brown *et al.* 1997; Hopf *et al.* 1999). Plus précisément, les boucles B/C et F/G du module IgG3 du domaine IV du perlecan interagissent très fortement avec les nidogènes 1 et 2, alors que seul le nidogène 1 va interagir avec la boucle D/E (Hopf *et al.* 2001). L'interaction avec les nidogènes 1 et 2 est également possible via le module LG2 du domaine V du perlecan (Friedrich *et al.* 1999). Cela permet donc la formation de trimères perlecan-nidogène-laminine, qui pourraient être important pour le renforcement de l'organisation structurale des membranes basales.

II C1c. Fibronectine – Fibuline – Fibrilline

La fibronectine est une glycoprotéine homodimérique présente dans les membranes basales et importante pour l'adhésion cellulaire. Elle interagit avec les chaînes HS et le domaine IV du perlecan (Battaglia *et al.* 1992; Hopf *et al.* 1999) avec une forte affinité pour les module IgG4 et une plus faible pour les module IgG5, IgG10 à 15 du perlecan (Hopf *et al.* 2001).

Les fibulines sont des protéines des membranes basales impliquées dans l'adhésion et la prolifération cellulaire (Timpl *et al.* 2003). Cette famille est composée de cinq membres : les fibulines 1 à 5. Le perlecan, via son domaine IV (Brown *et al.* 1997; Hopf *et al.* 1999), plus spécifiquement le module IgG2, et plus faiblement les modules IgG 3, 4, et 13 à 15, interagit avec la fibuline 2 (Hopf *et al.* 2001). De façon intéressante, on peut noter que le pont disulfure se formant entre les deux Cys présentes dans les modules IgG1 et IgG19 du perlecan humain (IgG1 et IgG12 du perlecan murin) rapproche les deux sites d'interaction avec la fibronectine et la fibuline, permettant sans doute la formation d'une structure plus compacte. La fibuline 2 interagit également avec les modules EG3 et 4 du domaine V du perlecan (Friedrich *et al.* 1999).

Le perlecan interagit avec la fibrilline 1 (Tiedemann *et al.* 2005). Cette glycoprotéine est le composant principal des microfibrilles, agrégats supramoléculaires présents dans de nombreuses matrices extracellulaires qui couvrent la surface des cellules élastiques de certains organes tels que les muscles squelettiques, la peau, les vaisseaux sanguins...). Elle consiste en une répétition de modules cbEGF (calcium binding epidermal growth factor). Le plus long

module central interagit avec le domaine II du perlecan, et avec une affinité moins grande avec les chaînes HS du domaine I. La fibronectine, également associée aux microfibrilles au début de leur biogenèse, n'interagit pas avec la fibrilline 1. Le perlecan pourrait alors jouer le rôle d'un pont entre la fibronectine et la fibrilline 1 et ainsi être impliqué dans la biogenèse des microfibrilles. Il pourrait également servir à ancrer les microfibrilles aux membranes basales.

HC1d. Les protéines spécifiques de la matrice cartilagineuse

L'ECM1 (extracellular matrix protein 1) est une glycoprotéine sécrétée, impliquée dans la formation des os et l'angiogenèse. Elle est constituée d'un domaine N-terminal, de deux domaines centraux et d'un domaine C-terminal. C'est ce dernier qui interagit avec les modules EG du domaine V du perlecan (Mongiat *et al.* 2003). Ces deux molécules sont notamment co-exprimées dans les vaisseaux sanguins et les os en développement, et cette interaction pourraient donc jouer un rôle dans l'angiogenèse et la formation endochondrale des os.

La protéine WRAP est exprimée spécifiquement par les chondrocytes, et joue un rôle dans l'assemblage et le maintien des structures cartilagineuses (Allen *et al.* 2006). Le domaine III-2 et les chaînes HS du perlecan interagissent avec une grande affinité avec cette protéine.

HC1e. Les autres protéines des membranes basales et matrices extracellulaires

L'héparine interagit avec le domaine IV du perlecan (Brown *et al.* 1997; Hopf *et al.* 1999), plus précisément le module IgG5 dans lequel les résidus Arg 1973, 1977, 2005 et 2007 jouent un rôle très important (Hopf *et al.* 2001), mais aussi via les modules EG1 et EG2 du domaine V (Friedrich *et al.* 1999). Le perlecan pourrait donc interagir via ces domaines avec les autres HSPGs des membranes basales.

Le perlecan peut se dimériser, voire former des trimères ou des tétramères par des liaisons non covalentes au niveau du domaine V (Yurchenco *et al.* 1987; Brown *et al.* 1997).

Le perlecan interagit aussi avec les sulphatides via son domaine V, impliquant au moins 2 modules LG, ce qui pourrait avoir un rôle dans l'adhésion cellulaire (Friedrich *et al.* 1999).

La thrombospondine 1 (TSP-1) est une protéine de la matrice extracellulaire impliquée dans la coagulation, l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire. Ces diverses activités biologiques résultent de l'interaction de cette protéine avec des récepteurs cellulaires, notamment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le perlecan interagit avec TSP-1 via ses chaînes HS, jouant un rôle de co-récepteur pour lier et concentrer la TSP-1 à la surface cellulaire (Vischer *et al.* 1997; Feitsma *et al.* 2000)

HC2. Les récepteurs cellulaires

HC2a. Le dystroglycan

Le dystroglycan (DG) est une protéine transmembranaire qui lie les composants des membranes basales au cytosquelette. Il est codé par un seul gène donnant une protéine, qui est clivée pour donner deux sous-unités : la sous-unité extracellulaire (α -DG) et la sous-unité transmembranaire (β -DG). L'interaction entre le perlecan et l' α -DG est très forte. Elle implique au moins deux modules LG du domaine V (Friedrich *et al.* 1999), avec une plus forte affinité pour les modules LG1 et 2 que pour le module LG3 (Talts *et al.* 1999).

HC2b. Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires, jouant un rôle dans l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice, mais également dans la signalisation cellulaire, contrôlant ainsi la croissance, la différenciation et la survie cellulaire. Ce sont des hétérodimères composés d'une chaîne α et d'une chaîne β . Chez les mammifères, 19 chaînes α et 8 chaînes β ont été décrites. L'intégrine β_1 interagit avec le domaine V du perlecan (Brown *et al.* 1997). Cette interaction est responsable de l'adhésion et de la migration de plusieurs types cellulaires (Battaglia *et al.* 1993). Cette interaction est, selon les études, dépendante (SundarRaj *et al.* 1995) ou indépendante (Schulze *et al.* 1996) de la séquence Arg-Gly-Asp présente dans le domaine III du perlecan. Il existerait donc deux types d'interaction perlecan-intégrines (Hayashi *et al.* 1992). Une interaction mineure du perlecan a été montrée avec les chaînes β_3 (Hayashi *et al.* 1992) et les chaînes α_2 et α_5 des intégrines (Battaglia *et al.* 1993). Le domaine I de la chaîne α_2 interagit avec le module LG3 et plus faiblement avec les modules LG1 et LG2 du domaine V du perlecan (Bix *et al.* 2004). Cette interaction est dépendante du calcium extracellulaire et va mener à l'activation d'une voie de signalisation responsable de la désorganisation des fibres d'actine et de l'adhésion des cellules endothéliales. Le perlecan

joue donc un rôle dans l'adhésion, la migration des cellules et l'angiogenèse via ses interactions avec différentes intégrines.

HC3. Les facteurs de croissance

HC3a. Les FGFs

Le perlecan interagit avec le facteur de croissance FGF-2 (fibroblast growth factor 2) par ses chaînes HS (Whitelock *et al.* 1996). Les chaînes HS du perlecan agissent comme un réservoir de facteurs de croissance, avec une double fonction. D'une part, le perlecan peut favoriser la liaison du FGF2 à son récepteur FGFR1 (Aviezer *et al.* 1994; Aviezer *et al.* 1997). Le perlecan peut ainsi jouer un rôle dans la prolifération cellulaire (Aviezer *et al.* 1999) et dans la néovascularisation, ayant ainsi un rôle pro-angiogénique notamment lors de la progression des tumeurs. D'autre part, le perlecan en séquestrant les FGFs, les protège de la dégradation par les protéases et limite leur diffusion. Il aurait alors un rôle anti-angiogénique (Iozzo and San Antonio 2001).

Le FGF7 (ou keratinocyte growth factor) et le FGF-BP (Mongiat *et al.* 2000; Mongiat *et al.* 2001) interagissent également avec le perlecan via le sous-domaines III-1 et le motif LE2 du domaine III, respectivement. Le perlecan interagit également avec les facteurs de croissance FGF-1 et FGF-9 dans le cartilage (Melrose *et al.* 2006).

HC3b. TGF – INF – PDGF – PF4

Chez les mammifères, il existe 3 isoformes du TGF β (transforming growth factor β). Le perlecan interagit très fortement avec TGF β 1 via ses chaînes HS, de façon moindre avec TGF β 2 et pas du tout avec TGF β 3 (Lyon *et al.* 1997). Le TGF β 1 forme un homodimère sur les chaînes HS. Cette interaction potentialise l'effet du TGF β 1 sur la croissance cellulaire, et le protège de la protéolyse. Le TGF β stimule la production des HSPGs, en agissant de façon post-transcriptionnelle, sans doute en augmentant la stabilité de l'ARN (Dodge *et al.* 1990).

Le perlecan interagit aussi avec le PDGF (platelet derived growth factor) via son domaine III-2, qui peut lier le PDGF-AA et -BB, et plus modérément par son domaine IV et V liant faiblement le PDGF-BB (Gohring *et al.* 1998). Le domaine I interagit aussi avec le PDGF-BB, sans doute via ses chaînes HS.

Le platelet factor 4 (PF4) est impliqué dans l'inflammation et la cicatrisation. C'est un facteur pro-coagulant et anti-angiogénique. Il interagit avec les chaînes HS du perlecan via un domaine spécifique appelé PPD (Stringer and Gallagher 1997).

Le perlecan interagit également avec la partie C-terminale de l'interféron γ (INF γ) d'une manière forte et spécifique par des interactions ioniques, probablement via ses chaînes GAG (Lortat-Jacob *et al.* 1991).

IIC3c. Les facteurs de croissance chondrogéniques

Le BMP-2 (Bone morphogenetic Protein 2) est un facteur de croissance de la famille des TGFs. Il se présente sous la forme d'un homodimère. Il induit la formation du cartilage et de l'os et joue un rôle dans la différenciation des ostéoblastes. Il possède en N-terminal un motif de 10 acides aminés basiques, chargé positivement, qui interagit avec l'héparine et les chaînes HS des protéoglycanes tels que le perlecan (Ruppert *et al.* 1996; Yang *et al.* 2006).

Le perlecan interagit également avec un autre facteur de croissance spécifique des chondrocytes : le CTGF/Hcs24 (connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24) via ses chaînes HS et le corps de la protéine. Le complexe perlecan-CTGF forme un trimère avec les intégrines (notamment $\alpha 5$, $\beta 1$ et $\beta 3$) pour stimuler la prolifération et la différenciation des chondrocytes via les voies des MAP Kinases p42/44 et p38, respectivement (Nishida *et al.* 2003).

IIC3d. Les facteurs de croissance tumorigéniques

Plus récemment, il a été montré que le perlecan liait la progranuline via les modules LG1-EG1-EG2 du domaine V (Gonzalez *et al.* 2003). La progranuline est un facteur de croissance présent dans les tumeurs et les zones de cicatrisation. Elle est composée de 7,5 répétitions (A à G + P) appelées granulines, qui sont chacune composées de 12 Cys. Les répétitions B et F interagissent avec le perlecan. Cette interaction stimule la croissance cellulaire *in vitro*. Ces deux protéines sont exprimées dans les tumeurs ovariennes et dans les vaisseaux sanguins, suggérant un rôle de cette interaction dans le développement des tumeurs et dans l'angiogénèse *in vivo*.

L'angiopoïétine existe sous trois formes : incorporée dans la matrice extracellulaire (Ang1), sécrétée (Ang 2) et présente à la surface cellulaire (Ang3). L'angiopoïétine 3 inhibe l'angiogénèse et la progression des métastases, alors que l'angiopoïétine 1 a un rôle inverse.

Le perlecan interagit avec le domaine coiled-coil de l'angiopoïétine 3 via ses chaînes HS, potentialisant son action (Xu *et al.* 2004).

IID. Fonctions du perlecan

Grâce à son expression ubiquitaire et précoce au cours du développement, et de ces multiples interactions, le perlecan assure de multiples fonctions. Cependant, je ne détaillerai ici que ses fonctions dans le cartilage et le muscle, les deux tissus les plus sévèrement affectés dans le SJS.

IID1. Dans le cartilage

IID1a. La chondrogenèse

Deux mécanismes de formation des os existent : l'ossification intramembranaire (crâne et clavicules) et l'ossification endochondrale (tous les os longs). L'ossification endochondrale (figure 12) utilise une matrice de cartilage pour la formation des os (Erlebacher *et al.* 1995). Ce processus commence avec le regroupement de cellules mésenchymateuses dans la région du futur os (Kronenberg 2003). Ces cellules se différencient en chondroblastes qui synthétisent une matrice cartilagineuse, puis en chondrocytes qui synthétisent notamment le collagène II, marqueur précoce de la chondrogenèse, formant le centre d'ossification primaire. Les cellules de la bordure de ce cartilage forment le perichondrium. Puis, les chondrocytes arrêtent de proliférer, deviennent hypertrophiques et forment une matrice riche en collagène X, minéralisée ensuite avec du calcium. Ces chondrocytes pris au piège de leur matrice meurent par apoptose, laissant derrière eux une matrice vide qui est alors envahie par les vaisseaux sanguins. Les cellules du perichondrium se différencient en ostéoclastes et ostéoblastes, qui atteignent la matrice cartilagineuse via les vaisseaux sanguins, et la transforment en réelle structure osseuse. Alors que l'os grandit, des centres d'ossification secondaires se développent au niveau des épiphyses. De part et d'autre de la diaphyse, les chondrocytes continuent à proliférer dans une région appelée plaque de croissance (figure 13). Cette plaque de croissance est organisée en différentes zones, selon l'état de développement des chondrocytes : une zone de réserve où les chondrocytes sont latents et désorganisés, une zone de prolifération où les chondrocytes sont organisés en colonnes, une zone d'hypertrophie où les chondrocytes deviennent matures et s'hypertrophient, puis les zones de calcification et enfin d'ossification, qui rejoignent la diaphyse. Cette plaque de croissance se réduit avec l'âge et disparaît à l'adolescence.

IID1b. Composition du cartilage

Le cartilage est principalement composé de fibres de collagène, qui lui confèrent son élasticité (Knudson and Knudson 2001). Bien que le cartilage ne possède pas de réelle matrice extracellulaire, les chondrocytes secrètent de nombreux protéoglycanes (versican, decorin, biglycan, fibromodulin, syndecan) (Schwartz and Domowicz 2002). Le protéoglycane majeur du cartilage est l'aggrecan, composé de 3 domaines globulaires, deux régions hydrophiles et de plus d'une centaine de sites d'attachement de chaînes GAG, qui sont pour 99,9% des chaînes chondroïtine sulfate (Govindraj *et al.* 2002). Il retient les molécules d'eau et joue un rôle de résistance à la compression (Melrose *et al.* 2005). Le perlecan est le principal héparane sulfate protéoglycane du cartilage, présent sous une forme particulière substituée avec 25% de chaînes héparane sulfate et 75% de chaînes chondroïtine sulfate (Govindraj *et al.* 2002).

IID1c. Rôles du perlecan

Le perlecan est un acteur crucial de la chondrogenèse. *In vitro*, le perlecan, via son domaine I et ses chaînes HS ou CS, est suffisant pour induire l'agrégation des cellules mésenchymateuses et leur différenciation en chondrocytes (French *et al.* 2002). Néanmoins, *in vivo*, il apparaît après le collagène II et ne semble donc pas nécessaire à l'initiation de la chondrogenèse (French *et al.* 1999). Seul, il ne peut pas non plus induire la maturation des chondrocytes en chondrocytes hypertrophiques, ni leur différenciation finale menant à leur apoptose (Gomes *et al.* 2002). Son rôle serait donc de favoriser la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes (Melrose *et al.* 2002; Melrose *et al.* 2003; Gomes *et al.* 2006), probablement grâce à sa fonction de co-récepteur de facteurs de croissance (Hassell *et al.* 2002; Ornitz and Marie 2002). Le perlecan contrôle la biodisponibilité des FGFs : les chaînes HS vont plutôt agir comme un réservoir de FGF2, le séquestrant loin de son récepteur (Govindraj *et al.* 2006) alors que les chaînes CS vont inhiber l'interaction FGF-perlecan (Smith *et al.* 2007). Le récepteur principal des FGFs dans le cartilage est le FGFR3, présent dans les chondrocytes en prolifération, bien que les récepteurs FGFR1 et FGFR2 soient également présents dans les chondrocytes hypertrophiques et les cellules mésenchymateuses, respectivement. Le FGFR3 est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire (Deng *et al.* 1996) en stimulant les voies STAT1 (inhibition de la prolifération) et les voies MAPK (différenciation) (Barnard *et al.* 2005). Le perlecan permettrait donc la prolifération cellulaire des chondrocytes en séquestrant le FGF-2, empêchant ainsi son interaction avec le FGFR3 et l'inhibition de la prolifération.

In vitro, l'interaction du perlecan avec le facteur de croissance BMP-2 permettrait d'induire la maturation et la différenciation terminale des chondrocytes (Gomes *et al.* 2003).

Le perlecan joue un rôle dans l'adhésion des chondrocytes et l'agrégation des cellules mésenchymateuses en régulant les interactions cellules-matrice (DeLise *et al.* 2000) via les intégrines et leurs voies de signalisation (Terpstra *et al.* 2003). Le collagène est un élément essentiel à la croissance et au développement du cartilage (Talts *et al.* 1998). Le perlecan, en stabilisant les fibres de collagène, jouerait également un rôle important dans l'organisation du cartilage. *In vitro*, il aide à la formation des fibres de collagène (Kvist *et al.* 2006), et interagit *in vivo* avec les fibres de collagène type I et II (Yang *et al.* 2005; Yang *et al.* 2006).

Enfin, le perlecan est exprimé au niveau des vaisseaux qui envahissent le cartilage, et joue un rôle important dans cette vascularisation (Melrose *et al.* 2004), qui est essentielle pour la nutrition et le développement des os, des articulations et du centre d'ossification secondaire.

Dans le SJS, le perlecan ne pourrait donc pas jouer son rôle d'organisation et de maintien du cartilage, menant à une désorganisation des chondrocytes et de la plaque de croissance et à une croissance défectueuse des os longs.

IID2. Dans le muscle

IID2a. La myogenèse

La myogenèse est une suite d'évènements organisée donnant naissance aux cellules musculaires (figure 14). Elle commence avec l'accumulation des myoblastes, cellules mononucléées différenciées dans le lignage musculaire. Ces myoblastes vont alors réorganiser leurs microtubules et acquérir une forme longitudinale. Lorsque les cellules sont assez proches les unes des autres, permettant le contact entre les membranes, ces myoblastes vont fusionner, donnant une cellule longue, cylindrique et multinucléée appelée myotube. Ces myotubes mûrent et deviennent les fibres musculaires ou myofibres lorsque les noyaux, localisés en position centrale, migrent à la périphérie de la cellule.

Plusieurs facteurs myogéniques, les MRFs (Myogenic Regulatory Factors) sont impliqués dans la myogenèse : Myf5 et MyoD sont impliqués dans la détermination myogénique et la prolifération alors que la myogénine et Myf6 sont impliqués dans la différenciation (Sabourin and Rudnicki 2000). Ces protéines sont des facteurs de transcription à motif bHLH (helix-

loop-helix) qui vont se dimériser avec les protéines E et se fixer sur les boîtes E présentes dans les promoteurs de certains gènes musculaires. La myogénine par exemple stimule la transcription de la sous-unité γ des récepteurs à l'acétylcholine (voir chapitre III. La jonction neuromusculaire) (Brunetti and Goldfine 1990). De nombreux mécanismes régulent l'expression de ces facteurs, notamment d'autres facteurs de transcription (MEF-2) et de nombreux co-facteurs, des histones acétyltransférase et désacétylases qui régulent la structure de la chromatine et des protéines du cycle cellulaire (Muscat and Dressel 2000; Sabourin and Rudnicki 2000).

HD2b. L'organisation d'une fibre musculaire

Les fibres musculaires possèdent un cytoplasme appelé sarcoplasme et une membrane appelée sarcolemme, qui présente des invaginations profondes appelées tubules T, associés avec deux citernes de réticulum sarcoplasmique, ce qui forme la triade. Le cytosquelette contient des myofibrilles, composées de fins filaments d'actine et de filaments plus épais de myosine, organisées en unités sarcomériques. Chaque sarcomère est limité par une strie Z de chaque côté, qui ancre les filaments d'actine. L'actine est produite sous forme monomérique globulaire, qui peut se polymériser pour former des chaînes linéaires. Chaque filament fin est composé de 2 chaînes d'actine en double hélice, associées à des molécules de tropomyosine (protéine allongée, logée au creux des sillons de la double hélice) et de troponine (aux extrémités de chaque molécule de tropomyosine) (figure 15A). Les molécules de myosine sont composées de 4 chaînes légères et de 2 chaînes lourdes (MyHC). Une chaîne lourde possède une queue C-terminale, qui permet l'association des molécules de myosine entre elles, et d'une tête globulaire N-terminale qui se lie aux filaments d'actine. Plusieurs centaines de molécules de myosine s'associent pour former un filament épais (figure 15B). La partie centrale de ces filaments, dépourvue de têtes globulaires, délimite la bande M. Il existe différents types de fibres selon le type MyHC qu'elles expriment : les fibres de type I expriment la MyHC1 et les fibres de type II les MyHC2. Les fibres de type I, dites fibres lentes, sont stables et résistantes à la fatigue, utilisées pour les exercices de longue durée et ont un métabolisme oxydatif. Les fibres de type II, dites fibres rapides, très puissantes mais fatigables et utilisées pour les efforts brefs et intenses, ont un métabolisme glycolytique. La composition en type de fibres dépend du muscle (le soléaire contient une majorité de fibres de type I, alors que le *tibialis anterior* (TA) et l'*extensor digitorum longus* (EDL) contiennent une majorité de fibres de type II) et de son état (en cas de dénervation par exemple, ni l'EDL,

ni le soléaire ne contiennent de fibres de type I, alors qu'en cas de réinervation, le soléaire n'exprime pratiquement que des fibres de type I) (Jin *et al.* 2004; Kalhovde *et al.* 2005).

IID2c. Rappel sur le mécanisme de contraction

Lors de l'arrivée d'un message nerveux, les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (voir chapitre III. La jonction neuromusculaire), qui sont des canaux cationiques non sélectifs, vont provoquer l'entrée d'ions et la dépolarisation locale de la membrane musculaire. Cette dépolarisation locale active les canaux sodiques sensibles au voltage, générant ainsi un potentiel d'action qui se propage le long du muscle et atteint notamment les triades. Cette dépolarisation est à l'origine du couplage excitation-contraction, via l'ouverture des canaux calciques récepteurs à la ryanodine (RyR) situés dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. Les ions calcium stockés dans ce réticulum sont libérés massivement dans le sarcoplasme, entraînant une augmentation très importante de calcium intracellulaire à proximité des myofibrilles. La liaison de ce calcium sur la troponine entraîne un changement de conformation de cette molécule et un déplacement de la tropomyosine qui libère ainsi les sites de liaison de la myosine sur l'actine. Le glissement des filaments de myosine et d'actine entre eux provoque le rapprochement des stries Z de toute la cellule, et donc un raccourcissement global de sa taille : c'est la contraction (figure 15C).

IID2d. Rôle du perlecan

Le profil d'expression du perlecan dans le muscle, exprimé dans le myoblaste, mais plus dans le myotube, peut suggérer un rôle du perlecan dans la myogenèse (Larrain *et al.* 1997). Le perlecan interagit avec et concentre les facteurs de croissance tels que le TGF et les FGF, qui sont des facteurs clés pour la myogenèse (Pirkanen *et al.* 2000), stimulant la division, mais inhibant la différenciation (Brunetti and Goldfine 1990). Le perlecan pourrait donc jouer un rôle dans la prolifération des myoblastes (Sanes 2003). L'adhésion des myoblastes en culture sur un substrat de collagène IV est inhibée par un traitement avec du perlecan (Villar *et al.* 1999). Le perlecan, via ses interactions avec le collagène IV, joue donc également un rôle dans l'adhésion des myoblastes en culture.

Dans le muscle squelettique adulte, chaque fibre est entourée d'une membrane basale, l'endomysium, qui englobe également les quelques cellules musculaires souches appelées cellules satellites, présentes et nécessaires à la régénération musculaire. Les fibres sont regroupées par faisceau, recouvert d'une autre membrane basale, le périmysium (figure 16).

Les composants principaux de l'endomysium sont le collagène IV et la laminine $\alpha 2$, qui jouent un rôle important dans l'élasticité de la fibre nécessaire au mécanisme de contraction-relâchement. La membrane musculaire contient un complexe glycoprotéique particulier, le DGC (dystrophin-glycoprotéine complex) (figure 17), est notamment composé du dystroglycan, qui joue un rôle de pont entre la membrane basale (α DG se lie à la laminine $\alpha 2$) et le cytosquelette (β DG se lie à la dystrophine) pour stabiliser le sarcolemme (Sanes 2003). Le perlecan interagit avec l' α -DG, et de par ses multiples interactions avec les composants de la matrice (Iozzo *et al.* 1994), notamment laminine 2 et collagène IV, il pourrait jouer un rôle dans l'organisation de la membrane basale musculaire (Timpl 1993).

II.E. Modèles animaux

II.E1. La drosophile *Drosophila melanogaster*

II.E1a. La structure de Trol

Chez la mouche *Drosophila melanogaster*, l'orthologue du perlecan est codé par le gène *trol* (Voigt *et al.* 2002; Park *et al.* 2003) pour *terribly reduced optic lobes*, nom issu du phénotype observé chez les mutants de ce gène (Datta and Kankel 1992). Le gène *trol* est localisé sur la bande 3A4 du chromosome X. Il est constitué de 44 exons, et code pour un cadre ouvert de lecture de 13,5kb, générant une protéine de 450kDa. La structure de la protéine Trol est similaire à celle du perlecan (figure 18). La plus grande différence est l'inexistence du domaine I chez la drosophile. Une autre différence est l'extension du domaine II, de quatre motifs LA chez les mammifères à 22 chez la drosophile. Le domaine III consiste en trois motifs de type laminine, et le domaine IV est constitué de 12 répétitions IgG, partageant respectivement 34% et 24% d'homologie avec le perlecan humain. La structure du domaine V a été plus étudiée (Friedrich *et al.* 2000). Il montre 30% et 33% d'homologie avec le domaine V du perlecan humain et murin, respectivement et consiste en un tandem de 3 motifs LG et 4 motifs EG. Des différences majeures sont notées. Le domaine EG3 est remplacé chez la drosophile par un module de 30 résidus, riche en prolines, mais ne contenant aucune cystéine. Trol ne possède pas de région de liaison entre EG4 à LG3. Il possède un site Arg-Gly-Asp d'adhésion cellulaire qui n'est pas présent chez les mammifères. Il subit des modifications post-traductionnelles, telles que la formation d'un pont disulfure interne, l'attachement de chaînes GAG et des N-glycosylations.

II E1b. Expression

Trol est exprimé durant l'oogenèse par transcription maternelle (Voigt *et al.* 2002). Il est exprimé à tous les stades du cycle de vie de la drosophile. Du blastocyste au stade embryonnaire 14, l'expression de *trol* est ubiquitaire et uniforme. Durant les stades embryonnaires tardifs, *trol* est exprimé dans le mésoderme de l'intestin, dans les cellules cardiaques et dans les corps gras. La protéine se dépose autour du système nerveux et des muscles (cœur, intestin) au niveau des membranes basales (Friedrich *et al.* 2000). Chez la larve, *trol* est exprimé par les disques imaginaux, particulièrement dans ceux des yeux, antennes et pattes, et dans un groupe particulier de cellules neurales, localisées en dehors des lobes optiques. Chez l'adulte, *trol* est exprimé dans la tête, les gonades, les glandes salivaires et les corps gras (Park *et al.* 2003).

II E1c. Phénotype des mutants

Trol a été identifié initialement par un criblage génétique réalisé dans le but de détecter des anomalies de morphologie du système nerveux larvaire, résultant de défauts du développement des lobes optiques chez l'embryon (Datta and Kankel 1992). 156 allèles sont aujourd'hui répertoriés (flybase : <http://flybase.bio.indiana.edu>). Un spectre de phénotype allant de la mort après le stade larvaire 2 jusqu'à une viabilité adulte est observé selon les allèles. Ainsi, le mutant le plus sévère (*trol^{sd}*) a été généré par une mutagenèse insertionnelle à l'élément P, et donne une perte de fonction sévère (Datta and Kankel 1992). Ces mutants meurent au stade larvaire 2, et montrent une vacuolisation du cortex associée à une diminution de 40 à 90% des neuroblastes en division (Datta 1995). Ce phénotype peut être sauvé en générant des individus mosaïques. Les animaux atteignent alors l'âge adulte, mais la structure des lobes optiques, normalement organisée en trois zones (la rétine, la lamina et la medula), est perdue et les lobes optiques ne sont qu'une masse de tissu amorphe. Une autre lignée de mutants (*trol^{b22}*) a été générée par rayons X. Cette mutagenèse a entraîné la perte d'un nucléotide, menant à un décalage du cadre de lecture provoquant un codon stop dans le domaine V et générant une protéine tronquée de 400kDa au lieu de 450kDa pour la protéine sauvage (Park *et al.* 2003). Ces mutants sont viables et atteignent l'âge adulte, mais une désorganisation et une taille anormale des ommatidies (unités composant l'œil de la drosophile, ≈ 800 ommatidies/œil), ainsi qu'un placement et un nombre aberrant de cils, sont observés (Datta and Kankel 1992). La comparaison de ces deux mutants montre qu'un effet de dose se produit pour *Trol* chez la drosophile, comme proposé pour le perlecan chez

l'Homme, avec une corrélation inverse entre la quantité de protéine présente et la sévérité du phénotype.

II E1d. Fonctions de Trol

Trol semble requis dans l'activation de la prolifération des neuroblastes quiescents bloqués en G0, en stimulant la transition G1-S. La façon dont Trol régule cette transition a été étudiée et plusieurs protéines dans différentes voies de signalisation semblent impliquées. *Evenskipped* (*eve*), un gène à homéodomaine, régulateur de transcription, semble être inclus dans la même voie de signalisation que *trol* (Park *et al.* 1998). Trol semble également initier la division des neuroblastes en relevant l'arrêt du cycle cellulaire causé par Anachronism (Ana) (Datta 1995). Une voie de signalisation menant à la transition G1-S semble particulièrement impliquée car trois protéines présentes dans cette voie sauvent le phénotype des mutants *trol* : la phosphatase String (*cdc25*), la cycline E et le facteur E2F (figure 19) (Caldwell and Datta 1998; Park *et al.* 2003). Enfin, Trol interagit avec *branchless* (orthologue de FGF2) et *hedgehog* (Park *et al.* 2003).

Le nombre élevé de différents allèles et phénotypes liés à Trol et ses nombreuses interactions et implications dans différentes voies de signalisation, font de Trol une protéine complexe en terme de structure et de régulation, et semblent indiquer qu'il fait partie d'un mécanisme beaucoup plus général dans le contrôle de la prolifération cellulaire au cours du développement, et non restreint aux lobes optiques. L'invalidation de l'orthologue du perlecan dans ce modèle souligne donc le rôle du perlecan dans les voies de signalisation cellulaire.

II E2. Le nématode *Caenorhabditis elegans*

II E2a. Structure et régulation de Unc-52

Le nématode a été le premier modèle animal chez lequel un mutant du perlecan a été décrit. L'orthologue du gène *HSPG2* est le gène *uncoordinated-52* (*unc-52*), ainsi nommé à cause du phénotype paralysé des mutants (Rogalski *et al.* 1993). Le gène *unc-52* est composé de 37 exons. La structure de la protéine UNC-52 est similaire à celle du perlecan, malgré quelques différences (figure 18). Le domaine I est très petit (28 acides aminés, riche en acide aspartique) et est unique à UNC-52. Le domaine II consiste en 3 motifs LDL-R et 2 motifs IgG. Le domaine III montre 43% d'homologie avec le perlecan murin et consiste en une succession de modules LE et L4. Le domaine IV est composé d'une répétition de 15 motifs N-CAM et

contient une séquence Arg-Gly-Asp d'adhésion cellulaire dans la répétition 12. Le domaine V contient trois modules LG et trois modules EG et une séquence supplémentaire de 180 acides aminés riches en sérines et thréonines non présentes chez les mammifères (Mullen *et al.* 1999). De façon intéressante, trois isoformes sont exprimées par épissage alternatif grâce à des sites de polyadénylation différents, situés après les exons 10, 26 et 37 : un petit (DI à DIII, 1160 acides aminés), un moyen (DI à DIV, 2482 acides aminés, 270kDa) et un long (DI à DV, codant pour une protéine totale de 3375 acides aminés et de 370kDa) (figure 20). Il existe également des épissages alternatifs de certains exons des domaines III et IV (exons 6, 16, 17, 18, 21, 22) (Rogalski *et al.* 1995), produisant des isoformes supplémentaires.

Ces événements d'épissages alternatifs du gène *Unc-52* sont contrôlés par des protéines telles que MEC-8 et SMU-1 et 2. Le gène *Mec-8* code pour une protéine de 312 acides aminés, contenant deux motifs de reconnaissance ARN de 80 acides aminés chacun (Lundquist *et al.* 1996). Elle est exprimée dans les noyaux des cellules de l'hypoderme (Spike *et al.* 2002). Elle régule l'épissage alternatif de certains isoformes d'*unc-52*, favorisant la production des ARNm contenant les exons 15-16-19 (excision des exons 17 et 18) ou 15-16-17-19 (excision de l'exon 18) (Lundquist and Herman 1994). Les protéines nucléaires SMU-1 (contenant 5 motifs WD impliqués dans les interactions protéiques) et SMU-2 sont des composants du spliceosome, où elles interagissent entre elles pour inhiber l'épissage de l'exon 17 (Spike *et al.* 2001; Spartz *et al.* 2004).

II E2b. Expression

Le corps de *C.elegans* est organisé en quatre quadrants (2 dorsaux, 2 ventraux) de deux rangées de cellules musculaires chacun. Le cytosquelette des cellules musculaires est composé de lignes M et de corps denses qui ancrent les filaments épais de myosine et les filaments fins d'actine, respectivement, à la membrane basale (Hresko *et al.* 1994). Ces muscles sont recouverts d'une membrane basale, d'un hypoderme et d'une cuticule (figure 21). Les contractions musculaires se transmettent à la cuticule grâce à un complexe protéique transmembranaire, ce qui permet au ver de se déplacer. UNC-52 est présent dans la membrane basale des cellules musculaires des tissus contractiles (muscles du corps, mais aussi muscles de l'utérus, de l'anus, de la vulve et des gonades) (Francis and Waterston 1991). Il est associé au complexe protéique qui permet d'attacher les cellules musculaires à la matrice, composé de Pat-2, Pat-3 (intégrines), Pat-4 (intégrine linked kinase), Pat-6 (actopaxine) et UNC-112 (Rogalski *et al.* 2000; Mackinnon *et al.* 2002; Lin *et al.* 2003).

Grâce à l'utilisation de différents anticorps reconnaissant des domaines différents d'UNC-52 (GM1 reconnaît le domaine III et donc les trois isoformes d'UNC-52, alors que GM3, MH2 et MH3 reconnaissent le domaine IV soit les isoformes moyens et longs), il a été montré que les différents isoformes étaient exprimés selon des profils d'expression spatiale et temporelle différents (Mullen *et al.* 1999). L'isoforme court est exprimé dans le pharynx et les muscles anaux chez l'embryon et l'adulte, alors que les isoformes moyens et longs sont tout d'abord exprimés de façon restreinte dans les muscles du corps pendant l'embryogenèse, puis sont distribués de façon plus large dans les tissus contractiles chez l'adulte.

IIE2c. Phénotype des mutants

On observe trois catégories de mutants *unc-52* (Rogalski *et al.* 1993; Rogalski *et al.* 1995) :

- Les mutants de classe I sont viables, avec un phénotype atténué. L'embryogenèse est normale, mais l'organisation des cellules musculaires du corps commence à se dégrader aux stades larvaires tardifs. Chez l'adulte, les corps denses sont fracturés et les myofilaments ne sont plus attachés à la membrane cellulaire, menant à une paralysie. Cependant, les muscles du pharynx ne sont pas atteints. Les mutations chez ces mutants (quatre mutations non-sens et une mutation d'excision-épissage) sont présentes dans les exons subissant l'épissage alternatif et codant pour des répétitions IgG du domaine IV (IgG8 (exon 16), IgG9 (exon 17) et IgG10 (exon 18)). Ces mutations ne touchent donc pas l'isoforme court et permettent, par épissage alternatif des exons mutés, la production des isoformes moyens et longs juste tronqués de quelques répétitions IgG.

- Les mutants de classe II sont paralysés au stage embryonnaire 2 et montrent une désorganisation des bandes et des myofilaments qui ne s'assemblent pas, menant à la mort au stage embryonnaire 2. Ce groupe comprend notamment un mutant (*st549*) dont le phénotype est causé par un codon stop dans l'exon 7, codant pour une partie du domaine III présente dans toutes les isoformes. Cette mutation aboutit à donc l'élimination complète de toutes les isoformes (pas de marquage GM1 ou GM3) et à la complète absence de protéine (Mullen *et al.* 1999). Ce groupe contient également quatre autres mutants létaux, possédant des mutations dans le domaine IV. Ces mutations touchent les isoformes moyens et long, et les mutants montrent une désorganisation des bandes de myosine. Néanmoins, ils expriment de façon normale l'isoforme court (marquage normal de GM1 dans les muscles du pharynx et de l'anus).

- Les mutants de classe III, ne sont pas paralysés, mais leur développement et leur élongation sont arrêtés au stage embryonnaire 2. Ces mutants possèdent une insertion d'un transposon dans l'exon 2 codant pour l'IgG1 situé dans le domaine II, mais montrent un marquage résiduel de protéine. Il s'agirait donc d'une mutation hypomorphe sévère.

Un dernier mutant (*gk3*), possédant une délétion de tout le domaine V, a été caractérisé. Il exprime les isoformes courts et moyens, mais pas l'isoforme long. Son phénotype est très léger, et il ne montre qu'un retardement dans la ponte, les œufs étant retenus dans les gonades (Mullen *et al.* 1999). La comparaison entre tous ces mutants montre de nouveau, comme chez l'Homme et la drosophile, que plus la quantité de protéine présente est importante, moins le phénotype est sévère, et qu'un effet de dose se produit également pour le nématode.

II E2d. Fonctions de UNC-52

La comparaison des phénotypes des mutants de classe II (déficients pour les isoformes moyen et long, myofilaments non assemblés) avec le mutant *gk3* (déficients pour l'isoforme long seulement, phénotype quasi-normal) mène à la conclusion que l'isoforme moyen est nécessaire et suffisant à l'assemblage des muscles du corps. Au contraire, l'organisation des bandes d'actine dans le pharynx des mutants *st549* (déficients pour les trois isoformes) est normale. L'isoforme court ne semble pas être nécessaire à l'assemblage des muscles du pharynx (Mullen *et al.* 1999). L'étude des mutants de classe I a montré que les isoformes résultant des épissages alternatifs montrent une spécificité temporelle (adultes) et spatiale (muscles du corps). De plus, des mutants déficients pour deux à quatre répétitions IgG ont une viabilité et une structure musculaire normale. Le nombre de répétitions IgG ne semblent donc pas être d'une importance primordiale pour la fonction d'UNC-52. Les trois épissages alternatifs donnant naissance aux trois isoformes majeurs semblent donc changer les propriétés et les interactions des différentes protéines formées, alors que les épissages alternatifs des domaines III et IV semblent être plutôt associés à des fines modulations de la fonction (Mullen *et al.* 1999; Rogalski *et al.* 2001). De façon différente par rapport à la drosophile, l'invalidation du perlecan chez le nématode souligne cette fois ci le rôle du perlecan dans le maintien des membranes basales.

II E3. La souris *Mus musculus*

II E3a. Structure du perlecan murin

Le gène *Hspg2* murin est situé sur le chromosome 4, possède 87 exons et code pour une protéine de 3707 acides aminés d'un poids moléculaire de 396kDa (Noonan *et al.* 1991). Le

perlecan murin montre 87% d'homologie avec le perlecan humain, mais quelques différences sont à noter. Le domaine III contient une séquence Arg-Gly-Asp impliquée dans l'adhésion cellulaire (Noonan *et al.* 1991), non conservée chez l'Homme (Murdoch *et al.* 1992). Le domaine IV ne contient que 14 répétitions IgG (au lieu de 21 chez l'Homme) (Noonan *et al.* 1991), suggérant une duplication ou un épissage récent dans l'évolution (Kallunki and Tryggvason 1992). On trouve dans ce domaine un résidu Cys supplémentaire dans les répétitions IgG1 et IgG12, permettant la formation d'un pont disulfure (IgG1 et 19 chez l'Homme), et quatre motifs Asp-Ser-Gly-Glu, sites d'attachement des chaînes GAG (contre neuf chez l'Homme). Le domaine V ne contient qu'une séquence Leu-Arg-Glu impliquée dans la croissance axonale (contre deux chez l'Homme) (Iozzo *et al.* 1994).

II E3b. Invalidation du gène *Hspg2*

De façon à étudier le rôle du perlecan *in vivo* chez les mammifères, différents modèles de souris déficientes pour le perlecan ont été générés depuis quelques années. Deux invalidations totales du perlecan ont été réalisées au même moment par deux laboratoires différents : un en insérant une cassette PGK-Néo dans l'exon 7 du perlecan (Arikawa-Hirasawa *et al.* 1999) et l'autre en insérant une cassette similaire mais flanquée de deux séquences loxP dans l'intron 5 et une séquence loxP supplémentaire dans l'intron 6 (Costell *et al.* 1999) (figure 22). Les séquences loxP sont des séquences palindromiques de 34 nucléotides, qui se recombinent en présence de Cre recombinase. La délétion d'une partie des introns 5 et 6 et de la totalité de l'exon 6 est donc obtenue, menant à une protéine tronquée et détruite. Dans les deux cas, une absence totale de perlecan sécrété et une létalité embryonnaire des homozygotes mutants sont retrouvées, alors que les hétérozygotes sont normaux. Dans le premier modèle (Arikawa-Hirasawa *et al.* 1999), 40% des embryons meurent au stade embryonnaire E10.5 avec des anomalies du développement céphalique comprenant un sous-développement du prosencéphale et du rhombencéphale. Au stade E14.5, 6% des embryons montrent une exencéphalie. Les embryons survivants meurent au stade périnatal et montrent de nombreuses anomalies osseuses telles que des anomalies crâniofaciales, un thorax étroit et des membres arqués. L'ossification endochondrale est anormale et la plaque de croissance est désorganisée, avec une diminution de la prolifération des chondrocytes et de leur organisation en colonnes. Le second modèle (Costell *et al.* 1999) montre un développement normal des embryons jusqu'à E9.5, mais 70 à 80% des embryons meurent entre E10.5 et E12.5, à cause d'anomalies cardiaques (ruptures locales dans la couche de cardiomyocytes et membrane basale fine menant à des hémorragies) et d'anomalies céphaliques (ruptures de la membrane basale

menant à une fuite des cellules neuroépithéliales dans l'ectoderme). Les 20 à 30% d'embryons survivants meurent entre E15.5 et la naissance, avec des microanévrismes dans plusieurs organes et une sévère ostéochondrodysplasie (nanisme, crâne vouté, membres et colonne vertébrale courts). La plaque de croissance est également anormale, avec une absence de minéralisation et une orientation transversale des zones d'ossification. Le cartilage montre une désorganisation du réseau de collagène, et des fibrilles plus courtes. Ces embryons souffrent également d'une transposition des gros vaisseaux (Gonzalez-Iriarte *et al.* 2003). En effet, l'aorte est normalement positionnée dorsalement par rapport à la veine pulmonaire. Chez les mutants, l'aorte et la veine pulmonaire sont côte à côte et les artères coronaires sont échangées, l'artère coronaire gauche provenant du sinus de Valsalva droit et inversement. Tous ces résultats confirment *in vivo* un rôle crucial du perlecan dans la maintenance, mais pas dans la formation, des membranes basales notamment celles soumises à un stress mécanique (cerveau et cœur), et un rôle important dans l'organisation et la maturation des chondrocytes lors de la chondrogenèse, mais pas dans ses premières étapes (condensation et différenciation du mésenchyme) (Olsen 1999).

II E3c. Modèles hypomorphes

Deux modèles viables de souris mutantes pour le perlecan ont été récemment générés (figure 22). Dans le premier modèle, l'exon 3 du gène *Hspg2*, qui contient les sites d'attachement des chaînes HS, a été remplacé par une cassette PGK-Néo (Rossi *et al.* 2003). Le perlecan produit ne possède donc pas de chaînes HS, mais tout le corps de la protéine est normal. Les mutants homozygotes montrent un développement normal, mais ils développent une cataracte et une microphthalmie avec des anomalies du cristallin. Les fibres composant le cristallin sont désorganisées, gonflent et se liquéfient, des vacuoles se forment et transforment le cristallin en une masse amorphe. Avec l'âge, la paroi du cristallin, membrane basale fine et spécialisée, se rompt et les fibres dégénèrent. Ce résultat est en accord avec le rôle du perlecan dans la maintenance des membranes basales. Ces mutants montrent également une cicatrisation difficile et un retard dans le développement de tumeurs, lié à un développement altéré des vaisseaux sanguins (Zhou *et al.* 2004). Enfin, le développement et la structure du rein des mutants sont normaux, mais en conditions pathologiques de surdose de protéine, on observe une protéinurie beaucoup plus élevée que chez les animaux sauvages (Morita *et al.* 2005). *In vivo*, le perlecan, via ses chaînes HS, joue donc un rôle important dans la stimulation de l'angiogenèse et la vascularisation et dans la formation de la barrière de filtration des glomérules rénaux.

Le second modèle a été généré par l'insertion de la mutation faux-sens c.4595G>A (p.Cys1532Tyr) décrite dans une famille SJS (Nicole *et al.* 2000) dans l'exon 36 du gène *Hspg2* et d'une cassette de sélection PGK-Néo dans l'intron 36 (Rodgers *et al.* 2007). Les homozygotes mutants de cette lignée (C1532YNéo) sont viables, mais montrent des défauts locomoteurs avec des mouvements exagérés des hanches, ainsi que des anomalies faciales avec un museau plat et des petits yeux. Une étude détaillée du phénotype chondrodystrophique a été menée. Les os longs (fémur, humérus) sont épais et de forme irrégulière, les articulations sont irrégulières, les côtes et le sternum sont projetés en avant et la colonne vertébrale montre un défaut d'ossification. La plaque de croissance est désorganisée, surtout au niveau des zones de prolifération et d'hypertrophie, avec un nombre réduit de chondrocytes. Les zones d'ossification sont orientées transversalement à l'axe longitudinal de l'os. L'établissement du centre d'ossification secondaire est retardé. Ces résultats confirment un rôle du perlecan dans la chondrogenèse et l'organisation de la plaque de croissance. Ce phénotype chondrodystrophique est similaire à celui observé chez les patients SJS. Cependant, aucun phénotype neuromusculaire n'est observé. Une seconde lignée de mutants (C1532Y) a été générée à partir de la lignée C1532YNéo, dans laquelle la cassette de sélection Néo a été déléetée. Les homozygotes mutants sont viables et ne sont que faiblement affectés : ils montrent une désorganisation mineure des différentes zones de la plaque de croissance et des chondrocytes hypertrophiques plus gros. La différence de phénotype entre ces deux lignées serait expliquée par la présence d'un taux normal de perlecan dans la lignée C1532Y, alors que la protéine est pratiquement absente dans la lignée C1532YNéo. Cette diminution du taux de protéine serait liée à une diminution du taux de transcrits perlecan, médiée par l'effet de la cassette PGK-Néo sur l'excision-épissage du gène. L'effet de dose est donc ici clairement démontré pour le perlecan murin.

III. La jonction neuromusculaire (JNM) et pathologies associées

La jonction neuromusculaire adulte est constituée de trois types cellulaires : le nerf terminal, qui correspond à l'extrémité du motoneurone, les cellules de Schwann terminales (CSTs), qui entourent le nerf terminal, et l'élément post-synaptique, correspondant à une partie spécialisée de la fibre musculaire (figure 23). De plus, la membrane basale présente dans la fente synaptique est spécialisée, faisant ainsi partie intégrante de la JNM.

IIIA. Le développement de la JNM

La synaptogenèse est le processus durant lequel la JNM se construit, pour mener à l'élaboration de la structure organisée avec ses trois composants, responsable de la transmission synaptique. Les trois composants ont des origines tissulaires différentes : les cellules musculaires viennent du mésoderme, le nerf provient de la portion ventrale du tube neural et les CSTs sont dérivées des crêtes neurales provenant de la portion dorsale du tube neural. Ces composants doivent donc migrer et se différencier pour former la JNM.

IIIA1. La différenciation présynaptique

Avant même le contact avec le muscle, le nerf est capable de sécréter le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) en réponse à une stimulation électrique. Le contact du nerf avec le muscle se fait immédiatement après la fusion des myoblastes pour générer les myotubes (vers E12 chez la souris). Le nerf terminal commence alors sa spécialisation chez l'embryon en prenant la forme d'un gros bouton terminal. Après la naissance, le bouton terminal se différencie : le nombre de vésicules synaptiques augmente et les éléments du cytosquelette axonal sont perdus. Des zones denses apparaissent au niveau de la membrane nerveuse qui fait face au muscle et où les vésicules synaptiques s'agrègent : ce sont les zones actives. Le nerf terminal grossit et devient polarisé (Sanes and Lichtman 1999; Fox *et al.* 2007) (figure 24A). Chaque fibre musculaire est tout d'abord polyinnervée, mais au cours du développement post-natal, toutes les branches terminales sauf une se rétractent pour laisser une innervation unique à chaque fibre musculaire. Cette perte n'est pas due à une mort neuronale, mais le processus exact n'est pas connu et plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer ce retrait axonal : une dégénérescence Wallérienne de l'axone, une rétraction de la branche axonale avec réabsorption par l'axone original, ou une élimination de l'axone par la cellule de Schwann (Bishop *et al.* 2004; Koirala and Ko 2004) (figure 24B).

Les cellules de Schwann (CS) semblent en effet être des acteurs importants lors de la synaptogenèse. Leur nombre est finement régulé : à la naissance, 30 à 50% des JNMs ne possèdent pas de cellules de Schwann terminales (CSTs), mais seuls des prolongements des CS pré-terminales sont présents. Au cours du développement post-natal, le nombre de CSTs par JNM augmente grâce à la migration des CSs du nerf préterminal et à la division des CSTs déjà présentes (Love and Thompson 1998). Chez l'adulte, le nombre de CSTs est fonction de la taille de la JNM. Ce nombre reste dynamique tout au long de la vie, selon que les JNMs s'élargissent ou se rétrécissent (Lubischer and Bebinger 1999).

IIIA2. La différenciation post synaptique

Les récepteurs à l'acétylcholine (RACHs) sont des hétéropentamères formant un canal cationique peu spécifique dont l'ouverture est dépendante de la fixation de l'ACh. Lors de la myogenèse chez l'embryon, les sous-unités α , β , γ , δ des RACHs sont transcrites, traduites, pentamérisées sous forme $\alpha_2\beta\gamma\delta$ et ces RACHs sont incorporés dans la membrane. Lors de la différenciation en myotubes, des regroupements spontanés de RACHs se produisent au centre de la fibre *in vivo* (Flanagan-Steet *et al.* 2005; Panzer *et al.* 2005) et *in vitro* (Anderson and Cohen 1977; Frank and Fischbach 1979). Ce mécanisme est dépendant du récepteur tyrosine kinase MuSK (Muscle Specific Kinase). Cette protéine est composée d'un domaine extracellulaire contenant un peptide signal, 4 motifs IgG et une région riche en cystéines, d'une région transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique tyrosine kinase. La séquence signal est nécessaire pour l'oligomérisation de MuSK (Bianchetta *et al.* 2005), le premier motif IgG pour la réponse à l'agrine (Zhou *et al.* 1999), et toute la partie extracellulaire proche de la membrane joue un rôle dans l'interaction avec la rapsyne et l'activation des voies de signalisation menant à la différenciation pré et post-synaptique (Herbst *et al.* 2002). MuSK est spécifiquement exprimé par les noyaux du centre de la fibre au cours du développement et est nécessaire à l'étape d'initiation de la différenciation post synaptique (Lin *et al.* 2001). Les souris invalidées pour le gène *Musk* ne respirent pas et meurent à la naissance (DeChiara *et al.* 1996). Les branches du nerf phrénique s'étendent dans tout le diaphragme et ne sont pas restreints à la zone centrale, où sont normalement concentrés les agrégats de RACHs. Les agrégats de RACHs, ainsi que de l'acétylcholinestérase, l'ErbB4, l'utrophine et la rapsyne sont complètement absents, suggérant que MuSK est en grande partie responsable de l'agrégation des RACHs et de la différenciation post-synaptique.

MuSK assure son rôle dans l'agrégation des RACHs via son association avec une protéine cytoplasmique de 43 kDa : la rapsyne (receptor-associated protein at the synapse). La rapsyne est composée de plusieurs domaines : un domaine N-terminal nécessaire à l'association avec la membrane, 7 motifs TPR impliquée dans l'oligomérisation de la rapsyne, un domaine en hélice interagissant avec les RACHs et un domaine C-terminal en doigt de zinc RINGH2 riche en cystéines interagissant avec le DGC via le β -DG. Elle joue le rôle d'intermédiaire entre MuSK et les RACHs pour l'agrégation des RACHs (Burden 2002), mais également un rôle dans la stabilisation des RACHs grâce à ses interactions avec le complexe sous synaptique (Banks *et al.* 2003). Les souris invalidées pour la rapsyne meurent quelques heures après la

naissance avec une détresse respiratoire (Gautam *et al.* 1995). Aucun agrégat de RACHs n'est détectable et l'utrophine est absente. La rapsyne est donc nécessaire à l'agrégation des RACHs.

Au moment du contact nerf-muscle, le nerf permet d'affiner la zone des RACHs préformés sur la membrane musculaire. Deux mécanismes opposés régissent cette spécialisation (Kummer *et al.* 2006). Premièrement, un mécanisme assez peu connu, mettant en jeu la stimulation électrique par l'ACh, disperse les RACHs dans les zones extrasynaptiques, sans doute via une voie de signalisation impliquant la Cdk5 (Lin *et al.* 2005). Deuxièmement, le nerf sécrète un HSPG, la z-agrine, qui se fixe sur son récepteur MuSK, via un intermédiaire protéique nommé MASC. Cette interaction est suffisante pour induire l'agrégation des RACHs (Meier *et al.* 1997), et affine la localisation des RACHs en contrant le mécanisme de dispersion (Misgeld *et al.* 2005). De plus, un second facteur sécrété par le nerf, la neuréguline, se fixe sur ses récepteurs ErbB et permet l'expression des gènes codant pour les protéines synaptiques spécifiquement par les noyaux sous-synaptiques (figure 25).

A la naissance, les récepteurs sont regroupés au niveau des JNMs sous la forme d'une simple plaque. A P7, il se produit une transition transcriptionnelle d'une des sous-unités composant le RACH ($\gamma \rightarrow \epsilon$), hétéropentamère $\alpha 2\beta\gamma\delta$ chez l'embryon, qui devient $\alpha 2\beta\epsilon\delta$ chez l'adulte. Cette transition change les propriétés biochimiques du récepteur : la durée d'ouverture est réduite, mais la conductance et la perméabilité aux ions sont augmentées. A P21, la forme des agrégats de RACHs est similaire à celle d'un bretzel. En même temps, il se produit un changement morphologique : la plaque de RACHs s'invagine en une grosse gouttière puis forme des plis sous-synaptiques. Les récepteurs sont présents au niveau des crêtes de ces plis (Sanes and Lichtman 2001) (figure 26).

IIIB. La transmission du potentiel d'action synaptique

Lorsque la cellule nerveuse est stimulée par un courant électrique dépolarisant, un potentiel d'action (PA) apparaît. Il se propage le long de l'axone qui est soit non myélinisé, soit myélinisé, c'est-à-dire entouré par une gaine de myéline interrompue au niveau des nœuds de Ranvier. La propagation du PA dans ces axones myélinisés, dite saltatoire, est plus rapide. Arrivé au niveau de la JNM, ce PA provoque l'exocytose des vésicules synaptiques et la libération de paquets multimoléculaires d'ACh, appelés quanta. Cette libération est dépendante du calcium extracellulaire et se fait en plusieurs étapes nécessitant différentes protéines : transport des vésicules vers la membrane (synapsine, calmoduline), reconnaissance

des sites spécifiques d'exocytose (SNAP/SNARE), fusion des membranes (synaptophysine, synaptotagmine). La sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques sensibles au voltage de type P/Q pré-synaptiques interagit directement avec la synaptotagmine pour fixer les vésicules synaptiques dans la membrane plasmique. Deux molécules d'ACh libérée se fixent alors sur les sous-unités α des RACHs, ce qui provoque un changement de conformation et l'ouverture de ce canal ionique. Les cations entrent et entraînent une dépolarisation locale de la membrane musculaire : un potentiel de plaque motrice (PPM), qui active les canaux sodiques sensibles au voltage de la fibre musculaire et génère ainsi le potentiel d'action musculaire.

L'ACh est également libérée de façon spontanée et est alors à l'origine de potentiels de plaque motrice miniatures (PPMM) caractérisés par leur amplitude quasi-constante. Un PPMM résulte de la libération d'un seul quantum d'ACh.

III.C. Les composants de la JNM adulte

III.C1. Le nerf terminal

Le nerf terminal correspond à l'extrémité d'un axone d'un motoneurone. L'axone est recouvert d'une gaine de myéline interrompue (nœuds de Ranvier), ce qui permet la propagation saltatoire rapide du potentiel d'action. Au niveau de la JNM, le nerf perd sa gaine de myéline et se différencie. Il ne contient plus de neurofilament, constituant majeur du cytosquelette des axones, composé de filaments intermédiaires. Le nerf terminal est spécialisé dans la libération du neurotransmetteur : l'acétylcholine (ACh) (Sanes and Lichtman 1999). Il contient pour cela de nombreuses vésicules de 50nm de diamètre qui contiennent l'ACh : les vésicules synaptiques. Il contient également de nombreuses mitochondries, qui fournissent l'énergie nécessaire à la synthèse et à l'exocytose de l'ACh. Le nerf terminal est polarisé : les mitochondries sont regroupées en face des cellules de Schwann, et les vésicules synaptiques sont regroupées face au muscle, plus précisément en face des crêtes des plis sous-synaptiques au niveau des zones actives, sites préférentiels d'exocytose. Peu de composants de ces zones actives sont connus, mais leur association avec des canaux potassiques et calciques sensibles au voltage maximise l'efficacité de la sécrétion (Robitaille *et al.* 1993).

III.C2. La cellule de Schwann terminale (CST)

Les cellules de Schwann sont les cellules gliales du système nerveux périphérique. Il existe 2 types de cellules de Schwann : les cellules de Schwann préterminales myélinisantes qui

entourent le nerf et permettent la conduction saltatoire du potentiel nerveux, et les cellules de Schwann terminales (CST) non myélinisantes, qui entourent le nerf terminal.

Les CSTs jouent un rôle essentiel dans le développement et la maintenance à long terme de la structure et de la fonction des JNMs (Trachtenberg and Thompson 1997; Feng *et al.* 2005). Elles peuvent également favoriser la transmission synaptique en augmentant le taux de calcium extracellulaire (Castonguay and Robitaille 2001). Elles guident les extensions du nerf terminal et dictent le profil d'innervation lors de la régénération ou du remodelage des JNMs, et induisent l'agrégation des RACHs (Yang *et al.* 2001).

III C3. La membrane basale synaptique

La membrane basale joue trois rôles importants : un rôle structural dans l'organisation de la membrane basale, des propriétés adhésives impliquées dans la migration des cellules et un rôle de signalisation pour promouvoir la prolifération et la différenciation. Au niveau de la JNM, une membrane basale spécialisée est présente entre le nerf et le muscle. Elle exprime certaines molécules qui ne sont pas présentes dans la membrane basale extrasynaptique (figure 27). Le rôle primordial de cette membrane basale est d'organiser et de maintenir l'état différencié des 3 composants synaptiques et d'attacher le nerf terminal au muscle (Patton 2003).

III C3a. Agrine

L'agrine est une protéine d'environ 200kDa, qui possède 6 sites consensus Ser-Gly-x-Gly d'attachement de chaînes GAG. C'est un HSPG qui atteint 400kDa après modifications post-traductionnelles (Tsen *et al.* 1995). Elle est exprimée dans le système nerveux central et périphérique, les vaisseaux sanguins et le muscle embryonnaire, et est particulièrement concentrée au niveau de la JNM chez l'adulte (Eusebio *et al.* 2003).

Les isoformes d'agrine secrétées par le muscle et le nerf (z-agrine) sont différentes. L'agrine musculaire subit un épissage alternatif, elle ne contient pas les exons 5' et est 1000 fois moins active que la z-agrine pour agréger les RACHs. Cependant, l'agrine musculaire peut également induire l'agrégation des RACHs si elle est associée à des polymères de laminine-2, et selon un mécanisme impliquant MuSK (Smirnov *et al.* 2005). Les souris déficientes pour l'agrine se développent normalement jusqu'à E18, mais meurent *in utero* ou à la naissance (Gautam *et al.* 1996). Le nombre, la taille et la densité des agrégats de RACHs sont diminués chez ces mutants, et seule une minorité est correctement innervée. Les nerfs s'étendent le long

des fibres musculaires et contiennent peu de vésicules synaptiques. L'acétylcholinestérase est difficilement détectable. L'agrine est donc un organisateur essentiel de la différenciation post-synaptique, induisant l'agrégation des RACHs dans la membrane musculaire.

III C3b. Collagènes

Les gènes codant pour les chaînes de collagènes sont regroupés tête bêche par deux, dirigés par un seul promoteur, permettant une expression coordonnée des isoformes présentes dans différents tissus. Les isoformes $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ sont exprimées au niveau de la JNM, mais leur rôle, sans doute de maintien structural comme dans les zones extrasynaptiques, est redondant et peu connu (Sanes *et al.* 1990; Miner and Sanes 1994).

III C3c. Laminines

Dans le muscle, les chaînes prédominantes des laminines sont les chaînes $\alpha 2$ et $\gamma 1$. L'isoforme principal est la laminine-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$, aussi appelée mérosine). Les chaînes présentes au niveau de la JNM sont les chaînes $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ (anciennement appelée laminine S pour « synaptique »), qui forment les isoformes laminine-4 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$), -9 ($\alpha 4\beta 2\gamma 1$) et -11 ($\alpha 5\beta 2\gamma 1$). Les souris homozygotes mutantes pour la laminine $\beta 2$ sont normales jusqu'à P7, mais arrêtent leur croissance à cet âge et meurent entre P15 et P30, avec des défauts rénaux et de la JNM (Noakes *et al.* 1995). Le nerf terminal et la membrane post-synaptique ne sont pas apposés. Le nerf contient peu de zones actives, les vésicules terminales sont distribuées dans tout le nerf terminal au lieu d'être agrégées dans la moitié inférieure. Les CSTs envahissent la fente synaptique et peu de plis sous-synaptiques sont visibles. La fréquence des PPMs et PPMs est fortement diminuée et le contenu quantique est réduit (Knight *et al.* 2003). La laminine $\beta 2$ joue donc un rôle dans la différenciation synaptique et est particulièrement importante dans la différenciation du nerf terminal. Elle régule la croissance axonale *in vitro* (Hunter *et al.* 1989).

La laminine $\alpha 4$ est située dans la membrane basale entre les ouvertures des plis sous-synaptiques. Les souris déficientes pour la laminine $\alpha 4$ sont viables, mais montrent un phénotype locomoteur avec des mouvements désordonnés. A P7, les JNMs sont normales, mais chez l'adulte, elles sont fragmentées et les branches terminales du nerf sont plus fines que chez le contrôle. Les zones actives du nerf ne sont pas apposées en face des ouvertures

des plis sous-synaptiques (Patton *et al.* 2001). La laminine $\alpha 4$ est donc requise pour la bonne apposition des zones actives du nerf et des plis sous synaptiques.

In vitro, les cellules de Schwann s'étendent sur des boîtes recouvertes de laminine-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), -2 ou -4, mais restent rondes sur des boîtes recouvertes de laminine-11. *In vivo*, la laminine-11, contenant la chaîne $\alpha 5$, pourrait donc empêcher l'entrée de la cellule de Schwann dans la fente synaptique, permettant la bonne apposition des composants pré et post-synaptiques (Patton *et al.* 1998). Les souris invalidées pour la laminine $\alpha 5$ meurent entre E13.5 et E16.5 (Miner *et al.* 1998). Ils présentent de nombreux défauts développementaux, avec une exencéphalie et une syndactylie. Ces défauts sont attribuables au rôle des laminines dans le maintien des membranes basales.

Les laminines jouent donc un rôle actif dans l'apposition entre le nerf et le muscle au niveau de la JNM, et dans la structure fine des éléments spécialisés pré et post synaptiques. Elles ont un rôle crucial dans l'organisation des trois éléments cellulaires de la JNM.

III C3d. Nidogène

Une isoforme particulière du nidogène-1 (aussi nommé entactine) a été identifiée au niveau de la JNM (Chiu and Ko 1994). Grâce à ses interactions avec le collagène IV, le perlecan et la fibronectine via son domaine G2 et la laminine $\gamma 1$ via son domaine G3, le nidogène lie ces différentes molécules et joue donc un rôle dans la stabilisation de la membrane basale extrasynaptique. Un rôle similaire peut donc être suggéré au niveau de la JNM.

III C3e. Les neurégulines et leurs récepteurs ErbB

Les neurégulines sont des facteurs de croissance sécrétés par le nerf, le muscle et la CST. La neuréguline-1 (Nrg-1) est présente dans la membrane basale synaptique, mais au moins 14 isoformes sont générées par épissage alternatif et l'expression de chacune de ces isoformes n'a pas été déterminée. Toutes ces isoformes contiennent un domaine EGF qui se lie sur ses récepteurs membranaires ErbB3 et 4 et induit leur hétérodimérisation avec ErbB2 (qui elle-même ne lie pas les neurégulines). ErbB2 et 4 sont exprimés par le muscle et sont présents dans le fond des plis sous synaptiques (Trinidad *et al.* 2000). Les CSTs expriment ErbB2 et 3, mais l'expression d'ErbB2 est très fortement réduite chez l'adulte. Les neurégulines se concentrent dans le fond des plis sous synaptiques, là où se trouvent leurs récepteurs (Patton

2003). Elles peuvent interagir via leur domaines IgG avec les composants de la membrane basale, notamment les GAG des HSPGs (Meier *et al.* 1998).

La fixation de la neuréguline sur son récepteur ErbB induit la phosphorylation des résidus tyrosines dans le domaine intracellulaire de l'ErbB et le recrutement de facteurs et l'activation de voies de signalisation des MAP kinases (Tansey *et al.* 1996; Altiok *et al.* 1997; Mejat *et al.* 2003). Ces voies de signalisation mènent à l'activation du facteur de transcription de la famille Ets, le GABP. Ce facteur se fixe alors sur une séquence spécifique du promoteur, la boîte N, constituée par un motif de six nucléotides contenant la séquence consensus GGAA reconnue par le GABP. La fixation du GABP sur cette boîte stimule l'expression de protéines synaptiques spécifiques telles que les RACHs, l'acétylcholinestérase, MuSK, rapsyne, l'agrine musculaire et l'utrophine (figure 28).

Les souris invalidées pour ErbB3 (récepteurs présents dans les CSTs) exhibent une neuropathie sévère et ne survivent pas à la naissance. Les cellules de Schwann sont inexistantes et les motoneurons dégénèrent à partir de E18.5. (Riethmacher *et al.* 1997), indiquant que la voie Nrg-ErbB est essentielle pour que la cellule de Schwann assure son rôle dans le développement du système nerveux. Les souris mutantes pour ErbB2 et 4 (isoforme exprimée spécifiquement dans le muscle) sont viables, bien que plus maigres, et ne montrent qu'une affection mineure des JNMs avec seulement 20 à 30% des ARNm codant pour les RACHs (Escher *et al.* 2005).

III C4. La fibre musculaire

III C4a. Structure de l'élément post-synaptique

L'élément post-synaptique est une zone particulière de la fibre musculaire spécialisée par sa forme et par l'expression de protéines spécifiques dans son cytosquelette et sa membrane basale (Sanes and Lichtman 2001) (figure 29). Elle est spécialisée dans la réponse rapide à l'ACh, et contient notamment une concentration très élevée ($>10000/\mu\text{m}^2$) de récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (RACHs), qui forment un canal cationique peu spécifique. Leur ouverture permet une dépolarisation membranaire locale, le PPM, à l'origine de la genèse d'un potentiel d'action dans la fibre musculaire. La membrane post-synaptique est invaginée en plis sous-synaptiques profonds de 1 à 2 μm , qui s'ouvrent face des zones actives du nerf. Les RACHs sont regroupés au sommet des plis, alors que les canaux sodiques sensibles au voltage se situent dans le fond des plis.

III C4b. Protéines du complexe post-synaptique

Les RACHs sont stabilisés dans la membrane musculaire grâce à un complexe de protéines homologue au DGC excepté que la dystrophine est remplacée par l'utrophine. La dystrophine est présente au niveau du fond des plis sous-synaptiques alors que l'utrophine se situe au niveau des crêtes. L'utrophine est constituée d'un domaine N-terminal qui se lie aux filaments d'actine, d'un long domaine central, d'une région riche en cystéines qui permet les interactions avec les éléments du DGC et d'un domaine C-terminal (Grady *et al.* 1997). Son promoteur ne contient pas de TATA box, mais contient une boîte E, une boîte N et un motif SP1 (Khurana *et al.* 1999). Son expression est régulée par les facteurs de transcription myogéniques durant la myogenèse via la boîte E (Gramolini and Jasmin 1999), mais surtout par le facteur de transcription de la famille Ets induit par la voie des neurégulines, le GABP (Schaeffer *et al.* 2001) via la boîte N (Gramolini *et al.* 1999). Le GABP est un hétérodimère composé de GABP α , protéine de 58kDa possédant un motif de reconnaissance de l'ADN, et de GABP β , protéine de 43kDa qui induit la translocation nucléaire de l'hétérodimère (Mejat *et al.* 2003). Les souris déficientes en utrophine ne montrent pas de graves anomalies phénotypiques ou morphologiques, mais seulement une diminution de la densité des RACHs et du nombre et de la taille des plis sous-synaptiques, sans conséquences fonctionnelles. L'expression et la localisation des protéines du DGC à la JNM est normal (Deconinck *et al.* 1997). L'utrophine ne semble donc pas essentielle à la formation de la JNM, mais participe à l'invagination des plis sous-synaptiques.

L'utrophine interagit avec le complexe α/β -DG. Les souris complètement déficientes en DG meurent à E6.5. Pour réaliser des modèles viables, des souris chimériques ont été générées. Ces souris sont viables, mais développent une dystrophie musculaire et une cyphoscoliose. La JNM est fragmentée, les marquages des RACHs et de l'utrophine sont très faibles et l'acétylcholinestérase est absente (Cote *et al.* 1999). L' α -DG semble donc nécessaire à la stabilisation des agrégats de RACHs (Jacobson *et al.* 2001). La glycosylation de l' α -DG joue un rôle très important pour la fonction du DG et différentes souris déficientes en glycosyltransférases ont été générées. Les souris déficientes pour la glycosyltransférase LARGE développent une faiblesse musculaire et une incapacité progressive à s'agripper sur une barre (Levedakou *et al.* 2005). Leurs muscles squelettiques montrent des fibres en nécrose, des fibres à noyaux centraux et du splitting. La gaine de myéline des axones du nerf

sciatique est irrégulière, et on trouve des groupes d'axones non myélinisés. Le nombre de JNMs est diminué de 40%, leur forme est allongée et le marquage des RACHs est diffus. La localisation de l'agrine, de MuSK et de rapsyne à la JNM est irrégulière et le marquage de l'acétylcholinestérase et de la laminine- $\alpha 2$ sont réduits. L'interaction de l' α -DG avec la laminine est fortement réduite (Michele *et al.* 2002). De même, l'interaction avec le perlecan est réduite de 80% (Kanagawa *et al.* 2005). Chez l'Homme, des mutations de la glycosyltransférase fukutine mènent à une dystrophie musculaire congénitale, avec des muscles et des JNMs immatures, exprimant encore les isoformes de myosine et de la sous-unité fœtale γ des RACHs (Taniguchi *et al.* 2006). Le marquage des RACHs est faible et dispersé, et le nombre de plis sous-synaptiques est fortement réduit. Ceci confirme donc un rôle de l' α -DG dans la formation de la JNM.

D'autre part, l'utrophine interagit avec l' α -dystrobrevine (DB). Il existe 5 isoformes d' α -DB générées par épissage alternatif. Seules les isoformes 1 à 3 sont exprimées dans le muscle squelettique. L' α -DB 1 est localisée de façon prédominante au niveau de la JNM dans les crêtes des plis sous-synaptiques, alors que l' α -DB 2 est présente dans les zones extrasynaptiques et synaptiques au niveau du fond des plis (Grady *et al.* 2000). Les souris déficientes en α -DB sont viables, mais développent une dystrophie musculaire et une cardiomyopathie, avec une dégénérescence des fibres musculaires et des cardiomyocytes (Grady *et al.* 1999). Elles ont des JNMs normales jusqu'au jour post-natal P7, puis les RACHs, l'utrophine et la rapsyne montrent une localisation irrégulière et granulaire, et une diminution de moitié de la densité des plis sous synaptiques est observée. L' α -DB n'est donc pas nécessaire à la formation de la JNM, mais est essentielle à sa maturation. Une diminution du marquage de la syntrophine et de nNOS (Nitric Oxide Synthase) est observée, et l' α -DB semble donc requise pour ancrer ces molécules cytoplasmiques solubles à la membrane musculaire.

L'utrophine et la dystrophine interagissent également avec les syntrophines (Peters *et al.* 1997). Il existe 5 isoformes de syntrophine : $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ et $\gamma 2$. Toutes ont la même structure et contiennent 2 domaines PH (pleckstrin homology), un domaine PDZ qui interagit avec nNOS, et un domaine C-terminal unique aux syntrophines. A la JNM, les isoformes α et $\beta 2$ sont exprimées respectivement au niveau des crêtes et du fond des plis sous synaptiques. Les souris déficientes en $\beta 2$ syntrophine sont viables et fertiles et ne montrent aucun

phénotype visible. Les muscles et la densité des RACHs sont normaux (Adams *et al.* 2004). Les souris déficientes en α -syntrophine sont viables et fertiles et ne montrent aucun signe de dystrophie musculaire (Adams *et al.* 2000). Néanmoins, les JNMs montrent une diminution de la densité des RACHs, une désorganisation des plis sous-synaptiques et une diminution d'acétylcholinestérase à la JNM. La syntrophine semble donc stabiliser le DGC à la JNM. De la même façon, les souris déficientes pour nNOS montrent une diminution de la densité des RACHs, ce qui suggèrent que le NO soit requis dans l'agrégation de ces récepteurs (Shiao *et al.* 2004).

IIID. Le complexe acétylcholinestérase-ColQ

IIID1. L'acétylcholinestérase (AChE)

IIID1a. Les différents isoformes

Le gène codant pour l'AChE est situé sur le chromosome 7 et contient six exons. Le domaine catalytique de l'enzyme est codé par les exons 2, 3 et 4 et il existe différents promoteurs dans l'exon 1. Différentes isoformes d'AChE sont produites par épissage alternatif de la partie 3' : types H (hydrophobic) contenant l'exon 5, T (tailed) contenant l'exon 6, et R (readthrough) contenant l'intron situé en 3' de l'exon 4 (Massoulie *et al.* 1998) (figure 30). Les deux principales isoformes présentes chez les mammifères sont le type H, exprimé dans les cellules hématopoïétiques (foie, rate) et le type T plus largement exprimé, notamment dans les systèmes nerveux central et périphérique et dans le muscle (Legay *et al.* 1993; Legay *et al.* 1999). De plus, les trois isoformes sont présentes dans le muscle embryonnaire, et l'expression exclusive des isoformes de type T n'apparaît qu'après l'innervation (Legay *et al.* 1995). Les isoformes T (AChE_T) sont caractérisées par un peptide de 40 acides aminés dans leur partie C-terminale, appelé le peptide T. Ces isoformes T peuvent s'associer entre elle et former différentes molécules (figure 31) : globulaire monomérique (G1), dimérique (G2) ou tétramérique (G4) (Soreq and Seidman 2001; Darvesh *et al.* 2003). Les tétramères sont soit non amphiphiles (G4na) : les peptides T interagissent les uns avec les autres ; soit amphiphiles (G4a) : les peptides T sont exposés vers l'extérieur, et peuvent donc s'associer à ColQ ou PRiMA, qui ancrent l'AChE dans la membrane basale ou la membrane plasmique, respectivement (Bon and Massoulie 1997). Les molécules associées avec ColQ sont dites asymétriques et existent sous 3 formes : A4, A8 et A12, qui contiennent respectivement 1, 2 ou 3 tétramères d'AChE.

IID1b. Rôles de l'AChE

La forme asymétrique A12 est la forme majoritaire présente à la JNM (Rotundo *et al.* 2005) où elle est responsable de l'hydrolyse de l'ACh dans les synapses cholinergiques. La choline libérée est alors endocytée par le nerf terminal et peut être réutilisée (Zimmerman and Soreq 2006). La vitesse de libération de l'ACh fixée aux récepteurs est inférieure à la vitesse d'hydrolyse de l'ACh par l'AChE, de façon à ce que dès qu'une molécule d'ACh est libérée, de nombreuses molécules d'AChE soient libres pour l'hydrolyser et l'empêcher de stimuler un autre récepteur. L'AChE contrôle ainsi la concentration de neurotransmetteur présent dans la fente synaptique. Elle a une activité catalytique extrêmement rapide. Pour assurer cette rapidité, l'enzyme doit être localisée au bon endroit (Guerra *et al.* 2005). Une façon de garantir cette localisation est l'expression spécifique de l'AChE par les noyaux sous synaptiques (Jasmin *et al.* 1993). L'AChE joue également d'autres rôles indépendamment de ses propriétés catalytiques : stimulation de la genèse des neurites, propriétés adhésives, rôle dans la synaptogenèse et l'hématopoïèse (Soreq and Seidman 2001).

IID1c. Phénotype des mutants AChE

Une lignée de souris invalidée pour l'AChE a été générée par la délétion des exons 2 à 5. Les souris homozygotes mutantes complètement déficientes en AChE ne montrent pas de phénotype visible à la naissance, mais leur prise de poids et leur croissance est retardée. Elles ne vivent pas au delà de 3 semaines et présentent un phénotype particulier : elles sont plus petites que les sauvages, tournent en rond, n'ouvrent pas les yeux, montrent une immaturité de l'oreille externe et développent des tremblements (Xie *et al.* 2000). L'absence d'AChE cause donc un retard de développement et de maturation. Cependant, avec une attention particulière et en administrant à ces mutants un régime liquide riche en gras, les souris peuvent être maintenues en vie jusqu'à 4 mois (Girard *et al.* 2005). Les analyses électrophysiologiques sur hémidiaphragme ont montré que ces mutants étaient incapables de maintenir une contraction tétonique. De plus, les JNMs apparaissent normales à P7, mais sont complètement fragmentées dès P15. Le nerf montre également ce profil fragmenté, suggérant qu'il se soit adapté au surplus d'ACh non hydrolysé par l'AChE.

Les souris délétées pour les exons 5 et 6 de l'AChE sont viables, mais développent également des tremblements et une faiblesse musculaire (Camp *et al.* 2005). L'analyse des JNMs de ces mutants a montré des RACHs fragmentés. Ce profil pourrait être une adaptation de la

morphologie de la JNM pour permettre à l'ACh de s'échapper rapidement de la synapse (Girard *et al.* 2006).

IID2. ColQ

IID2a. Structure

Une autre façon de localiser l'AChE à la JNM, outre son expression par les noyaux sous-synaptiques, est son interaction avec ColQ. ColQ constitue une queue collagénique en triple hélice qui ancre l'AChE dans la membrane basale synaptique (Aldunate *et al.* 2004). Chaque monomère de ColQ est composé de plusieurs domaines (Krejci *et al.* 1997). Le domaine N-terminal (PRAD), riche en prolines, est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec les tétramères d'AChE. Ce domaine contient deux résidus Cys qui peuvent établir des ponts disulfures avec les tétramères d'AChE pour stabiliser l'interaction (Bon *et al.* 1997). Le domaine collagénique central contient 63 triplets Gly-x-y importants dans l'homotrimérisation de ColQ et 2 motifs HBD responsables de la liaison avec l'héparine ou les chaînes HS (Deprez and Inestrosa 1995). La coopération de ces deux motifs est importante pour l'interaction avec les HSPGs, mais ils diffèrent sur plusieurs points : leur affinité (le domaine HBD C-terminal montre une affinité plus grande), le nombre des résidus basiques qu'ils contiennent (le domaine HBD C-terminal contient 2 résidus basiques supplémentaires) et la nature de ces résidus (Arg-Lys-Gly-Arg pour le domaine HBD N-terminal et Lys-Arg-Gly-Lys pour le C-terminal). De plus, la conformation locale contribue autant que la séquence primaire à l'affinité avec les HSPGs (Deprez *et al.* 2003). Enfin, le domaine C-terminal contient un motif riche en prolines nécessaire à l'initiation de la formation de la triple hélice et un motif riche en cystéines nécessaire à l'attachement de ColQ sur son récepteur.

IID2b. Phénotype des mutants ColQ

Les souris invalidées pour ColQ ont été générées par le remplacement de l'exon codant pour le domaine PRAD par une cassette Néo seule ou associée au gène LacZ (Feng *et al.* 1999). Les homozygotes mutants des deux lignées exhibent le même phénotype : elles développent des tremblements dès le cinquième jour post-natal et grandissent beaucoup moins rapidement que les souris sauvages. La moitié meurent à P21, et les deux tiers des survivants meurent dans les quelques semaines qui suivent. Seuls 10 à 20% des mutants survivent à l'âge adulte. 40% des JNMs sont fragmentées et 20% sont immatures et n'acquièrent pas la forme typique en bretzel. L'AChE est totalement absente au niveau de la JNM. L'expression et la localisation de l' α -sarcoglycan, du β -DG, de la rapsyne, de l'utrophine et de l'agrine est

normale. En microscopie électronique, un envahissement de la fente synaptique par la cellule de Schwann terminale est visible, suggérant un mécanisme compensatoire pour limiter le taux d'ACh présent dans la fente synaptique. Des analyses électrophysiologiques sur hémidiaphragmes ont montré une augmentation du temps de décroissance des PPMs et PPMs, ainsi qu'une augmentation du contenu quantique.

IIID2c. Le complexe perlecan-ColQ-MuSK

L'agrégation de l'AChE au niveau de la JNM est contrôlée par deux mécanismes similaires à l'agrégation des RACHs : son expression est limitée aux noyaux sous-synaptiques, et sa queue collagénique ColQ lui permet d'être liée à des composants de la membrane basale.

Le perlecan est colocalisé avec les agrégats d'AChE-ColQ au niveau de la JNM et interagit avec une grande affinité avec ColQ (Peng *et al.* 1999), certainement via ses domaines HBD. *In vitro*, l'héparine bloque la formation des nouveaux agrégats d'AChE, mais ne détruit pas les agrégats anciennement formés (Rossi and Rotundo 1996). Le perlecan semble donc être impliqué dans la localisation de l'AChE (Steen and Froehner 2003), ancrant le complexe AChE-ColQ dans la membrane basale dès sa sécrétion (Peng *et al.* 1998). Le récepteur transmembranaire MuSK interagit avec le domaine C-terminal de ColQ (Cartaud *et al.* 2004). MuSK immobiliserait donc l'AChE-ColQ au niveau de la JNM via son interaction avec ColQ.

Un mécanisme est alors proposé dans lequel la forme A12 d'AChE est assemblée dans le Golgi, associée au perlecan via des liaisons électrostatiques, sécrétée et attachée dans la membrane basale, via les interactions perlecan/ α -DG. Puis, le complexe AChE-ColQ est immobilisé au niveau de la JNM via l'interaction ColQ-MuSK (figure 32).

IIIE. Hypothèse perlecan et SJS

L'efficacité de la transmission synaptique de la localisation correcte de l'AChE, qui restreint l'action du nerf en hydrolysant l'ACh. L'hypothèse actuellement proposée pour expliquer la raideur musculaire dans le SJS est qu'un manque de perlecan entraînerait une perte d'AChE au niveau de la JNM. Le système neuromusculaire des souris invalidées pour le perlecan a été étudié à E18.5 (Arikawa-Hirasawa *et al.* 2002). Les muscles et la membrane basale musculaire se développent normalement et l'innervation des fibres semble normale. Néanmoins, des anomalies de la JNM sont visibles, avec une augmentation de l'aire occupée par les RACHs associée à une diminution de leur densité. Le plus frappant est une absence

d'AChE-ColQ au niveau de la JNM. Le perlecan semble donc essentiel pour la localisation synaptique de l'AChE. Dans le SJS, ce déficit en AChE pourrait mener à un accrochage multiple de l'ACh sur ses récepteurs pré- et post-synaptiques, menant à stimulation répétitive du muscle suite à un influx nerveux unique, et expliquant alors l'hyperactivité musculaire observée. Néanmoins, un déficit en AChE a déjà été décrit dans un type de syndrome myasthénique congénital.

IIIF. Les syndromes myasthéniques congénitaux (SMC)

Les SMCs constituent un groupe de maladies génétiquement hétérogène (Engel *et al.* 2003; Engel and Sine 2005). Ils sont provoqués par une altération de la transmission synaptique et sont caractérisés par une faiblesse musculaire, avec une fatigabilité accentuée à l'effort. L'hypotonie est généralisée et atteint les muscles des yeux (ptosis), de la tête et des membres. Une diminution des réponses des potentiels d'unités motrices à une stimulation basse fréquence à l'EMG.

Une première classification (type I à III) avait été proposée en 1996 sur des critères de phénotype clinique et de transmission génétique (Middleton 1996), mais avec la découverte des différents gènes impliqués, une seconde classification selon le site où se situe l'anomalie (pré-synaptique, synaptique ou post-synaptique) est aujourd'hui beaucoup plus largement utilisée (Engel *et al.* 2003).

IIIF1. Syndrome myasthénique pré-synaptique

Le SMC présynaptique (ou type Ia) est dû à des mutations perte de fonctions récessives dans le gène codant pour la choline acétyltransférase (ChaT) (Ohno *et al.* 2001). ChaT est une enzyme synthétisée par les neurones et transportée dans le nerf terminal, où elle catalyse la réaction de synthèse d'ACh à partir de choline et d'acetylCo-enzyme A. Le gène est constitué de 18 exons et code 5 transcrits différents générés par épissage alternatif de la partie 5' (exons 1 à 4). Le premier exon code pour une autre protéine, VaChT (vesicular acetylcholine transporter). Toutes les mutations sont situées dans la partie 3' du gène (exons 6 à 15) et touchent donc la totalité des transcrits produits (Kraner *et al.* 2003; Schmidt *et al.* 2003; Barisic *et al.* 2005). Ce type de SMC se distingue par des épisodes soudains de détresse respiratoire, menant à des apnées et pouvant nécessiter des intubations et une ventilation artificielle. Les souris délétées pour le gène *Chat* meurent à la naissance, sans doute à cause de l'absence de stimulation du diaphragme. On note en effet chez ces souris une élimination totale de la neurotransmission, une hyperinnervation au moment du contact nerf-muscle chez

l'embryon et une altération de l'ultrastructure de la JNM avec des nerfs terminaux plus petits et moins de plis sous synaptiques (Brandon *et al.* 2003). De façon intéressante, les 15 mutations humaines décrites majoritairement sont des mutations faux-sens (sauf une mutation non-sens et une insertion de deux nucléotides menant à un décalage de lecture hétérozygotes composites) qui modifient l'activité de la ChAT sans l'abolir complètement. Ceci explique le phénotype atténué des patients par rapport aux souris présentant une délétion totale de l'enzyme.

III F2. Syndrome myasthénique synaptique

Le SMC synaptique (type Ic) est autosomique récessif et se caractérise par une absence d'AChE à la JNM, corrélée à une diminution de la taille des JNMs et une densité normale de RACH. A l'EMG, on peut voir une réponse répétée après une stimulation unique, due à une stimulation répétée des RACHs par l'ACh qui n'est plus hydrolysée par l'AChE. L'ultrastructure des JNMs est aussi modifiée avec des nerfs terminaux de petite taille, une dégénération des plis sous-synaptiques et un envahissement de l'espace synaptique par la cellule de Schwann terminale pour limiter le niveau d'ACh présent dans la fente synaptique. Ce type de SMC est causé par des mutations dans le gène *ColQ* (Donger *et al.* 1998; Ohno *et al.* 1998; Ohno *et al.* 1999). On trouve tous les types de mutations (faux-sens, non sens, insertion, délétion, mutation d'excision-épissage), situés dans tous les domaines de cette queue collagénique : les mutations dans le domaine PRAD empêchent la fixation des tétramères d'AChE, les mutations dans le domaine collagénique central empêchent la formation de la triple hélice, et enfin, les mutations dans le domaine C-terminal empêchent la fixation de ColQ sur son récepteur MuSK, et donc la localisation correcte de l'isoforme A12 de l'AChE à la JNM.

III F3. Syndromes myasthéniques post-synaptiques

Les types Id et Ie sont les SMC post-synaptiques avec des mutations dans des gènes codant pour différentes protéines du composant post-synaptique.

III F3a. Altérations des RACHs

Les mutations les plus nombreuses sont présentes dans les différentes sous unités des RACHs. Elles sont divisées en deux groupes. La majorité des mutations identifiées jusqu'à aujourd'hui diminuent l'expression des RACHs. Elles sont de tous types : faux-sens, non sens, insertion/délétion et excision-épissage. On en trouve dans les sous unités α , β (Quiram *et al.*

1999) et δ (Muller *et al.* 2006), qui mènent à un phénotype sévère, mais elles sont majoritairement concentrées dans le gène codant pour la sous unité ε (Engel *et al.* 1996) et dans son promoteur (Nichols *et al.* 1999; Ohno *et al.* 1999). Ces dernières n'entraînent qu'un phénotype mineur et une compensation par la sous unité fœtale γ exprimée de façon résiduelle dans le muscle adulte a été suggérée pour expliquer ce phénotype atténué (Croxen *et al.* 2001). Il existe des modèles de souris avec invalidation de la sous unité RACH ε (Witzemann *et al.* 1996; Missias *et al.* 1997). Elles développent une faiblesse musculaire et ne survivent pas au-delà de trois mois. Leurs JNMs se développent normalement, mais on peut voir une diminution des plis sous synaptiques et des terminaisons nerveuses qui s'étendent au-delà des RACHs. Le temps de décroissance des potentiels de plaque est allongé et les contractions téaniques ne sont pas maintenues, évoquant une altération de la transmission synaptique. Une compensation par l'isoforme fœtale γ se produit, celle-ci étant toujours exprimée chez les mutants à P30, alors qu'elle n'est plus détectable chez les contrôles du même âge.

Le second groupe de mutations touchant les RACHs vont modifier les propriétés cinétiques du canal. Certaines prolongent le courant synaptique en augmentant l'affinité de l'ACh pour son récepteur, le nombre et le temps d'ouverture : ce sont les mutations canal lent (Engel *et al.* 1996). La majorité de ces mutations sont des mutations gain de fonction et sont donc associées à une transmission autosomique dominante, mais une transmission autosomique récessive a également été rapportée. La grande quantité de calcium présent dans le muscle, due aux épisodes prolongés d'activation synaptique, mène à une dégénérescence de l'appareil post synaptique et des plis sous-synaptiques, avec la présence de noyaux apoptotiques et des vacuoles. D'autres mutations autosomique récessives ont l'effet inverse, elles diminuent le nombre et le temps d'ouverture : ce sont les mutations canal rapide. Elles sont ainsi nommées à cause du temps de décroissance très court des réponses synaptiques et entraînent un phénotype modéré.

III F3b. Altérations des canaux sodiques

Les canaux sodiques sensibles au voltage sont constitués de deux sous-unités : α et β . Huit gènes (*SCN1A* à *SCN8A*) codent pour les huit sous-unités α et deux (*SCN1B* et *SCN2B*) pour les sous-unités β . Dans le muscle, on trouve uniquement la sous-unité $\alpha 5$ dans le cœur et le muscle squelettique fœtal, et les sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 1$ dans le muscle squelettique adulte (canal Nav1.4) (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott 1999). La sous-unité α est essentielle pour la

fonction du canal. Elle est composée de quatre domaines (I à IV) hautement similaires contenant six segments (hélices α) transmembranaires (S1 à S6) séparés par des boucles cytoplasmiques ou extracellulaires. En 3 dimensions, les boucles S5-S6 forment le filtre ionique sélectif du pore, les segments S4 riches en arginines et lysines chargés positivement sont responsables de l'ouverture du pore par changement de conformation lors de la dépolarisation, et la boucle cytoplasmique III-IV est impliquée dans l'inactivation du canal. La sous-unité $\beta 1$ joue un rôle dans le contrôle des propriétés électrophysiologiques de la sous-unité α .

A la JNM, au niveau des plis sous-synaptique, les RACHs sont concentrés au niveau des crêtes alors que les canaux sodiques sensibles au voltage Nav1.4 (contenant la sous-unité $\alpha 4$), assurant la dépolarisation de la membrane musculaire, sont concentrés dans le fond des plis (Flucher and Daniels 1989). Des mutations de la sous-unité $\alpha 4$ ont été associées aux myotonies aggravées par le potassium, aux paramyotonies congénitales, et aux paralysies périodiques hyper- et hypokaliémiques (Fontaine *et al.* 1997; Cannon 2006). Récemment, deux mutations de cette sous-unité ont été découvertes chez une patiente atteinte de SMC : c.737C>T (p.Ser246Leu) dans la boucle cytoplasmique IS4-S5 et c.4325T>A (p.Val1442Glu) dans la boucle extracellulaire IIS3-S4, menant à un défaut d'inactivation du canal (Tsujino *et al.* 2003). Le canal reste dans son état inactif et ne peut pas être réactivé, ce qui mène à la faiblesse musculaire présente au niveau des yeux (ptosis), du visage, du tronc et des membres et à des arrêts respiratoires. La structure de la JNM (nerf et plis sous synaptiques), la quantité de RACHs et de canaux sodium, ainsi que l'amplitude et le contenu quantique des potentiels de plaque sont normaux.

III F3c. Altérations de MuSK et Rapsyne

Deux mutations dans le gène codant pour MuSK ont été répertoriées récemment chez une patiente souffrant de SMC : c.2368G>A (Val790Met) et c.220insC (protéine tronquée) (Chevessier *et al.* 2004). Ces mutations affectent la stabilité et la phosphorylation de la protéine, qui ne joue plus son rôle dans l'agrégation des récepteurs. A la JNM, on observe une diminution des marquages MuSK et RACH et du sprouting du nerf terminal.

Des mutations récessives ont également été identifiées dans tous les domaines de la rapsyne ainsi que dans la boîte E de son promoteur (Ohno *et al.* 2002; Ohno and Engel 2003; Ohno *et*

al. 2003). Ces mutations diminuent l'expression ou la stabilité de la protéine, ou empêchent la dimérisation ou l'association avec les RACHs (Cossins *et al.* 2006).

III F3d. Altérations de DOK-7

Des mutations tronquantes, faux-sens et d'excision épissage dans le gène *Dok-7* sont responsables du syndrome myasthénique récessif de type Ib, caractérisé par une faiblesse des muscles du tronc, du cou et des extrémités proximales des membres (Beeson *et al.* 2006; Muller *et al.* 2007; Palace *et al.* 2007). Cette protéine cytoplasmique est composée de différents domaines : un domaine N-terminal contenant les motifs PH (pleckstrin homology) et PTB (phosphotyrosine binding) et un domaine C-terminal contenant un motif SH2 (Src homology 2). Elle est spécifiquement exprimée dans les muscles squelettiques, le diaphragme et le cœur et accumulée au niveau de la JNM. *In vitro*, elle interagit avec MuSK via son domaine PTB et est capable d'induire l'agrégation des RACH. Les souris déficientes pour cette protéine meurent à la naissance. Aucun agrégat de RACHs n'est visible dans les zones où sont normalement situées les JNMs dans le diaphragme. *Dok-7* semble donc nécessaire *in vivo* à la synaptogenèse (Okada *et al.* 2006).

OBJECTIFS DE LA THESE

Le syndrome de Schwartz-Jampel (SJS) est caractérisé par une raideur musculaire associée à une chondrodystrophie. C'est une pathologie connue depuis 45 ans, mais c'est seulement récemment que le gène responsable de cette pathologie a été découvert : il s'agit du gène *HSPG2* codant pour le perlecan, un héparane sulfate protéoglycane de plus de 450kDa présent dans la majorité des membranes basales. Cependant, une autre pathologie, la Dysplasie dissegmentaire de type Silvermann-Handmaker (DDSH), est également due à des mutations perte de fonction du perlecan et mène à un phénotype beaucoup plus sévère. Des études ont alors été menées pour comprendre la relation entre le perlecan et la différence de sévérité entre ces deux pathologies, ainsi que le rôle du perlecan dans le développement des signes cliniques du SJS. Des hypothèses ont été émises, mais sont restées spéculatives. La différence de phénotype entre le SJS et la DDSH semble être basée sur un effet dose du perlecan, avec une corrélation inverse entre le taux de perlecan et la sévérité du phénotype, mais cette hypothèse est basée sur l'analyse d'un nombre faible de patients. D'autre part, le perlecan semble être impliqué dans l'ancrage de l'AChE à la JNM, et un déficit en cet enzyme à la JNM est proposé pour expliquer la raideur musculaire dans le SJS. Néanmoins, cette hypothèse est basée sur des analyses réalisées chez l'embryon, alors que le JNM n'est pas mature à cet âge, et un déficit en AChE a déjà été lié à un type de syndrome myasthénique congénital menant à une faiblesse musculaire.

Au cours de ma thèse, j'ai d'une part participé à l'étude des bases moléculaires du SJS par une recherche de mutations du gène *HSPG2* dans un large échantillon de patients SJS représentant le tiers de la population SJS décrite dans la littérature. D'autre part, j'ai caractérisé un modèle murin viable de cette pathologie, afin d'étudier le système neuromusculaire adulte des mutants pour comprendre les bases physiopathologiques menant à la raideur musculaire dans le SJS.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Article I publié

Le syndrome de Schwartz-Jampel résulte de mutations perte de fonction dans le gène *HSPG2* codant pour le perlecan. Avant cette étude, seulement dix mutations du perlecan avaient été décrites dans le SJS. Trois mutations de *HSPG2* ont également été décrites dans une pathologie allélique au SJS, la DDSH. Néanmoins, la gravité phénotypique de ces deux pathologies est très différente : Le SJS est caractérisé par une raideur musculaire et des déformations ostéoarticulaires qui mènent à un handicap fonctionnel sans remettre en cause la vie du patient alors que la DDSH est caractérisée par une ostéochondrodysplasie très sévère menant à la mort du patient dans les premiers jours de vie. Arikawa-Hirasawa *et al.* ont proposé que cette différence de sévérité soit due à un effet de dose : la DDSH serait due à une absence totale de perlecan sécrété, alors que dans le SJS, un niveau résiduel de perlecan fonctionnel subsisterait et permettrait un sauvetage du phénotype (Arikawa-Hirasawa *et al.* 2002). Cependant, cette hypothèse est basée sur un nombre faible de mutations et de patients (dix mutations chez huit patients dans le SJS et trois mutations chez deux patients dans la DDSH), et les bases moléculaires devaient donc être mieux définies. Nous avons donc exploré plus en avant cette hypothèse en recherchant les mutations *HSPG2* présentes dans une large cohorte de patients SJS et en étudiant les conséquences de certaines de ces mutations sur l'expression du perlecan grâce à des cellules (lymphoblastes ou fibroblastes) de patients établies en culture.

Dans cette étude, nous avons effectué une recherche de mutations *HSPG2* chez 35 patients (23 familles), représentant environ un tiers des cas de SJS. Nous avons identifié 22 nouvelles mutations. Ces mutations sont de tout type : non-sens (9%), faux-sens (23%), excision - épissage (27%) et délétions / insertions nucléotidiques (41%). Elles sont réparties tout au long du gène, bien que le domaine I ne soit pas touché et qu'un point chaud de mutations faux-sens soit observé dans les exons 35 à 38 codant pour l'extrémité C-terminale du domaine III. Plus de la moitié des mutations se trouve dans le domaine IV, mais cette observation est sans doute plus liée à la taille du domaine plutôt qu'à une localisation préférentielle. La majorité des mutations (82%) est unique à chaque famille et aucun effet fondateur n'a été démontré.

Toutefois, un profil d'expression différent a été observé entre les mutations faux-sens et les mutations tronquantes. En effet, le taux d'ARNm quantifié par QRT-PCR est diminué dans

les cellules issues de 2 patients possédant une mutation tronquante comparé à un contrôle, alors qu'il est inchangé dans les cellules issues de 2 patients possédant une mutation faux-sens. Des immunomarquages sur fibroblastes issus de biopsies de peau de ces 4 patients ont montré un déficit en perlecan sécrété dans la matrice extracellulaire. Un taux résiduel de perlecan apparemment normal était toujours observé, confirmant que les mutations étudiées exerçaient bien un effet hypomorphe. Cependant, un marquage distincts a pu être observé en fonction du type de mutation, avec un marquage intracellulaire visible dans les cellules issues de patients possédant des mutations faux-sens. Il semble donc que deux mécanismes distincts se produisent selon le type mutations : les mutations tronquantes mèneraient à une instabilité de l'ARN alors que les mutations faux-sens mèneraient à une rétention intracellulaire de la protéine. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation génotype-phénotype. Cette différence de comportement des protéines mutées ne semble donc pas s'accompagner de phénotypes cliniques distincts.

IA. Article

**Spectrum of *HSPG2* (Perlecan) Mutations in Patients With
Schwartz-Jampel Syndrome**

Stum M, Davoine CS, Vicart S, Guillot-Noel L, Topalogu H, Carod-Artal FJ, Kayserili H,
Hentati F, Merlini L, Urtizbera JA, Hammouda el H, Quan PC, Fontaine B, Nicole S

Human Mutation (2006) 27:497-509

IB. Résultats complémentaires

La première partie de mon travail de thèse a consisté à comprendre les bases moléculaires du SJS. Pour cela, nous avons effectué une recherche de mutations du gène *HSPG2* codant pour le perlecan chez 35 patients, puis nous avons étudié les conséquences fonctionnelles de ces mutations sur l'ARN et la protéine synthétisés par les cellules de patients. L'hypothèse soulevée par Arikawa-hirasawa *et al.* est qu'un effet de dose du perlecan pourrait intervenir dans la différence de phénotype entre la DDSH et le SJS, avec une absence totale versus un taux résiduel de perlecan secrété, respectivement (Arikawa-Hirasawa *et al.* 2002). Nous avons en effet pu vérifier par immunomarquage la présence d'un taux résiduel de perlecan de taille apparemment normale secrété dans la matrice extracellulaire de fibroblastes de patients en culture. J'ai ensuite pu vérifier que cet effet hypomorphe existait bien *in vivo* en réalisant des immunomarquages sur coupes transversales de muscles squelettiques issus de biopsies musculaires de trois patients SJS. L'un était hétérozygote composite pour les mutations p.L1491del et p.R3452Q (patient 16 de l'article I), le second était homozygote pour la mutation faux-sens p.R1478C (patient 15 de l'article I) et le dernier était hétérozygote composite pour la mutation non-sens p.R916X, le second allèle n'étant pas identifié (patient 1 de l'article III en annexe). Trois anticorps reconnaissant le perlecan ont été utilisés : deux anticorps monoclonaux (DI 1/100^e CSI 001-76 Antibody shop et DIII1/100^e 7B5 Zymed) et un anticorps polyclonal (DV, 1/50^e, L-20 Santa Cruz Biotechnology Inc.). Chez le contrôle, on observe un marquage uniforme et intense des membranes basales des fibres musculaires, alors que ce marquage est diminué chez les trois patients (figure 33), suggérant un déficit en perlecan secrété dans les membranes basales musculaires. J'ai ainsi confirmé *in vivo* l'effet hypomorphe des mutations SJS étudiées.

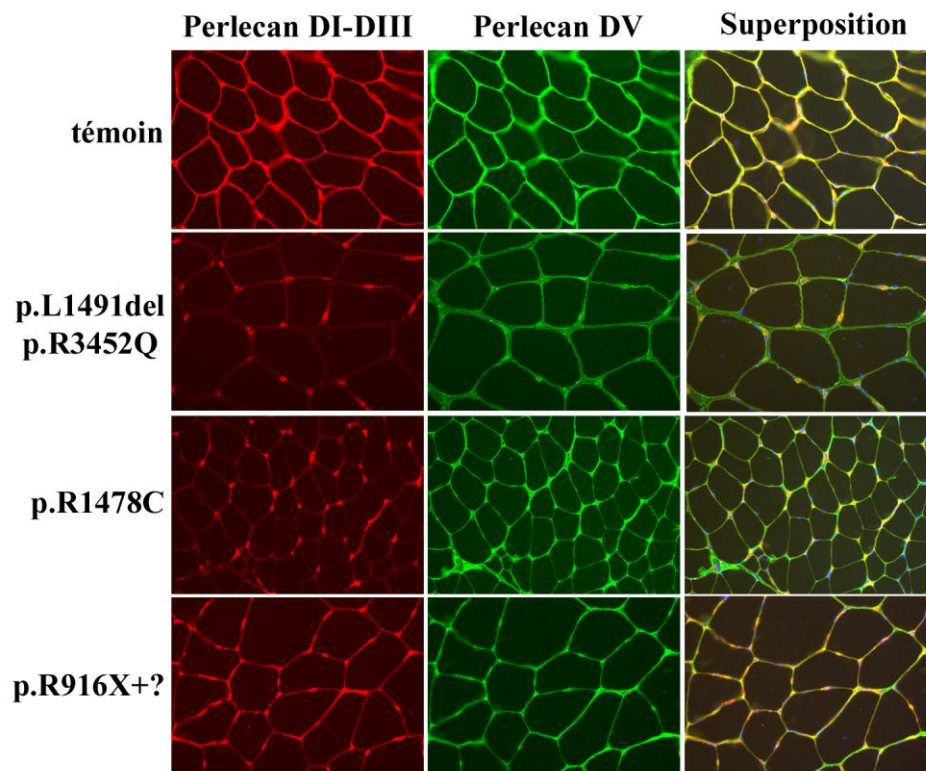


Figure 33 : Immunomarquages anti-perlecan réalisés sur coupes transversales de muscles squelettiques issus de biopsies musculaires de patients SJS. Les mutations des patients sont indiquées. Notez le déficit en perlecan sécrété dans les membranes basales des patients comparé au marquage uniforme et intense du témoin.

IC. Mécanismes responsables du déficit en perlecan

Une mutation est dite hypomorphe quand elle permet la production d'un taux résiduel de protéine partiellement ou complètement fonctionnelle. Nous avons montré que deux processus différents selon le type de mutations étaient à l'origine du déficit en perlecan dans le SJS (figure 34).

IC1. Contrôle qualité pour les mutations faux-sens

Les mutations faux-sens affectant un résidu Cys du domaine III entraînent l'accumulation intracellulaire de la protéine mutée, suggérant qu'elles empêchent la protéine d'acquies une conformation correcte ou d'interagir avec d'autres protéines. Les protéines sécrétées sont normalement assemblées et modifiées dans le réticulum endoplasmique (RE). Un mécanisme appelé le « contrôle qualité » vérifie la conformation de la protéine, et, si elle n'est pas correcte, empêche la sécrétion de cette protéine et la détruit. Ce mécanisme agit via les molécules chaperonnes. Ces protéines chaperonnes ont pour rôle d'assister le repliement de la protéine et de favoriser ses interactions, mais leur rôle principal est la reconnaissance et la destruction des protéines mutées (Outeiro and Tetzlaff 2007). Les molécules chaperonnes sélectionnent de manière spécifique les protéines (les glycoprotéines sont reconnues par la calnexine ou la calréticuline alors que les régions hydrophobes d'autres protéines sont reconnues par la BiP, par exemple), les empêchent de s'agréger dans le RE, les transportent dans le cytosol et maintiennent leur solubilité pour faciliter leur dégradation via la voie de l'ubiquitine et du protéasome (Nishikawa *et al.* 2005). Il arrive parfois que les protéines mutées ne soient pas reconnues par les chaperonnes et échappent au contrôle qualité. Ceci pourrait être à l'origine de la quantité résiduelle de protéine mutée sécrétée chez les patients homozygotes pour ces mutations faux-sens.

Cependant, et de façon problématique, les molécules chaperonnes peuvent dans certains cas contribuer au développement de pathologies, en retenant et détruisant des protéines mutées, qui sont en réalité capables d'acquies une conformation proche de la conformation normale et ainsi d'assumer la majorité de leurs fonctions biologiques (Welch 2004). Dans le SJS, nous avons pu observer sur les fibroblastes de patients porteurs d'une mutation faux-sens affectant un résidu Cys du domaine III une rétention du perlecan à l'intérieur de la cellule, probablement via ce contrôle qualité. Néanmoins, un taux résiduel de perlecan est observé dans la matrice, suggérant qu'une partie des protéines échappent au contrôle qualité, et sont

au moins partiellement fonctionnelles puisqu'elles permettent le sauvetage du phénotype. Une possibilité thérapeutique serait alors d'inhiber ce contrôle qualité pour permettre la sécrétion d'une quantité beaucoup plus importante de perlecan et améliorer ainsi le phénotype des patients. Cette possibilité a déjà été envisagée dans d'autres pathologies telle que la mucoviscidose, grâce à l'utilisation de chaperonnes chimiques et pharmaceutiques, mais ces tests restent pour le moment effectués *in vitro* (Brown *et al.* 1996).

IC2. NMD pour les mutations tronquantes

Les mutations tronquantes sont des mutations qui aboutissent à un codon stop prématuré (CSP), soit à cause d'un décalage du cadre de lecture introduit par des mutations d'excision-épissage ou par des insertions et délétions nucléotidiques, soit directement à cause d'une mutation non-sens. La cellule a mis en place un mécanisme particulier, le NMD (nonsense-mediated decay) qui permet d'éliminer les ARN possédant un CSP, aussi bien dans un contexte normal que pathologique (Holbrook *et al.* 2004). Il agit d'une part dans le contrôle de l'expression normale des protéines telles que les immunoglobulines des lymphocytes B et les récepteurs des lymphocytes T, dont les gènes subissent des réarrangements extensifs pour produire la variabilité nécessaire au système immunitaire pour répondre à une large variété d'antigènes (Li and Wilkinson 1998). Le NMD agit pour sélectionner seulement les gènes réarrangés avec succès. D'autre part, dans certaines pathologies telles que la β -thalassémie, la protéine mutée contenant un CSP est tronquée et exerce un effet dominant négatif (en s'associant avec la protéine normale, elle empêche le complexe de fonctionner). Le NMD permet de dégrader les ARNs codant pour cette protéine mutée et protège ainsi les hétérozygotes contre le développement de la pathologie (Kugler *et al.* 1995). Le mécanisme du NMD est encore largement inconnu, mais il repose dans la reconnaissance différentielle des CSP et des codons stop normaux lors de l'excision-épissage (Maquat 2004; Maquat 2005). Cette reconnaissance est assurée par un complexe de facteurs (CJE) qui s'assemblent sur le ribosome 24 nucléotides avant la jonction entre les exons (JEE). L'importance de ces JEE est cruciale : le CSP n'est reconnu que s'il se situe 50 nucléotides avant une JEE, et les CSP situés dans le dernier exon ne sont donc pas reconnus. Le NMD agit seulement sur les ARNm nouvellement formés et se produit au moment de l'exportation de l'ARN vers le cytoplasme. Même si le NMD s'effectue dans les deux sens (5' vers 3' et 3' vers 5'), il semble que les CSP en 5' soient moins sensibles au NMD que les CSP en 3'.

Néanmoins, le NMD, comme le contrôle qualité, peut éliminer des ARNm codant pour des protéines partiellement fonctionnelles. Certaines thérapies agissant pour inhiber le NMD sont possibles et ont déjà été testées pour différentes pathologies *in vivo* et *in vitro* (Kuzmiak and Maquat 2006) : antibiotique (puromycine, gentamicine), molécules qui inhibent certaines protéines du CJE (caféine, wortmannine)...etc... Dans le SJS, 82% des mutations nouvellement décrites dans cette étude mènent ou pourraient mener à des CSP. Dans les fibroblastes en culture de 2 patients portant des mutations tronquantes, le taux d'ARN présent est diminué par rapport au contrôle. La puromycine appliquée sur ces cellules a eu pour effet d'augmenter le niveau d'ARN, suggérant que le NMD existe dans le SJS et est responsable de la diminution du taux d'ARN observée. Dès lors, des tests *in vitro* et *in vivo* pourraient être envisagés pour déterminer si l'application, la prise ou l'injection d'antibiotiques de ce type pourraient avoir un effet positif sur la quantité d'ARN et de protéine, et donc sur l'amélioration du phénotype des patients. Cette possibilité a été testée *in vivo* par traitement à la gentamicine sur des patients atteints de mucoviscidose possédant des mutations entraînant un CSP dans le gène codant pour le canal chlore CFTR (Sermet-Gaudelus *et al.* 2007) et sur des souris *mdx* modèles de la myopathie de Duchenne possédant des mutations dans le gène codant pour la dystrophine (Barton-Davis *et al.* 1999), entraînant une amélioration du phénotype. Cependant, les traitements sont de courte durée car les effets secondaires de la gentamicine sont importants, tels que défaillance rénale et surdité, et une recherche de nouvelles drogues sans effet secondaire est actuellement menée. Un nouvel agent chimique, PTC-124, a été testé sur les souris *mdx* et permet la production et la sécrétion d'un taux de dystrophine suffisant pour améliorer le phénotype de ces souris, sans effet secondaire (Welch *et al.* 2007). Ceci s'avère donc prometteur pour l'ensemble des pathologies dans lesquelles le NMD intervient.

Nous avons montré que des événements d'excision-épissage alternatifs se produisaient, permettant d'ignorer la présence de mutations tronquantes et rendant ainsi ces mutations hypomorphes. Ce mécanisme est à la base de la technique thérapeutique du « saut d'exon » qui utilise des oligonucléotides anti-sens pour ignorer un site d'excision-épissage et ainsi éliminer l'exon contenant le CSP. Cette technique est testée chez les souris *mdx* modèles de la dystrophie de Duchenne et permet la production de dystrophine fonctionnelle, seulement tronquée de quelques acides aminés (Mann *et al.* 2001; Lu *et al.* 2005).

II. Article II en préparation

Après avoir étudié et mieux compris les bases moléculaires du SJS, nous voulions comprendre les bases physiopathologiques menant au phénotype neuromusculaire dans le SJS. Le perlecan semble jouer un rôle crucial dans l'ancrage de l'AChE au niveau de la JNM. L'hypothèse soulevée par Arikawa *et al.* est qu'un déficit en perlecan entraînerait un déficit en AChE à la JNM, menant à l'hyperactivité musculaire (Arikawa-Hirasawa *et al.* 2002). Néanmoins, les études sur lesquelles sont basées cette hypothèse ont été réalisées chez l'embryon alors que la JNM n'est pas encore mature à ce stade. De plus, la protéine MuSK joue également un rôle dans l'ancrage de l'AChE à la membrane post-synaptique et pourrait pallier le déficit en perlecan. D'autre part, le déficit en perlecan est seulement partiel dans le SJS et pourrait ne pas être suffisant pour entraîner un déficit en AChE avec un effet pathologique. Enfin, la myasthénie de type Ic a déjà été associée à un déficit en AChE à la JNM et mène à une faiblesse musculaire, contrairement à l'hyperactivité observée dans le SJS. Pour nous permettre de répondre à ces questions, nous avons donc développé et caractérisé un modèle murin du SJS en introduisant dans le génome de la souris la mutation p.Cys1532Tyr et une cassette de sélection PGK-Néo. Cette mutation a été retrouvée à l'état homozygote chez deux patients SJS consanguins (Nicole *et al.* 2000) et touche un résidu cystéine conservé au cours de l'évolution et important dans la structure de la protéine. Nous avons montré dans l'étude précédente que cette mutation était à l'origine d'une rétention intracellulaire de la protéine mutée chez l'Homme, et ne présentait pas d'anomalie transcriptionnelle visible par RT-PCR qualitative et quantitative.

Nous avons obtenu des mutants homozygotes viables et fertiles, présentant un phénotype neuromusculaire progressif avec des anomalies locomotrices. Une hyperactivité a été observée par électromyogramme chez les animaux âgés, avec des tracés évoquant les décharges pseudomyotoniques observées chez les patients SJS. Le taux de perlecan sécrété était réduit chez ces mutants aussi bien dans la matrice extracellulaire de fibroblastes en culture que dans les membranes basales musculaires sur coupes de muscles squelettiques. Les analyses morphologiques des muscles squelettiques ont montré des remaniements cellulaires suggérant des processus neurogéniques, tels que des regroupements de fibres à noyaux centraux et la prédominance de fibres de type I avec le regroupement des fibres de type II. L'analyse morphologique de la JNM a montré des remaniements importants avec une perte de la forme typique en bretzel, un fort déficit en AChE-ColQ, et une dénervation partielle. Ces anomalies étaient visibles dès l'âge de deux mois. Les analyses électrophysiologiques sur préparation nerf-

muscle *ex vivo* n'ont pas révélé d'hyperactivité (absence de PPMs spontanés ou répétitifs après une stimulation nerveuse unique), bien qu'un effet fonctionnel du déficit en AChE ait été observé, avec une prolongation du temps de décroissance des PPMMs et PPMs. Ces résultats confirment donc qu'il existe bien un déficit en AChE chez l'adulte quand le perlecan est déficitaire. Cependant, ce déficit semble être insuffisant pour entraîner des anomalies majeures de la transmission synaptique.

**Acetylcholinesterase deficiency with neuromuscular
junction remodelling in a knock-in mouse model of
Schwartz-Jampel syndrome**

Stum M, Girard E, Bernard V, Bangratz M, Davoine CS, Tabti N, Willer JC, Fontaine B,
Molgò J, Krejci E, Nicole S

En préparation

IIB. Résultats complémentaires: lignée *Hspg2*^{C1532Y}

L'invalidation totale du perlecan chez la souris étant létale *in utero*, il était nécessaire de générer un modèle viable pour pouvoir étudier le système neuromusculaire et la JNM chez l'adulte. Une invalidation conditionnelle dans le temps ou dans l'espace aurait pu être réalisée, mais la longue demie-vie du perlecan ainsi que la diminution de son expression dans le muscle adulte alors qu'il reste exprimé par les cellules endothéliales et les fibroblastes chez l'adulte aurait rendu la génération d'un tel modèle hasardeuse. Nous avons donc choisi de générer un modèle knock-in, en insérant la seule mutation faux-sens connue à cette époque, p.Cys1532Tyr. Nous avons de plus étudié les mutants possédant toujours la cassette de sélection PGK-Néo insérée dans le vecteur de recombinaison homologue. En effet, cette cassette a pour effet de diminuer l'expression du gène dans lequel elle est insérée (Nagy *et al.* 1998) pouvant alors renforcer l'effet de la mutation et reproduire l'effet hypomorphe des mutations SJS.

En janvier 2007, un modèle murin du SJS similaire au notre mais généré de façon indépendante a été publié (Rodgers *et al.* 2007). Les auteurs s'intéressaient à la chondrodystrophie présente dans le SJS et la publication détaillait le phénotype osseux des mutants possédant la mutation p.Cys1532Tyr et la cassette PGK-Néo, mais également celui des mutants où cette cassette avait été délétée et ne possédant donc que la mutation faux-sens. Dans ce dernier modèle, seules de subtiles anomalies des zones prolifératives et hypertrophiques de la plaque de croissance sont visibles. Les auteurs concluent à un phénotype normal et soulèvent la question de la réelle implication de la mutation p.Cys1532Tyr en tant que mutation faux-sens dans le SJS, suggérant qu'elle exerce en fait un effet sur l'excision-épissage du gène.

IIB1. Phénotype et génétique

Dans notre lignée de souris, la cassette de sélection PGK-Néo est flanquée de deux sites loxP, et peut être délétée par croisement avec des souris exprimant la CRE recombinase de façon ubiquitaire. Nous avons donc également généré une lignée de souris possédant seulement la mutation p.Cys1532Tyr et nous avons exploré le phénotype neuromusculaire des mutants obtenus (*Hspg2*^{C1532Y/C1532Y}) (figure 35).

L'analyse phénotypique des mutants des deux lignées a montré que le phénotype était plus sévère chez les *Hspg2*^{C1532YNeo/C1532YNeo} que chez les *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y}. En effet, au même âge (5 à 7 mois, âge où les signes phénotypiques deviennent plus flagrants), 31% des

Hspg2^{C1532Y^{Neo}/C1532Y^{Neo}} ont commencé à développer un phénotype musculaire avec des yeux moins saillants, une ré-ouverture des yeux difficile et des contractures occasionnelles des pattes arrières, et 54% montrent un phénotype sévère avec des yeux constamment fermés et des contractures longues et fréquentes des pattes arrières. Seuls 54% des *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y} au même âge ont commencé à développer un phénotype léger, et aucun ne montrent de signes sévères (n=13 pour chaque génotype, P=0,007, test du Chi², Sigma Stat).

| Phénotype entre 5 et 7 mois | <i>Hspg2</i> ^{C1532Y^{Neo}/C1532Y^{Neo}} | <i>Hspg2</i> ^{C1532Y/C1532Y} |
|--|---|---------------------------------------|
| normal | 15,38% | 46,15% |
| yeux moins saillants contractures occasionnelles | 30,77% | 53,85% |
| yeux fermés, voire infectés contractures longues et fréquentes | 53,85% | 0 |

IIB2. Expression du perlecan

Sur fibroblastes en culture et sur coupes de muscle squelettiques issus des mutants des deux lignées, des immunomarquages ont été réalisés avec des anticorps polyclonaux reconnaissant le perlecan (DI et DV, 1/50^e, dons du Prof. Timpl) et la laminine $\alpha 2$ (1/500^e clone 4H8-2, Sigma) (figure 36). Un déficit en perlecan secrété dans la matrice extracellulaire et les membranes basales musculaires ont été observés, bien que moins marqués que chez les mutants *Hspg2*^{C1532Y^{Neo}/C1532Y^{Neo}}. Sur les fibroblastes en culture, un marquage à l'intérieur de la cellule est observé, avec l'emplacement des noyaux laissé libre, suggérant fortement une rétention intracellulaire de la protéine mutée. Sur coupes transversales, on peut voir un marquage sous forme de points, traduisant probablement la rétention de la protéine à l'intérieur des cellules mononucléées exprimant le perlecan.

Le taux d'ARNm dans les muscles squelettiques de souris des deux lignées a ensuite été quantifié par RT-PCR quantitative avec une sonde perlecan. Une diminution du taux d'ARNm perlecan est observée chez les mutants *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y} par rapport au sauvage et aux mutants *Hspg2*^{C1532Y^{Neo}/C1532Y^{Neo}} (figure 37). Le taux d'ARNm a ensuite été quantifié en nous plaçant chez des souris hétérozygotes pour nous affranchir de toute modification secondaire de l'expression du perlecan que l'altération du muscle squelettique observée pourrait apporter. L'ARN sauvage et l'ARN mutant ont pu être distingués grâce à une enzyme de restriction (TseI) dont un site de restriction est supprimé par la mutation. L'intensité

relative de l'ARN muté sur l'ARN sauvage a ensuite été quantifiée après migration sur gel d'agarose (Image J version 1.37). J'ai ainsi montré que le taux relatif d'ARN mutant était environ 3 fois plus faible chez les *Hspg2*^{C1532Y^{Neo/+}} que chez les *Hspg2*^{C1532Y/+} (P=0,002, test de Mann-Whitney, Sigma Stat), probablement dû à l'effet de la cassette Néo.

IIB3. Phénotype musculaire

Par coloration Hématoxyline/Eosine sur coupes transversales de muscles squelettiques, des anomalies morphologiques similaires à celles des mutants *Hspg2*^{C1532Y^{Neo}/C1532Y^{Neo}} ont été observées chez les mutants *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y} (figure 38). Ces anomalies ne sont présentes à deux mois chez les *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y}, contrairement aux *Hspg2*^{C1532Y^{Neo}/C1532Y^{Neo}}. Elles sont bien présentes à six mois, mais sont moins nombreuses que chez les *Hspg2*^{C1532Y^{Neo}/C1532Y^{Neo}}. La coloration ATPase a révélé un profil normal du nombre et des types de fibres dans le soléaire. L'étude de la JNM sur fibres musculaires dilacérées a montré une structure anormale des JNMs avec perte de la forme typique en bretzel, et également un fort déficit en AChE dès l'âge d'un mois (figure 39).

Ces résultats, bien qu'incomplets à ce jour, aident à conclure sur deux points importants. D'une part, les mutants *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y} ne possédant que la mutation faux-sens développent un phénotype similaire aux mutants *Hspg2*^{C1532Y^{Neo}/C1532Y^{Neo}}, suggérant que cette mutation faux-sens a bien un effet à elle seule. D'autre part, les mutants *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y} semblent atteints plus légèrement que les mutants *Hspg2*^{C1532Y^{Neo}/C1532Y^{Neo}}, ce qui pourrait résulter d'un effet de dose comme chez l'Homme.

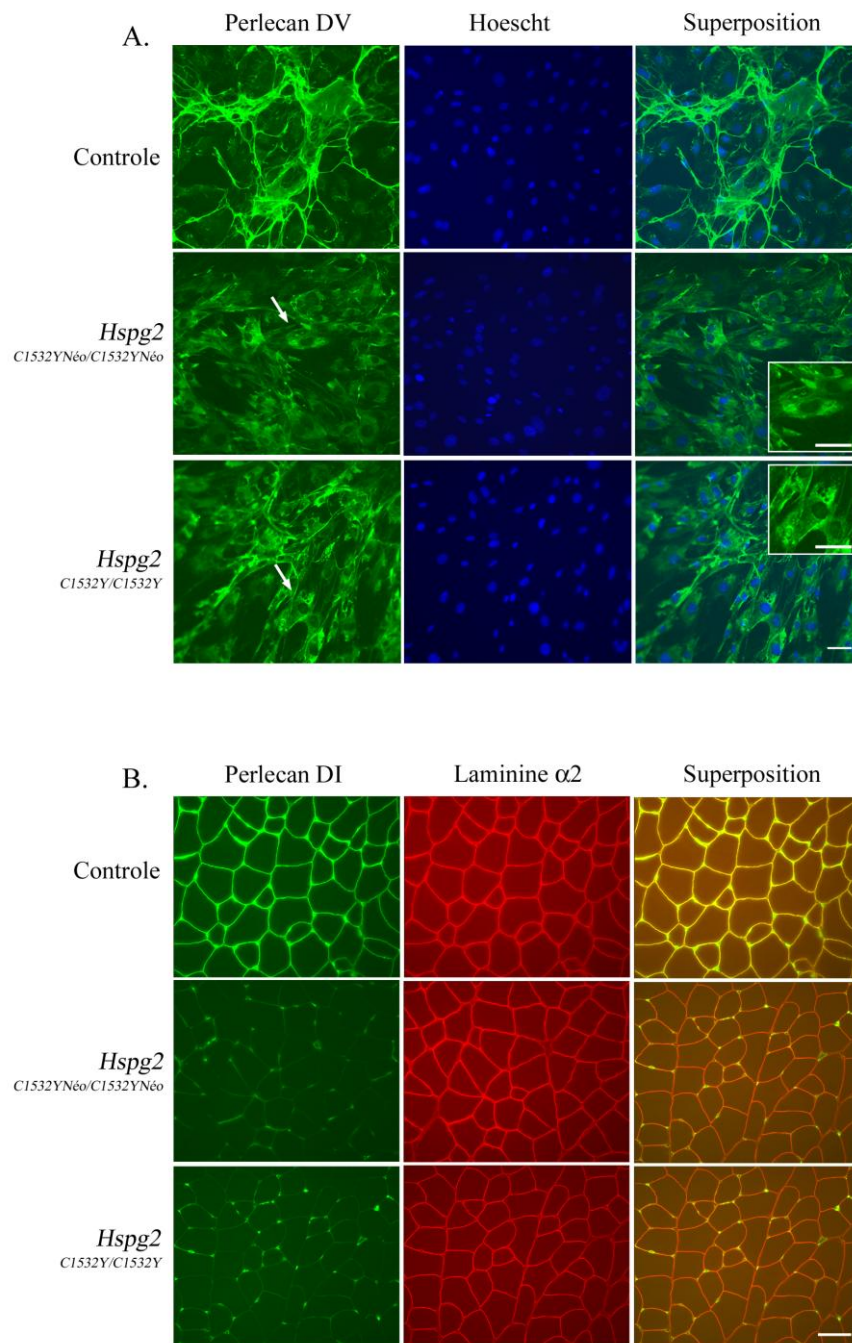


Figure 36 : (A) Immunomarquage perlecan sur fibroblastes en culture issus de biopsies de peau de souris sauvages (contrôle) ou mutantes. Notez la rétention intracellulaire et le taux résiduel de perlecan sécrété dans la matrice extracellulaire plus important chez les mutants *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y} comparé aux mutants *Hspg2*^{C1532YNeo/C1532YNeo}, bien que la densité cellulaire soit la même (noyaux marqués par le hoescht). (B) Immunomarquages perlecan sur coupes transversales de gastrocnémien de souris sauvages ou mutantes âgées de deux mois. Notez le taux résiduel de perlecan sécrété dans les membranes basales plus important chez les mutants *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y} alors que le marquage laminine α2 montre une membrane basale normale. Les points visibles sur le marquage correspondent probablement à la rétention intracellulaire dans les cellules mononucléées exprimant le perlecan. Barres d'échelle = 50µm.

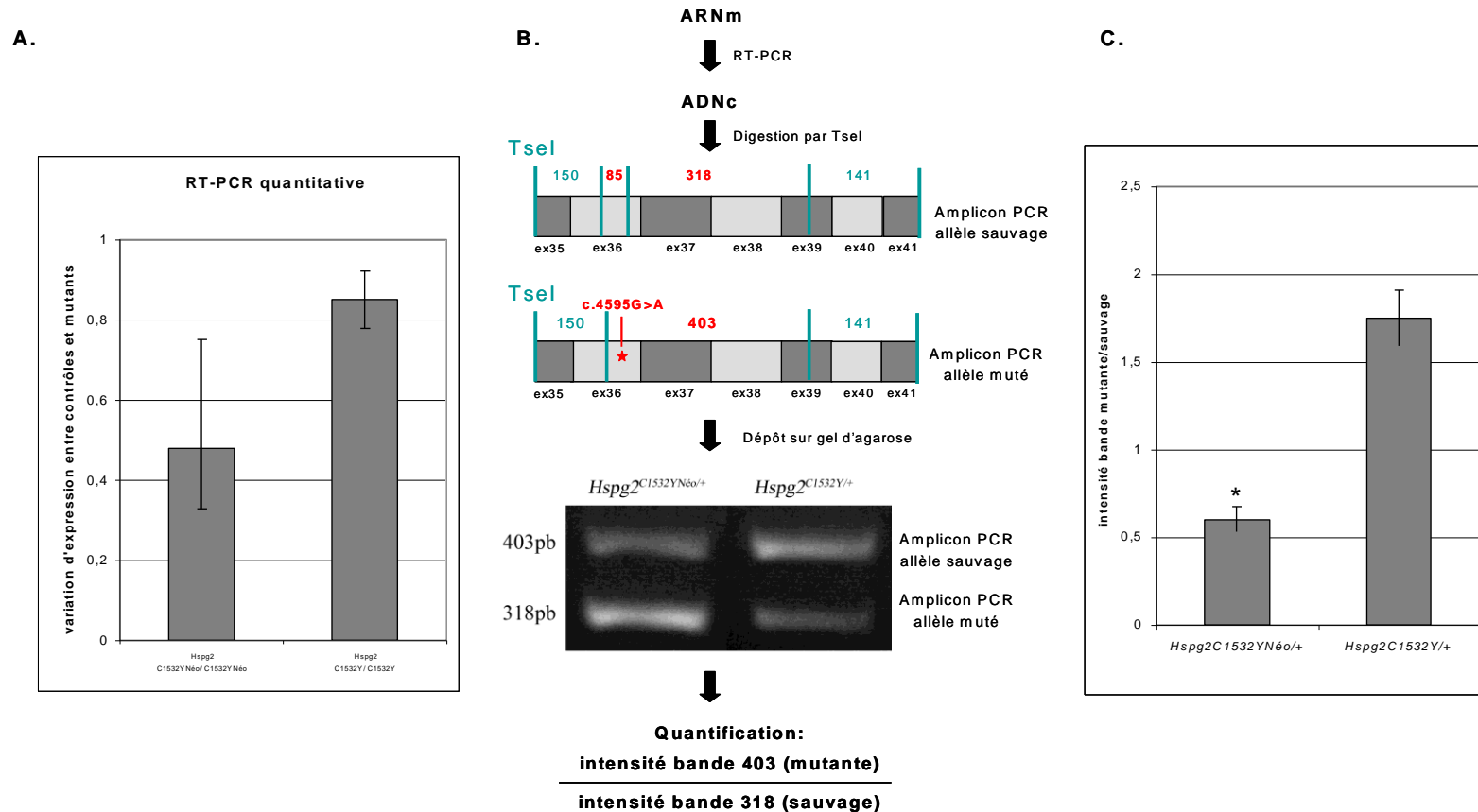


Figure 37 : Analyse des ARNs dans les deux lignées. (A) La RT-PCR quantitative sur ARNm extraits de muscles squelettiques montre une diminution du taux de transcrits chez les mutants homozygotes $Hspg2^{C1532YNeo/C1532YNeo}$ par rapport au contrôle et au $Hspg2^{C1532Y/C1532Y}$. (B) Chez les hétérozygotes des deux lignées, après RT-PCR avec des amorces situées dans les exons 35 et 41, les amplicons sont digérés avec l'enzyme de restriction TseI, qui permet de distinguer l'allèle mutant de l'allèle sauvage. La quantité de produit PCR est ensuite évaluée par quantification de l'intensité des bandes sur gel d'agarose. (C) On peut noter que le taux relatif de produit PCR mutant est environ 3 fois plus faible chez les $Hspg2^{C1532YNeo/+}$ que chez les $Hspg2^{C1532Y/+}$. Les SEM sont représentées.

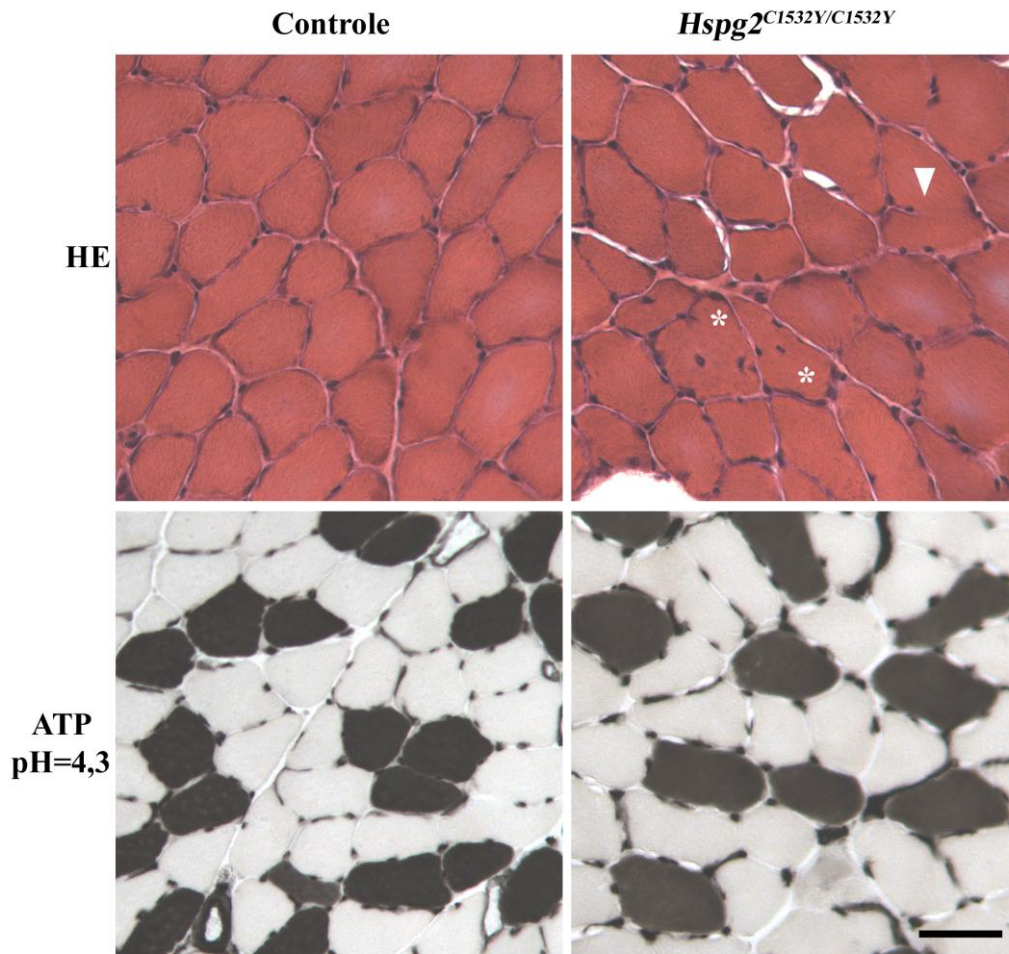


Figure 38 : Coloration hématoxyline et éosine et ATPase (pH=4,3) sur soupes transversales de soléaire de souris contrôle et mutante *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y} à six mois. Les modifications morphologiques sont mineures chez ce mutant, mais on peut noter la présence de fibres à noyaux centraux (astérisques) et de splitting (flèche). Le profil ATPase est normal. Barre d'échelle = 50µm.

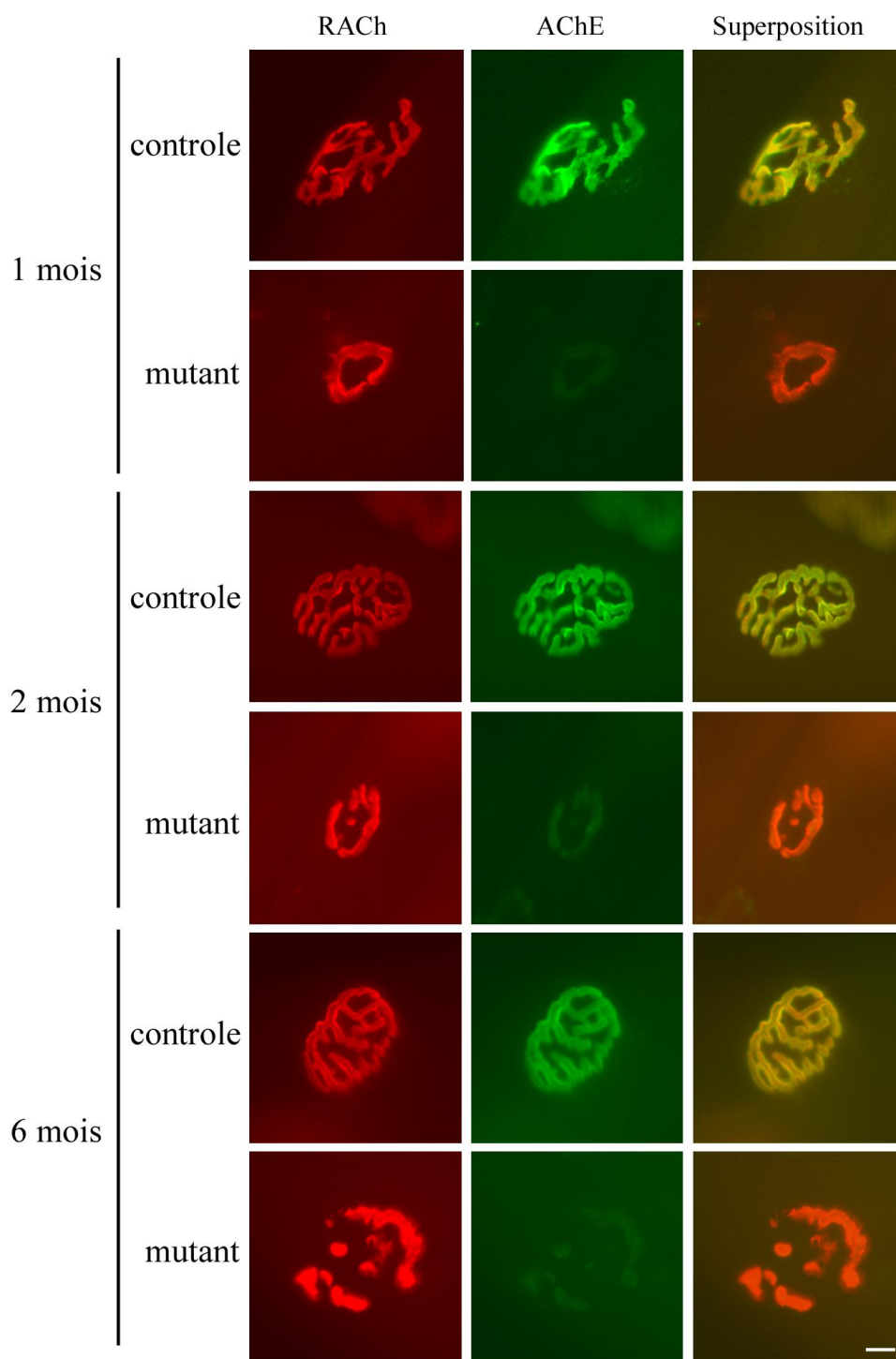


Figure 39 : Marquage des jonctions neuromusculaires sur *extensor digitorum longus* (EDL) dilacéré des récepteurs à l'acétylcholine (RACH) par l' α -bungarotoxine couplée à la rhodamine et de l'acétylcholinestérase (AChE) par la fasciculine couplée au FITC, chez des animaux sauvages (contrôle) et homozygotes mutants *Hspg2*^{C1532Y/C1532Y} (mutant) à 1, 2 et 6 mois, sous microscopie conventionnelle. Notez la structure anormale des JNMs et le fort déficit en AChE chez les mutants comparé au contrôle. Barre d'échelle = 10 μ m.

IIC. Perspectives

Une conclusion importante suggérée par ce travail est que le déficit en AChE seul ne mène pas à l'hyperactivité musculaire via un effet direct sur le composant post-synaptique et que d'autres modifications seraient requises pour mener à l'hyperactivité dans le SJS. L'analyse de la JNM sur une biopsie neuromusculaire chez un patient SJS a montré des résultats similaires à ceux obtenus chez les souris mutantes. La structure de la JNM est modifiée avec des bordures des gouttières post-synaptiques peu définies. Le déficit en AChE a été démontré fonctionnellement (Koelle) et moléculairement (par immunofluorescence). Le marquage du nerf terminal a montré des branches terminales plus fines et moins nombreuses, avec des agrégats de RACHs isolés, signes d'évènements de dénervation-réinnervation (article III en préparation, annexe). Ces modifications sont donc bien caractéristiques de la pathologie. L'analyse électromyographique de deux patients SJS chez lesquels des mutations d'*HSPG2* et un déficit en perlecan ont été prouvés a montré des salves pseudomyotoniques de fréquence et d'amplitude constante. Cependant, les caractéristiques électrophysiologiques d'un déficit en AChE, telles que des réponses répétitives après un seul stimulus nerveux ou des réponses décroissantes après une stimulation nerveuse répétitive, n'ont été observées chez aucun des deux patients, suggérant que le déficit en AChE ne mène pas directement à des conséquences fonctionnelles post-synaptique. L'analyse détaillée des salves pseudomyotoniques a suggéré qu'elles pouvaient avoir une origine pré-synaptique.

D'autres hypothèses doivent donc être considérées et nous suggérons que l'association du déficit en AChE, d'une immaturité de la JNM et de défauts du nerf pourrait exercer un effet synergique à l'origine de l'hyperactivité neuromusculaire. Notamment, des changements pré-synaptiques sont envisageables.

La laminine $\beta 2$ interagit avec la sous-unité α des canaux calcium présynaptiques de type P/Q via son domaine Leu-Arg-Glu pour stabiliser les zones actives dans le nerf terminal (Nishimune *et al.* 2004). Cette interaction serait un message d'arrêt de la croissance des motoneurones et favoriserait la différenciation pré-synaptique. Le perlecan contient de telles séquences Leu-Arg-Glu dans son domaine V (deux chez l'Homme, une seule chez la souris). Une interaction similaire du perlecan avec les canaux calciques peut donc être imaginée. Le déficit en perlecan pourrait alors participer à une perturbation de la croissance axonale et à une désorganisation des zones actives. De même, une interaction entre une protéine de la matrice extracellulaire, la tenascine-R et les sous-unités β des canaux sodiques a été

démontrée dans le système nerveux central (Xiao *et al.* 1999). Cette interaction facilite la guidance axonale en inhibant la croissance des neurites. L'interaction entre des canaux et des protéines de la matrice pour réguler la croissance neuronale semble donc être un mécanisme répandu dans le système nerveux.

D'autre part, le phénotype des souris mutantes pour les laminines $\alpha 2$ et $\alpha 4$, qui rétractent leurs pattes arrières quand elles sont suspendues par la queue, est dû à une neuropathie périphérique. Cette neuropathie est causée par un défaut de myélinisation des axones périphériques, dû à une diminution du nombre de cellules de Schwann (Yang *et al.* 2005). Les laminines $\alpha 2$ et $\alpha 4$ semblent donc stimuler la prolifération et la migration des cellules de Schwann, processus nécessaire à la myélinisation, par un effet direct et non par la formation d'une membrane basale. Le mécanisme moléculaire impliqué serait une interaction des laminines avec les intégrines, avec une spécificité d'isoformes d'intégrine pour chacune des laminines. Le phénotype de nos mutants perlecan est proche de celui de ces souris invalidés pour les laminines $\alpha 2$ et $\alpha 4$. De plus, le perlecan interagit avec plusieurs chaînes d'intégrines ($\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 2$, $\alpha 5$), et un rôle similaire à celui des laminines pour le perlecan peut donc être suggéré. La présence d'anomalies dans les axones du nerf moteur (épaisseur et nombre de couches de myéline, diamètre des axones) qui pourraient mener à une souffrance axonale dans notre modèle murin, à l'origine de l'instabilité de l'innervation observée, doit être déterminée. Le modèle murin que j'ai caractérisé reproduit donc les bases moléculaires et phénotypiques du SJS, et sera alors un outil utile pour tester cette hypothèse et étudier plus en avant la physiopathologie du SJS.

CONCLUSION

L'ensemble de mon travail de thèse nous a permis de définir avec plus de précision les bases moléculaires et physiopathologiques menant au SJS. Le SJS est dû à des mutations hypomorphes. Nous avons montré que des événements d'excision-épissage sont pour certaines mutations responsables de la production et la sécrétion d'un taux résiduel de perlecan fonctionnel. Le déficit en perlecan résulte de deux mécanismes distincts selon que la mutation est tronquante ou faux-sens. Cependant, aucune corrélation génotype phénotype n'a pu être déterminée. Cette caractérisation moléculaire des mutations du gène *HSPG2* dans le SJS permettent non seulement de mieux appréhender le comportement de la protéine mutée, mais aussi d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques pharmacologiques, pour cette pathologie multi-systémique qui rend difficile la thérapie génétique ou cellulaire.

Le modèle murin que nous avons réalisé en reproduisant une mutation faux-sens SJS (Cys1532Tyr) chez la souris reproduit les bases moléculaires et phénotypiques du SJS, avec un déficit en perlecan et une raideur musculaire, en faisant un très bon modèle d'étude de la pathologie. Ce modèle a révélé des anomalies de la JNM, avec une perte de forme typique en bretzel et un fort déficit en AChE-CoIQ à la JNM, mais également des défauts pré-synaptiques, avec une dénervation partielle. Ces résultats suggèrent fortement que le déficit en AChE n'est pas le seul responsable dans l'hyperactivité musculaire, mais qu'un effet synergique de ce déficit avec des anomalies pré et post synaptiques agirait pour mener à la raideur musculaire observée. Notre modèle nous permettra de répondre à ces questions, et également de pouvoir tester différentes drogues pouvant mener à l'amélioration du phénotype.

Le perlecan est une protéine complexe à étudier, tant par son expression ubiquitaire et ses nombreuses interactions que par ses différents rôles en tant que protéine de structure ou de corécepteur aux facteurs de croissance. L'analyse des pathologies qui lui sont associées représente donc un challenge important dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques et du rôle fonctionnel du perlecan. Notre modèle représente alors un outil majeur pour ces études.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ouvrages :

Andrew G. Engel and Clara Franzini-Armstrong
Myology, second edition, McGraw-Hill, Inc.

Thèses :

GIRARD Emmanuelle

Altérations génétiques des cholinestérases chez des souris : conséquences morphologiques et fonctionnelles à la jonction neuromusculaire

Th : Neurophysiologie, Museum d'histoire naturelle, 2006

NICOLE Sophie

Vers l'identification du gène responsable de Syndrome de Schwartz-Jampel de type I : cartographies génétique, physique et étude de gènes candidats

Th : Génétique Humaine, Université Paris 6, 1999

Articles de périodiques :

Aberfeld, D. C., L. P. Hinterbuchner and M. Schneider (1965). "Myotonia, dwarfism, diffuse bone disease and unusual ocular and facial abnormalities (a new syndrome)." Brain 88(2): 313-322.

Aberfeld, D. C., T. Namba, M. V. Vye and D. Grob (1970). "Chondrodystrophic myotonia: report of two cases. Myotonia, dwarfism, diffuse bone disease, and unusual ocular and facial abnormalities." Arch Neurol 22(5): 455-462.

Adams, M. E., N. Kramarcy, T. Fukuda, A. G. Engel, R. Sealock and S. C. Froehner (2004). "Structural abnormalities at neuromuscular synapses lacking multiple syntrophin isoforms." J Neurosci 24(46): 10302-10309.

Adams, M. E., N. Kramarcy, S. P. Krall, S. G. Rossi, R. L. Rotundo, R. Sealock and S. C. Froehner (2000). "Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin." J Cell Biol 150(6): 1385-1398.

Aldunate, R., J. C. Casar, E. Brandan and N. C. Inestrosa (2004). "Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase." Brain Res Brain Res Rev 47(1-3): 96-104.

Aleck, K. A., A. Grix, C. Clericuzio, P. Kaplan, G. E. Adomian, R. Lachman and D. L. Rimoin (1987). "Dyssegmental dysplasias: clinical, radiographic, and morphologic evidence of heterogeneity." Am J Med Genet 27(2): 295-312.

Allen, J. M., J. F. Bateman, U. Hansen, R. Wilson, P. Bruckner, R. T. Owens, T. Sasaki, R. Timpl and J. Fitzgerald (2006). "WARP is a novel multimeric component of the

- chondrocyte pericellular matrix that interacts with perlecan." J Biol Chem 281(11): 7341-7349.
- Altiok, N., S. Altiok and J. P. Changeux (1997). "Heregulin-stimulated acetylcholine receptor gene expression in muscle: requirement for MAP kinase and evidence for a parallel inhibitory pathway independent of electrical activity." Embo J 16(4): 717-725.
- Anderson, M. J. and M. W. Cohen (1977). "Nerve-induced and spontaneous redistribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells." J Physiol 268(3): 757-773.
- Arikawa-Hirasawa, E., A. H. Le, I. Nishino, I. Nonaka, N. C. Ho, C. A. Francomano, P. Govindraj, J. R. Hassell, J. M. Devaney, J. Spranger, R. E. Stevenson, S. Iannaccone, M. C. Dalakas and Y. Yamada (2002). "Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia." Am J Hum Genet 70(5): 1368-1375.
- Arikawa-Hirasawa, E., S. G. Rossi, R. L. Rotundo and Y. Yamada (2002). "Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice." Nat Neurosci 5(2): 119-123.
- Arikawa-Hirasawa, E., H. Watanabe, H. Takami, J. R. Hassell and Y. Yamada (1999). "Perlecan is essential for cartilage and cephalic development." Nat Genet 23(3): 354-358.
- Arikawa-Hirasawa, E., W. R. Wilcox, A. H. Le, N. Silverman, P. Govindraj, J. R. Hassell and Y. Yamada (2001). "Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene." Nat Genet 27(4): 431-434.
- Arikawa-Hirasawa, E., W. R. Wilcox and Y. Yamada (2001). "Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type: unexpected role of perlecan in cartilage development." Am J Med Genet 106(4): 254-257.
- Aviezer, D., D. Hecht, M. Safran, M. Eisinger, G. David and A. Yayon (1994). "Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis." Cell 79(6): 1005-1013.
- Aviezer, D., R. V. Iozzo, D. M. Noonan and A. Yayon (1997). "Suppression of autocrine and paracrine functions of basic fibroblast growth factor by stable expression of perlecan antisense cDNA." Mol Cell Biol 17(4): 1938-1946.
- Aviezer, D., M. Safran and A. Yayon (1999). "Heparin differentially regulates the interaction of fibroblast growth factor-4 with FGF receptors 1 and 2." Biochem Biophys Res Commun 263(3): 621-626.
- Banks, G. B., C. Fuhrer, M. E. Adams and S. C. Froehner (2003). "The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex." J Neurocytol 32(5-8): 709-726.
- Barisic, N., J. S. Muller, E. Paucic-Kirincic, M. Gazdik, K. Lah-Tomulic, A. Pertl, J. Sertic, N. Zurak, H. Lochmuller and A. Abicht (2005). "Clinical variability of CMS-EA (congenital myasthenic syndrome with episodic apnea) due to identical CHAT mutations in two infants." Eur J Paediatr Neurol 9(1): 7-12.
- Barnard, J. C., A. J. Williams, B. Rabier, O. Chassande, J. Samarut, S. Y. Cheng, J. H. Bassett and G. R. Williams (2005). "Thyroid hormones regulate fibroblast growth factor receptor signaling during chondrogenesis." Endocrinology 146(12): 5568-5580.
- Barton-Davis, E. R., L. Cordier, D. I. Shoturma, S. E. Leland and H. L. Sweeney (1999). "Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice." J Clin Invest 104(4): 375-381.
- Battaglia, C., M. Aumailley, K. Mann, U. Mayer and R. Timpl (1993). "Structural basis of beta 1 integrin-mediated cell adhesion to a large heparan sulfate proteoglycan from basement membranes." Eur J Cell Biol 61(1): 92-99.

- Battaglia, C., U. Mayer, M. Aumailley and R. Timpl (1992). "Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core." Eur J Biochem 208(2): 359-366.
- Beeson, D., O. Higuchi, J. Palace, J. Cossins, H. Spearman, S. Maxwell, J. Newsom-Davis, G. Burke, P. Fawcett, M. Motomura, J. S. Muller, H. Lochmuller, C. Slater, A. Vincent and Y. Yamanashi (2006). "Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy." Science 313(5795): 1975-1978.
- Bengtsson, E., M. Morgelin, T. Sasaki, R. Timpl, D. Heinegard and A. Aspberg (2002). "The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor." J Biol Chem 277(17): 15061-15068.
- Bianchetta, M. J., R. A. Betensky and J. B. Cohen (2005). "Cell-surface MuSK self-association: a crucial role for the putative signal sequence." Biochemistry 44(49): 16229-16238.
- Bishop, D. L., T. Misgeld, M. K. Walsh, W. B. Gan and J. W. Lichtman (2004). "Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding." Neuron 44(4): 651-661.
- Bix, G., J. Fu, E. M. Gonzalez, L. Macro, A. Barker, S. Campbell, M. M. Zutter, S. A. Santoro, J. K. Kim, M. Hook, C. C. Reed and R. V. Iozzo (2004). "Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin." J Cell Biol 166(1): 97-109.
- Bon, S., F. Coussen and J. Massoulie (1997). "Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail." J Biol Chem 272(5): 3016-3021.
- Bon, S. and J. Massoulie (1997). "Quaternary associations of acetylcholinesterase. I. Oligomeric associations of T subunits with and without the amino-terminal domain of the collagen tail." J Biol Chem 272(5): 3007-3015.
- Bork, P. and L. Patthy (1995). "The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation." Protein Sci 4(7): 1421-1425.
- Brandon, E. P., W. Lin, K. A. D'Amour, D. P. Pizzo, B. Dominguez, Y. Sugiura, S. Thode, C. P. Ko, L. J. Thal, F. H. Gage and K. F. Lee (2003). "Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice." J Neurosci 23(2): 539-549.
- Brown, C. R., L. Q. Hong-Brown, J. Biwersi, A. S. Verkman and W. J. Welch (1996). "Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein." Cell Stress Chaperones 1(2): 117-125.
- Brown, J. C., T. Sasaki, W. Gohring, Y. Yamada and R. Timpl (1997). "The C-terminal domain V of perlecan promotes beta1 integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans." Eur J Biochem 250(1): 39-46.
- Brown, S. B., R. Garcia-Mullin and Y. Murai (1975). "The Schwartz-Jampel syndrome (Myotonic chondrodystrophy) in the adult." Neurology 25: 365-366.
- Brunetti, A. and I. D. Goldfine (1990). "Role of myogenin in myoblast differentiation and its regulation by fibroblast growth factor." J Biol Chem 265(11): 5960-5963.
- Burden, S. J. (2002). "Building the vertebrate neuromuscular synapse." J Neurobiol 53(4): 501-511.
- Cadilhac, J., P. Baldet, J. Greze and H. Duday (1975). "E.M.G. studies of two family cases of the Schwartz and Jampel syndrome (osteo-chondro-muscular dystrophy with myotonia)." Electromyogr Clin Neurophysiol 15(1): 5-12.

- Caldwell, M. C. and S. Datta (1998). "Expression of cyclin E or DP/E2F rescues the G1 arrest of trol mutant neuroblasts in the Drosophila larval central nervous system." Mech Dev 79(1-2): 121-130.
- Camp, S., L. Zhang, M. Marquez, B. de la Torre, J. M. Long, G. Bucht and P. Taylor (2005). "Acetylcholinesterase (AChE) gene modification in transgenic animals: functional consequences of selected exon and regulatory region deletion." Chem Biol Interact 157-158: 79-86.
- Cannon, S. C. (2006). "Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain." Annu Rev Neurosci 29: 387-415.
- Cartaud, A., L. Strohlic, M. Guerra, B. Blanchard, M. Lambergeon, E. Krejci, J. Cartaud and C. Legay (2004). "MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction." J Cell Biol 165(4): 505-515.
- Casar, J. C., C. Cabello-Verrugio, H. Olguin, R. Aldunate, N. C. Inestrosa and E. Brandan (2004). "Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation." J Cell Sci 117(Pt 1): 73-84.
- Castonguay, A. and R. Robitaille (2001). "Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse." J Neurosci 21(6): 1911-1922.
- Chevessier, F., B. Faraut, A. Ravel-Chapuis, P. Richard, K. Gaudon, S. Bauche, C. Prioleau, R. Herbst, E. Goillot, C. Ioos, J. P. Azulay, S. Attarian, J. P. Leroy, E. Fournier, C. Legay, L. Schaeffer, J. Koenig, M. Fardeau, B. Eymard, J. Pouget and D. Hantai (2004). "MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome." Hum Mol Genet 13(24): 3229-3240.
- Chiu, A. Y. and J. Ko (1994). "A novel epitope of entactin is present at the mammalian neuromuscular junction." J Neurosci 14(5 Pt 1): 2809-2817.
- Cohen, I. R., S. Grassel, A. D. Murdoch and R. V. Iozzo (1993). "Structural characterization of the complete human perlecan gene and its promoter." Proc Natl Acad Sci U S A 90(21): 10404-10408.
- Cordeiro-Ferreira, N., M. Gomes Da Costa and D. Amparo-Marques (1973). "Syndrome de Schwartz." Bordeaux Médical 12: 1777-1786.
- Cormier-Daire, V., A. Superti-Furga, A. Munnich, S. Lyonnet, P. Rustin, A. L. Delezoide, P. De Lonlay, A. Giedion, P. Maroteaux and M. Le Merrer (1998). "Clinical homogeneity of the Stuve-Wiedemann syndrome and overlap with the Schwartz-Jampel syndrome type 2." Am J Med Genet 78(2): 146-149.
- Cossins, J., G. Burke, S. Maxwell, H. Spearman, S. Man, J. Kuks, A. Vincent, J. Palace, C. Fuhrer and D. Beeson (2006). "Diverse molecular mechanisms involved in AChR deficiency due to rapsyn mutations." Brain 129(Pt 10): 2773-2783.
- Costell, M., E. Gustafsson, A. Aszodi, M. Morgelin, W. Bloch, E. Hunziker, K. Addicks, R. Timpl and R. Fassler (1999). "Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes." J Cell Biol 147(5): 1109-1122.
- Costell, M., K. Mann, Y. Yamada and R. Timpl (1997). "Characterization of recombinant perlecan domain I and its substitution by glycosaminoglycans and oligosaccharides." Eur J Biochem 243(1-2): 115-121.
- Costell, M., T. Sasaki, K. Mann, Y. Yamada and R. Timpl (1996). "Structural characterization of recombinant domain II of the basement membrane proteoglycan perlecan." FEBS Lett 396(2-3): 127-131.
- Cote, P. D., H. Moukhles, M. Lindenbaum and S. Carbonetto (1999). "Chimaeric mice deficient in dystroglycans develop muscular dystrophy and have disrupted myoneural synapses." Nat Genet 23(3): 338-342.

- Croxen, R., C. Young, C. Slater, S. Haslam, M. Brydson, A. Vincent and D. Beeson (2001). "End-plate gamma- and epsilon-subunit mRNA levels in AChR deficiency syndrome due to epsilon-subunit null mutations." Brain 124(Pt 7): 1362-1372.
- Dagoneau, N., D. Scheffer, C. Huber, L. I. Al-Gazali, M. Di Rocco, A. Godard, J. Martinovic, A. Raas-Rothschild, S. Sigaudy, S. Unger, S. Nicole, B. Fontaine, J. L. Taupin, J. F. Moreau, A. Superti-Furga, M. Le Merrer, J. Bonaventure, A. Munnich, L. Legeai-Mallet and V. Cormier-Daire (2004). "Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome." Am J Hum Genet 74(2): 298-305.
- Darvesh, S., D. A. Hopkins and C. Geula (2003). "Neurobiology of butyrylcholinesterase." Nat Rev Neurosci 4(2): 131-138.
- Datta, S. (1995). "Control of proliferation activation in quiescent neuroblasts of the *Drosophila* central nervous system." Development 121(4): 1173-1182.
- Datta, S. and D. R. Kankel (1992). "l(1)trol and l(1)devl, loci affecting the development of the adult central nervous system in *Drosophila melanogaster*." Genetics 130(3): 523-537.
- DeChiara, T. M., D. C. Bowen, D. M. Valenzuela, M. V. Simmons, W. T. Poueymirou, S. Thomas, E. Kinetz, D. L. Compton, E. Rojas, J. S. Park, C. Smith, P. S. DiStefano, D. J. Glass, S. J. Burden and G. D. Yancopoulos (1996). "The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo." Cell 85(4): 501-512.
- Deconinck, A. E., A. C. Potter, J. M. Tinsley, S. J. Wood, R. Vater, C. Young, L. Metzinger, A. Vincent, C. R. Slater and K. E. Davies (1997). "Postsynaptic abnormalities at the neuromuscular junctions of utrophin-deficient mice." J Cell Biol 136(4): 883-894.
- DeLise, A. M., L. Fischer and R. S. Tuan (2000). "Cellular interactions and signaling in cartilage development." Osteoarthritis Cartilage 8(5): 309-334.
- Deng, C., A. Wynshaw-Boris, F. Zhou, A. Kuo and P. Leder (1996). "Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth." Cell 84(6): 911-921.
- Deprez, P., N. C. Inestrosa and E. Krejci (2003). "Two different heparin-binding domains in the triple-helical domain of ColQ, the collagen tail subunit of synaptic acetylcholinesterase." J Biol Chem 278(26): 23233-23242.
- Deprez, P. N. and N. C. Inestrosa (1995). "Two heparin-binding domains are present on the collagenic tail of asymmetric acetylcholinesterase." J Biol Chem 270(19): 11043-11046.
- Desbois, J., J. Guyou, P. Grenet and A. Herrault (1977). "Chondrodystrophie myotonique (ou syndrome de Schwartz-Jampel). Etude d'une fratrie et revue de la littérature." Ann. Pédiat. 24: 563-574.
- Diaz-Serrano, K. V., C. B. Brandao, R. B. Brandao, P. C. Watanabe and S. C. Regalo (2006). "Dental findings and muscular-skeletal features in Schwartz-Jampel syndrome: case report of two affected siblings." Spec Care Dentist 26(5): 225-229.
- Dodge, G. R., I. Kovalszky, J. R. Hassell and R. V. Iozzo (1990). "Transforming growth factor beta alters the expression of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells." J Biol Chem 265(29): 18023-18029.
- Dolan, M., T. Horchar, B. Rigatti and J. R. Hassell (1997). "Identification of sites in domain I of perlecan that regulate heparan sulfate synthesis." J Biol Chem 272(7): 4316-4322.
- Donger, C., E. Krejci, A. P. Serradell, B. Eymard, S. Bon, S. Nicole, D. Chateau, F. Gary, M. Fardeau, J. Massoulié and P. Guicheney (1998). "Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic)." Am J Hum Genet 63(4): 967-975.

- Engel, A. G., K. Ohno, C. Bouzat, S. M. Sine and R. C. Griggs (1996). "End-plate acetylcholine receptor deficiency due to nonsense mutations in the epsilon subunit." Ann Neurol 40(5): 810-817.
- Engel, A. G., K. Ohno, M. Milone, H. L. Wang, S. Nakano, C. Bouzat, J. N. Pruitt, 2nd, D. O. Hutchinson, J. M. Brengman, N. Bren, J. P. Sieb and S. M. Sine (1996). "New mutations in acetylcholine receptor subunit genes reveal heterogeneity in the slow-channel congenital myasthenic syndrome." Hum Mol Genet 5(9): 1217-1227.
- Engel, A. G., K. Ohno, X. M. Shen and S. M. Sine (2003). "Congenital myasthenic syndromes: multiple molecular targets at the neuromuscular junction." Ann N Y Acad Sci 998: 138-160.
- Engel, A. G., K. Ohno and S. M. Sine (2003). "Congenital myasthenic syndromes: A diverse array of molecular targets." J Neurocytol 32(5-8): 1017-1037.
- Engel, A. G. and S. M. Sine (2005). "Current understanding of congenital myasthenic syndromes." Curr Opin Pharmacol 5(3): 308-321.
- Erickson, A. C. and J. R. Couchman (2000). "Still more complexity in mammalian basement membranes." J Histochem Cytochem 48(10): 1291-1306.
- Erlebacher, A., E. H. Filvaroff, S. E. Gitelman and R. Derynck (1995). "Toward a molecular understanding of skeletal development." Cell 80(3): 371-378.
- Escher, P., E. Lacazette, M. Courtet, A. Blindenbacher, L. Landmann, G. Bezakova, K. C. Lloyd, U. Mueller and H. R. Brenner (2005). "Synapses form in skeletal muscles lacking neuregulin receptors." Science 308(5730): 1920-1923.
- Eusebio, A., F. Oliveri, P. Barzaghi and M. A. Ruegg (2003). "Expression of mouse agrin in normal, denervated and dystrophic muscle." Neuromuscul Disord 13(5): 408-415.
- Fasanelli, S., K. Kozlowski, S. Reiter and D. Sillence (1985). "Dyssegmental dysplasia (report of two cases with a review of the literature)." Skeletal Radiol 14(3): 173-177.
- Feitsma, K., H. Hausser, H. Robenek, H. Kresse and P. Vischer (2000). "Interaction of thrombospondin-1 and heparan sulfate from endothelial cells. Structural requirements of heparan sulfate." J Biol Chem 275(13): 9396-9402.
- Feng, G., E. Krejci, J. Molgo, J. M. Cunningham, J. Massoulie and J. R. Sanes (1999). "Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function." J Cell Biol 144(6): 1349-1360.
- Feng, Z., S. Koirala and C. P. Ko (2005). "Synapse-glia interactions at the vertebrate neuromuscular junction." Neuroscientist 11(5): 503-513.
- Flanagan-Steet, H., M. A. Fox, D. Meyer and J. R. Sanes (2005). "Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations." Development 132(20): 4471-4481.
- Flucher, B. E. and M. P. Daniels (1989). "Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein." Neuron 3(2): 163-175.
- Fontaine, B., S. Nicole, H. Topaloglu, C. Ben Hamida, P. Beighton, F. Spaans, J. M. Cantu, S. Bakouri, N. Romero, K. Ricker, P. Barros-Nunez, G. Ponsot, M. Ben Hamida, J. Weissenbach, F. Hentati and F. Lehmann-Horn (1996). "Recessive Schwartz-Jampel syndrome (SJS): confirmation of linkage to chromosome 1p, evidence of genetic homogeneity and reduction of the SJS locus to a 3-cM interval." Hum Genet 98(3): 380-385.
- Fontaine, B., E. Plassart-Schiess and S. Nicole (1997). "Diseases caused by voltage-gated ion channels." Mol Aspects Med 18(6): 415-463.
- Fox, M. A., J. R. Sanes, D. B. Borza, V. P. Eswarakumar, R. Fassler, B. G. Hudson, S. W. John, Y. Ninomiya, V. Pedchenko, S. L. Pfaff, M. N. Rheault, Y. Sado, Y. Segal, M. J.

- Werle and H. Umemori (2007). "Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals." Cell 129(1): 179-193.
- Francis, R. and R. H. Waterston (1991). "Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*." J Cell Biol 114(3): 465-479.
- Frank, E. and G. D. Fischbach (1979). "Early events in neuromuscular junction formation in vitro: induction of acetylcholine receptor clusters in the postsynaptic membrane and morphology of newly formed synapses." J Cell Biol 83(1): 143-158.
- French, M. M., R. R. Gomes, Jr., R. Timpl, M. Hook, K. Czymmek, M. C. Farach-Carson and D. D. Carson (2002). "Chondrogenic activity of the heparan sulfate proteoglycan perlecan maps to the N-terminal domain I." J Bone Miner Res 17(1): 48-55.
- French, M. M., S. E. Smith, K. Akanbi, T. Sanford, J. Hecht, M. C. Farach-Carson and D. D. Carson (1999). "Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro." J Cell Biol 145(5): 1103-1115.
- Friedrich, M. V., W. Gohring, M. Morgelin, A. Brancaccio, G. David and R. Timpl (1999). "Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V." J Mol Biol 294(1): 259-270.
- Friedrich, M. V., M. Schneider, R. Timpl and S. Baumgartner (2000). "Perlecan domain V of *Drosophila melanogaster*. Sequence, recombinant analysis and tissue expression." Eur J Biochem 267(11): 3149-3159.
- Gautam, M., P. G. Noakes, L. Moscoso, F. Rupp, R. H. Scheller, J. P. Merlie and J. R. Sanes (1996). "Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice." Cell 85(4): 525-535.
- Gautam, M., P. G. Noakes, J. Mudd, M. Nichol, G. C. Chu, J. R. Sanes and J. P. Merlie (1995). "Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice." Nature 377(6546): 232-236.
- Giedion, A., E. Boltshauser, J. Briner, G. Eich, G. Exner, H. Fendel, L. Kaufmann, B. Steinmann, J. Spranger and A. Superti-Furga (1997). "Heterogeneity in Schwartz-Jampel chondrodystrophic myotonia." Eur. J. Pediatr. 156(3): 214-223.
- Girard, E., J. Barbier, A. Chatonnet, E. Krejci and J. Molgo (2005). "Synaptic remodeling at the skeletal neuromuscular junction of acetylcholinesterase knockout mice and its physiological relevance." Chem Biol Interact 157-158: 87-96.
- Girard, E., V. Bernard, S. Camp, P. Taylor, E. Krejci and J. Molgo (2006). "Remodeling of the neuromuscular junction in mice with deleted exons 5 and 6 of acetylcholinesterase." J Mol Neurosci 30(1-2): 99-100.
- Gohring, W., T. Sasaki, C. H. Heldin and R. Timpl (1998). "Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope." Eur J Biochem 255(1): 60-66.
- Gomes, R., C. Kirn-Safran, M. C. Farach-Carson and D. D. Carson (2002). "Perlecan: an important component of the cartilage pericellular matrix." J Musculoskelet Neuronal Interact 2(6): 511-516.
- Gomes, R. R., Jr., M. C. Farach Carson and D. D. Carson (2003). "Perlecan-stimulated nodules undergo chondrogenic maturation in response to rhBMP-2 treatment in vitro." Connect Tissue Res 44 Suppl 1: 196-201.
- Gomes, R. R., Jr., S. S. Joshi, M. C. Farach-Carson and D. D. Carson (2006). "Ribozyme-mediated perlecan knockdown impairs chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 fibroblasts." Differentiation 74(1): 53-63.

- Gonzalez-Iriarte, M., R. Carmona, J. M. Perez-Pomares, D. Macias, M. Costell and R. Munoz-Chapuli (2003). "Development of the coronary arteries in a murine model of transposition of great arteries." J Mol Cell Cardiol 35(7): 795-802.
- Gonzalez, E. M., M. Mongiat, S. J. Slater, R. Baffa and R. V. Iozzo (2003). "A novel interaction between perlecan protein core and progranulin: potential effects on tumor growth." J Biol Chem 278(40): 38113-38116.
- Govindraj, P., L. West, T. J. Koob, P. Neame, K. Doege and J. R. Hassell (2002). "Isolation and identification of the major heparan sulfate proteoglycans in the developing bovine rib growth plate." J Biol Chem 277(22): 19461-19469.
- Govindraj, P., L. West, S. Smith and J. R. Hassell (2006). "Modulation of FGF-2 binding to chondrocytes from the developing growth plate by perlecan." Matrix Biol 25(4): 232-239.
- Grady, R. M., R. W. Grange, K. S. Lau, M. M. Maimone, M. C. Nichol, J. T. Stull and J. R. Sanes (1999). "Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies." Nat Cell Biol 1(4): 215-220.
- Grady, R. M., J. P. Merlie and J. R. Sanes (1997). "Subtle neuromuscular defects in utrophin-deficient mice." J Cell Biol 136(4): 871-882.
- Grady, R. M., H. Zhou, J. M. Cunningham, M. D. Henry, K. P. Campbell and J. R. Sanes (2000). "Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin--glycoprotein complex." Neuron 25(2): 279-293.
- Gramolini, A. O., L. M. Angus, L. Schaeffer, E. A. Burton, J. M. Tinsley, K. E. Davies, J. P. Changeux and B. J. Jasmin (1999). "Induction of utrophin gene expression by heregulin in skeletal muscle cells: role of the N-box motif and GA binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A 96(6): 3223-3227.
- Gramolini, A. O. and B. J. Jasmin (1999). "Expression of the utrophin gene during myogenic differentiation." Nucleic Acids Res 27(17): 3603-3609.
- Guerra, M., A. Cartaud, J. Cartaud and C. Legay (2005). "Acetylcholinesterase and molecular interactions at the neuromuscular junction." Chem Biol Interact 157-158: 57-61.
- Handmaker, S. D., J. A. Campbell, L. D. Robinson, O. Chinwah and R. J. Gorlin (1977). "Dyssegmental dwarfism: a new syndrome of lethal dwarfism." Birth Defects Orig Artic Ser 13(3D): 79-90.
- Hassell, J., Y. Yamada and E. Arikawa-Hirasawa (2002). "Role of perlecan in skeletal development and diseases." Glycoconj J 19(4-5): 263-267.
- Hayashi, K., J. A. Madri and P. D. Yurchenco (1992). "Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through beta 1 and beta 3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycan." J Cell Biol 119(4): 945-959.
- Herbst, R., E. Avetisova and S. J. Burden (2002). "Restoration of synapse formation in Musk mutant mice expressing a Musk/Trk chimeric receptor." Development 129(23): 5449-5460.
- Holbrook, J. A., G. Neu-Yilik, M. W. Hentze and A. E. Kulozik (2004). "Nonsense-mediated decay approaches the clinic." Nat Genet 36(8): 801-808.
- Hopf, M., W. Gohring, E. Kohfeldt, Y. Yamada and R. Timpl (1999). "Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin." Eur J Biochem 259(3): 917-925.
- Hopf, M., W. Gohring, K. Mann and R. Timpl (2001). "Mapping of binding sites for nidogens, fibulin-2, fibronectin and heparin to different IG modules of perlecan." J Mol Biol 311(3): 529-541.
- Horan, F. and P. Beighton (1975). "Orthopaedic aspects of the Schwartz syndrome." J Bone Joint Surg Am 57(4): 542-544.

- Hresko, M. C., B. D. Williams and R. H. Waterston (1994). "Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*." J Cell Biol 124(4): 491-506.
- Hunter, D. D., B. E. Porter, J. W. Bullock, S. P. Adams, J. P. Merlie and J. R. Sanes (1989). "Primary sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal lamina protein S-laminin." Cell 59(5): 905-913.
- Huttenlocher, P. R., J. Landwirth, V. Hanson, B. B. Gallagher and K. Bensch (1969). "Osteochondro-muscular dystrophy. A disorder manifested by multiple skeletal deformities, myotonia, and dystrophic changes in muscle." Pediatrics 44(6): 945-958.
- Iozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." Annu Rev Biochem 67: 609-652.
- Iozzo, R. V., I. R. Cohen, S. Grassel and A. D. Murdoch (1994). "The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices." Biochem J 302 (Pt 3): 625-639.
- Iozzo, R. V. and J. D. San Antonio (2001). "Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena." J Clin Invest 108(3): 349-355.
- Jacobson, C., P. D. Cote, S. G. Rossi, R. L. Rotundo and S. Carbonetto (2001). "The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane." J Cell Biol 152(3): 435-450.
- Jasmin, B. J., R. K. Lee and R. L. Rotundo (1993). "Compartmentalization of acetylcholinesterase mRNA and enzyme at the vertebrate neuromuscular junction." Neuron 11(3): 467-477.
- Jin, T. E., V. Witzemann and M. Brecht (2004). "Fiber types of the intrinsic whisker muscle and whisking behavior." J Neurosci 24(13): 3386-3393.
- Joseph, S. J., M. D. Ford, C. Barth, S. Portbury, P. F. Bartlett, V. Nurcombe and U. Greferath (1996). "A proteoglycan that activates fibroblast growth factors during early neuronal development is a perlecan variant." Development 122(11): 3443-3452.
- Kalhovde, J. M., R. Jerkovic, I. Sefland, C. Cordonnier, E. Calabria, S. Schiaffino and T. Lomo (2005). "'Fast' and 'slow' muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells." J Physiol 562(Pt 3): 847-857.
- Kallunki, P. and K. Tryggvason (1992). "Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor." J Cell Biol 116(2): 559-571.
- Kanagawa, M., D. E. Michele, J. S. Satz, R. Barresi, H. Kusano, T. Sasaki, R. Timpl, M. D. Henry and K. P. Campbell (2005). "Disruption of perlecan binding and matrix assembly by post-translational or genetic disruption of dystroglycan function." FEBS Lett 579(21): 4792-4796.
- Khurana, T. S., A. G. Rosmarin, J. Shang, T. O. Krag, S. Das and S. Gammeltoft (1999). "Activation of utrophin promoter by heregulin via the ets-related transcription factor complex GA-binding protein alpha/beta." Mol Biol Cell 10(6): 2075-2086.
- Knight, D., L. K. Tolley, D. K. Kim, N. A. Lavidis and P. G. Noakes (2003). "Functional analysis of neurotransmission at beta2-laminin deficient terminals." J Physiol 546(Pt 3): 789-800.
- Knudson, C. B. and W. Knudson (2001). "Cartilage proteoglycans." Semin Cell Dev Biol 12(2): 69-78.
- Koirala, S. and C. P. Ko (2004). "Pruning an axon piece by piece: a new mode of synapse elimination." Neuron 44(4): 578-580.

- Kraner, S., I. Laufenberg, H. M. Strassburg, J. P. Sieb and O. K. Steinlein (2003). "Congenital myasthenic syndrome with episodic apnea in patients homozygous for a CHAT missense mutation." Arch Neurol 60(5): 761-763.
- Krejci, E., S. Thomine, N. Boschetti, C. Legay, J. Sketelj and J. Massoulie (1997). "The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen." J Biol Chem 272(36): 22840-22847.
- Kronenberg, H. M. (2003). "Developmental regulation of the growth plate." Nature 423(6937): 332-336.
- Kugler, W., J. Enssle, M. W. Hentze and A. E. Kulozik (1995). "Nuclear degradation of nonsense mutated beta-globin mRNA: a post-transcriptional mechanism to protect heterozygotes from severe clinical manifestations of beta-thalassemia?" Nucleic Acids Res 23(3): 413-418.
- Kummer, T. T., T. Misgeld and J. R. Sanes (2006). "Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost." Curr Opin Neurobiol 16(1): 74-82.
- Kuzmiak, H. A. and L. E. Maquat (2006). "Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges." Trends Mol Med 12(7): 306-316.
- Kvist, A. J., A. E. Johnson, M. Morgelin, E. Gustafsson, E. Bengtsson, K. Lindblom, A. Aszodi, R. Fassler, T. Sasaki, R. Timpl and A. Aspberg (2006). "Chondroitin sulfate perlecan enhances collagen fibril formation. Implications for perlecan chondrodysplasias." J Biol Chem 281(44): 33127-33139.
- Larrain, J., J. Alvarez, J. R. Hassell and E. Brandan (1997). "Expression of perlecan, a proteoglycan that binds myogenic inhibitory basic fibroblast growth factor, is down regulated during skeletal muscle differentiation." Exp Cell Res 234(2): 405-412.
- Laurie, G. W., J. T. Bing, H. K. Kleinman, J. R. Hassell, M. Aumailley, G. R. Martin and R. J. Feldmann (1986). "Localization of binding sites for laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (type IV) collagen." J Mol Biol 189(1): 205-216.
- Legay, C., S. Bon and J. Massoulie (1993). "Expression of a cDNA encoding the glycolipid-anchored form of rat acetylcholinesterase." FEBS Lett 315(2): 163-166.
- Legay, C., M. Huchet, J. Massoulie and J. P. Changeux (1995). "Developmental regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization." Eur J Neurosci 7(8): 1803-1809.
- Legay, C., F. A. Mankal, J. Massoulie and B. J. Jasmin (1999). "Stability and secretion of acetylcholinesterase forms in skeletal muscle cells." J Neurosci 19(19): 8252-8259.
- Lehmann-Horn, F. and K. Jurkat-Rott (1999). "Voltage-gated ion channels and hereditary disease." Physiol Rev 79(4): 1317-1372.
- Levedakou, E. N., X. J. Chen, B. Soliven and B. Popko (2005). "Disruption of the mouse Large gene in the enr and myd mutants results in nerve, muscle, and neuromuscular junction defects." Mol Cell Neurosci 28(4): 757-769.
- Li, S. and M. F. Wilkinson (1998). "Nonsense surveillance in lymphocytes?" Immunity 8(2): 135-141.
- Lin, W., R. W. Burgess, B. Dominguez, S. L. Pfaff, J. R. Sanes and K. F. Lee (2001). "Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse." Nature 410(6832): 1057-1064.
- Lin, W., B. Dominguez, J. Yang, P. Aryal, E. P. Brandon, F. H. Gage and K. F. Lee (2005). "Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism." Neuron 46(4): 569-579.
- Lin, X., H. Qadota, D. G. Moerman and B. D. Williams (2003). "C. elegans PAT-6/actopaxin plays a critical role in the assembly of integrin adhesion complexes in vivo." Curr Biol 13(11): 922-932.

- Lortat-Jacob, H., H. K. Kleinman and J. A. Grimaud (1991). "High-affinity binding of interferon-gamma to a basement membrane complex (matrigel)." J Clin Invest 87(3): 878-883.
- Love, F. M. and W. J. Thompson (1998). "Schwann cells proliferate at rat neuromuscular junctions during development and regeneration." J Neurosci 18(22): 9376-9385.
- Lu, Q. L., A. Rabinowitz, Y. C. Chen, T. Yokota, H. Yin, J. Alter, A. Jadoon, G. Bou-Gharios and T. Partridge (2005). "Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles." Proc Natl Acad Sci U S A 102(1): 198-203.
- Lubischer, J. L. and D. M. Bebinger (1999). "Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction." J Neurosci 19(24): RC46.
- Lundquist, E. A. and R. K. Herman (1994). "The mec-8 gene of *Caenorhabditis elegans* affects muscle and sensory neuron function and interacts with three other genes: unc-52, smu-1 and smu-2." Genetics 138(1): 83-101.
- Lundquist, E. A., R. K. Herman, T. M. Rogalski, G. P. Mullen, D. G. Moerman and J. E. Shaw (1996). "The mec-8 gene of *C. elegans* encodes a protein with two RNA recognition motifs and regulates alternative splicing of unc-52 transcripts." Development 122(5): 1601-1610.
- Lyon, M., G. Rushton and J. T. Gallagher (1997). "The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific." J Biol Chem 272(29): 18000-18006.
- Mackinnon, A. C., H. Qadota, K. R. Norman, D. G. Moerman and B. D. Williams (2002). "*C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes." Curr Biol 12(10): 787-797.
- Mann, C. J., K. Honeyman, A. J. Cheng, T. Ly, F. Lloyd, S. Fletcher, J. E. Morgan, T. A. Partridge and S. D. Wilton (2001). "Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse." Proc Natl Acad Sci U S A 98(1): 42-47.
- Maquat, L. E. (2004). "Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol 5(2): 89-99.
- Maquat, L. E. (2005). "Nonsense-mediated mRNA decay in mammals." J Cell Sci 118(Pt 9): 1773-1776.
- Massoulie, J., A. Anselmet, S. Bon, E. Krejci, C. Legay, N. Morel and S. Simon (1998). "Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization." J Physiol Paris 92(3-4): 183-190.
- Meier, T., D. M. Hauser, M. Chiquet, L. Landmann, M. A. Ruegg and H. R. Brenner (1997). "Neural agrin induces ectopic postsynaptic specializations in innervated muscle fibers." J Neurosci 17(17): 6534-6544.
- Meier, T., F. Masciulli, C. Moore, F. Schoumacher, U. Eppenberger, A. J. Denzer, G. Jones and H. R. Brenner (1998). "Agrin can mediate acetylcholine receptor gene expression in muscle by aggregation of muscle-derived neuregulins." J Cell Biol 141(3): 715-726.
- Mejat, A., A. Ravel-Chapuis, M. Vandromme and L. Schaeffer (2003). "Synapse-specific gene expression at the neuromuscular junction." Ann N Y Acad Sci 998: 53-65.
- Melrose, J., P. Roughley, S. Knox, S. Smith, M. Lord and J. Whitelock (2006). "The structure, location, and function of perlecan, a prominent pericellular proteoglycan of fetal, postnatal, and mature hyaline cartilages." J Biol Chem 281(48): 36905-36914.
- Melrose, J., S. Smith, M. Cake, R. Read and J. Whitelock (2005). "Perlecan displays variable spatial and temporal immunolocalisation patterns in the articular and growth plate cartilages of the ovine stifle joint." Histochem Cell Biol 123(6): 561-571.
- Melrose, J., S. Smith, P. Ghosh and J. Whitelock (2003). "Perlecan, the multidomain heparan sulfate proteoglycan of basement membranes, is also a prominent component of the

- cartilaginous primordia in the developing human fetal spine." J Histochem Cytochem 51(10): 1331-1341.
- Melrose, J., S. Smith, S. Knox and J. Whitelock (2002). "Perlecan, the multidomain HS-proteoglycan of basement membranes, is a prominent pericellular component of ovine hypertrophic vertebral growth plate and cartilaginous endplate chondrocytes." Histochem Cell Biol 118(4): 269-280.
- Melrose, J., S. Smith and J. Whitelock (2004). "Perlecan immunolocalizes to perichondrial vessels and canals in human fetal cartilaginous primordia in early vascular and matrix remodeling events associated with diarthrodial joint development." J Histochem Cytochem 52(11): 1405-1413.
- Mereu, T. R., I. H. Porter and G. Hug (1969). "Myotonia, shortness of stature, and hip dysplasia. Schwartz-Jampel syndrome." Am. J. Dis. Child. 117(4): 470-478.
- Michele, D. E., R. Barresi, M. Kanagawa, F. Saito, R. D. Cohn, J. S. Satz, J. Dollar, I. Nishino, R. I. Kelley, H. Somer, V. Straub, K. D. Mathews, S. A. Moore and K. P. Campbell (2002). "Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies." Nature 418(6896): 417-422.
- Middleton, L. T. (1996). "Congenital myasthenic syndromes. 34th ENMC International Workshop, 10-11 June 1995." Neuromuscul Disord 6(2): 133-136.
- Miner, J. H., J. Cunningham and J. R. Sanes (1998). "Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain." J Cell Biol 143(6): 1713-1723.
- Miner, J. H. and J. R. Sanes (1994). "Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches." J Cell Biol 127(3): 879-891.
- Misgeld, T., T. T. Kummer, J. W. Lichtman and J. R. Sanes (2005). "Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter." Proc Natl Acad Sci U S A 102(31): 11088-11093.
- Missias, A. C., J. Mudd, J. M. Cunningham, J. H. Steinbach, J. P. Merlie and J. R. Sanes (1997). "Deficient development and maintenance of postsynaptic specializations in mutant mice lacking an 'adult' acetylcholine receptor subunit." Development 124(24): 5075-5086.
- Mongiati, M., J. Fu, R. Oldershaw, R. Greenhalgh, A. M. Gown and R. V. Iozzo (2003). "Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis." J Biol Chem 278(19): 17491-17499.
- Mongiati, M., J. Otto, R. Oldershaw, F. Ferrer, J. D. Sato and R. V. Iozzo (2001). "Fibroblast growth factor-binding protein is a novel partner for perlecan protein core." J Biol Chem 276(13): 10263-10271.
- Mongiati, M., S. M. Sweeney, J. D. San Antonio, J. Fu and R. V. Iozzo (2003). "Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan." J Biol Chem 278(6): 4238-4249.
- Mongiati, M., K. Taylor, J. Otto, S. Aho, J. Uitto, J. M. Whitelock and R. V. Iozzo (2000). "The protein core of the proteoglycan perlecan binds specifically to fibroblast growth factor-7." J Biol Chem 275(10): 7095-7100.
- Morita, H., A. Yoshimura, K. Inui, T. Ideura, H. Watanabe, L. Wang, R. Soininen and K. Tryggvason (2005). "Heparan sulfate of perlecan is involved in glomerular filtration." J Am Soc Nephrol 16(6): 1703-1710.
- Mullen, G. P., T. M. Rogalski, J. A. Bush, P. R. Gorji and D. G. Moerman (1999). "Complex patterns of alternative splicing mediate the spatial and temporal distribution of perlecan/UNC-52 in *Caenorhabditis elegans*." Mol Biol Cell 10(10): 3205-3221.

- Muller, J. S., S. K. Baumeister, U. Schara, J. Cossins, S. Krause, M. von der Hagen, A. Huebner, R. Webster, D. Beeson, H. Lochmuller and A. Abicht (2006). "CHRND mutation causes a congenital myasthenic syndrome by impairing co-clustering of the acetylcholine receptor with rapsyn." *Brain* 129(Pt 10): 2784-2793.
- Muller, J. S., A. Herczegfalvi, J. J. Vilchez, J. Colomer, L. L. Bachinski, V. Mihaylova, M. Santos, U. Schara, M. Deschauer, M. Shevell, C. Poulin, A. Dias, A. Soudo, M. Hietala, T. Aarimaa, R. Krahe, V. Karcagi, A. Huebner, D. Beeson, A. Abicht and H. Lochmuller (2007). "Phenotypical spectrum of DOK7 mutations in congenital myasthenic syndromes." *Brain* 130(Pt 6): 1497-1506.
- Murdoch, A. D., G. R. Dodge, I. Cohen, R. S. Tuan and R. V. Iozzo (1992). "Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor." *J Biol Chem* 267(12): 8544-8557.
- Murdoch, A. D., B. Liu, R. Schwarting, R. S. Tuan and R. V. Iozzo (1994). "Widespread expression of perlecan proteoglycan in basement membranes and extracellular matrices of human tissues as detected by a novel monoclonal antibody against domain III and by in situ hybridization." *J Histochem Cytochem* 42(2): 239-249.
- Muscat, G. E. and U. Dressel (2000). "Not a minute to waste." *Nat Med* 6(11): 1216-1217.
- Nagy, A., C. Moens, E. Ivanyi, J. Pawling, M. Gertsenstein, A. K. Hadjantonakis, M. Pirity and J. Rossant (1998). "Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles." *Curr Biol* 8(11): 661-664.
- Nichols, P., R. Croxen, A. Vincent, R. Rutter, M. Hutchinson, J. Newsom-Davis and D. Beeson (1999). "Mutation of the acetylcholine receptor epsilon-subunit promoter in congenital myasthenic syndrome." *Ann Neurol* 45(4): 439-443.
- Nicole, S., C. Ben Hamida, P. Beighton, S. Bakouri, S. Belal, N. Romero, D. Viljoen, G. Ponsot, A. Sammoud, J. Weissenbach and et al. (1995). "Localization of the Schwartz-Jampel syndrome (SJS) locus to chromosome 1p34-p36.1 by homozygosity mapping." *Hum Mol Genet* 4(9): 1633-1636.
- Nicole, S., C. S. Davoine, H. Topaloglu, L. Cattolico, D. Barral, P. Beighton, C. B. Hamida, H. Hammouda, C. Cruaud, P. S. White, D. Samson, J. A. Urtizberea, F. Lehmann-Horn, J. Weissenbach, F. Hentati and B. Fontaine (2000). "Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia)." *Nat Genet* 26(4): 480-483.
- Nicole, S., S. Vicart, C. Davoine and B. Fontaine (2001). "Mutations of perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, cause Schwartz-Jampel syndrome: a new mechanism for myotonia?" *Acta Myologica* XX(2): 130-133.
- Nishida, T., S. Kubota, T. Fukunaga, S. Kondo, G. Yosimichi, T. Nakanishi, T. Takano-Yamamoto and M. Takigawa (2003). "CTGF/Hcs24, hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes." *J Cell Physiol* 196(2): 265-275.
- Nishikawa, S., J. L. Brodsky and K. Nakatsukasa (2005). "Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD)." *J Biochem (Tokyo)* 137(5): 551-555.
- Nishimune, H., J. R. Sanes and S. S. Carlson (2004). "A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals." *Nature* 432(7017): 580-587.
- Noakes, P. G., M. Gautam, J. Mudd, J. R. Sanes and J. P. Merlie (1995). "Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2." *Nature* 374(6519): 258-262.

- Noonan, D. M., A. Fulle, P. Valente, S. Cai, E. Horigan, M. Sasaki, Y. Yamada and J. R. Hassell (1991). "The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule." J Biol Chem 266(34): 22939-22947.
- Ohno, K., B. Anlar and A. G. Engel (1999). "Congenital myasthenic syndrome caused by a mutation in the Ets-binding site of the promoter region of the acetylcholine receptor epsilon subunit gene." Neuromuscul Disord 9(3): 131-135.
- Ohno, K., J. Brengman, A. Tsujino and A. G. Engel (1998). "Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A 95(16): 9654-9659.
- Ohno, K., J. M. Brengman, K. J. Felice, D. R. Cornblath and A. G. Engel (1999). "Congenital end-plate acetylcholinesterase deficiency caused by a nonsense mutation and an A-->G splice-donor-site mutation at position +3 of the collagenlike-tail-subunit gene (COLQ): how does G at position +3 result in aberrant splicing?" Am J Hum Genet 65(3): 635-644.
- Ohno, K. and A. G. Engel (2003). "Congenital myasthenic syndromes: gene mutations." Neuromuscul Disord 13(10): 854-857.
- Ohno, K., A. G. Engel, X. M. Shen, D. Selcen, J. Brengman, C. M. Harper, A. Tsujino and M. Milone (2002). "Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome." Am J Hum Genet 70(4): 875-885.
- Ohno, K., M. Sadeh, I. Blatt, J. M. Brengman and A. G. Engel (2003). "E-box mutations in the RAPSN promoter region in eight cases with congenital myasthenic syndrome." Hum Mol Genet 12(7): 739-748.
- Ohno, K., A. Tsujino, J. M. Brengman, C. M. Harper, Z. Bajzer, B. Udd, R. Beyring, S. Robb, F. J. Kirkham and A. G. Engel (2001). "Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans." Proc Natl Acad Sci U S A 98(4): 2017-2022.
- Okada, K., A. Inoue, M. Okada, Y. Murata, S. Kakuta, T. Jigami, S. Kubo, H. Shiraishi, K. Eguchi, M. Motomura, T. Akiyama, Y. Iwakura, O. Higuchi and Y. Yamanashi (2006). "The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis." Science 312(5781): 1802-1805.
- Olsen, B. R. (1999). "Life without perlecan has its problems." J Cell Biol 147(5): 909-912.
- Ornitz, D. M. and P. J. Marie (2002). "FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease." Genes Dev 16(12): 1446-1465.
- Outeiro, T. F. and J. Tetzlaff (2007). "Mechanisms of disease II: cellular protein quality control." Semin Pediatr Neurol 14(1): 15-25.
- Palace, J., D. Lashley, J. Newsom-Davis, J. Cossins, S. Maxwell, R. Kennett, S. Jayawant, Y. Yamanashi and D. Beeson (2007). "Clinical features of the DOK7 neuromuscular junction synaptopathy." Brain 130(Pt 6): 1507-1515.
- Panzer, J. A., S. M. Gibbs, R. Dosch, D. Wagner, M. C. Mullins, M. Granato and R. J. Balice-Gordon (2005). "Neuromuscular synaptogenesis in wild-type and mutant zebrafish." Dev Biol 285(2): 340-357.
- Park, Y., M. Fujioka, J. B. Jaynes and S. Datta (1998). "Drosophila homeobox gene eve enhances trol, an activator of neuroblast proliferation in the larval CNS." Dev Genet 23(3): 247-257.
- Park, Y., C. Ng and S. Datta (2003). "Induction of string rescues the neuroblast proliferation defect in trol mutant animals." Genesis 36(4): 187-195.

- Park, Y., C. Rangel, M. M. Reynolds, M. C. Caldwell, M. Johns, M. Nayak, C. J. Welsh, S. McDermott and S. Datta (2003). "Drosophila perlecan modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division." Dev Biol 253(2): 247-257.
- Patton, B. L. (2003). "Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses." J Neurocytol 32(5-8): 883-903.
- Patton, B. L., A. Y. Chiu and J. R. Sanes (1998). "Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft." Nature 393(6686): 698-701.
- Patton, B. L., J. M. Cunningham, J. Thyboll, J. Kortessmaa, H. Westerblad, L. Edstrom, K. Tryggvason and J. R. Sanes (2001). "Properly formed but improperly localized synaptic specializations in the absence of laminin alpha4." Nat Neurosci 4(6): 597-604.
- Peng, H. B., A. A. Ali, D. F. Daggett, H. Rauvala, J. R. Hassell and N. R. Smalheiser (1998). "The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction." Cell Adhes Commun 5(6): 475-489.
- Peng, H. B., H. Xie, S. G. Rossi and R. L. Rotundo (1999). "Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan." J Cell Biol 145(4): 911-921.
- Peters, M. F., M. E. Adams and S. C. Froehner (1997). "Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex." J Cell Biol 138(1): 81-93.
- Pirkanen, A., J. C. Kiefer and S. D. Hauschka (2000). "IGFs, insulin, Shh, bFGF, and TGF-beta1 interact synergistically to promote somite myogenesis in vitro." Dev Biol 224(2): 189-203.
- Porter, B. E., J. Weis and J. R. Sanes (1995). "A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin." Neuron 14(3): 549-559.
- Quiram, P. A., K. Ohno, M. Milone, M. C. Patterson, N. J. Pruitt, J. M. Brengman, S. M. Sine and A. G. Engel (1999). "Mutation causing congenital myasthenia reveals acetylcholine receptor beta/delta subunit interaction essential for assembly." J Clin Invest 104(10): 1403-1410.
- Riethmacher, D., E. Sonnenberg-Riethmacher, V. Brinkmann, T. Yamaai, G. R. Lewin and C. Birchmeier (1997). "Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor." Nature 389(6652): 725-730.
- Robitaille, R., M. L. Garcia, G. J. Kaczorowski and M. P. Charlton (1993). "Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release." Neuron 11(4): 645-655.
- Rodgers, K. D., T. Sasaki, A. Aszodi and O. Jacenko (2007). "Reduced perlecan in mice results in chondrodysplasia resembling Schwartz-Jampel syndrome." Hum Mol Genet 16(5): 515-528.
- Rogalski, T. M., E. J. Gilchrist, G. P. Mullen and D. G. Moerman (1995). "Mutations in the unc-52 gene responsible for body wall muscle defects in adult Caenorhabditis elegans are located in alternatively spliced exons." Genetics 139(1): 159-169.
- Rogalski, T. M., G. P. Mullen, J. A. Bush, E. J. Gilchrist and D. G. Moerman (2001). "UNC-52/perlecan isoform diversity and function in Caenorhabditis elegans." Biochem Soc Trans 29(Pt 2): 171-176.
- Rogalski, T. M., G. P. Mullen, M. M. Gilbert, B. D. Williams and D. G. Moerman (2000). "The UNC-112 gene in Caenorhabditis elegans encodes a novel component of cell-matrix adhesion structures required for integrin localization in the muscle cell membrane." J Cell Biol 150(1): 253-264.
- Rogalski, T. M., B. D. Williams, G. P. Mullen and D. G. Moerman (1993). "Products of the unc-52 gene in Caenorhabditis elegans are homologous to the core protein of the mammalian basement membrane heparan sulfate proteoglycan." Genes Dev 7(8): 1471-1484.

- Rossi, M., H. Morita, R. Sormunen, S. Airene, M. Kreivi, L. Wang, N. Fukai, B. R. Olsen, K. Tryggvason and R. Soininen (2003). "Heparan sulfate chains of perlecan are indispensable in the lens capsule but not in the kidney." Embo J 22(2): 236-245.
- Rossi, S. G. and R. L. Rotundo (1996). "Transient interactions between collagen-tailed acetylcholinesterase and sulfated proteoglycans prior to immobilization on the extracellular matrix." J Biol Chem 271(4): 1979-1987.
- Rotundo, R. L., S. G. Rossi, L. M. Kimbell, C. Ruiz and E. Marrero (2005). "Targeting acetylcholinesterase to the neuromuscular synapse." Chem Biol Interact 157-158: 15-21.
- Ruppert, R., E. Hoffmann and W. Sebald (1996). "Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity." Eur J Biochem 237(1): 295-302.
- Sabourin, L. A. and M. A. Rudnicki (2000). "The molecular regulation of myogenesis." Clin Genet 57(1): 16-25.
- Sanes, J. R. (2003). "The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle." J Biol Chem 278(15): 12601-12604.
- Sanes, J. R., E. Engvall, R. Butkowski and D. D. Hunter (1990). "Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere." J Cell Biol 111(4): 1685-1699.
- Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (1999). "Development of the vertebrate neuromuscular junction." Annu Rev Neurosci 22: 389-442.
- Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (2001). "Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus." Nat Rev Neurosci 2(11): 791-805.
- Sasaki, T., M. Costell, K. Mann and R. Timpl (1998). "Inhibition of glycosaminoglycan modification of perlecan domain I by site-directed mutagenesis changes protease sensitivity and laminin-1 binding activity." FEBS Lett 435(2-3): 169-172.
- Sasaki, T., H. Larsson, D. Tisi, L. Claesson-Welsh, E. Hohenester and R. Timpl (2000). "Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity." J Mol Biol 301(5): 1179-1190.
- Schaeffer, L., A. de Kerchove d'Exaerde and J. P. Changeux (2001). "Targeting transcription to the neuromuscular synapse." Neuron 31(1): 15-22.
- Schmidt, C., A. Abicht, K. Krampf, W. Voss, R. Stucka, G. Mildner, S. Petrova, U. Schara, W. Mortier, J. Bufler, A. Huebner and H. Lochmuller (2003). "Congenital myasthenic syndrome due to a novel missense mutation in the gene encoding choline acetyltransferase." Neuromuscul Disord 13(3): 245-251.
- Schulze, B., K. Mann, R. Battistutta, H. Wiedemann and R. Timpl (1995). "Structural properties of recombinant domain III-3 of perlecan containing a globular domain inserted into an epidermal-growth-factor-like motif." Eur J Biochem 231(3): 551-556.
- Schulze, B., T. Sasaki, M. Costell, K. Mann and R. Timpl (1996). "Structural and cell-adhesive properties of three recombinant fragments derived from perlecan domain III." Matrix Biol 15(5): 349-357.
- Schwartz, N. B. and M. Domowicz (2002). "Chondrodysplasias due to proteoglycan defects." Glycobiology 12(4): 57R-68R.
- Schwartz, O. and R. S. Jampel (1962). "Congenital blepharophimosis associated with a unique generalized myopathy." Arch Ophthalmol 68: 52-57.
- Sermet-Gaudelus, I., M. Renouil, A. Fajac, L. Bidou, B. Parbaille, S. Pierrot, N. Davy, E. Bismuth, P. Reinert, G. Lenoir, J. F. Lesure, J. P. Rousset and A. Edelman (2007). "In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study." BMC Med 5: 5.

- Shiao, T., A. Fond, B. Deng, M. Wehling-Henricks, M. E. Adams, S. C. Froehner and J. G. Tidball (2004). "Defects in neuromuscular junction structure in dystrophic muscle are corrected by expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscles, but not in muscles lacking alpha- and beta1-syntrophins." Hum Mol Genet 13(17): 1873-1884.
- Smirnov, S. P., P. Barzaghi, K. K. McKee, M. A. Ruegg and P. D. Yurchenco (2005). "Conjugation of LG domains of agrins and perlecan to polymerizing laminin-2 promotes acetylcholine receptor clustering." J Biol Chem 280(50): 41449-41457.
- Smith, S. M., L. A. West, P. Govindraj, X. Zhang, D. M. Ornitz and J. R. Hassell (2007). "Heparan and chondroitin sulfate on growth plate perlecan mediate binding and delivery of FGF-2 to FGF receptors." Matrix Biol 26(3): 175-184.
- Soreq, H. and S. Seidman (2001). "Acetylcholinesterase--new roles for an old actor." Nat Rev Neurosci 2(4): 294-302.
- Spartz, A. K., R. K. Herman and J. E. Shaw (2004). "SMU-2 and SMU-1, *Caenorhabditis elegans* homologs of mammalian spliceosome-associated proteins RED and fSAP57, work together to affect splice site choice." Mol Cell Biol 24(15): 6811-6823.
- Spike, C. A., A. G. Davies, J. E. Shaw and R. K. Herman (2002). "MEC-8 regulates alternative splicing of *unc-52* transcripts in *C. elegans* hypodermal cells." Development 129(21): 4999-5008.
- Spike, C. A., J. E. Shaw and R. K. Herman (2001). "Analysis of *smu-1*, a gene that regulates the alternative splicing of *unc-52* pre-mRNA in *Caenorhabditis elegans*." Mol Cell Biol 21(15): 4985-4995.
- Spranger, J., B. D. Hall, B. Hane, A. Srivastava and R. E. Stevenson (2000). "Spectrum of Schwartz-Jampel syndrome includes micromelic chondrodysplasia, kyphomelic dysplasia, and Burton disease." Am J Med Genet 94(4): 287-295.
- Steen, M. S. and S. C. Froehner (2003). "PerleCan fix your muscle AChEs." Trends Neurosci 26(5): 241-242.
- Stringer, S. E. and J. T. Gallagher (1997). "Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate." J Biol Chem 272(33): 20508-20514.
- SundarRaj, N., D. Fite, S. Ledbetter, S. Chakravarti and J. R. Hassell (1995). "Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment." J Cell Sci 108 (Pt 7): 2663-2672.
- Talts, J. F., Z. Andac, W. Gohring, A. Brancaccio and R. Timpl (1999). "Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins." Embo J 18(4): 863-870.
- Talts, J. F., A. Pfeifer, F. Hofmann, E. B. Hunziker, X. H. Zhou, A. Aszodi and R. Fassler (1998). "Endochondral ossification is dependent on the mechanical properties of cartilage tissue and on intracellular signals in chondrocytes." Ann N Y Acad Sci 857: 74-85.
- Taniguchi, M., H. Kurahashi, S. Noguchi, T. Fukudome, T. Okinaga, T. Tsukahara, Y. Tajima, K. Ozono, I. Nishino, I. Nonaka and T. Toda (2006). "Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in alpha-dystroglycanopathies." Hum Mol Genet 15(8): 1279-1289.
- Tansey, M. G., G. C. Chu and J. P. Merlie (1996). "ARIA/HRG regulates AChR epsilon subunit gene expression at the neuromuscular synapse via activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/MAPK pathway." J Cell Biol 134(2): 465-476.
- Taylor, R. G., R. B. Layzer, H. S. Davis and W. M. Fowler, Jr. (1972). "Continuous muscle fiber activity in the Schwartz-Jampel syndrome." Electroencephalogr Clin. Neurophysiol. 33(5): 497-509.

- Terpstra, L., J. Prud'homme, A. Arabian, S. Takeda, G. Karsenty, S. Dedhar and R. St-Arnaud (2003). "Reduced chondrocyte proliferation and chondrodysplasia in mice lacking the integrin-linked kinase in chondrocytes." J Cell Biol 162(1): 139-148.
- Tiedemann, K., T. Sasaki, E. Gustafsson, W. Gohring, B. Batge, H. Notbohm, R. Timpl, T. Wedel, U. Schlotzer-Schrehardt and D. P. Reinhardt (2005). "Microfibrils at basement membrane zones interact with perlecan via fibrillin-1." J Biol Chem 280(12): 11404-11412.
- Timpl, R. (1993). "Proteoglycans of basement membranes." Experientia 49(5): 417-428.
- Timpl, R., T. Sasaki, G. Kostka and M. L. Chu (2003). "Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins." Nat Rev Mol Cell Biol 4(6): 479-489.
- Trachtenberg, J. T. and W. J. Thompson (1997). "Nerve terminal withdrawal from rat neuromuscular junctions induced by neuregulin and Schwann cells." J Neurosci 17(16): 6243-6255.
- Trinidad, J. C., G. D. Fischbach and J. B. Cohen (2000). "The Agrin/MuSK signaling pathway is spatially segregated from the neuregulin/ErbB receptor signaling pathway at the neuromuscular junction." J Neurosci 20(23): 8762-8770.
- Tsen, G., W. Halfter, S. Kroger and G. J. Cole (1995). "Agrin is a heparan sulfate proteoglycan." J Biol Chem 270(7): 3392-3399.
- Tsujino, A., C. Maertens, K. Ohno, X. M. Shen, T. Fukuda, C. M. Harper, S. C. Cannon and A. G. Engel (2003). "Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel." Proc Natl Acad Sci U S A 100(12): 7377-7382.
- Tu, H., T. Sasaki, A. Snellman, W. Gohring, P. Pirila, R. Timpl and T. Pihlajaniemi (2002). "The type XIII collagen ectodomain is a 150-nm rod and capable of binding to fibronectin, nidogen-2, perlecan, and heparin." J Biol Chem 277(25): 23092-23099.
- Villar, M. J., J. R. Hassell and E. Brandan (1999). "Interaction of skeletal muscle cells with collagen type IV is mediated by perlecan associated with the cell surface." J Cell Biochem 75(4): 665-674.
- Vischer, P., K. Feitsma, P. Schon and W. Volker (1997). "Perlecan is responsible for thrombospondin 1 binding on the cell surface of cultured porcine endothelial cells." Eur J Cell Biol 73(4): 332-343.
- Voigt, A., R. Pflanz, U. Schafer and H. Jackle (2002). "Perlecan participates in proliferation activation of quiescent Drosophila neuroblasts." Dev Dyn 224(4): 403-412.
- Welch, E. M., E. R. Barton, J. Zhuo, Y. Tomizawa, W. J. Friesen, P. Trifillis, S. Paushkin, M. Patel, C. R. Trotta, S. Hwang, R. G. Wilde, G. Karp, J. Takasugi, G. Chen, S. Jones, H. Ren, Y. C. Moon, D. Corson, A. A. Turpoff, J. A. Campbell, M. M. Conn, A. Khan, N. G. Almstead, J. Hedrick, A. Mollin, N. Risher, M. Weetall, S. Yeh, A. A. Branstrom, J. M. Colacino, J. Babiak, W. D. Ju, S. Hirawat, V. J. Northcutt, L. L. Miller, P. Spatrack, F. He, M. Kawana, H. Feng, A. Jacobson, S. W. Peltz and H. L. Sweeney (2007). "PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations." Nature 447(7140): 87-91.
- Welch, W. J. (2004). "Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding." Semin Cell Dev Biol 15(1): 31-38.
- Westvik, J. and R. S. Lachman (1998). "Coronal and sagittal clefts in skeletal dysplasias." Pediatr Radiol 28(10): 764-770.
- Whitelock, J. M., L. D. Graham, J. Melrose, A. D. Murdoch, R. V. Iozzo and P. A. Underwood (1999). "Human perlecan immunopurified from different endothelial cell sources has different adhesive properties for vascular cells." Matrix Biol 18(2): 163-178.
- Whitelock, J. M., A. D. Murdoch, R. V. Iozzo and P. A. Underwood (1996). "The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast

- growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases." J Biol Chem 271(17): 10079-10086.
- Witzemann, V., H. Schwarz, M. Koenen, C. Berberich, A. Villarroel, A. Wernig, H. R. Brenner and B. Sakmann (1996). "Acetylcholine receptor epsilon-subunit deletion causes muscle weakness and atrophy in juvenile and adult mice." Proc Natl Acad Sci U S A 93(23): 13286-13291.
- Xiao, Z. C., D. S. Ragsdale, J. D. Malhotra, L. N. Mattei, P. E. Braun, M. Schachner and L. L. Isom (1999). "Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits." J Biol Chem 274(37): 26511-26517.
- Xie, W., J. A. Stribley, A. Chatonnet, P. J. Wilder, A. Rizzino, R. D. McComb, P. Taylor, S. H. Hinrichs and O. Lockridge (2000). "Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase." J Pharmacol Exp Ther 293(3): 896-902.
- Xu, Y., Y. J. Liu and Q. Yu (2004). "Angiopoietin-3 is tethered on the cell surface via heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem 279(39): 41179-41188.
- Yang, D., J. Bierman, Y. S. Tarumi, Y. P. Zhong, R. Rangwala, T. M. Proctor, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, J. H. Miner, L. S. Sherman, B. G. Gold and B. L. Patton (2005). "Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8." J Cell Biol 168(4): 655-666.
- Yang, J. F., G. Cao, S. Koirala, L. V. Reddy and C. P. Ko (2001). "Schwann cells express active agrin and enhance aggregation of acetylcholine receptors on muscle fibers." J Neurosci 21(24): 9572-9584.
- Yang, W., R. R. Gomes, A. J. Brown, A. R. Burdett, M. Alicknavitch, M. C. Farach-Carson and D. D. Carson (2006). "Chondrogenic differentiation on perlecan domain I, collagen II, and bone morphogenetic protein-2-based matrices." Tissue Eng 12(7): 2009-2024.
- Yang, W. D., R. R. Gomes, Jr., M. Alicknavitch, M. C. Farach-Carson and D. D. Carson (2005). "Perlecan domain I promotes fibroblast growth factor 2 delivery in collagen I fibril scaffolds." Tissue Eng 11(1-2): 76-89.
- Yurchenco, P. D., P. S. Amenta and B. L. Patton (2004). "Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens." Matrix Biol 22(7): 521-538.
- Yurchenco, P. D., Y. S. Cheng and G. C. Ruben (1987). "Self-assembly of a high molecular weight basement membrane heparan sulfate proteoglycan into dimers and oligomers." J Biol Chem 262(36): 17668-17676.
- Zhou, H., D. J. Glass, G. D. Yancopoulos and J. R. Sanes (1999). "Distinct domains of MuSK mediate its abilities to induce and to associate with postsynaptic specializations." J Cell Biol 146(5): 1133-1146.
- Zhou, Z., J. Wang, R. Cao, H. Morita, R. Soininen, K. M. Chan, B. Liu, Y. Cao and K. Tryggvason (2004). "Impaired angiogenesis, delayed wound healing and retarded tumor growth in perlecan heparan sulfate-deficient mice." Cancer Res 64(14): 4699-4702.
- Zimmerman, G. and H. Soreq (2006). "Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission." Cell Tissue Res 326(2): 655-669.

ANNEXES

ANNEXES

Publication :

Fournier E, Franques J, Bauché S, Bernard V, Stum M, Davoine CS, Fardeau M, Fontaine B, Hantai D, Tranchant C, Koenig J, Eymard B, Nicole S. *Evidence of acetylcholinesterase deficiency at the neuromuscular junction without consequences on synaptic transmission in Schwartz-Jampel disease*. En préparation.

Stum M, Davoine CS, Fontaine B, Nicole S. *Schwartz-Jampel syndrome and perlecan deficiency*; Acta Myologica Oct;24(2):89-92.

Chapitre d'ouvrage :

Nicole S, Stum M, Fontaine B. *Perlecan: Schwartz-Jampel syndrome (SJS, MIM 255800) and dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type (DDSH, MIM 224410)*. Epstein C, Erickson R and Wynshaw-Boris A, editors. Molecular basis of inborn errors of development. Vol 1: Oxford University Press, sous presse.

Communications écrites:

Stum M, Marques H, Fontaine B, Nicole S, *Perlecan deficiency leads to abnormal neuromuscular junctions in a mouse model of Schwartz-Jampel syndrome*, Society For Neuroscience meeting, Atlanta, Georgia, USA (Octobre 2006)

Stum M, Davoine CS, Vicart S, Guillot-Noël L, Quan PC, Fontaine B, Nicole S. *Spectrum and functional analyses of HSPG2 (perlecan) mutations in Schwartz-Jampel Syndrome : Perlecan Deficiency as a Cause of Severe Myotonia*. European Human Genetics Conference Amsterdam, Netherlands (Mai 2006)

Stum M, Davoine CS, Vicart S, Guillot-Noël L, Quan PC, Fontaine B, Nicole S. *Syndrome de Schwartz-Jampel: analyse moléculaire et clinique d'une large série de patients*. 3èmes assises de Génétique Humaine et Médicale, Montpellier, France (Janvier 2006)

Stum M, Marques H, Fontaine B, Nicole S, *Développement d'un modèle murin du syndrome de Schwartz-Jampel*, Colloque GIS-Institut des maladies rares, Paris, France (Mai 2005)

Stum M, Girard E, Davoine CS, Molgo J, Tabti N, Willer JC, Fontaine B, Krejci E, Nicole S, *Generation of a mouse model for Schwartz-Jampel syndrome: role of perlecan in neuromuscular junction formation and/or maintenance*, Myology 2005 meeting, Nantes, France (Mai 2005)

Stum M, Girard E, Molgo J, Tabti N, Willer JC, Fontaine B, Krejci E, Nicole S, *Generation of a mouse model for Schwartz-Jampel Syndrome*, Conférences en neurobiologie Ladislav Tauc, Gif-sur-Yvette, France (Décembre 2004)

Communication orale:

Stum M, Girard E, Bernard V, Bauché S, Bangratz M, Davoine CS, Fournier E, Tabti N, Willer JC, Eymard B, Fontaine B, Hantai D, Koenig J, Molgó J, Krejci E, Nicole S, *Acetylcholinesterase deficiency with neuromuscular junction remodeling in a mouse model of Schwartz-Jampel syndrome*, European Human Genetics Conference Nice, France (Juin 2007)

I. Article III en préparation

**Evidence of acetylcholinesterase deficiency at the
neuromuscular junction without consequences on synaptic
transmission in Schwartz-Jampel disease**

Fournier E, Franques J, Bauché S, Bernard V, Stum M, Davoine CS, Fardeau M, Fontaine B,
Hantai D, Tranchant C, Koenig J, Eymard B, Nicole S.

En préparation

II. Revue I

Schwartz-Jampel syndrome and perlecan deficiency

Stum M, Davoine CS, Fontaine B, Nicole S.

Acta Myologica (Oct 2005);24(2):89-92.

III. Revue II

**Schwartz-Jampel syndrome (SJS, MIM 255800) and
dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type
(DDSH, MIM 224410)**

Nicole S, Stum M, Fontaine B.

Epstein C, Erickson R and Wynshaw-Boris A, editors. Molecular basis of inborn errors of development. Vol 1: Oxford University Press.
Sous presse.