

Université de Montréal

Plasticité présynaptique et gliale à long-terme
en réponse à un changement chronique de l'activité synaptique,
à la jonction neuromusculaire d'amphibien

par
Eve-Lyne Bélair

Département de physiologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *philosophiæ doctor*
en sciences neurologiques

Septembre, 2008

© Eve-Lyne Bélair, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Plasticité présynaptique et gliale à long-terme
en réponse à un changement chronique de l'activité synaptique,
à la jonction neuromusculaire d'amphibien

présentée par :
Eve-Lyne Bélair

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Claude Lacaille
président-rapporteur

Richard Robitaille
directeur de recherche

Vincent Castellucci
membre du jury

Paul De Koninck
examineur externe

Et un représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

La plasticité synaptique est une importante propriété du système nerveux, impliquée dans l'intégration de l'information. Cette plasticité a généralement été décrite par des changements aux niveaux pré et postsynaptiques. Notamment, l'efficacité présynaptique, soit la probabilité de libération de neurotransmetteurs associée au contenu quantique d'une synapse, peut être augmentée ou diminuée selon l'activité antérieure de la synapse. Malgré cette caractérisation, les mécanismes à l'origine de la détermination de l'efficacité présynaptique demeurent obscurs. Également, la plasticité synaptique reste encore mal définie au niveau glial, limitant, de ce fait, notre compréhension de l'intégration de l'information. Pourtant, la dernière décennie a mené à une redéfinition du rôle des cellules gliales. Autrefois reléguées à un rôle de support passif aux neurones, elles sont désormais reconnues comme étant impliquées dans la régulation de la neurotransmission. Notamment, à la jonction neuromusculaire (JNM), les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs) sont reconnues pour moduler l'efficacité présynaptique et les phénomènes de plasticité. Un tel rôle actif dans la modulation de la neurotransmission implique cependant que les CSPs soient en mesure de s'adapter aux besoins changeants des JNMs auxquelles elles sont associées. La plasticité synaptique devrait donc sous-tendre une forme de plasticité gliale.

Nous savons, en effet, que la JNM est capable de modifications tant morphologiques que physiologiques en réponse à des altérations de l'activité synaptique. Par exemple, la stimulation chronique des terminaisons nerveuses entraîne une diminution persistante de l'efficacité présynaptique et une augmentation de la résistance à la dépression. À l'opposé, le blocage chronique des récepteurs nicotiques entraîne une augmentation prolongée de l'efficacité présynaptique. Aussi, compte tenu que les CSPs détectent et répondent à la neurotransmission et qu'elles réagissent à certains stimuli environnementaux par des changements morphologiques, physiologiques et d'expression génique, nous proposons que le changement d'efficacité présynaptique imposé à la synapse, soit par une stimulation nerveuse chronique ou par blocage chronique des récepteurs nicotiques, résulte en une

adaptation des propriétés des CSPs. Cette thèse propose donc d'étudier, en parallèle, la plasticité présynaptique et gliale à long-terme, en réponse à un changement chronique de l'activité synaptique, à la JNM d'amphibien.

Nos résultats démontrent les adaptations présynaptiques de l'efficacité présynaptique, des phénomènes de plasticité à court-terme, du contenu mitochondrial et de la signalisation calcique. De même, ils révèlent différentes adaptations gliales, notamment au niveau de la sensibilité des CSPs aux neurotransmetteurs et des propriétés de leur réponse calcique. Les adaptations présynaptiques et gliales sont discutées, en parallèle, en termes de mécanismes et de fonctions possibles dans la régulation de la neurotransmission. Nos travaux confirment donc la coïncidence de la plasticité présynaptique et gliale et, en ce sens, soulèvent l'importance des adaptations gliales pour le maintien de la fonction synaptique.

MOTS CLÉS :

1. Cellule de Schwann périssynaptique
2. Jonction neuromusculaire
3. Plasticité synaptique
4. Dépression synaptique
5. Potentialisation post-tétanique
6. Mitochondries
7. Frequenine
8. Stimulation nerveuse chronique
9. Blocage chronique des récepteurs nicotiniques
10. Imagerie calcique

ABSTRACT AND KEYWORDS

Synaptic plasticity is a major property of the nervous system, believed to be at the basis of neuronal information processing. This plasticity has been generally described with pre and postsynaptic adaptations. Notably, presynaptic efficacy, referring to the probability of transmitter release associated with the quantal content of a synapse, can be increased or decreased according to the previous history of synapses. Despite this characterization, the mechanisms implicated in the activity-dependent determination of synaptic efficacy remain unknown. Moreover, synaptic plasticity has never been described in terms of glial adaptations, thus limiting our comprehension of neuronal information processing. Nevertheless, the past decade has led to a redefinition of glial cells functions. Relegated to a passive role of neuronal support in the past, glial cells are now known to be involved in the regulation of neurotransmission. For instance, at the neuromuscular junction (NMJ), perisynaptic Schwann cells (PSCs) are believed to modulate synaptic efficacy and plasticity. Such an active role requires, however, that PSCs adapt to the changing needs of NMJs. Thus, synaptic plasticity must underlie glial plasticity.

At the NMJ, changes in synaptic activity result in several morphological and physiological adaptations. Among others, chronic nerve stimulation was shown to decrease synaptic efficacy and short-term depression. Conversely, chronic blockade of postsynaptic nicotinic receptors increases synaptic efficacy. Given that PSCs can detect and respond to neurotransmission with a calcium elevation and that they react to environmental stimuli with morphological, physiological and gene expression adaptations, we propose that prolonged changes in synaptic efficacy, induced by chronic nerve stimulation or chronic blockade of nicotinic receptors, would lead to PSCs adaptations. Thus, in this thesis, we studied, in parallel, long-term presynaptic and glial plasticity, in response to chronic changes in synaptic activity, at the amphibian NMJ.

Our results show presynaptic adaptations of synaptic efficacy, short-term plasticity, mitochondrial content and calcium signalling. They also reveal several adaptations of PSCs, related to their sensitivity to neurotransmitters and their calcium responses properties. These presynaptic and glial adaptations are discussed, in parallel, in terms of possible mechanisms and functions in the regulation of neurotransmission. Our work also confirms the coincidence of presynaptic and glial plasticity and, therefore, raises the importance of glial adaptations for the maintenance of synaptic function.

KEY WORDS :

1. Perisynaptic Schwann cell
2. Neuromuscular junction
3. Synaptic plasticity
4. Synaptic depression
5. Post-tetanic potentiation
6. Mitochondria
7. Frequentin
8. Chronic nerve stimulation
9. Chronic blockade of nicotinic receptors
10. Calcium imaging

TABLE DES MATIÈRES

1. CHAPITRE PREMIER	1
1.1. PRÉAMBULE	1
1.1.1. LA DOCTRINE NEURONALE	1
1.1.2. ÉVOLUTION DU CONCEPT INTERACTIONS SYNAPSE-GLIE	3
1.1.2.1. HOMÉOSTASIE DU MILIEU EXTRACELLULAIRE	3
1.1.2.2. RÉCEPTEURS GLIAUX ET DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ NEURONALE	4
1.1.2.3. CANAUX IONIQUES	5
1.1.2.4. INTERACTIONS MÉTABOLIQUES	6
1.1.2.5. RÉPONSES CALCIFIQUES	7
1.1.2.6. INTERACTIONS PENDANT LE DÉVELOPPEMENT	8
1.1.2.7. MODULATION DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE ET DE LA PLASTICITÉ	9
1.1.3. LA SYNAPSE TRIPARTITE	11
1.2. LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE	14
1.2.1. TERMINAISON NERVEUSE DU NEURONE MOTEUR	15
1.2.2. FIBRE MUSCULAIRE	15
1.2.3. CELLULE DE SCHWANN PÉRISYNAPTICQUE	16
1.2.4. FONCTION DE LA JNM	17
1.2.4.1. FACTEUR DE SÉCURITÉ	18
1.2.4.2. DÉTERMINANT PRÉSYPNTICQUE DU FACTEUR DE SÉCURITÉ	19
1.2.4.2.1. EFFICACITÉ PRÉSYPNTICQUE	Erreur ! Signet non défini.
1.2.4.2.1.1. FACTEURS DÉTERMINANT L'EFFICACITÉ PRÉSYPNTICQUE	21
1.2.4.2.1.1.1. TAILLE DE LA TERMINAISON NERVEUSE	21
1.2.4.2.1.1.2. ULTRASTRUCTURE DES ZONES ACTIVES	21
1.2.4.2.1.1.2.1. Longueur de la zone active	22
1.2.4.2.1.1.2.2. Arrangement des particules transmembranaires	24
1.2.4.2.1.1.2.3. Densité des vésicules synaptiques	25
1.2.4.2.1.1.3. CONTENU EN ACH DES VÉSICULES SYNAPTICQUES	29
1.2.4.2.1.1.4. DENSITÉ DES MITOCHONDRIES	29
1.2.4.2.1.1.5. HOMÉOSTASIE DU CALCIUM	31
1.2.4.2.1.1.5.1. Influx de calcium	31
1.2.4.2.1.1.5.2. Chélation du calcium	33
1.2.4.2.1.1.5.3. Sensibilité au calcium	33
1.2.4.2.1.1.5.3.1. Frequentine	37
1.2.4.2.1.1.5.4. Séquestration et extrusion du calcium	37
1.2.4.2.1.1.5.4.1. Échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et pompes calciques ATPases	38
1.2.4.2.1.1.5.4.2. Réticulum endoplasmique lisse	38
1.2.4.2.1.1.5.4.3. Mitochondries	39
1.2.4.2.1.1.5.5. Mobilisation du calcium	40
1.2.4.2.1.2. MODULATION À COURT TERME DE L'EFFICACITÉ PRÉSYPNTICQUE	42
1.2.4.2.1.2.1. FACILITATION	42
1.2.4.2.1.2.2. AUGMENTATION ET PTP	44
1.2.4.2.1.2.3. DÉPRESSION	47
1.2.4.2.1.2.4. MODULATION CHOLINERGICQUE	49
1.2.4.2.1.2.5. MODULATION PURINERGICQUE	50
1.2.4.2.1.2.6. MODULATION PEPTIDERGICQUE	52
1.2.4.3. DÉTERMINANTS POSTSYNAPTICQUES DU FACTEUR DE SÉCURITÉ	53

1.2.4.3.1. ACÉTYLCHOLINESTÉRISE	53
1.2.4.3.2. DENSITÉ, DISTRIBUTION ET SENSIBILITÉ DES NACHRS	54
1.2.4.3.3. CANAUX Na^+ -VOLTAGE DÉPENDANTS	56
1.2.4.3.4. AUTRES PROPRIÉTÉS DE LA FIBRE MUSCULAIRE	57
1.2.4.4. MODULATION GLIALE DU FACTEUR DE SÉCURITÉ	58
1.2.4.4.1.1. SYNOPSIS	61
1.2.4.4.1.2. INTRODUCTION	62
1.2.4.4.1.3. AN ADVANTAGEOUS POSITION	62
1.2.4.4.1.4. DETECTORS OF SYNAPTIC TRANSMISSION	62
1.2.4.4.1.4.1. A COCKTAIL OF PRESYNAPTICALLY RELEASED MOLECULES	62
1.2.4.4.1.4.2. A VARIETY OF RECEPTORS	63
1.2.4.4.1.4.3. AN EVOLUTIONARILY CONSERVED PROPERTY	64
1.2.4.4.1.4.4. ADAPTED Ca^{2+} RESPONSES	64
1.2.4.4.1.4.5. PRESENCE OF VOLTAGE-GATED ION CHANNELS	65
1.2.4.4.1.5. MODULATORS OF SYNAPTIC TRANSMISSION	66
1.2.4.4.1.5.1. G-PROTEIN SIGNALLING	66
1.2.4.4.1.5.2. CALCIUM SIGNALLING	69
1.2.4.4.1.5.3. GLUTAMATE CARBOXYPEPTIDASE II	73
1.2.4.4.1.6. PUTATIVE GLIOTRANSMITTERS	76
1.2.4.4.1.6.1. POSSIBLE MEDIATORS OF SYNAPTIC DEPRESSION	76
1.2.4.4.1.6.1.1. Nitric oxide	76
1.2.4.4.1.6.1.2. Glutamate	76
1.2.4.4.1.6.1.3. Endocannabinoids	77
1.2.4.4.1.6.1.4. Arachidonic acid	77
1.2.4.4.1.6.2. POSSIBLE MEDIATORS OF SYNAPTIC POTENTIATION	78
1.2.4.4.1.6.2.1. Prostaglandins	78
1.2.4.4.1.6.2.2. neurotrophic factors: BDNF	78
1.2.4.4.1.7. LONG-TERM MODULATION BY PSCS	79
1.2.4.4.1.8. CONCLUSION	80
1.2.4.4.1.9. FURTHER READING	81
1.2.4.5. PLASTICITÉ À LONG-TERME DU FACTEUR DE SÉCURITÉ	83
1.2.4.5.1. DIMINUTION CHRONIQUE DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE	83
1.2.4.5.1.1. DÉNERVATION	83
1.2.4.5.1.2. BLOCAGE DE LA LIBÉRATION VÉSICULAIRE : TOXINE BOTULINIQUE	84
1.2.4.5.1.3. BLOCAGE DES CANAUX Na^+ VOLTAGE-DÉPENDANTS : TTX ET ANESTHÉSIEQUES LOCAUX	84
1.2.4.5.1.4. DÉCOUPLAGE DE L'EXCITATION ET DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE : FORMAMIDE	84
1.2.4.5.1.5. BLOCAGE DES NACHRS : CURARE ET α -BUNGAROTOXINE	85
1.2.4.5.1.6. PHÉNOTYPES COMMUNS	85
1.2.4.5.1.6.1. DÉTERMINANT PRÉSYPNTIQUE DU FACTEUR DE SÉCURITÉ	86
1.2.4.5.1.6.1.1. Efficacité présynaptique	Erreur ! Signet non défini.
1.2.4.5.1.6.1.1.1. Taille de la terminaison nerveuse	88
1.2.4.5.1.6.1.1.2. Ultrastructure de la terminaison nerveuse	90
1.2.4.5.1.6.1.1.3. Homéostasie du calcium	91
1.2.4.5.1.6.2. DÉTERMINANTS POSTSYNAPTQUES DU FACTEUR DE SÉCURITÉ	93
1.2.4.5.1.6.2.1. AChE	93
1.2.4.5.1.6.2.2. nAChRs	93
1.2.4.5.1.6.2.3. Canaux Na^+ voltage-dépendants	96
1.2.4.5.1.6.2.4. Diamètre des fibres musculaires	96
1.2.4.5.1.6.3. DÉTERMINANT GLIAL DU FACTEUR DE SÉCURITÉ	97

1.2.4.5.2. AUGMENTATION CHRONIQUE DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE	99
1.2.4.5.2.1. PHÉNOTYPES COMMUNS	99
1.2.4.5.2.1.1. DÉTERMINANT PRÉSYPNAPTIQUE DU FACTEUR DE SÉCURITÉ	99
1.2.4.5.2.1.1.1. Efficacité présynaptique	Erreur ! Signet non défini.
<i>1.2.4.5.2.1.1.1.1. Taille de la terminaison nerveuse</i>	103
<i>1.2.4.5.2.1.1.1.2. Ultrastructure des zones actives</i>	103
<i>1.2.4.5.2.1.1.1.3. Homéostasie du Ca²⁺</i>	104
1.2.4.5.2.1.2. DÉTERMINANTS POSTSYNAPTQUES DU FACTEUR DE SÉCURITÉ	105
1.2.4.5.2.1.2.1. AChE	105
1.2.4.5.2.1.2.2. Protéines musculaires	105
1.2.4.5.2.1.3. DÉTERMINANT GLIAL DU FACTEUR DE SÉCURITÉ	107
1.3. BUTS DE LA THÈSE	108
1.3.1. MODÈLE EXPÉRIMENTAL	108
1.3.2. OBJECTIFS	109

2. CHAPITRE DEUXIÈME **111**

2.1. PREMIER ARTICLE	111
2.1.1. INTRODUCTION DU PREMIER ARTICLE	111
2.1.2. TEXTE INTÉGRAL DU PREMIER ARTICLE	114
2.1.2.1. SUMMARY	115
2.1.2.2. INTRODUCTION	116
2.1.2.3. MATERIALS AND METHODS	118
2.1.2.3.1. ANIMALS	118
2.1.2.3.2. STIMULATING ELECTRODES	118
2.1.2.3.3. POSITIONNING OF STIMULATING ELECTRODES	118
2.1.2.3.4. CHRONIC <i>IN VIVO</i> STIMULATION	119
2.1.2.3.5. ELECTROPHYSIOLOGY	120
2.1.2.3.6. MEASURE OF NMJ LENGTH	122
2.1.2.3.7. IMMUNOHISTOCHEMISTRY FOR FREQUENIN	122
2.1.2.3.8. LABELLING OF MITOCHONDRIA	123
2.1.2.3.9. WESTERN BLOTTING	124
2.1.2.3.10. CALCIUM IMAGING OF NERVE TERMINALS	124
2.1.2.3.11. STATISTICAL ANALYSIS	126
2.1.2.4. RESULTS	126
2.1.2.4.1. CONDITIONNING	126
2.1.2.4.2. EFFECTS OF STIMULATION ON TRANSMITTER RELEASE PROBABILITY	127
2.1.2.4.3. EFFECTS OF STIMULATION ON SYNAPTIC DEPRESSION	132
2.1.2.4.4. EFFECTS OF STIMULATION ON MITOCHONDRIA	134
2.1.2.4.5. EFFECTS OF STIMULATION ON PRÉSYPNAPTIQUE CALCIUM HOMEOSTASIS	135
2.1.2.4.6. EFFECTS OF STIMULATION ON FREQUENIN EXPRESSION	141
2.1.2.5. DISCUSSION	143
2.1.2.5.1. MODIFICATION OF TRANSMITTER RELEASE AND PLASTICITY	143
2.1.2.5.2. MITOCHONDRIA	144
2.1.2.5.3. CALCIUM ENTRY AND HOMEOSTASIS	145
2.1.2.5.4. BUFFER AND REGULATORY PROTEINS	147
2.1.2.6. CONCLUSION	147
2.1.2.7. REFERENCE LIST	148
2.1.3.1. DÉVELOPPER UN MODÈLE DE STIMULATION CHRONIQUE <i>IN VIVO</i> CHEZ LA GRENOUILLE	157

<i>2.1.3.2. CARACTÉRISER LE MODÈLE DE STIMULATION EN TERMES DE CHANGEMENTS D'EFFICACITÉ PRÉSYPNAPTIQUE ET DE PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À COURT-TERME</i>	157
<i>2.1.3.3. VALIDER LES MÉCANISMES À L'ORIGINE DE LA DÉTERMINATION DE L'EFFICACITÉ PRÉSYPNAPTIQUE DE FAÇON DÉPENDANTE DE L'ACTIVITÉ</i>	158
2.1.4. CONCLUSION DU PREMIER ARTICLE	159
2.2. DEUXIÈME ARTICLE	160
2.2.1. INTRODUCTION DU DEUXIÈME ARTICLE	160
2.2.2. TEXTE INTÉGRAL DU DEUXIÈME ARTICLE	162
<i>2.2.2.1. SUMMARY</i>	163
<i>2.2.2.2. INTRODUCTION</i>	164
<i>2.2.2.3. METHODS</i>	165
2.2.2.3.1. ANIMALS	165
2.2.2.3.2. CHRONIC IN VIVO NERVE STIMULATION	165
2.2.2.3.3. CHRONIC IN VIVO α-BUNGAROTOXIN BLOCKADE OF NACHRS	166
2.2.2.3.4. ELECTROPHYSIOLOGY	166
2.2.2.3.5. CALCIUM IMAGING OF PSCS	167
2.2.2.3.6. STATISTICAL ANALYSIS	168
2.2.2.4. RESULTS	169
2.2.2.4.1. IN VIVO CONDITIONING	169
2.2.2.4.2. EFFECTS OF TREATMENTS ON SHORT-TERM PLASTICITY	169
2.2.2.4.3. EFFECTS OF TREATMENTS ON NERVE-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES	172
2.2.2.4.4. CHANGES IN TRANSMITTER RELEASE CANNOT ACCOUNT FOR CHANGES IN PSC CALCIUM RESPONSES	175
2.2.2.4.5. CHANGES IN ATP-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES	177
2.2.2.4.6. CHANGES IN MUSCARINE-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES	183
2.2.2.5. DISCUSSION	187
2.2.2.5.1. NATURE OF PSC ADAPTATIONS	187
2.2.2.5.2. PHYSIOLOGICAL RELEVANCE OF PSC ADAPTATIONS	189
2.2.2.5.3. MECHANISMS OF PSC ADAPTATIONS	189
2.2.2.5.4. ROLES OF CALCIUM RESPONSES IN PSCS	191
2.2.2.6. CONCLUSION	192
2.2.2.7. REFERENCES	193
2.2.3. DISCUSSION DU DEUXIÈME ARTICLE	198
<i>2.2.3.1. DÉVELOPPER UN MODÈLE DE BLOCAGE IN VIVO DES NACHRS</i>	198
<i>2.2.3.2. DÉTERMINER LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À COURT-TERME DES JNMs SOUMISES À UN CHANGEMENT CHRONIQUE DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE</i>	199
<i>2.2.3.3. CARACTÉRISER LES PROPRIÉTÉS GLIALES DANS LES JNMs SOUMISES À UN CHANGEMENT CHRONIQUE DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE</i>	199
2.2.4. CONCLUSION DU DEUXIÈME ARTICLE	202

3. DISCUSSION GÉNÉRALE **203**

3.1. ADAPTATIONS DES SIGNAUX CALCIQUES PRÉSYPNAPTIQUES ET GLIAUX EN RÉPONSE AUX CHANGEMENTS D'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE	203
3.1.1. ADAPTATIONS DU SIGNAL CALCIQUE PRÉSYPNAPTIQUE	204
<i>3.1.1.1. MITOCHONDRIES</i>	204
<i>3.1.1.2. LIEN ENTRE LE CALCIUM ET LA PHYSIOLOGIE DU NEURONE</i>	205
<i>3.1.1.3. TRANSDUCTEURS DU SIGNAL CALCIQUE</i>	206
3.1.1.3.1. FREQUENINE	206
3.1.1.3.2. CALMODULINE	206

3.1.1.3.3. CAMKII	207
3.1.1.3.3.1. DÉTERMINATION DE L'EFFICACITÉ PRÉSYPNAPTIQUE	208
3.1.1.3.3.2. RÉGULATION DES MITOCHONDRIES	209
3.1.1.3.3.3. DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE	209
3.1.2. ADAPTATIONS DU SIGNAL CALCIQUE GLIAL	211
3.1.2.1. MÉCANISMES DES ADAPTATIONS GLIALES	211
3.1.2.1.1. RÉCEPTEURS AUX NEUROTRANSMETTEURS	212
3.1.2.1.2. RÉCEPTEURS À L'IP ₃	214
3.1.2.1.3. MITOCHONDRIES	215
3.1.2.1.4. CALRÉTICULINE	215
3.1.2.1.5. ACCESSIBILITÉ AUX RÉSERVES CALCIQUES DES VOIES DE SIGNALISATION	216
3.1.2.1.6. MODULATION NEUROTROPHIQUE, PURINERGIQUE ET PEPTIDERGIQUE, DES RÉPONSES CALCIQUES GLIALES	217
3.1.2.1.6.1. NEUROTROPHINES	217
3.1.2.1.6.2. ADÉNOSINE	218
3.1.2.1.6.3. SUBSTANCE P	218
3.1.2.1.7. INTRUSION DES PROLONGEMENTS GLIAUX DANS LA FENTE SYNAPTIQUE	219
3.1.3. PARALLÈLE ENTRE LES ADAPTATIONS PRÉSYPNAPTIQUES ET GLIALES	220
3.1.3.1. MITOCHONDRIES	220
3.1.3.2. CAMK	222
3.1.3.2.1. ENCODAGE DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE DANS LES PROPRIÉTÉS DES RÉPONSES CALCIQUES GLIALES	222
3.2. HÉTÉROGÉNÉITÉ DES CSPS	223
3.2.1. SENSIBILITÉ AUX NEUROTRANSMETTEURS	223
3.2.2. DÉTERMINATION DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ MOLÉCULAIRE DES CSPS	225
3.2.3. RÉGULATION DES PROPRIÉTÉS GLIALES PAR L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE	227
3.2.4. POPULATIONS DE CSPS	228
3.3. RÔLE DES RÉPONSES CALCIQUES GLIALES	228
3.3.1. RÉGULATION DE LA LIBÉRATION DE NEUROTRANSMETTEURS	228
3.3.1.1. ÉQUILIBRE ENTRE LES MÉCANISMES DÉPRESSEURS ET POTENTIALISATEURS	230
3.3.1.2. L'ATP COMME GLIOTRANSMETTEUR	232
3.3.1.3. AUTRES GLIOTRANSMETTEURS	233
3.3.1.4. CONSÉQUENCES D'UNE ALTÉRATION DES RÉPONSES CALCIQUES GLIALES	233
3.3.2. VOIE PURINERGIQUE	234
L'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS PURINERGIQUES STIMULERAIT DIFFÉRENTES VOIES DE SIGNALISATION, IMPLIQUÉES NOTAMMENT DANS LA SYNTHÈSE ET LA LIBÉRATION DE PROSTAGLANDINES ET DE FACTEURS NEUROTROPHIQUES, CAPABLES DE MODULER LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE. CES VOIES DE SIGNALISATION SONT L'OBJET DES SECTIONS SUIVANTES.	234
3.3.2.1. SYNTHÈSE ET LIBÉRATION DE PROSTAGLANDINES	234
3.3.2.2. SYNTHÈSE ET LIBÉRATION DE NEUROTROPHINES	235
3.3.3. VOIE MUSCARINIQUE	238
3.4. SUCCESSION TEMPORELLE DES CHANGEMENTS SYNAPTIQUES DÉPENDANTS DE L'ACTIVITÉ	239
3.5. IMPLICATIONS CLINIQUES	240
4. CONCLUSIONS DE LA THÈSE	241
5. RÉFÉRENCES DE LA THÈSE	243

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE DEUXIÈME

PREMIER ARTICLE

Table 1. Effects of stimulation on transmitter release probability	131
--	-----

DEUXIÈME ARTICLE

Table 1. Effects of treatments on nerve-evoked PSC calcium responses	173
Table 2. Effects of treatments on PSC calcium responses evoked with maximal effective ATP concentration.....	178
Table 3. Effects of chronic nerve stimulation on PSC calcium responses evoked with sub-maximal effective ATP concentration.....	182
Table 4. Effect of treatments on calcium responses evoked, in highly sensitive PSCs, with sub-maximal effective muscarine concentration.....	185

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE PREMIER

Figure 1. Vision classique de la synapse chimique	2
Figure 2. Synapse tripartite	12
Figure 3. JNM de grenouille.....	14
Figure 4. CSPs à la JNM de grenouille	17
Figure 5. Organisation des sites de libération de neurotransmetteurs à la JNM de grenouille.....	20
Figure 6. Voies endocytotiques parallèles des vésicules rapidement mobilisables et des vésicules de réserve.....	28
Figure 7. Modèle d'interactions des SNAREs et de la synaptotagmine pendant l'exocytose.....	36

CHAPITRE TIRÉ DE ENCYCLOPEDIA OF NEUROSCIENCE

Figure 1. Injection of GTP γ S in PSCs depresses synaptic transmission.....	66
Figure 2. PSCs modulate endogenous high frequency depression.....	68
Figure 3. Potentiation of synaptic transmission by PSCs.....	71
Figure 4. Synaptic depression is modulated by PSCs	72
Figure 5. Schematic representation of synapse-glia interactions at the NMJ	75

CHAPITRE DEUXIÈME

PREMIER ARTICLE

Figure 1. Stimulating electrodes for chronic long-term conditioning in vivo.....	120
Figure 2. Effects of stimulation on the probability of transmitter release.....	130
Figure 3. Effects of stimulation on short-term plasticity : high frequency facilitation and depression	133
Figure 4. Effects of stimulation on mitochondria.....	135
Figure 5. Presynaptic calcium imaging	139
Figure 6. Simultaneous presynaptic calcium imaging and recording of synaptic transmission.....	140
Figure 7. Effects of stimulation on frequenin expression	142

DEUXIÈME ARTICLE

Figure 1. Effects of treatments on short-term plasticity: high frequency facilitation, depression and PTP	171
Figure 2. Effects of treatments on nerve-evoked PSC calcium responses	175
Figure 3. Model of transmitter release during 40 Hz, 30 s stimulation.....	176
Figure 4. Effects of treatments on PSC calcium responses evoked with maximal effective ATP concentration.....	180
Figure 5. Effects of chronic nerve stimulation on PSC calcium responses evoked with sub-maximal effective ATP concentration.....	183
Figure 6. Effect of treatments on muscarine-evoked PSC calcium responses	187

DISCUSSION DU DEUXIÈME ARTICLE

Figure 1. Modèle de blocage in vivo des nAChRs chez la grenouille	198
Figure 2. Modèle d'activation des CSPs en fonction de leur sensibilité.....	201

CHAPITRE TROISIÈME : DISCUSSION GÉNÉRALE

Figure 1. Contenu mitochondrial des CSPs.....	221
Figure 2. Aspect temporel de l'activation des CSPs par l'activité synaptique.....	224
Figure 3. Équilibre entre les mécanismes potentialisateurs et dépresseurs	231

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2-AG	2-arachidonoylglycérol
AA	acide arachidonique
ACh	acétylcholine
AChE	acétylcholinestérase
ACPD	acide (1S,3R)-aminocyclopentanedicarboxylique
ADP	adénosine diphosphate
AMP	adénosine monophosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
apoE	apolipoprotéine E
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BAPTA	acide 1,2-bis(o-aminophenoxy)éthane-N,N,N',N'tétraacétique
BDNF	facteur neurotrophique dérivé du cerveau brain derived neurotrophic factor
BoTx	toxine botulinique
Ca ²⁺	ion calcium
CaMK	kinase dépendante de la Ca ²⁺ /calmoduline
CaMKII	kinase dépendante de la Ca ²⁺ /calmoduline de type 2
CGRP	peptide relié au gène de la calcitonine calcitonin gene related peptide
CICR	libération de calcium induite par le calcium calcium-induced calcium release
CNS	système nerveux central central nervous system
<i>c.p.</i>	<i>cutaneus pectoris</i>
CSP	cellule de Schwann périssynaptique
EDL	<i>extensor digitorum longus</i>
EPC	courant de plaque motrice endplate current
EPP	potentiel de plaque motrice endplate potential
ETA	<i>epitrochleoanconeus</i>
FDB	<i>flexor digitorum brevis</i>
GCP II	glutamate carboxypeptidase II
GD3	épitopes du disialosyl sur les gangliosides 3 disialosyl epitopes on gangliosid
GDNF	facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales glial cell line-derived neurotrophic factor
GDP	guanosine diphosphate
GDPβS	analogue non-hydrolysable du GDP
GFAP	protéine gliale fibrillaire acide glial fibrillary acidic protein

GTP	guanosine triphosphate
GTP γ S	analogue non-hydrolysable du GTP
IP ₃	inositol 1,4,5-trisphosphate
IP ₃ R	récepteurs sensibles à l'IP ₃
JNM	jonction neuromusculaire
K ⁺	ion potassium
LAL	<i>levator auris longus</i>
Li ⁺	ion lithium
LTA	adaptation à long-terme long-term adaptation
mAChR	récepteur muscarinique à l'ACh
mEPP	potentiel de plaque motrice miniature miniature endplate potential
mEPSC	courant postsynaptique excitateur miniature miniature excitatory postsynaptic current
MCPG	(S)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine
MF	muscle fibre
Mg ²⁺	ion magnésium
mGluR	récepteur métabotrope du glutamate
MMP3	métalloprotéinase matricielle 3 matrix metalloproteinase 3
Na ⁺	ion sodium
NAAG	N-acétylaspartylglutamate
nAChRs	récepteurs nicotiniques à l'ACh
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCS	senseurs de Ca ²⁺ neuronaux
NK-1R	récepteur à neurokinine-1
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMJ	jonction neuromusculaire neuromuscular junction
NO	oxyde nitrique
NOS	NO-synthase
NT	terminaison nerveuse nerve terminal
NT-3 (4,5,6)	neurotrophine-3, neurotrophine-4...
P2XR	récepteur ionotropique à l'ATP P2X
P2YR	récepteur métabotrope à l'ATP P2Y
PCR	réaction en chaîne par polymérase polymerase chain reaction
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PLC	phospholipase C
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PPF	facilitation à des stimuli pairés paired-pulse facilitation

PSC	cellule de Schwann perisynaptique perisynaptic Schwann cell
PTP	potentialisation post-tétanique
PTX	toxine pertussique
SNC	système nerveux central
TrKB	récepteur à activité tyrosine kinase B
TrKC	récepteur à activité tyrosine kinase C
SNAP-25	protéine de 25 kDa associée au synaptosome synaptosome-associated protein of 25 kDa
SNARE	récepteur pour la protéine d'attachement du facteur soluble sensible à la N-ethylmaleimide soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
t-SNARE	SNARE sur la membrane cytoplasmique target-SNARE
v-SNARE	SNARE sur la membrane vésiculaire vesicular-SNARE
TTX	tétradotoxine

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés sous la direction du Dr Richard Robitaille à qui je souhaiterais exprimer toute ma reconnaissance pour son support et sa confiance durant ces six dernières années. Je voudrais également faire part de mon appréciation aux membres de mon comité de parrainage, Dr Serge Rossignol et Dr Vincent Castellucci, pour leur encadrement assidu. Enfin, je voudrais remercier Joanne Vallée pour sa collaboration aux expériences présentées dans cette thèse, de même que les autres membres du laboratoire qui ont su enrichir ces années de formation. Ces travaux ont aussi été rendus possibles grâce au support financier du CRSNG, du FRSQ, de la FES et du Groupe Manuvie.

1. CHAPITRE PREMIER

1.1. PRÉAMBULE

L'une des caractéristiques fondamentales de tout être vivant est sa capacité de détecter et de répondre à des stimuli de son environnement, de façon adaptée. Avec l'évolution et la complexification des niveaux d'organisation des êtres vivants, un réseau spécialisé dans cette fonction s'est développé : le système nerveux. L'un des principaux rôles de ce système est, en effet, de véhiculer des informations sensorielles de différentes modalités, à partir de récepteurs sensoriels vers un centre d'intégration à plusieurs niveaux. Depuis ce centre d'intégration, une réponse appropriée est générée, laquelle est généralement traduite en information motrice avant d'être acheminée vers l'effecteur concerné.

1.1.1. LA DOCTRINE NEURONALE

Les informations sensorielles ou motrices voyagent à très grande vitesse, sous la forme d'influx nerveux ou potentiel d'action, à travers un réseau constitué de près de 100 milliards de neurones. C'est d'ailleurs d'après cette organisation que vers la fin du 19^e siècle, Ramón y Cajal proposa la doctrine neuronale qui prévaut encore aujourd'hui. Selon cette doctrine, les neurones constituent les unités structurales et fonctionnelles de base du système nerveux et leur organisation en réseaux expliquerait les mécanismes physiologiques sous-tendant le transfert d'informations.

Les neurones établissent en effet chacun des milliers de contacts synaptiques avec d'autres neurones ou effecteurs. La synapse est donc la structure permettant la communication entre les neurones ou entre ceux-ci et leurs effecteurs (Figure 1). L'influx nerveux y est transféré d'un élément présynaptique (terminaison nerveuse) à un élément postsynaptique (neurone ou organe effecteur). Dans les synapses dites chimiques, le transfert est possible grâce à la libération de neurotransmetteurs par l'élément présynaptique, suivant l'arrivée d'un potentiel d'action et l'entrée d'ions Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse. Les neurotransmetteurs ainsi libérés dans la fente synaptique, diffusent vers la membrane postsynaptique où ils se lient à leurs

récepteurs-canaux spécifiques. Cette liaison entraîne l'ouverture du canal ionique, l'entrée d'ions et, de ce fait, mène à la transduction du signal chimique en signal électrique. Lorsque ce dernier est suffisamment grand, il y a génération d'un potentiel d'action dans l'élément postsynaptique.

FIGURE 1. VISION CLASSIQUE DE LA SYNAPSE CHIMIQUE

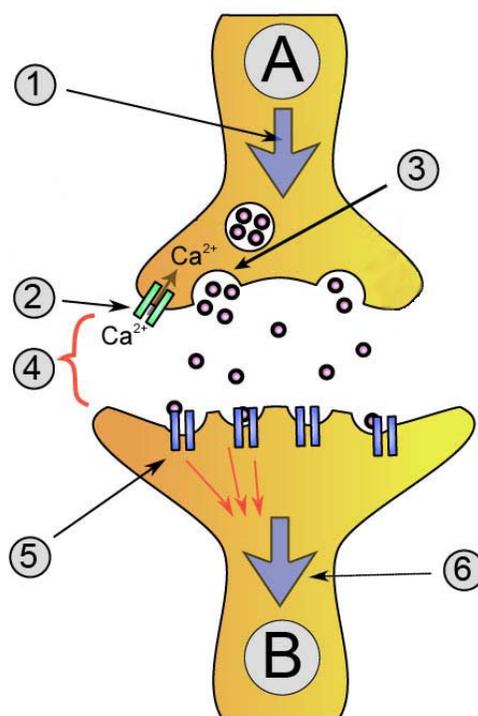


FIGURE 1. VISION CLASSIQUE DE LA SYNAPSE CHIMIQUE

(1) Un potentiel d'action envahissant la terminaison nerveuse d'un neurone présynaptique **A** dépolarise sa membrane et (2) provoque l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. Ceux-ci permettent aux ions calcium de pénétrer dans la terminaison nerveuse, (3) ce qui déclenche l'exocytose des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs. (4) Les neurotransmetteurs traversent la fente synaptique et vont se lier à leurs récepteurs spécifiques sur la membrane du neurone postsynaptique **B**. (5) La liaison des neurotransmetteurs avec leurs récepteurs active une cascade de signalisation intracellulaire, laquelle peut mener à la dépolarisation du neurone postsynaptique (6) et à la génération d'un potentiel d'action dans ce dernier. **Adapté de Wikipedia, GNU free documentation license.**

Figure 1. Vision classique de la synapse chimique

Bien qu'un peu simpliste, cette description de la synapse et de son fonctionnement est fortement inspirée de la doctrine neuronale et n'engage qu'un seul type cellulaire, les neurones, dans le traitement de l'information nerveuse. Toutefois, à la lumière des découvertes de la dernière décennie sur le rôle des cellules gliales, le type cellulaire le plus abondant du système nerveux, une redéfinition de la synapse s'est imposée.

1.1.2. ÉVOLUTION DU CONCEPT INTERACTIONS SYNAPSE-GLIE

Il existe en effet dans le système nerveux, un type cellulaire neuf fois plus nombreux que les neurones : les cellules gliales. Identifiées dès 1846 par Virchow, ces cellules étaient toutefois restées dans l'ombre de la doctrine neuronale qui prévalait alors. Ainsi, leur rôle avait été réduit à celui de colle assurant la cohésion des neurones, d'où leur appellation (gr. *glia*, glue). Par la suite, l'amélioration des techniques de microscopie et d'histologie et le développement de la neuro-anatomie, avec comme chefs de file les Deiters (1865), Golgi (1885) et Ramón y Cajal (1913), ont permis une meilleure caractérisation des cellules gliales, notamment des astrocytes. Ces derniers sont en relation anatomique intime avec les neurones, ce qui a, d'ailleurs, suggéré une relation physiologique entre ces deux structures.

1.1.2.1. HOMÉOSTASIE DU MILIEU EXTRACELLULAIRE

L'une des premières fonctions attribuée aux cellules gliales concerne la régulation du milieu ionique. D'abord proposée par Gerschenfeld dès la fin des années 50 (Gerschenfeld et al., 1959), cette fonction a, par la suite, trouvé appui dans les travaux de Kuffler et de ses collègues (Kuffler et al., 1966). Ceux-ci ont d'ailleurs établi les bases du concept d'interactions neurone-glie en démontrant que la glie pouvait détecter les changements dans l'état des axones. En effet, le potentiel membranaire de repos très négatif de la glie est principalement déterminé par la concentration de K^+ extracellulaire. De ce fait, le potentiel membranaire de la glie devenait un bon indicateur de l'activité neuronale, laquelle est à l'origine d'une libération de K^+ dans le milieu extracellulaire (Orkand et al., 1966). Il a également été proposé que les jonctions communicantes (Brightman and Reese, 1969), les

canaux reliant le cytoplasme des astrocytes entre eux, étaient responsables de disperser les ions K^+ dans le syncytium, afin de maintenir la capacité gliale de tamponner le K^+ extracellulaire, protégeant ainsi les neurones contre les fluctuations de la concentration extracellulaire de cet ion.

De la même façon, la glie protégerait les neurones contre l'accumulation de neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire, grâce à un système de transporteurs spécialisés (Henn and Hamberger, 1971) (Danbolt, 1994).

Malgré ces découvertes majeures la glie était toutefois encore considérée, à cette époque, comme une structure non-excitabile, dont la fonction principale était de protéger le neurone. En outre, la communication entre le neurone et la glie semblait strictement unidirectionnelle.

1.1.2.2. RÉCEPTEURS GLIAUX ET DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ NEURONALE

La notion de communication entre les neurones et la glie a été révolutionnée dans les années 70 avec la découverte de récepteurs sur les cellules gliales. En effet, on passait alors d'un signal simple ionique, la concentration extracellulaire de K^+ , informant la glie de l'état d'activité neuronale, à un signal moléculaire complexe et multidimensionnel. Les premières démonstrations de l'existence de ces récepteurs proviennent de l'analyse des changements dans les systèmes de second messagers, suivant l'application d'un agoniste du récepteur sur des cultures primaires d'astrocytes (Gilman and Schrier, 1972; McCarthy and de Vellis, 1978; van Calker et al., 1980). Avec l'arrivée des préparations en tranches et des techniques d'isolation des astrocytes, le développement d'anticorps spécifiques pour l'immunohistochimie et l'avènement de la réaction en chaîne par polymérase (PCR), la présence de récepteurs a pu, quelques dizaines d'années plus tard, être confirmée sur les astrocytes matures *in vitro* et *in situ* (Aoki and Pickel, 1992; Van Der Zee et al., 1993; Whitaker-Azmitia et al., 1993). Par la suite, le recours à l'électrophysiologie et à l'imagerie calcique ont permis de prouver que les récepteurs gliaux *in situ* étaient fonctionnels et pouvaient être activés par la libération de neurotransmetteurs lors de

l'activité synaptique (Porter and McCarthy, 1996; Araque et al., 2002). De nos jours, on dénombre une panoplie de récepteurs astrocytaires pour différents neurotransmetteurs et neuromodulateurs (Porter and McCarthy, 1997; Zhang and Haydon, 2005). Des essais de liaison avec des ligands radiomarqués, de même que l'hybridation in situ et le PCR, ont cependant démontré qu'il existe une grande hétérogénéité dans les récepteurs exprimés par un astrocyte pendant le développement (Muller et al., 1994) et selon sa région d'origine (Deecher et al., 1993; Bal et al., 1994), suggérant une interaction des astrocytes avec leur microenvironnement.

L'activation des récepteurs gliaux génère des seconds messagers, phosphoryle ou déphosphoryle certaines protéines, module des canaux et l'expression de certains gènes. En fait, tous les effets de l'activation de récepteurs retrouvés dans d'autres types cellulaires sont présents chez les cellules gliales. De plus, la stimulation des récepteurs gliaux induit la libération de plusieurs substances neuromodulatrices, qu'on qualifera plus tard de gliotransmetteurs (Martin, 1992). Dès lors ces cellules sont vues comme des éléments pleinement fonctionnels, capables de détecter l'activité synaptique et de générer des réponses complexes à une grande variété de stimuli environnementaux et dont la physiologie est hautement régulée par les neurones. Elles ont donc le potentiel de jouer des rôles importants dans le fonctionnement du système nerveux.

1.1.2.3. CANAUX IONIQUES

La pensée que les cellules gliales étaient des structures non-excitables a été supportée, de nombreuses années après les travaux de Kuffler, par des études électrophysiologiques qui ont failli à révéler l'existence de conductances ioniques voltage-dépendantes (Ransom and Goldring, 1973, 1973). Ce n'est que dans les années 80 et 90, avec le développement des cultures gliales et des techniques de patch clamp que fut démontrée l'expression de canaux gliaux voltage-dépendants pour le K^+ , le Na^+ , le Ca^{2+} et les anions, de même que l'existence de récepteurs canaux et de canaux calcium-dépendants sur les cellules gliales

(Verkhratsky and Steinhauser, 2000). En fait, les cellules gliales en culture expriment une variété de canaux ioniques similaire à celle retrouvée sur les neurones. Toutefois, comme pour les récepteurs aux neurotransmetteurs et au neuromodulateurs, l'expression de ces canaux varie pendant le développement et selon la région cérébrale avec laquelle la cellule gliale est associée (Corvalan et al., 1990; Sontheimer et al., 1991). C'est donc dire que les interactions neurone-glie permettent une spécialisation régionale des propriétés gliales.

La découverte des canaux ioniques ouvrit la porte à de nouvelles fonctions pour les cellules gliales, notamment dans la régulation de l'homéostasie ionique et du volume glial, dans le contrôle de transporteurs sodium-dépendants et la régulation des événements intracellulaires dépendants du calcium. Plus récemment, à l'aide des techniques modernes d'électrophysiologie, la diversité des canaux ioniques gliaux fut confirmée dans les préparations en tranche (Verkhratsky and Steinhauser, 2000), une percée pour une compréhension plus globale du rôle des cellules gliales dans le traitement de l'information.

Ainsi, la découverte des canaux ioniques, avec celle des récepteurs, révolutionna la vision des cellules gliales qui, bien qu'incapables de générer des potentiels d'action, sont capables de détecter l'activité synaptique et d'engendrer des réponses intracellulaires complexes. Dès lors, on pouvait envisager une communication entre les neurones et la glie.

1.1.2.4. INTERACTIONS MÉTABOLIQUES

Les premières indications d'une modulation du métabolisme glial par les neurones datent des années 70 et font suite à la découverte des récepteurs aux neurotransmetteurs sur les cellules gliales. Ainsi, il fut démontré que la stimulation de certains récepteurs sur les cellules gliales en culture diminuait l'assimilation de glucose (Newburgh and Rosenberg, 1972), augmentait l'activité enzymatique (Narumi et al., 1978) et promouvait la glycolyse dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Sorg and Magistretti, 1991). De la même façon,

une augmentation du K^+ extracellulaire, similaire à celle produite par l'activité nerveuse, augmentait la glycogénolyse dépendante du calcium dans les tranches corticales (Hof et al., 1988). Ces résultats suggéraient donc que les neurones, via la libération de K^+ et de neurotransmetteurs ou neuromodulateurs pouvaient ajuster le métabolisme glial à leur niveau d'activité. En retour, l'hydrolyse du glycogène dans la glie produit du lactate (Lopes-Cardozo et al., 1986; Poitry-Yamate et al., 1995) ou de l'alanine (Tsacopoulos et al., 1994), lesquels sont utilisés comme carburant par les neurones. Ces observations venaient donc confirmer le rôle des cellules gliales dans le support métabolique des neurones, un rôle qui avait par ailleurs été suggéré dès le début des années 1900 d'après les travaux de Golgi qui avait décrit la position stratégique des astrocytes entre les capillaires cérébraux et les prolongements neuronaux.

1.1.2.5. RÉPONSES CALCIFIQUES

La relégation des cellules gliales à un rôle de support, physique trophique et métabolique, pour les neurones résultait d'une simple observation : les cellules gliales sont incapables de générer un potentiel d'action. Or, la doctrine neuronale faisait du potentiel d'action la base du traitement de l'information biologique. La découverte que les astrocytes présentent en fait une forme d'excitabilité a donc révolutionné le concept d'interactions neurone-glie. L'excitabilité calcique des astrocytes a été démontrée pour la première fois en 1990, par la visualisation de vagues calciques oscillatoires intracellulaires suivant l'application de glutamate sur des astrocytes en culture (Cornell-Bell et al., 1990). La propagation de ces réponses calciques d'un astrocyte à l'autre sous forme de vague a suggéré l'existence d'une communication entre ces cellules, laquelle a été confirmée par la stimulation mécanique des astrocytes (Charles et al., 1991). D'autres neuroligands ont par la suite été impliqués dans l'excitabilité calcique des astrocytes en culture, démontrant, par le fait même, l'hétérogénéité des astrocytes quant à leur aptitude à répondre par une élévation calcique (McCarthy and Salm, 1991). Une certaine hétérogénéité des réponses calciques, consistant soit en une élévation calcique soutenue, soit en des oscillations du niveau de calcium, selon le type d'agoniste appliqué, existait

également au sein d'un même astrocyte. Ces observations suggéraient que différents types d'information pouvaient être véhiculés par le calcium dans les réseaux gliaux en culture. Cette suggestion a, par la suite, pu être étendue aux réseaux gliaux *in situ*, puisque des réponses calciques variables ont été observées dans les astrocytes des tranches d'hippocampe, suivant l'application de différents agonistes glutamatergiques et la dépolarisation (Porter and McCarthy, 1995). De plus, l'excitation des astrocytes a pu être liée à l'activité des afférences neuronales glutamatergiques dans les tranches d'hippocampe (Dani et al., 1992), suggérant une communication directe entre les neurones et la glie. Ces découvertes ont, par ailleurs, ouvert la voie pour de nouveaux et importants rôles du calcium intracellulaire comme signal dans les réseaux neurones-glie.

Bien que les astrocytes possèdent différents canaux perméables au calcium, les réponses calciques gliales pouvaient être induites même en absence de Ca^{2+} extracellulaire (Jensen and Chiu, 1991), démontrant que les astrocytes possèdent un système organisé de libération du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires du réticulum endoplasmique, via l'activation des récepteurs canaux calciques sensibles à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3 , IP_3R) (Milani et al., 1989; Shao and McCarthy, 1995), puis de récupération du Ca^{2+} à l'aide de Ca^{2+} -ATPases spécifiques.

Encore une fois, la découverte de cette forme d'excitabilité gliale par le calcium intracellulaire, lequel peut, à son tour, réguler une foule d'événements intracellulaires dépendants du calcium, venait appuyer la possibilité d'une communication réciproque entre les neurones et les glies.

1.1.2.6. INTERACTIONS PENDANT LE DÉVELOPPEMENT

Un exemple de cette communication bidirectionnelle survient pendant le développement. En effet, pendant la neurogénèse, des interactions réciproques neurones-glie dictent la structure du système nerveux. Ces interactions avaient d'abord été proposées au début des années 1970 suivant l'observation que les neurones migrent le long des guides gliaux (Rakic, 1971). Cependant, ce n'est

qu'avec le développement des techniques de biologie moléculaire que des mécanismes d'interaction cellulaires furent proposés afin d'expliquer ce phénomène. Ainsi, la migration des cônes de croissance serait, entre autres, régie par des ligands extracellulaires attractifs et répulsifs, présents sur les cellules gliales (Mitchell et al., 1996), (Rothberg et al., 1990). Par ailleurs, la régulation de l'expression des récepteurs gliaux pourrait elle aussi être impliquée dans la migration des neurones le long des prolongements gliaux (Muller et al., 1994), suggérant que la communication neurone-glie est modulée pendant le développement. Outre le guidage axonal, les cellules gliales synthétisent et relâchent des facteurs trophiques, qui influencent la croissance et la différenciation des neurones en culture (Banker, 1980; Arenander and de Vellis, 1982). Également, les astrocytes régulent le nombre et la maturation des synapses (Ullian et al., 2001).

L'existence de cette communication réciproque entre les neurones et la glie pendant une étape où la plasticité du système nerveux est maximale émettait toutefois un bémol quant à la possibilité d'une telle interaction dans un système mature, considéré moins plastique, jusqu'à preuve du contraire des années plus tard.

1.1.2.7. MODULATION DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE ET DE LA PLASTICITÉ

La possibilité d'une communication réciproque entre les neurones et la glie dans un système mature était donc demeurée pure spéculation jusqu'à ce qu'il soit démontré que les réponses calciques astrocytaires influençaient la concentration de calcium cytosolique des neurones avoisinants en culture (Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994). Puisque le calcium neuronal peut à son tour moduler certains canaux et protéines impliquées dans la libération de neurotransmetteurs, il était dès lors permis d'envisager une modulation de l'excitabilité neuronale et de la neurotransmission par la glie. Le médiateur de cette modulation, proposé par Parpura et ses collègues, était le glutamate puisque l'élévation du calcium intracellulaire des astrocytes était suffisante pour sa libération dans les monocultures et que l'effet sur les neurones était bloqué par des antagonistes des récepteurs glutamatergiques. Un rôle de la glie dans

la modulation de l'efficacité présynaptique a, par la suite, été confirmé *in situ*, alors que l'application d'un bloqueur du métabolisme glial (FAC) inhibait les potentiels postsynaptiques intracellulaires et de champ et diminuait la transmission spontanée (Keyser and Pellmar, 1994). Cependant, il manquait toujours le lien direct entre l'activation gliale et la réponse neuronale.

Prenant avantage d'un système simple, la jonction neuromusculaire (JNM), où la relation entre les éléments gliaux, pré- et postsynaptiques est conservée et peut être étudiée au niveau d'une seule synapse, Robitaille démontra que l'injection d'un analogue non-hydrolysable de la guanosine triphosphate (GTP) ou diphosphate (GDP) spécifiquement dans la cellule de Schwann pérисynaptique, mimant ou inhibant son activation respectivement, modulait l'efficacité présynaptique et la dépression (Robitaille, 1998). Dès lors, un rôle plus actif de la glie dans la transmission synaptique fut établi.

Dans cette lancée, nombre d'études ont été effectuées pour démontrer un rôle plus actif des cellules gliales dans la transmission synaptique et la plasticité. Ainsi, dans une étude de Fiacco et McCarthy (Fiacco and McCarthy, 2004) il fut démontré que les astrocytes, dans les tranches d'hippocampe, libéraient du glutamate suivant l'hydrolyse d'IP₃ engagé. Le glutamate ainsi libéré activait à son tour les récepteurs métabotropiques (mGluR) des neurones excitateurs, facilitant leur libération de glutamate. Ces résultats venaient donc confirmer, dans un système intact, les observations faites *in vitro*, soit que les réponses calciques gliales contribuaient à la plasticité synaptique (Araque et al., 1998).

Parallèlement, on assiste à un engouement pour l'étude des rôles plus « classiques » des cellules gliales, telles que l'homéostasie ionique, la clairance de neurotransmetteurs et les fonctions nutritives, mais dans une optique plus systémique, c'est-à-dire la régulation de l'activité d'une population de neurones. Par exemple, le tamponnage du K⁺ par les astrocytes aurait un rôle à jouer dans les oscillations lors de l'état de sommeil (Amzica and Massimini, 2002). De la même façon, le glutamate

relâché par les astrocytes serait impliqué dans la synchronie neuronale, via l'activation de récepteurs NMDA extrasynaptiques (Fellin et al., 2004). Le rôle des cellules gliales dans l'établissement de la synchronie des neurones et des oscillations suggère par ailleurs une implication possible de ces cellules dans le «binding» temporel de l'activité neuronale et donc un rôle dans les processus cognitifs et la conscience. Par ailleurs, la clairance du glutamate par la glie modulerait l'efficacité présynaptique, tel que démontré dans l'hypothalamus de rattes en lactation. En effet, la lactation modifie l'intrusion des prolongements gliaux dans la fente synaptique, diminuant ainsi la clairance du glutamate et conséquemment diminuant sa libération par les neurones du noyau supraoptique (Oliet et al., 2001). Finalement, les élévations calciques dans les pieds astrocytaires moduleraient le diamètre des artérioles cérébrales (Zonta et al., 2003; Mulligan and MacVicar, 2004), contrôlant ainsi le débit sanguin et, de ce fait, l'apport nutritif aux neurones. Le type de modulation, vasodilatation ou vasoconstriction, serait toutefois dépendant du neurotransmetteur impliqué, suggérant une adaptation de la réponse gliale à la qualité de l'information neuronale. Ainsi, la réponse gliale serait ajustée aux besoins des neurones, permettant une régulation appropriée de leur activité.

1.1.3. LA SYNAPSE TRIPARTITE

La vision des cellules gliales a donc beaucoup évolué depuis les 30 dernières années, non seulement la communication des neurones à la glie est généralement admise, mais on admet maintenant la réciprocité de cette relation et de plus en plus on s'entend pour attribuer à ces cellules des fonctions dans la régulation de l'activité synaptique et la plasticité. D'ailleurs, la plupart des fonctions gliales considérées «passives» à première vue, telles que l'homéostasie ionique et la fonction nutritive, serviraient un dessein plus grand, celui de moduler la transmission synaptique et par conséquent de moduler le traitement de l'information. Il a même été suggéré que les cellules gliales permettraient une compartimentation spatiale et temporelle des neurones et des interactions synapses-glies, une fonction qui serait essentielle pour la conscience (Mitterauer, 1998). Ainsi, le neurone n'est plus le seul responsable de l'intégration de l'information, au contraire les cellules gliales seraient impliquées à

plusieurs niveaux dans cette fonction. Dès lors, il devient essentiel de redéfinir la synapse et de l'aborder comme une structure tripartite, c'est-à-dire comprenant un élément présynaptique, un élément postsynaptique et un élément glial, les trois interagissant pour permettre l'intégration de l'information (Figure 2).

FIGURE 2. SYNAPSE TRIPARTITE

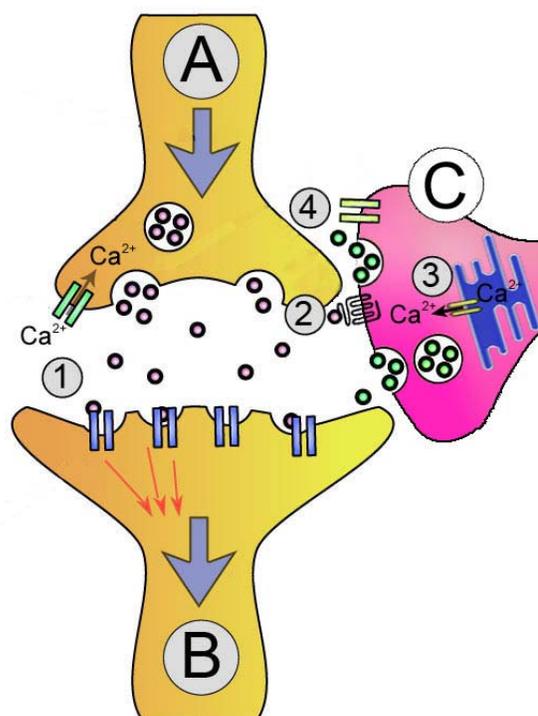


FIGURE 2. SYNAPSE TRIPARTITE

(1) Suivant l'arrivée d'un potentiel d'action et l'entrée des ions calcium dans la terminaison nerveuse, la libération de neurotransmetteurs par le neurone présynaptique A, permet, non seulement l'activation de récepteurs sur le neurone postsynaptique B, mais également (2) l'activation de récepteurs sur l'élément glial C. (3) L'activation de ces récepteurs entraîne généralement la libération de calcium à partir des réserves intracellulaires. (4) L'élévation calcique gliale participe à différents processus cellulaires, dont la libération de gliotransmetteurs pouvant activer les neurones pré ou postsynaptique de façon rétrograde. **Adapté de Wikipedia, GNU free documentation license.**

Figure 2. Synapse tripartite

Par ailleurs, l'intégration de l'information ne se résume pas à un transfert passif de l'influx nerveux d'un élément à un autre, ni à la transduction d'un message unique. L'information intégrée dépend, en effet, d'un cocktail de molécules libérées et d'autant de récepteurs activés. De plus, les propriétés de la synapse sont sans cesse remodelées par l'activité synaptique, de sorte que l'intégration de l'information appelle à la plasticité de chacun des éléments qui composent la synapse et, conséquemment, à la plasticité de leurs interactions.

Ainsi, la compréhension du mécanisme d'intégration de l'information, implique nécessairement une meilleure compréhension des interactions neurones-glies. Or, cette compréhension ne va pas sans nécessiter une meilleure caractérisation des propriétés gliales et de leur propre potentiel de plasticité, qui restent, à ce jour, très méconnus. Comprendre en effet comment les propriétés gliales sont régulées par l'activité synaptique contribuera à démystifier leur propre rôle dans l'intégration de l'information et la modulation de l'activité synaptique.

L'étude de la régulation des propriétés gliales par l'activité synaptique peut être facilitée par l'utilisation d'un modèle expérimental simple, où la structure de la synapse tripartite est conservée et où il est possible d'étudier une synapse isolée : soit la JNM. Outre sa simplicité, la JNM permet d'observer la plupart des phénomènes de plasticité normalement retrouvés dans le système nerveux central (SNC). Par conséquent, les résultats obtenus à la JNM sont souvent extrapolables à l'ensemble des synapses chimiques du système nerveux, sinon contribuent à la compréhension de leur fonctionnement, tel que largement démontré par le passé.

Les sections suivantes se veulent donc un survol des propriétés de la JNM avec une emphase sur le rôle des éléments présynaptiques, postsynaptiques et gliaux dans l'accomplissement de la fonction neuromusculaire, laquelle implique l'intégration de l'information nerveuse par chacun des éléments, leurs interactions réciproques et leur plasticité à court et à long-terme. Par ailleurs, des précisions seront apportées quant aux particularités de la JNM cholinergique de grenouille, notamment au niveau du

muscle *cutaneus pectoris* (*c.p.*), dont les propriétés sont abondamment documentées, justifiant ainsi son utilisation pour l'étude des interactions synapse-glie.

1.2. LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

À l'instar d'autres synapses chimiques, la JNM, aussi appelée plaque motrice, est une structure tripartite, formée de la terminaison nerveuse d'un neurone moteur (élément présynaptique), de la région spécialisée d'une fibre musculaire (élément postsynaptique) et des prolongements de quelques cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs, élément glial) (Figure 3). Les éléments pré et postsynaptiques y sont séparés d'une fente synaptique relativement grande (~50 nm), comparativement à la plupart des synapses chimiques (15-30 nm), dans laquelle les prolongements gliaux font plus ou moins intrusion.

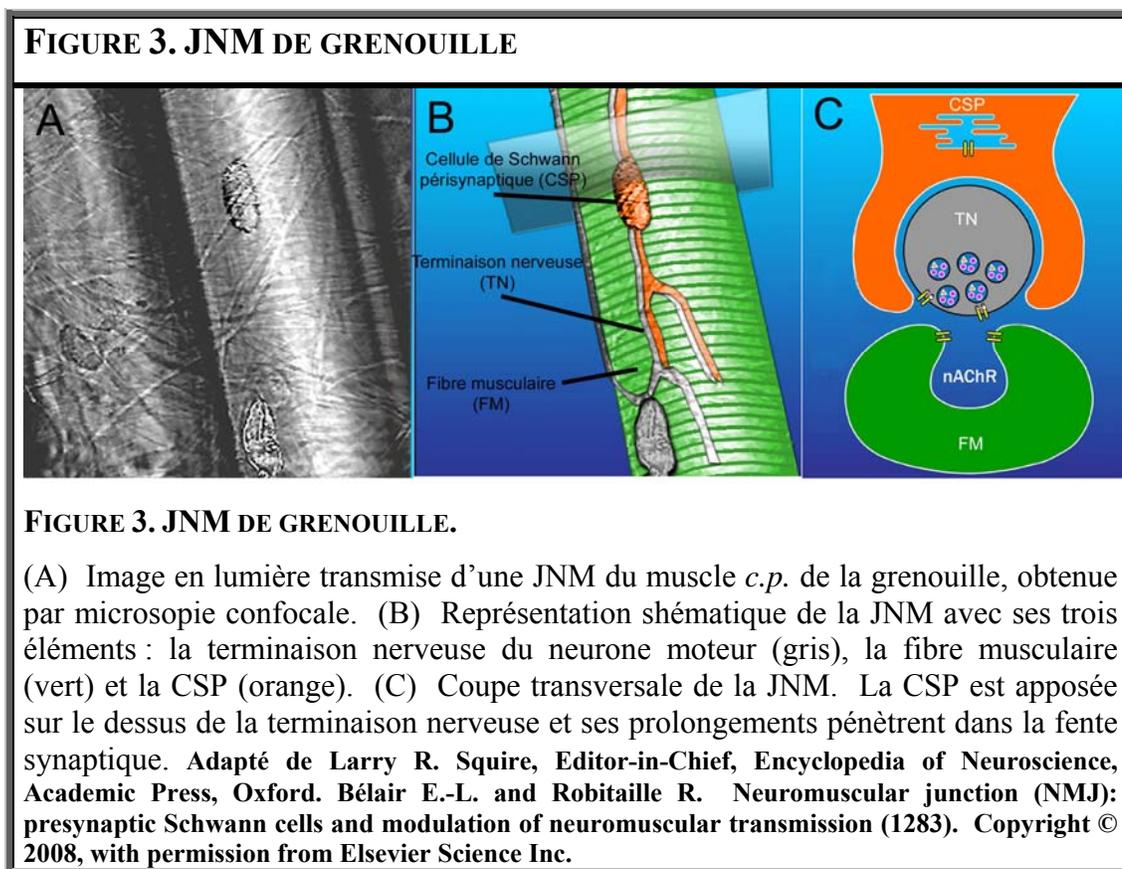


Figure 3. JNM de grenouille

1.2.1. TERMINAISON NERVEUSE DU NEURONE MOTEUR

La terminaison nerveuse d'un neurone moteur constitue l'élément présynaptique de la JNM. Une terminaison nerveuse émerge de chacune des collatérales émises par l'axone du neurone et contacte une seule fibre musculaire. Au contact de la fibre musculaire, la collatérale de l'axone perd sa gaine de myéline pour devenir la terminaison nerveuse, laquelle se ramifie en quelques branches. L'ensemble des fibres musculaires contactées par les terminaisons nerveuses d'un même neurone moteur constitue une unité motrice, dont la taille varie de 10 à 500 fibres.

La terminaison nerveuse contient des zones spécialisées, appelées zones actives, qui constituent le site privilégié de libération des neurotransmetteurs. Elle contient également les enzymes et le système de recapture nécessaires à la biosynthèse des neurotransmetteurs, de même que les transporteurs requis pour leur emmagasinement dans les vésicules synaptiques. On y retrouve, en outre, un certain nombre de vésicules à cœur dense contenant différents neuropeptides, de même que la plupart des organelles contenues dans le corps cellulaire, notamment un large réseau de réticulum endoplasmique et de nombreuses mitochondries.

1.2.2. FIBRE MUSCULAIRE

La fibre musculaire constitue l'élément postsynaptique de la JNM. Une fibre musculaire est généralement innervée, à un seul endroit, par la terminaison nerveuse d'un seul motoneurone, rarement plus de deux. Dans le muscle *c.p.* l'incidence de polyinnervation serait de l'ordre de 36%, avec une fréquence augmentée au niveau des petites unités motrices (Trussell and Grinnell, 1985).

À l'instar de la terminaison nerveuse, la fibre musculaire possède également une zone membranaire spécialisée au niveau de la JNM. Celle-ci est constituée de nombreux replis dont les crêtes sont recouvertes de récepteurs canaux spécifiques au neurotransmetteur libéré par la terminaison, soit l'acétylcholine (ACh) chez les vertébrés et le glutamate chez les invertébrés. D'ailleurs, les replis postsynaptiques sont directement apposés aux zones actives présynaptiques.

1.2.3. CELLULE DE SCHWANN PÉRISYNAPTIQUE

Les cellules gliales du système nerveux périphérique sont de trois types principaux, à la différence du SNC qui en contient au moins cinq (astrocytes, oligodendrocytes, cellules épendymaires, glie radiaire et microglie). Il s'agit des cellules de Schwann myélinisantes, non-myélinisantes et des CSPs, toutes trois issues de la même lignée cellulaire (Georgiou and Charlton, 1999). Les cellules de Schwann myélinisantes entourent l'axone d'un seul neurone, normalement à large diamètre, et constituent sa gaine de myéline, laquelle sert d'isolant électrique et permet la conduction rapide de l'influx nerveux. À l'inverse, une même cellule de Schwann non-myélinisante peut être en relation anatomique étroite avec plusieurs axones de petit diamètre, reposant dans les creux de sa surface (Jessen and Mirsky, 2005). Enfin, les cellules qui nous intéressent et qui feront l'objet de la section 1.2.4.4, les CSPs, aussi reconnues sous le nom de cellules de Schwann terminales, constituent l'élément glial associé à la JNM.

Plusieurs CSPs sont généralement associées à une même JNM. Celles-ci seraient possiblement les clones d'une même cellule mère qui se serait divisée après avoir rejoint une JNM en développement (Zuo et al., 2004). Le nombre de CSPs serait fonction de la taille de la plaque motrice, augmentant lorsque cette dernière s'élargit ou diminuant lorsqu'elle rétrécit (Lubischer and Bebinger, 1999). Au niveau du muscle *c.p* de la grenouille, on retrouve 4 à 5 CSPs apposées sur le dessus d'une terminaison nerveuse (Figure 4). Ces CSPs émettent relativement peu de prolongements, par opposition aux astrocytes du SNC, mais ceux-ci pénètrent dans la fente synaptique à intervalles réguliers, pour envelopper la terminaison nerveuse. Ainsi, toutes les 3 à 4 zones actives, des «doigts» gliaux s'introduisent partiellement dans l'espace synaptique (Wu and Betz, 1999). Cependant, selon les modèles animaux, l'intrusion gliale serait plus ou moins grande et serait limitée par des interactions répulsives avec la laminine présente dans la fente synaptique (Patton et al., 1998). Chez la souris, les prolongements des CSPs seraient, de plus, motiles et se rétracteraient ou s'étendraient au-delà des récepteurs postsynaptiques en fonction du temps (Zuo et al., 2004).

FIGURE 4. CSPs A LA JNM DE GRENOUILLE

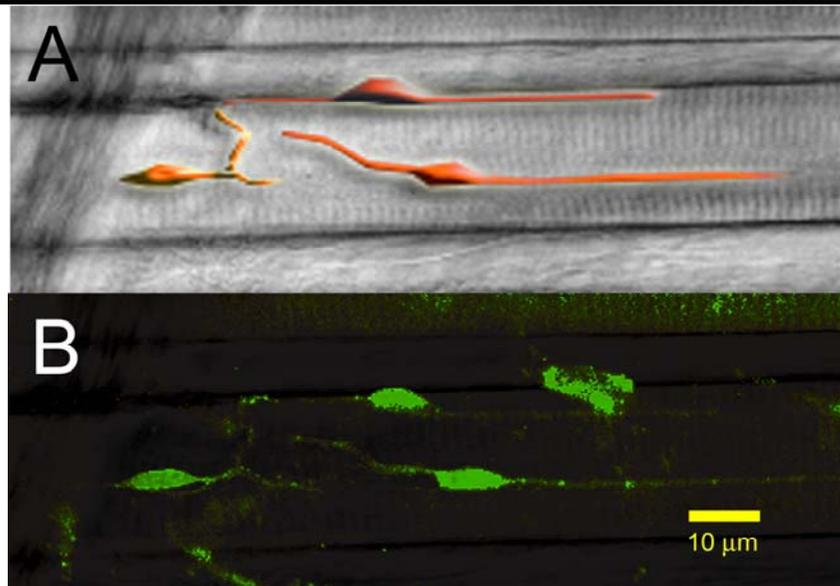


FIGURE 4. CSPs À LA JNM DE GRENOUILLE.

(A) Image en lumière transmise d'une JNM du muscle *c.p.* de la grenouille, obtenue par microscopie confocale. Trois CSPs y sont schématisées en orange. (B) Marquage au fluo-4 des CSPs, vu en microscopie confocale à fluorescence.

Figure 4. CSPs à la JNM de grenouille

1.2.4. FONCTION DE LA JNM

La fonction primaire de la JNM est de permettre la contraction musculaire. Entendu que trois éléments, en étroite relation anatomique, composent la JNM, il est permis d'envisager une relation physiologique entre ces trois éléments, laquelle aurait pour objectif l'accomplissement de cette fonction. Ainsi, la terminaison nerveuse, la fibre musculaire et les CSPs travailleraient de concert pour assurer la fidélité de la neurotransmission. La fidélité de la neurotransmission est assurée par la libération de neurotransmetteurs en quantité supérieure à celle requise pour déclencher un potentiel d'action dans la fibre musculaire. Ce facteur de sécurité (safety factor) permet donc à la neurotransmission de demeurer effective dans la plupart des situations, même pathologiques.

1.2.4.1. FACTEUR DE SÉCURITÉ

À la JNM de grenouille, le facteur de sécurité repose principalement sur la libération d'une très grande quantité de neurotransmetteurs, tandis que chez d'autres espèces, il résulte de la surexpression des récepteurs postsynaptiques (Wood and Slater, 2001). Pour le muscle *c.p.* de la grenouille le facteur de sécurité serait de l'ordre de 4 (Grinnell and Herrera, 1980).

Ainsi, le facteur de sécurité repose principalement sur des déterminants pré- et postsynaptiques. Au niveau présynaptique, le facteur de sécurité sera déterminé par l'efficacité présynaptique, tandis qu'au niveau postsynaptique il sera influencé par l'acétylcholinestérase, de même que par la densité et la localisation des récepteurs nicotiques à l'ACh (nAChRs) et des canaux Na^+ voltage-dépendants. Ces déterminants ne constituent toutefois pas des caractéristiques statiques de la JNM et seront donc modulés avec l'activité synaptique, l'âge, le niveau d'exercice, le statut hormonal et même, au gré des saisons. La plasticité à court ou long-terme des déterminants pré- et postsynaptiques modifiera, à son tour, le facteur de sécurité et, conséquemment, la communication entre les trois éléments de la synapse de façon ponctuelle ou prolongée. La glie pourrait également intervenir dans cette plasticité. Par conséquent, une modification des propriétés gliales, altérant la rétroaction de la glie sur les déterminants pré- et postsynaptique du facteur de sécurité, agirait aussi indirectement sur ce dernier. La possibilité de modifier le facteur de sécurité, à court ou long-terme témoigne, par ailleurs, de la nécessité d'une intégration fine de l'information synaptique par les trois éléments qui composent la JNM.

Dans les sections qui suivent, le déterminant présynaptique du facteur de sécurité et sa plasticité à court-terme seront revus plus en détail, de même que les déterminants postsynaptiques et gliaux. Également, la plasticité à long-terme de ces trois déterminants sera abordée.

1.2.4.2. DÉTERMINANT PRÉSYPNAPTIQUE DU FACTEUR DE SÉCURITÉ

1.2.4.2.1. L'EFFICACITÉ PRÉSYPNAPTIQUE

L'efficacité présynaptique correspond à la probabilité de libération de neurotransmetteurs. Elle est, notamment, déterminée à partir du contenu quantique d'une synapse, soit le nombre de quanta de neurotransmetteurs libérés en même temps par une terminaison nerveuse, suivant l'arrivée d'un potentiel d'action. Selon la théorie quantique, un quantum de neurotransmetteurs correspondrait au contenu d'une vésicule synaptique.

Un quantum peut être libéré de façon spontanée et aléatoire, en absence de tout potentiel d'action : il s'agit de la libération spontanée. Au contraire, l'arrivée d'un potentiel d'action dans une terminaison nerveuse induit la libération synchronisée de plusieurs quanta de neurotransmetteurs : on parle alors de libération évoquée, laquelle détermine le contenu quantique d'une synapse. Le contenu quantique d'une JNM est de l'ordre d'une vingtaine à plus d'une centaine de quanta selon les espèces, (humain < rat < grenouille) alors qu'il est beaucoup plus petit pour les synapses du SNC, variant de un à quelques quanta (Wood and Slater, 2001). À la JNM de grenouille, chaque zone active libérerait en moyenne 0.5 à 1 quantum par potentiel d'action (Poage and Meriney, 2002), d'où son efficacité présynaptique relativement élevée (Figure 5).

Il existe cependant une grande variabilité d'efficacité présynaptique entre les JNMs de muscles différents, entre les JNMs d'un même muscle et entre les JNMs d'une même unité motrice. En règle générale, les muscles dits phasiques possèdent des JNMs de forte efficacité présynaptique, tandis que les muscles toniques présentent des JNMs de plus faible efficacité. Les JNMs de muscles phasiques différents varient également en efficacité présynaptique. Au niveau des JNMs du *c.p.*, le nombre de quanta libérés de façon évoquée est évalué à 86 (Banner and Herrera, 1986). Lorsqu'exprimé par unité de longueur de JNM, ce contenu quantique est de deux à quatre fois celui des JNMs du muscle *sartorius*, aussi considéré phasique (Grinnell and Herrera, 1980). De plus, au sein d'un muscle phasique tel que le *c.p.*,

les JNMs les plus fortes pourraient libérer jusqu'à 20 fois plus de neurotransmetteurs que les JNMs les plus faibles (Propst and Ko, 1987). Également, on observe dans une même unité motrice du *c.p.* une variation de deux à trois fois dans la libération évoquée de neurotransmetteurs (Trussell and Grinnell, 1985).

FIGURE 5. ORGANISATION DES SITES DE LIBÉRATION DE NEUROTRANSMETTEURS À LA JNM DE GRENOUILLE

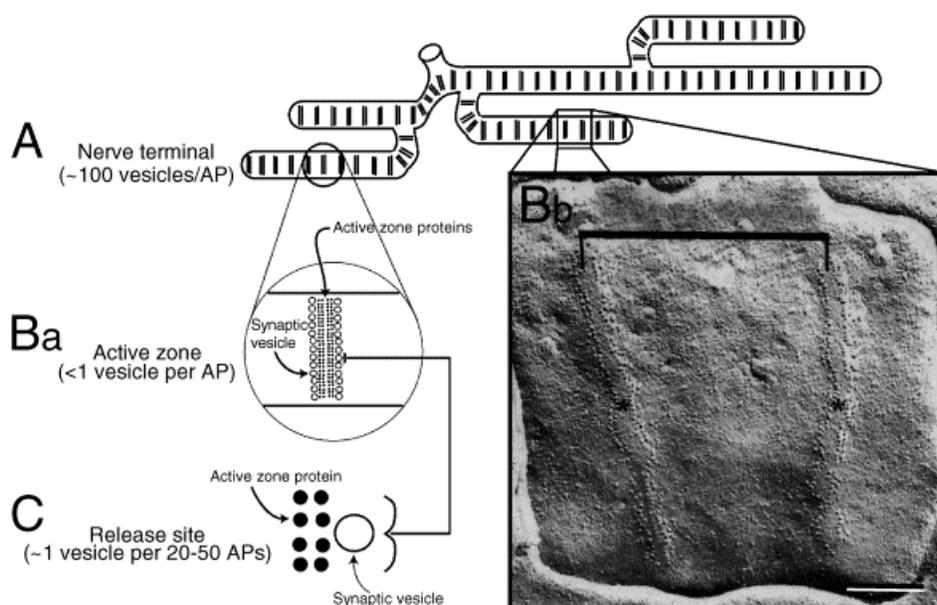


FIGURE 5. ORGANISATION DES SITES DE LIBÉRATION DE NEUROTRANSMETTEURS À LA JNM DE GRENOUILLE.

(A) Schéma représentant la structure de la terminaison nerveuse, (Ba) d'une zone active (C) et d'un site de libération. Une estimation de la probabilité de libération est indiquée pour chacune de ces structures. (Bb) Micrographie électronique d'une JNM après cryofracture. Deux zones actives y sont visibles, chacune étant caractérisée par une rangée double de larges particules transmembranaires. Échelle = 200 nm. Tiré de *Physiology and Behavior*, Vol 77 (4-5), Poage, RE and Meriney, SD. Presynaptic calcium influx, neurotransmitter release, and neuromuscular disease, p. 507-512. Copyright © 2002, with permission from Elsevier Science Inc.

Figure 5. Organisation des sites de libération de neurotransmetteurs à la JNM de grenouille

L'efficacité présynaptique est une caractéristique rapidement modulable. Aussi varie-t-elle au cours de certains phénomènes de plasticité synaptique à court-terme observables à la JNM et dans d'autres synapses. L'étendue de cette plasticité est aussi dépendante de l'efficacité présynaptique initiale et celle-ci serait déterminée par

différents facteurs morphologiques et physiologiques. Ces facteurs et la plasticité à court-terme de l'efficacité présynaptique sont l'objet des sections suivantes.

1.2.4.2.1.1. FACTEURS DÉTERMINANT L'EFFICACITÉ PRÉSYNAPTIQUE

Plusieurs facteurs pourraient contribuer à déterminer l'efficacité présynaptique. Parmi les facteurs proposés notons la taille de la terminaison nerveuse et l'ultrastructure de ses zones actives; le contenu en ACh des vésicules synaptiques; la densité des mitochondries et l'homéostasie du calcium.

1.2.4.2.1.1.1. TAILLE DE LA TERMINAISON NERVEUSE

À la JNM, il existe une corrélation positive entre la taille d'une terminaison nerveuse et son efficacité présynaptique (Kuno et al., 1971; Harris and Ribchester, 1979). Ainsi, à la JNM de grenouille, les longues terminaisons libèreraient plus de neurotransmetteurs au total que les courtes. Cette corrélation ne peut cependant pas toujours expliquer les différences d'efficacité présynaptique entre deux muscles phasiques. Ainsi les terminaisons nerveuses du muscle *c.p.* et du muscle *sartorius* de la grenouille auraient des tailles comparables (Herrera et al., 1985).

En outre, au niveau du muscle *c.p.*, lorsque calculée par unité de longueur de JNM, la quantité de neurotransmetteurs libérée serait inversement proportionnelle à la longueur de la terminaison nerveuse, pour une résistance postsynaptique donnée (Nudell and Grinnell, 1982). Ainsi, les terminaisons nerveuses plus courtes libèreraient plus de neurotransmetteurs par unité de longueur que les longues terminaisons faisant synapse avec des fibres musculaires de résistance électrique similaire. Par conséquent, des facteurs autres que la taille de la terminaison nerveuse devraient être impliqués dans la détermination de l'efficacité présynaptique.

1.2.4.2.1.1.2. ULTRASTRUCTURE DES ZONES ACTIVES

Grâce à la technique de cryofracture, les zones actives des JNMs de grenouille ont été caractérisées comme étant constituées de deux rangées doubles d'environ 200 particules transmembranaires, correspondant notamment à des canaux calciques

voltage-dépendants, le long desquels sont groupées en rang les vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs (Figure 5Bb et C) (Dreyer et al., 1973; Heuser et al., 1974; Pumplun et al., 1981). Dans les JNMs du muscle *c.p.* de la grenouille les zones actives linéaires sont généralement longues de 1 μm et sont séparées les unes des autres d'environ 1 μm . Différents corrélats associés à la longueur totale de zones actives, à l'arrangement des particules transmembranaires et à la densité des vésicules synaptiques ont été proposés pour expliquer l'efficacité présynaptique des JNMs. Ceux-ci sont revus dans les sections suivantes.

1.2.4.2.1.1.2.1. Longueur de la zone active

Dans un même muscle de grenouille, le contenu quantique par unité de longueur de terminaison nerveuse serait positivement corrélé avec la longueur de zone active présente dans chaque unité (Propst and Ko, 1987). Ainsi, pour 100 μm de terminaison nerveuse, une longueur de zone active quatre fois plus grande correspondrait à un contenu quantique trois fois plus élevé. La pente de cette relation serait toutefois influencée par la concentration de Ca^{2+} extracellulaire, compte tenu de la relation non linéaire entre le calcium et le contenu quantique (Dodge and Rahamimoff, 1967). En outre, la longueur des zones actives et leur espacement seraient relativement constants au sein d'une même terminaison nerveuse. Cette observation serait d'ailleurs en accord avec l'uniformité du contenu quantique observé le long de la région centrale d'une même JNM, correspondant à 60-90% de la longueur de cette dernière (D'Alonzo and Grinnell, 1985). Les régions distales au point de contact entre l'axone et la fibre musculaire présenteraient toutefois un contenu quantique plus faible, notamment dans le cas de longues terminaisons nerveuses. Malgré tout, le contenu quantique d'une terminaison donnée serait positivement corrélé avec la longueur totale de ses zones actives.

Cette corrélation existe également, chez la grenouille, dans les JNMs de muscles phasiques différents, dont les efficacités présynaptiques diffèrent aussi significativement. Ainsi, les JNMs des muscles de forte efficacité présynaptique possèderaient une longueur de zones actives 20% plus grande, par unité de longueur

de terminaison, que leurs homologues de plus faible efficacité présynaptique (Propst et al., 1986). La taille de chacune des zones actives serait également plus grande dans les JNMs de forte efficacité; une caractéristique favorisée par une profonde invagination de la terminaison nerveuse dans les replis postsynaptiques (Herrera et al., 1985). De la même façon, les JNMs de muscles toniques possèderaient des zones actives plus courtes que les JNMs de muscles phasiques (Verma and Reese, 1984). Cette observation n'est cependant pas reproduite chez l'écrevisse, où les zones actives seraient de taille similaire dans les terminaisons toniques et phasiques (Msghina et al., 1998), quoique l'occurrence de longues zones actives soit plus fréquente dans les JNMs phasiques (Msghina et al., 1999). Également, des synapses formées de multiples zones actives rapprochées seraient observées plus fréquemment dans les JNMs phasiques. Ainsi, bien que les JNMs toniques des écrevisses contiennent plus de zones actives par unité de longueur de terminaison, la complexité des zones actives des JNMs phasiques pourrait contribuer à leur plus grande efficacité présynaptique (King et al., 1996). Un modèle où la proximité de multiples zones actives permettrait une interaction entre ces dernières et un chevauchement des domaines calciques a d'ailleurs été proposé pour expliquer les différences d'efficacité présynaptique entre ces JNMs (Cooper et al., 1996). Cependant, dans le muscle *c.p.* de la grenouille, la distance d'environ 1 μm entre les zones actives ferait en sorte qu'il y aurait potentiellement très peu de coopérativité entre ces dernières lors de la neurotransmission normale (Shahrezaei et al., 2006).

Par ailleurs, l'augmentation du contenu quantique observée durant le développement et la régénération des JNMs serait concomitante avec une augmentation de la taille des zones actives (Ko, 1984, 1985). En effet, durant les stades précoces du développement et de la régénération, les zones actives seraient courtes et segmentées. Dans les stades plus avancés, les segments s'allongeraient pour ultimement fusionner et ainsi former des zones actives plus longues et continues. Des zones actives plus longues seraient également trouvées dans les JNMs du muscle contralatéral à une dénervation, lequel présenterait une forte augmentation de son contenu quantique par unité de longueur de terminaison nerveuse (Herrera et al., 1985).

1.2.4.2.1.1.2.2. Arrangement des particules transmembranaires

Tel que mentionné plus haut, les particules transmembranaires caractérisant la zone active correspondraient aux canaux calciques voltage-dépendants par lesquels le calcium pénétrerait dans la terminaison nerveuse suivant l'arrivée d'un potentiel d'action (Pumplin et al., 1981; Robitaille et al., 1990; Cohen et al., 1991). L'entrée de Ca^{2+} à la zone active via ces canaux induit la libération de neurotransmetteurs, tel que postulé par Katz et Miledi dès la fin des années 60 (Katz and Miledi, 1967). Cette relation étroite entre le calcium et la libération de neurotransmetteurs serait non-linéaire de sorte que l'exocytose d'un quantum de neurotransmetteur nécessiterait la coopération de plusieurs ions Ca^{2+} (Dodge and Rahamimoff, 1967; Barton et al., 1983). À la JNM de grenouille, les ions provenant d'un ou deux de ces canaux seraient suffisants pour induire la libération d'une vésicule (Yoshikami et al., 1989; Shahrezaei et al., 2006). Ainsi, une faible coopérativité entre les canaux calciques serait requise, malgré que leur positionnement à proximité les uns des autres et à moins de 100 nm de chacune des vésicules synaptiques favoriserait une telle coopérativité (Heuser et al., 1974). Dans ce modèle, les canaux calciques voltage-dépendants seraient de type N (Kerr and Yoshikami, 1984). Ceux-ci sont caractérisés par un seuil d'activation élevé et une cinétique lente. En outre, leur probabilité d'ouverture serait relativement faible compte tenu qu'un potentiel d'action entraînerait l'ouverture de deux à six canaux calciques voltage-dépendants par zone active (Wachman et al., 2004; Shahrezaei et al., 2006). Compte tenu de cette faible probabilité d'ouverture, un plus grand nombre de canaux calciques voltage-dépendants pourrait favoriser une plus grande efficacité présynaptique.

Également, parmi les particules transmembranaires de la zone active de grenouille, on retrouverait possiblement des canaux K^+ activés par le calcium, à proximité des canaux calciques voltage-dépendants (Roberts et al., 1990; Robitaille et al., 1993). Ces canaux seraient impliqués dans la repolarisation membranaire suivant un potentiel d'action et, par conséquent, réguleraient indirectement l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques voltage-dépendants (Robitaille and Charlton, 1992). En outre, les canaux K^+ activés par le calcium seraient sensibles à l'ACh (Hevron et al., 1986).

Ainsi, à l'opposé des canaux calciques voltage-dépendants, un grand nombre de canaux K^+ activés par le calcium pourrait contribuer à diminuer l'efficacité d'une synapse.

Malgré tout, dans un même muscle de grenouille, le nombre total de particules transmembranaires des zones actives serait positivement corrélé avec le contenu quantique d'une terminaison nerveuse (Propst and Ko, 1987). En outre, dans les muscles phasiques d'efficacités présynaptiques différentes, les zones actives des JNMs du muscle le plus faible présenteraient un arrangement discontinu de leurs particules transmembranaires (Propst et al., 1986). De la même façon, chez le lézard, on dénombrerait plus de ces particules dans les JNMs de muscles phasiques, comparativement aux muscles toniques dont les JNMs sont de plus faible efficacité présynaptique (Walrond and Reese, 1985). Dans ces préparations, en effet, les zones actives des JNMs toniques seraient constituées d'une seule rangée double de particules transmembranaires, contrairement à deux pour les JNMs phasiques. Au contraire, chez l'écrevisse, les JNMs toniques et phasiques présenteraient sensiblement le même nombre de particules transmembranaires à chacune de leurs zones actives, sauf pour certaines zones actives très allongées, retrouvées dans les JNMs phasiques (Msghina et al., 1999).

1.2.4.2.1.1.2.3. Densité des vésicules synaptiques

Le nombre total de vésicules à la JNM est très variable, mais serait de l'ordre de 300 000-600 000 chez les vertébrés, tandis qu'il peut être de seulement quelques dizaines dans certaines synapses du SNC. Au niveau du *c.p.*, un petit nombre de ces vésicules, une trentaine seulement, seraient arrimées à la membrane cytoplasmique à chacune des zones actives (Wachman et al., 2004). Les vésicules restantes formeraient un ensemble morphologiquement homogène regroupé dans la terminaison nerveuse (Rizzoli and Betz, 2004). Pourtant, ces vésicules appartiendraient à deux ensembles distincts d'un point de vue fonctionnel, soit les vésicules rapidement mobilisables (*readily releasable pool*) et les vésicules de réserve (*reserve pool*) (Richards et al., 2000).

Les vésicules rapidement mobilisables représentent environ 15-20 % de l'ensemble des vésicules synaptiques. Elles sont les premières à être libérées lors d'une stimulation nerveuse. À la JNM de grenouille, leur effectif est d'ailleurs rapidement réduit par une stimulation à haute-fréquence (30 Hz, moins de 10 sec) (Richards et al., 2003). Cet effectif est cependant continuellement et rapidement réapprovisionné par voie d'endocytose et de recyclage. Chez la drosophile, ce processus de réapprovisionnement serait, par ailleurs, dépendant du calcium extracellulaire (Kuromi and Kidokoro, 2002).

Contre toute attente, les vésicules rapidement mobilisables n'occuperaient pas nécessairement une position plus avantageuse près des sites de libération, mais seraient plutôt dispersées de façon aléatoire dans l'ensemble des vésicules synaptiques (Rizzoli and Betz, 2004). Ces vésicules seraient cependant motiles à l'état de repos et se déplaceraient selon un modèle de diffusion simple (Gaffield et al., 2006). Lors de la stimulation, cette motilité augmenterait à un niveau suffisant pour expliquer l'exocytose des vésicules rapidement mobilisables.

Contrairement aux vésicules rapidement mobilisables, les vésicules de réserve seraient immobiles au repos (Gaffield et al., 2006) et ancrées au cytosquelette d'actine par une protéine. Jusqu'à récemment, on attribuait ce rôle à la synapsine (Fdez and Hilfiker, 2006). Toutefois, l'utilisation de souris déficientes pour le gène de la synapsine a démontré que les vésicules de réserve étaient toujours immobilisées à la JNM, dans ces conditions. L'ancrage de ces vésicules au cytosquelette impliquerait donc plus d'une protéine, sensibles à la phosphorylation (Gaffield and Betz, 2007). En effet, la phosphorylation serait préalable à la mobilisation des vésicules de réserve et à leur exocytose (Betz and Henkel, 1994; Gaffield et al., 2006). Chez la drosophile, la mobilisation de ces vésicules impliquerait d'ailleurs l'activation de la cascade AMP_c/protéine kinase A (PKA) (Kuromi and Kidokoro, 2000), alors qu'elle pourrait faire intervenir la calmoduline et la kinase dépendante de Ca²⁺/calmoduline (CaMK) chez la grenouille (Brailoiu et al., 2002).

La mobilisation des vésicules de réserve surviendrait principalement lors d'une activité neuronale élevée et soutenue (Kuromi and Kidokoro, 2000). De la même façon, à la JNM de grenouille, les vésicules de réserve seraient mobilisées après 10 à 15 secondes de stimulation à une fréquence de 30 Hz (Richards et al., 2003). Tout comme pour les vésicules rapidement mobilisables, les vésicules de réserves libérées sont récupérées par voie d'endocytose et sont recyclées, avant de réintégrer leur ensemble d'origine. Toutefois, les voies endocytotiques empruntées par chacun des ensembles de vésicules seraient distinctes. En effet, les vésicules rapidement mobilisables rejoindraient directement leur ensemble d'origine après leur internalisation. Au contraire, les vésicules de réserve seraient récupérées par une invagination de la membrane cytoplasmique, formant des citernes. Les vésicules de réserve bourgeonneraient ensuite à partir de ces citernes avant de rejoindre leur ensemble d'origine (Figure 6). La récupération de ces vésicules serait également plus lente que celle des vésicules rapidement mobilisables, avec une latence d'environ 5 minutes, et tout autant pour sa complétion (Richards et al., 2000). Chez la drosophile, ce processus ne serait d'ailleurs entamé qu'une fois la période de stimulation terminée et requerrait la mobilisation du calcium des réserves intracellulaires (Kuromi and Kidokoro, 2002). Bien qu'il existe des différences importantes entre les invertébrés et les vertébrés, le calcium pourrait aussi jouer un rôle important dans la détermination des voies endocytotiques empruntées par les vésicules chez ces derniers (Richards et al., 2000).

La densité des vésicules synaptiques ne semble pas être corrélée avec l'efficacité d'une synapse. En effet, les zones actives des JNMs de muscles toniques et phasiques chez le lézard possèderaient un nombre similaire de vésicules synaptiques (Walrond and Reese, 1985). De la même façon les JNMs des muscles phasiques *c.p.* et *sartorius* de la grenouille présenteraient sensiblement la même densité vésiculaire, malgré une importante différence d'efficacité présynaptique (Grinnell and Herrera, 1980; Herrera et al., 1985). En outre, la transmission synaptique à la JNM de souris âgée ne serait pas affectée, sinon augmentée, pendant le vieillissement, malgré une perte importante de vésicules synaptiques (Banker et al., 1983). De façon similaire

chez le rat, malgré une plus grande efficacité présynaptique, le muscle phasique *extensor digitorum longus* (EDL) posséderait un plus petit nombre de vésicules synaptiques que le muscle tonique *soleus* (Reid et al., 1999).

FIGURE 6. VOIES ENDOCYTOTIQUES PARALLÈLES DES VÉSICULES RAPIDEMENT MOBILISABLES ET DES VÉSICULES DE RÉSERVE

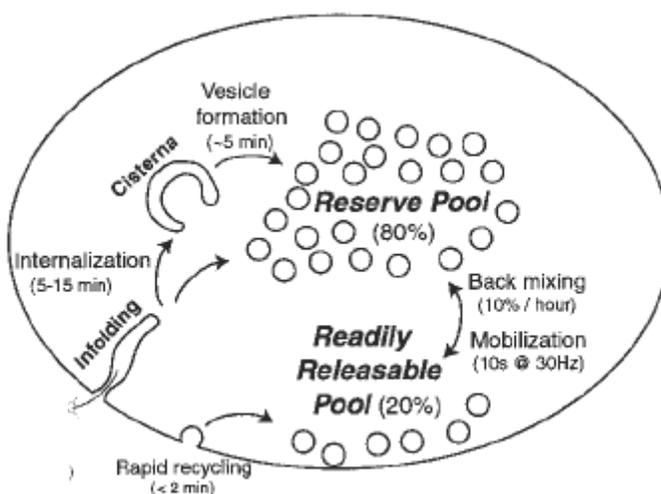


FIGURE 6. VOIES ENDOCYTOTIQUES PARALLÈLES DES VÉSICULES RAPIDEMENT MOBILISABLES ET DES VÉSICULES DE RÉSERVE

Une voie de recyclage rapide approvisionne l'ensemble de vésicules rapidement mobilisables. Une voie parallèle internalise la membrane lentement par invagination et formation de citernes, à partir desquelles les vésicules de réserve sont régénérées. Très peu d'échange se font entre les deux ensembles de vésicules. Tiré de *Neuron*, Vol 27, Richards, DA et al. Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals, p. 551-559. Copyright © 2000, with permission from Elsevier.

Figure 6. Voies endocytotiques parallèles des vésicules rapidement mobilisables et des vésicules de réserve

Toutefois, le nombre de vésicules rapidement mobilisables pourrait, lui, être corrélé avec le contenu quantique d'une JNM, tel que démontré chez la larve de drosophile (Kuromi and Kidokoro, 1999). Cette corrélation serait aussi présente chez le rat, où la proportion de vésicules disponibles pour une libération immédiate, correspondant aux vésicules rapidement mobilisables, serait plus importante dans les JNMs du muscle phasique EDL que dans le muscle tonique *soleus* (Reid et al., 1999). Au contraire, chez l'écrevisse, les JNMs toniques possèderaient un ensemble de

vésicules rapidement mobilisables significativement plus grand que les JNMs phasiques, tel que mesuré en microscopie électronique par le nombre de vésicules synaptiques arrimées à la membrane, près des zones actives (Millar et al., 2002). Aussi a-t-il été conclu, pour ce modèle, que les différences d'efficacité présynaptique entre les JNMs toniques et phasiques ne pouvaient être expliquées exclusivement par des différences ultrastructurales de la zone active.

1.2.4.2.1.1.3. CONTENU EN ACh DES VÉSICULES SYNAPTIQUES

À la JNM de grenouille, un quantum de neurotransmetteurs, correspondant au contenu d'une vésicule synaptique, contiendrait environ 10 000 molécules d'ACh (Van der Kloot and Molgo, 1994). Le contenu en ACh de ces vésicules serait cependant modulé par l'activité antérieure de la synapse. Ainsi, 3000 stimuli administrés à une fréquence de 10 Hz réduiraient la taille des courants miniatures spontanés, reliés à la libération d'un quantum de neurotransmetteurs. Cette réduction serait principalement due à un remplissage incomplet des vésicules plutôt qu'à une désensibilisation des récepteurs postsynaptiques. En fait, le remplissage des vésicules synaptiques se ferait en plusieurs étapes et un remplissage, dit «final», surviendrait au moment où les vésicules seraient mobilisées (Naves and Van der Kloot, 2001). Ce remplissage final pourrait donc être modulé, altérant de ce fait la quantité de neurotransmetteurs libérée, sans toutefois modifier le contenu quantique de la synapse. Aucune preuve d'une différence de contenu vésiculaire en neurotransmetteurs n'est cependant disponible pour expliquer les différences de d'efficacité présynaptique entre deux muscles. Toutefois, chez l'écrevisse, les terminaisons nerveuses toniques contiendraient des taux plus élevés du neurotransmetteur glutamate, ce qui pourrait faciliter le remplissage des vésicules synaptiques lors de périodes d'activité neuronale soutenue (Shupliakov et al., 1995).

1.2.4.2.1.1.4. DENSITÉ DES MITOCHONDRIES

À la JNM du *c.p.*, on dénombre en moyenne cinq mitochondries par surface de $0.33\mu\text{m}^2$ de terminaison nerveuse, le long de la membrane présynaptique (Grinnell and Herrera, 1980). Au total, les mitochondries occuperaient environ 6 % du volume

de la terminaison nerveuse (Alnaes and Rahamimoff, 1975). Leur abondance témoigne de leur importance à la JNM, notamment pour leur production d'ATP. À la JNM de drosophile, la production d'ATP par les mitochondries serait en effet essentielle à la mobilisation des vésicules de réserve (Verstreken et al., 2005). Ainsi, l'altération de la localisation synaptique des mitochondries, tout comme l'inhibition de la production mitochondriale d'ATP, entraînerait un déficit dans la mobilisation de ces vésicules et dans le maintien d'une neurotransmission normale pendant une stimulation à haute fréquence. Ce déficit serait cependant surmonté par l'administration d'ATP exogène. L'ATP mitochondrial interviendrait à deux niveaux dans la mobilisation des vésicules de réserve. D'une part, il participerait à l'activation de la PKA en tant que précurseur de l'AMPC et d'autre part, il serait nécessaire à l'activation de la chaîne légère de myosine, impliquée dans le routage des vésicules. Par conséquent, la production d'ATP par les mitochondries participerait au maintien de l'efficacité présynaptique lors d'une activité neuronale soutenue.

Les terminaisons nerveuses des muscles phasiques *c.p* et *sartorius* de la grenouille diffèreraient en termes de nombre de mitochondries, les terminaisons plus fortes du *c.p.* en contenant plus. Cette différence pourrait être le résultat de besoins énergétiques différents entre les deux muscles, imposés par un niveau supérieur de libération de neurotransmetteurs chez le *c.p.* (Herrera et al., 1985). Cependant, chez l'écrevisse, les neurones moteurs toniques présenteraient un contenu mitochondrial plus élevé et une plus grande activité oxydative que les neurones moteurs phasiques. Les nombreuses mitochondries des neurones toniques leur permettraient, en fait, de résister à la fatigue synaptique. Ainsi, l'altération de la fonction oxydative mitochondriale par différents moyens, le découplage de la phosphorylation oxydative ou l'inhibition de la chaîne de transport d'électrons, entraînerait une plus grande dépression dans les JNMs toniques et une dépression accélérée dans les JNMs phasiques (Bradacs et al., 1997; Nguyen et al., 1997). Un tel rôle dans la résistance à la dépression synaptique serait d'ailleurs cohérent avec l'implication possible des mitochondries dans la mobilisation des vésicules de réserve. À la JNM de souris

cependant, l'inhibition de la synthèse d'ATP mitochondrial par l'oligomycine, en absence de dépolarisation, n'aurait pas d'effet sur la dépression induite par la stimulation à haute fréquence (David and Barrett, 2003).

Outre leur rôle dans la production d'ATP, les mitochondries seraient également impliquées dans la régulation de l'homéostasie du calcium, laquelle pourrait également participer à la détermination de l'efficacité présynaptique. Cette fonction est décrite plus en détail dans la section 1.2.4.2.1.1.5.4, où il est question des mécanismes de séquestration du Ca^{2+} .

1.2.4.2.1.1.5. HOMÉOSTASIE DU CALCIUM

Dans la plupart des cellules, le Ca^{2+} joue un rôle primordial dans la régulation de nombreux processus cellulaires. Il agit notamment à titre de messager second dans plusieurs voies de signalisation intracellulaires. Dans les neurones, une relation étroite existe d'ailleurs entre le calcium et la libération de neurotransmetteurs et par conséquent, entre le calcium et l'efficacité présynaptique. Celle-ci pourrait donc être sous l'influence de l'influx de calcium et de ses mécanismes de gestion (chélation, séquestration, mobilisation et extrusion), de même qu'elle pourrait varier selon la sensibilité au calcium de la machinerie impliquée dans libération de neurotransmetteurs.

1.2.4.2.1.1.5.1. Influx de calcium

Suivant la dépolarisation membranaire et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, le Ca^{2+} pénètre dans la terminaison nerveuse, le long de son gradient électrochimique. Ainsi, l'entrée de Ca^{2+} est fonction de la concentration extracellulaire de cet ion. À la JNM de grenouille, la relation entre cette dernière et la libération de neurotransmetteurs suivrait d'ailleurs une exponentielle de puissance 4. Cette relation serait sensiblement la même pour les JNMs de forte et de faible efficacité présynaptique. De la même façon, la relation entre la fréquence des événements spontanés et la concentration extracellulaire de Ca^{2+} serait aussi similaire dans les JNMs d'efficacité différentes (Grinnell and Herrera, 1980). Cependant, cette

fréquence de libération spontanée serait augmentée, suivant une stimulation tétanique, selon un décours temporel similaire à l'augmentation et à la potentialisation post-tétanique (PTP). Or, celles-ci présenteraient chacune une constante de temps et une amplitude proportionnelles au contenu quantique de la JNM. Toutefois, en absence de Ca^{2+} extracellulaire, le décours temporel de l'augmentation de la fréquence des événements spontanés serait similaire pour toutes les JNMs, indépendamment de leur efficacité présynaptique. Il a donc été suggéré qu'une plus grande entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons fortes serait à l'origine de l'augmentation supérieure et prolongée de la fréquence de libération spontanée (Pawson and Grinnell, 1990). Selon la même logique, dans les JNMs de souris âgées, caractérisées par une plus forte efficacité présynaptique, la prolongation de la constante de temps de la PTP impliquerait un influx calcique augmenté dans ces terminaisons nerveuses, puisque cette prolongation serait abolie en absence de Ca^{2+} extracellulaire (Alshuaib and Fahim, 1990). Chez l'écrevisse, les JNMs phasiques admettraient également plus de Ca^{2+} , à toutes les fréquences de stimulation que les JNMs toniques, indépendamment de la taille de la terminaison nerveuse. Également, le niveau de Ca^{2+} basal serait significativement plus élevé dans les JNMs phasiques. Toutefois, à influx de Ca^{2+} égal, les JNMs phasiques libèreraient toujours plus de neurotransmetteurs que les JNMs toniques, suggérant qu'un mécanisme en aval du signal calcique serait responsable de la détermination de l'efficacité présynaptique. En outre, malgré une accumulation supérieure de Ca^{2+} à une fréquence donnée, les JNMs phasiques présenteraient moins de facilitation que leurs homologues toniques (Msghina et al., 1999). Afin d'expliquer ces observations, un modèle d'interactions entre zones actives rapprochées a été proposé, tenant compte du fait que les JNMs phasiques possèdent plus de zones actives de ce type. Selon ce modèle, les domaines calciques de zones actives adjacentes se chevaucheraient de sorte que le Ca^{2+} , à mi-chemin entre deux de ces zones, atteindrait une concentration plus élevée qu'au niveau d'une zone active isolée. Ces zones actives rapprochées, où la probabilité de libération de neurotransmetteurs serait plus élevée, pourraient donc être sélectivement recrutées à basse fréquence. À plus haute fréquence, des zones actives plus éloignées pourraient interagir et donner lieu à l'augmentation de la probabilité

de libération de neurotransmetteurs caractéristique de la facilitation (Cooper et al., 1996). Ainsi, ce ne serait pas tant l'entrée de Ca^{2+} que l'interaction entre les domaines calciques qui contribuerait à déterminer l'efficacité présynaptique.

1.2.4.2.1.1.5.2. Chélation du calcium

Une fois pénétré dans la terminaison nerveuse, le Ca^{2+} libre diffuse et se lie rapidement à différentes cibles. La liaison du Ca^{2+} aux senseurs de l'appareil de libération de neurotransmetteurs initiera l'exocytose de ces derniers en une fraction de milliseconde. Parallèlement, la liaison du Ca^{2+} à des protéines de signalisation activera différents processus cellulaires avec un délai relativement long et de façon prolongée. D'autres protéines lieront également le Ca^{2+} dans l'unique but d'en faire la chélation. Ainsi, la mobilité et la cinétique de liaison de ces chélateurs endogènes et des protéines de liaison au Ca^{2+} déterminera la dynamique des ions Ca^{2+} et leur disponibilité pour la libération de neurotransmetteurs, affectant, de ce fait, l'efficacité présynaptique. Malgré tout, la capacité de chélation rapide du Ca^{2+} serait similaire pour les JNMs de forte et de faible efficacité présynaptique. En effet, chez l'écrevisse, la pente d'une élévation calcique serait similaire pour les JNMs toniques et phasiques, à signal calcique équivalent (Msghina et al., 1999). Toutefois, la capacité totale de chélation pourrait être supérieure dans les terminaisons nerveuses toniques. En effet, l'entrée d'une charge importante de Ca^{2+} , suivant l'application d'une concentration élevée d'ionophore, bloquerait le transport axonal et affecterait la morphologie des mitochondries plus rapidement dans les neurones phasiques, suggérant que les neurones toniques sont mieux adaptés pour la gestion de concentrations élevées de Ca^{2+} (Atwood and Lnenicka, 1992).

1.2.4.2.1.1.5.3. Sensibilité au calcium

La libération des vésicules synaptiques fait intervenir différentes protéines localisées sur la membrane plasmique, près des canaux calciques voltage-dépendants, et sur la membrane vésiculaire. Ces protéines membranaires et vésiculaires, dont font partie les SNAREs, appelées ainsi parce qu'elles constituent les récepteurs pour la protéine d'attachement du facteur soluble sensible à la N-ethylmaleimide, agissent donc de

concert pour provoquer l'arrimage des vésicules sur la membrane plasmique, puis amorcer et déclencher l'exocytose. L'arrimage des vésicules à la zone active nécessiterait la formation d'un complexe protéique formé de la syntaxine, de la SNAP-25 (protéine de 25 kDa associée au synaptosome, synaptosome-associated protein of 25 kDa) et de la synaptobrévine. La syntaxine et la SNAP-25, sont des SNAREs associées à la membrane plasmique (t-SNARE, target-SNARE), tandis que la synaptobrévine est associée à la membrane vésiculaire (v-SNARE, vesicular-SNARE). La syntaxine se lie aussi au canal calcique et assure donc l'arrimage des vésicules dans les zones où de fortes concentrations de Ca^{2+} peuvent s'établir. D'ailleurs, lors de l'amorçage, la synaptotagmine, une protéine intégrale de la membrane vésiculaire, sensible au Ca^{2+} , s'adjoindrait au complexe des SNAREs. La synaptotagmine agirait donc à titre de senseur de Ca^{2+} et contrôlerait ainsi la sensibilité au Ca^{2+} de la libération de neurotransmetteurs. Au total, seize isoformes de la synaptotagmine existeraient chez les vertébrés, mais les synaptotagmines 1, 2 et 3 seraient sans doute les principales impliquées dans la libération évoquée, en raison de leur cinétique rapide de liaison au Ca^{2+} (Hui et al., 2005). La synaptotagmine contiendrait effectivement deux domaines cytoplasmiques, C2A et C2B, contenant chacun plusieurs sites de liaison pour le Ca^{2+} . Le domaine C2A se lierait à la fois à la syntaxine et aux phospholipides membranaires, en présence de Ca^{2+} (Figure 7).

L'affinité des domaines C2A et C2B pour le Ca^{2+} serait cependant faible, de l'ordre de 60 et 100 μM respectivement, d'où la nécessité de microdomaines à concentration élevée en Ca^{2+} pour induire la libération de neurotransmetteurs. Toutefois, l'affinité du domaine C2A pour le Ca^{2+} pourrait être modulée par la liaison de polyphosphoinositides au domaine C2B. L'affinité des domaines de liaison au calcium pourrait également varier selon les isoformes de synaptotagmine exprimés. D'ailleurs, au niveau du diaphragme de la souris, les synaptotagmines 1 et 2 seraient coexprimées dans certaines JNMs. La synaptotagmine 2 serait, en effet, exprimée dans toutes les terminaisons nerveuses et la synaptotagmine 1, dans environ 40% d'entre elles. La perte de synaptotagmine 2 chez les souris knock-out résulterait en une diminution de la probabilité de libération évoquée et en une augmentation de la libération spontanée

de neurotransmetteurs. De plus, lors d'une stimulation à haute fréquence, les souris knock-out présenteraient une désynchronisation prononcée de la neurotransmission, suggérant que la synaptotagmine 2 régule la libération de neurotransmetteurs, sans toutefois être essentielle à celle-ci (Pang et al., 2006). La délétion de la synaptotagmine 1, à la JNM de drosophile en développement, aurait toutefois un effet plus critique sur la neurotransmission. Ainsi, en absence de synaptotagmine 1, bien que la transmission spontanée soit significativement augmentée, la libération quantique de neurotransmetteurs serait dramatiquement réduite jusqu'à faillir régulièrement. Une mutation ciblant le domaine C2B résulterait en un phénotype similaire, suggérant le rôle essentiel de ce domaine dans la transmission synaptique (Mackler et al., 2002). Au contraire, le domaine C2A pourrait réprimer la libération de neurotransmetteurs en absence de Ca^{2+} . En effet, à la JNM d'écrevisse, un anticorps dirigé contre le domaine C2A de la synaptotagmine 1 faciliterait la transmission synaptique (Hua et al., 2007). Ainsi, la synaptotagmine pourrait jouer le double rôle de frein et déclencheur de l'exocytose. En ce sens, l'affinité de ses domaines de liaison au Ca^{2+} pourrait moduler l'efficacité présynaptique, de même que l'expression différentielle de ses isoformes.

Outre la synaptotagmine, différentes protéines pourraient également jouer un rôle dans la sensibilité au Ca^{2+} de la neurotransmission. Celles-ci pourraient, par exemple, exercer leur action en amont du déclenchement de l'exocytose, soit lors de la mobilisation des vésicules, leur arrimage à la membrane ou lors de l'amorçage de l'exocytose. Selon leur expression, l'efficacité d'une synapse pourrait varier. D'ailleurs, la sensibilité au calcium diffèrerait notablement entre les JNM phasiques et toniques de l'écrevisse. En effet, suivant la photolyse de calcium encagé dans la terminaison nerveuse, les JNMs phasiques libèreraient leur ensemble de vésicules rapidement mobilisables à un taux plus élevé que les JNMs toniques et avec un plus court délai (Millar et al., 2005). Cette plus grande sensibilité pourrait expliquer, en partie du moins, le fait que malgré un plus petit nombre de vésicules synaptiques arrimées à la membrane, les JNMs phasiques présenteraient un contenu quantique

plus élevé (Millar et al., 2002). Parmi les candidats proposés pour augmenter la sensibilité des JNMs phasiques au calcium, notons la protéine frequenine.

FIGURE 7. MODÈLE D'INTERACTIONS DES SNARES ET DE LA SYNAPTOTAGMINE PENDANT L'EXOCYTOSE.

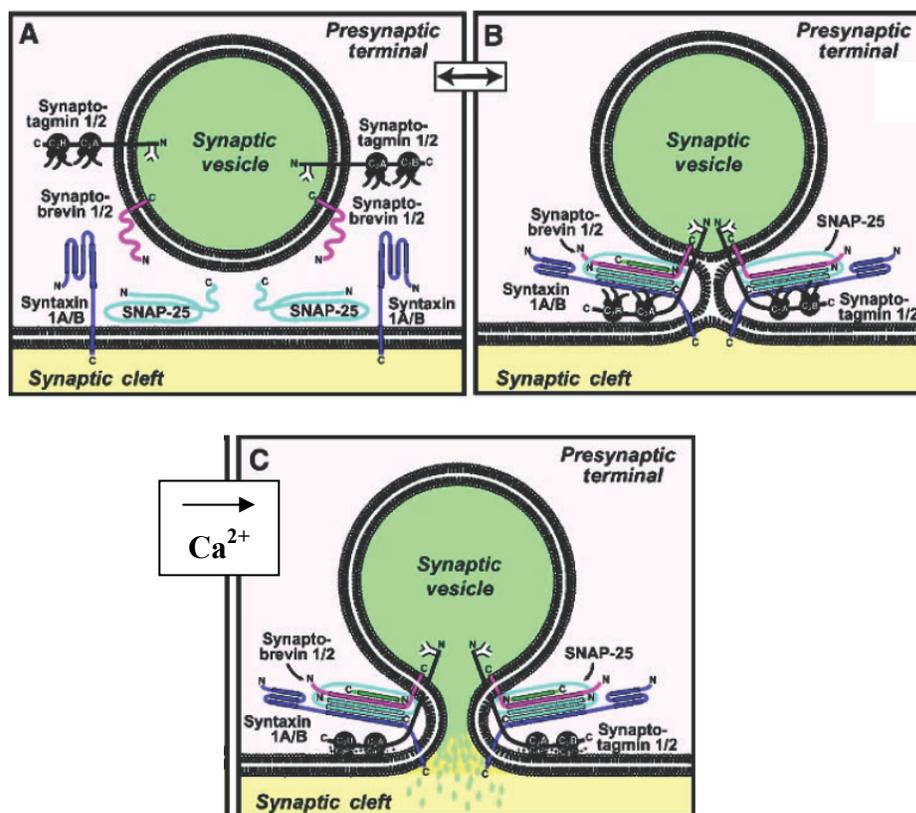


FIGURE 7. MODÈLE D'INTERACTIONS DES SNARES ET DE LA SYNAPTOTAGMINE PENDANT L'EXOCYTOSE.

(A) Lors de l'arrimage, les SNAREs (syntaxine, SNAP-25 et synaptobrevine) et la synaptotagmine ne sont pas encore engagées dans des interactions directes. (B) La formation du complexe des SNAREs et son association avec la synaptotagmine amènent les membranes vésiculaires et cytoplasmiques à proximité et amorcent la fusion vésiculaire. (C) L'influx de Ca^{2+} permet l'insertion des domaines C2 de la synaptotagmine dans la membrane cytoplasmique ce qui entraîne l'ouverture du pore de fusion. Tiré de *Annual Review of Neuroscience*, Vol 27, Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle, p. 509-547. Copyright © 2004, with permission from Annual Review.

Figure 7. Modèle d'interactions des SNAREs et de la synaptotagmine pendant l'exocytose

1.2.4.2.1.1.5.3.1. Frequenine

La frequenine est une protéine de liaison au Ca^{2+} appartenant à la famille des senseurs de Ca^{2+} neuronaux (NCS, neuronal calcium sensor proteins). Les membres de cette famille possèdent tous quatre domaines hélice-boucle-hélice (EF-hand domains), dont deux ou trois possèdent une haute affinité pour le Ca^{2+} . Ils lient donc le Ca^{2+} à des concentrations légèrement au-dessus des concentrations intracellulaires au repos et changent de conformation après sa liaison. Ils possèdent également une séquence consensus à leur extrémité N-terminale pouvant accueillir un groupement dérivé de l'acide myristique. L'ajout de ce groupement permettrait de cibler la protéine à la membrane (Burgoyne and Weiss, 2001)

Lorsque surexprimée à la JNM de drosophile, la frequenine faciliterait la libération de neurotransmetteurs, lors d'une stimulation à haute fréquence (Pongs et al., 1993). Également, à la JNM de grenouille immature, cette protéine serait associée à une augmentation de l'efficacité présynaptique et son expression augmenterait au cours du développement (Olafsson et al., 1995). La frequenine serait, de plus, exprimée sélectivement dans les JNMs phasiques de l'écrevisse (Jeromin et al., 1999). En outre, l'expression de l'ARNm codant pour un homologue de la frequenine, le NCS-1, serait augmentée durant la potentialisation à long-terme dans le gyrus dentelé du rat (Genin et al., 2001).

1.2.4.2.1.1.5.4. Séquestration et extrusion du calcium

Outre la chélation, divers mécanismes sont généralement enclenchés pour limiter, dans le temps et l'espace, l'action du Ca^{2+} pénétrant une terminaison nerveuse. Celui-ci sera donc séquestré à l'intérieur de deux organelles, le réticulum endoplasmique lisse et les mitochondries, ou évacué à l'extérieur de la terminaison par l'activité d'échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et de pompes calciques ATPases de la membrane cytoplasmique.

1.2.4.2.1.1.5.4.1. *Échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et pompes calciques ATPases*

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ procède généralement à l'échange d'un ion Ca^{2+} pour trois ions Na^+ . Au potentiel de repos, le Ca^{2+} serait normalement évacué hors de la terminaison nerveuse, tandis que le Na^+ y pénétrerait. Toutefois, le potentiel d'inversion de ce processus serait légèrement plus positif que le potentiel de repos, de sorte qu'à l'arrivée d'un potentiel d'action, le Ca^{2+} entrerait plutôt dans la terminaison nerveuse et le Na^+ en sortirait. Les pompes calciques ATPases utiliseraient, quant à elles, l'énergie d'une molécule d'ATP pour expulser deux ions Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire. Leur affinité pour le Ca^{2+} et leur vitesse de transport seraient, par ailleurs, modulées par la calmoduline. À la JNM de grenouille, ces mécanismes d'extrusion du Ca^{2+} contribueraient pour environ 30% de la clairance de faibles charges de Ca^{2+} . En effet, l'inhibition des pompes calciques ATPases par élévation du pH externe et le blocage de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en remplaçant les ions Na^+ par des ions Li^+ , prolongeraient tous deux la déclinaison du signal calcique, induit par une stimulation de deux secondes à 100 Hz. Les effets de chacun des transporteurs seraient également cumulatifs (Suzuki et al., 2002). Ainsi, une modulation de leur activité pourrait affecter l'efficacité présynaptique par une altération de la durée du signal calcique.

1.2.4.2.1.1.5.4.2. *Réticulum endoplasmique lisse*

Le réticulum endoplasmique lisse constitue la plus grande réserve intracellulaire de calcium, s'étendant des dendrites aux terminaisons nerveuses. À la JNM de grenouille, il serait d'ailleurs impliqué dans la séquestration du Ca^{2+} , notamment lors d'une stimulation neuronale répétée. En effet, le blocage de ses pompes calciques ATPases à l'aide de la thapsigargin induirait une accumulation de cet ion dans le cytosol de la terminaison nerveuse, durant un train de stimulation (Castonguay and Robitaille, 2001; Suzuki et al., 2002; Bennett et al., 2007). Ce processus de séquestration pourrait cependant être impliqué uniquement dans la gestion de grandes charges de Ca^{2+} et aurait un effet mineur sur les petites charges (Suzuki et al., 2002), quoique Castonguay et al. (2001) aient observé une prolongation du signal calcique induit par une stimulation unique, en présence de thapsigargin.

1.2.4.2.1.1.5.4.3. Mitochondries

À l'instar du réticulum endoplasmique et en plus de leur rôle dans la production d'ATP, les mitochondries seraient aussi impliquées dans la séquestration du Ca^{2+} . Elles possèdent, en effet, des uni-porteurs pour le Ca^{2+} permettant le transport de cet ion le long de son gradient électrochimique. Dans différents modèles de JNMs, elles permettraient d'ailleurs la clairance du Ca^{2+} suivant une brève stimulation à haute fréquence (David et al., 1998; Suzuki et al., 2002; David and Barrett, 2003). À la JNM de grenouille, la séquestration du Ca^{2+} par les mitochondries serait dépendante de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} et surviendrait à une concentration d'environ 0.2 μM . Dans ce modèle, les mitochondries seraient donc principalement impliquées dans la séquestration de charges de Ca^{2+} relativement faibles comparativement au réticulum endoplasmique. Elles travailleraient également conjointement avec les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et les pompes calciques de la membrane cytoplasmique pour maintenir une concentration cytoplasmique de Ca^{2+} relativement basse (Suzuki et al., 2002). Cependant, l'inhibition de la séquestration du Ca^{2+} par dépolarisation des mitochondries altérerait très peu le signal calcique induit par une stimulation unique, mais augmenterait significativement ce signal lors de courts trains de stimulation (Bennett et al., 2007). En outre, à la JNM de souris, un traitement similaire augmenterait la dépression synaptique lors d'une stimulation à haute fréquence, sans affecter le contenu quantique à une fréquence de 1 Hz. Dans ce cas, la dépression pourrait être consécutive à une augmentation de la fréquence de libération spontanée, résultant d'une augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} (David and Barrett, 2003). Ainsi, la séquestration du Ca^{2+} par les mitochondries faciliterait la résistance à la dépression, en limitant l'augmentation de libération spontanée. Des résultats similaires ont également été obtenus chez le lézard (Talbot et al., 2003).

Par leur effet sur la cinétique du signal calcique, ces différents mécanismes de séquestration et d'extrusion du Ca^{2+} pourraient influencer l'efficacité d'une synapse. D'ailleurs, chez l'écrevisse, le taux d'extrusion du Ca^{2+} dans les JNMs toniques serait significativement plus rapide que dans les JNMs phasiques. D'une part, le signal

calcique induit par un ionophore sélectif au Ca^{2+} serait supérieur dans les terminaisons nerveuses phasiques, comparativement aux terminaisons toniques, et cette différence serait abolie par une inhibition de la séquestration du Ca^{2+} par les mitochondries et de l'extrusion du Ca^{2+} par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Fengler and Lnenicka, 2002). D'autre part, pour un signal calcique donné, induit par la stimulation, le taux de diminution de ce signal dans les JNMs toniques serait le double de celui obtenu dans les JNMs phasiques. De plus, en présence de charges calciques importantes, le taux de diminution du signal calcique présenterait deux composants, l'un rapide et l'autre lent, le composant lent intervenant à des fréquences de stimulation inférieures dans les JNMs phasiques, étant donné que ces dernières admettraient plus de Ca^{2+} , à toutes les fréquences de stimulation (Msghina et al., 1999). Ce composant lent pourrait refléter la séquestration du Ca^{2+} dans les mitochondries et/ou le réticulum endoplasmique lisse.

1.2.4.2.1.1.5.5. Mobilisation du calcium

Le calcium séquestré dans le réticulum endoplasmique pourrait être mobilisé de nouveau dans le cytosol par deux mécanismes distincts, soit l'activation des récepteurs sensibles à la ryanodine et l'activation des récepteurs à l' IP_3 . Selon le premier mécanisme, une élévation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} entraînerait l'activation des récepteurs sensibles à la ryanodine présents sur la membrane réticulaire et l'amplification du signal calcique dans le cytosol. Ce mécanisme est mieux connu sous le nom de libération de calcium induite par le calcium (calcium-induced calcium release, CICR). L'activation des récepteurs sensibles à la ryanodine nécessiterait d'abord un amorçage lent et serait suivie de leur inactivation rapide, deux étapes aussi dépendantes du calcium (Narita et al., 1998). Outre leur activation par le Ca^{2+} cytoplasmique, les récepteurs à la ryanodine seraient également modulés par différents facteurs tels l'ATP, le Mg^{2+} , l'adénosine diphosphate (ADP)-ribose cyclique (un métabolite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NADP) et seraient sensibles à la phosphorylation et à l'état d'oxydoréduction de la cellule (Fill and Copello, 2002). Selon le deuxième mécanisme, l'activation de la phospholipase C par des protéines G couplées à un

récepteur métabotrope, ou directement par un récepteur tyrosine kinase, entraînerait l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) et la production d'IP₃. L'IP₃ viendrait ensuite se lier à ses récepteurs spécifiques (IP₃R) sur la membrane réticulaire et entraînerait la libération de Ca²⁺ dans le cytosol. La sensibilité de ces récepteurs pourrait être régulée par la concentration de Ca²⁺ dans le lumen du réticulum, de même que par leur hétérogénéité, résultant de la présence de différents produits géniques, de l'épissage alternatif ou de modifications post-traductionnelles. En outre, les IP₃R présenteraient eux-aussi une forme de CICR de sorte que le Ca²⁺ exercerait une rétroaction positive sur la libération de Ca²⁺ des réserves intracellulaires. Cette rétroaction positive serait cependant vite remplacée par une rétroaction négative du Ca²⁺ qui inactiverait alors le récepteur (Berridge, 1993).

À la JNM de grenouille, les mécanismes de CICR seraient impliqués dans l'augmentation de la fréquence des événements spontanés, induite par une stimulation à haute fréquence prolongée. En effet, l'application de ryanodine ou de thapsigargine bloquerait ce phénomène, de même que l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire qui lui est associé (Narita et al., 1998). Ainsi, la contribution de ces mécanismes de mobilisation du Ca²⁺ au signal calcique serait significative lors de stimulations soutenues. Toutefois, lors d'une stimulation brève à 30 Hz, l'application préalable de ryanodine pour bloquer le CICR n'affecterait pas l'amplitude ni le déroulement temporel du signal calcique observé (Suzuki et al., 2000).

Les mitochondries possèdent également deux types de transporteurs permettant la mobilisation du Ca²⁺ de la matrice mitochondriale vers le cytosol, contre son gradient de concentration. L'un de ces transporteurs est Na²⁺-dépendant, tandis que l'autre est Na²⁺-indépendant et dépendrait plutôt d'un gradient de protons. De plus, les mitochondries pourraient extruder le Ca²⁺ accumulé via la formation de pores de perméabilité transitoires (Gunter et al., 2000). À la JNM de souris, le Ca²⁺ mitochondrial serait principalement mobilisé via un échangeur Na⁺/Ca²⁺. L'inhibition de ce dernier prolongerait effectivement le signal calcique mitochondrial.

induit par une stimulation à haute fréquence. De plus, cette prolongation serait accompagnée d'une diminution du Ca^{2+} résiduel dans la terminaison nerveuse et d'une diminution de la PTP. Au contraire, l'inhibition du pore de perméabilité transitoire n'affecterait pas le signal calcique mitochondrial (Garcia-Chacon et al., 2006).

La mobilisation du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires pourrait donc contribuer, tout comme la plupart des mécanismes de gestion du Ca^{2+} , à moduler l'efficacité présynaptique dans différentes conditions d'activité neuronale.

1.2.4.2.1.2. MODULATION À COURT TERME DE L'EFFICACITÉ PRÉSYPNAPTIQUE

L'efficacité présynaptique peut être modulée par l'activité neuronale. Ainsi, selon les patrons de stimulation neuronale utilisés, différents phénomènes de plasticité pourront être induits. Certains de ces phénomènes, tels que la facilitation, l'augmentation et la PTP, augmentent transitoirement le contenu quantique de la synapse alors que d'autres, tels que la dépression, diminuent l'efficacité présynaptique temporairement. En outre, l'activation d'une variété de récepteurs modulerait le contenu quantique ponctuellement.

1.2.4.2.1.2.1. FACILITATION

La facilitation est le phénomène par lequel un potentiel d'action envahissant la terminaison nerveuse augmente la probabilité de libération de neurotransmetteurs par rapport au potentiel d'action précédent. À la JNM de grenouille, ce phénomène présente deux composants, l'un à cinétique rapide (F1) et l'autre à cinétique lente (F2), dont les constantes de temps sont 60 et 500 ms respectivement (Zengel and Magleby, 1982). La facilitation a été proposée comme étant la conséquence de l'accumulation de Ca^{2+} résiduel à la zone active. L'accumulation de Ca^{2+} dépendrait alors du temps requis pour que le changement de conductance calcique, induit par le potentiel d'action conditionnant, revienne aux valeurs de repos et de la vitesse à laquelle le Ca^{2+} est éliminé des sites de libération de neurotransmetteurs (Katz and Miledi, 1968). La dépendance de la facilitation à la concentration de Ca^{2+}

intracellulaire a d'ailleurs été démontrée à la JNM de grenouille par l'utilisation de chélateurs de Ca^{2+} , tels que le BAPTA (acide 1,2-bis(o-aminophenoxy)éthane-N,N,N',N'tétraacétique), lesquels réduiraient l'augmentation rapide de l'efficacité présynaptique, sans affecter la transmission synaptique basale (Tanabe and Kijima, 1989; Van der Kloot and Molgo, 1993). Une explication pour ce dernier phénomène réside dans le fait que la concentration de Ca^{2+} à l'embouchure des canaux-calciques et près du complexe de libération des neurotransmetteurs est excessivement élevée et compenserait les effets du BAPTA. Aussi, dès la fermeture de ces canaux, le BAPTA pourrait efficacement faire la chélation du Ca^{2+} , inhibant la facilitation par le fait même. Toutefois, selon l'hypothèse du Ca^{2+} résiduel, l'amplitude de la facilitation dépendrait de la sommation entre le Ca^{2+} résiduel et l'influx de Ca^{2+} par les canaux voltage-dépendants. Or, étant donné que la concentration de Ca^{2+} normalement requise localement pour induire la libération de neurotransmetteurs est de l'ordre de 10 à 100 μM , une faible augmentation de cette concentration par le Ca^{2+} résiduel (moins de 1 μM) serait possiblement insuffisante pour expliquer l'amplitude de la facilitation. Aussi a-t-il été suggéré que la facilitation devait se produire à une localisation ayant une affinité plus élevée pour le Ca^{2+} et donc différente de celle normalement impliquée dans la libération évoquée (Zucker and Regehr, 2002). En ce sens, à la JNM d'écrevisse et de grenouille, la facilitation a pu être expliquée par un modèle impliquant des sites proximaux au site de liaison du Ca^{2+} impliqué dans la libération évoquée (Bennett et al., 2004; Matveev et al., 2006). Selon ce modèle, des senseurs de Ca^{2+} ayant une cinétique de liaison avec le Ca^{2+} plus lente que la synaptotagmine, le senseur vraisemblablement impliqué dans la libération évoquée, participeraient à la facilitation. Ces senseurs se dissocieraient également très lentement du Ca^{2+} lié. Par conséquent, la facilitation résulterait de l'accumulation du Ca^{2+} lié à ces sites. Ce modèle réconcilierait d'ailleurs les observations faites à la JNM de grenouille, où la cinétique lente de liaison du Ca^{2+} aux sites facilitateurs expliquerait leur sensibilité aux chélateurs, de même que le délai requis pour le développement maximal de la facilitation (Van der Kloot, 1994; Suzuki et al., 2000).

Le degré de facilitation affiché par une synapse est fonction de son efficacité initiale. Ainsi, dans un muscle phasique, les JNMs à contenu quantique élevé présentent moins de facilitation que les JNMs de plus faible efficacité présynaptique (Nudell and Grinnell, 1982). De la même façon, les terminaisons phasiques et toniques diffèrent énormément quant à leur degré de facilitation, les deuxièmes pouvant afficher une très grande augmentation d'efficacité présynaptique à la suite de stimulations répétées comparativement aux premières (Bradacs et al., 1997).

1.2.4.2.1.2.2. AUGMENTATION ET PTP

Une augmentation de la probabilité de libération de neurotransmetteurs sur une plus longue période, allant de quelques secondes à plusieurs minutes, peut survenir lorsque le nombre de potentiels d'action d'un train de stimulation est augmenté. Il s'agit alors d'augmentation et de PTP. À la JNM de grenouille, ces deux phénomènes peuvent être distingués l'un de l'autre d'après leur constante de temps, soit environ 7 secondes pour l'augmentation et généralement plus de 30 secondes pour la PTP. La constante de temps de la PTP augmenterait cependant en fonction de la fréquence et de la durée de la stimulation (Magleby and Zengel, 1975), tandis que la constante de temps de l'augmentation ne serait pas affectée par une durée de stimulation prolongée (Magleby and Zengel, 1976). La durée de la stimulation affecterait toutefois l'amplitude de ces deux phénomènes (Magleby and Zengel, 1975; Zengel and Magleby, 1982).

L'augmentation serait réduite par des bloqueurs des canaux calciques, suggérant que l'entrée de Ca^{2+} a un rôle à jouer dans ce phénomène, à la JNM de grenouille (Zengel et al., 1993). Aussi, l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire résultant de l'augmentation du Ca^{2+} extracellulaire, du découplage métabolique des mitochondries, de la libération de Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires ou de l'inhibition des pompes Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique affecterait principalement l'augmentation (Zengel et al., 1994). Au contraire, la PTP serait peu ou pas altérée par ces manipulations. De même, la PTP ne serait pas affectée par le blocage des canaux calciques et pourrait même se développer après une stimulation tétanique en absence

de Ca^{2+} extracellulaire, pour autant que la concentration de ce dernier soit rétablie après la stimulation. Ainsi, l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques voltage-dépendants ne serait pas essentielle à son développement (Misler and Hurlbut, 1983). La PTP serait cependant modulée par la concentration extracellulaire de K^+ : une faible concentration prolongeant sa durée (Misler et al., 1987). Cette dépendance au K^+ s'expliquerait par le fait qu'une diminution du gradient chimique de cet ion réduirait l'extrusion de Na^+ via l'échangeur Na^+/K^+ , provoquant ainsi son accumulation dans la terminaison nerveuse. L'accumulation de Na^+ inverserait alors l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et provoquerait l'intrusion du Ca^{2+} impliqué dans la PTP. Dans le même ordre d'idées chez l'écrevisse, l'augmentation du Na^+ dans la terminaison nerveuse par son injection dans l'axone, l'ouverture des canaux Na^+ ou le blocage de l'échangeur Na^+/K^+ , augmenterait l'entrée de Ca^{2+} via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Le blocage de l'échangeur Na^+/K^+ prolongerait également la PTP (Mulkey and Zucker, 1992). Celle-ci ne serait toutefois pas altérée par un bloqueur spécifique de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitochondrial suggérant qu'un échangeur plutôt situé à la membrane plasmique serait impliqué (Zhong et al., 2001). Au contraire, chez la souris, l'inhibition de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitochondrial, prolongerait l'élévation calcique mitochondriale induite par une stimulation téτανique et diminuerait, de ce fait, la PTP (Garcia-Chacon et al., 2006).

Ces hypothèses sont cependant difficilement réconciliables avec l'absence d'effet de la chélation du Ca^{2+} sur la PTP, à la JNM de grenouille (Tanabe and Kijima, 1989). Il faudrait donc possiblement envisager des sites de liaison au Ca^{2+} distincts de celui impliqué dans la libération évoquée, à très haute affinité pour le Ca^{2+} et à cinétique de dissociation lente ou à activité constitutive. Aussi, l'activation d'une protéine kinase par le Ca^{2+} , telle que la protéine kinase C (PKC) pourrait être envisagée. L'implication de la PKC dans la PTP a d'ailleurs été démontrée dans l'hippocampe de rat (Brager et al., 2003) et son activation augmente la libération de neurotransmetteurs à la JNM de grenouille (Shapira et al., 1987). Un rôle de la PKC dans une forme de potentialisation à long-terme a, de plus, été suggéré pendant le développement, à la JNM de grenouille. Dans ce modèle, l'accumulation de Na^+

dans la terminaison nerveuse pendant la stimulation téτανique permettrait l'extrusion du calcium mitochondrial via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, dont l'activité serait modulée par la PKC (Yang et al., 2003). Par ailleurs, la cascade AMPc/PKA pourrait également intervenir dans la PTP pour son rôle dans la mobilisation des vésicules de réserve chez la drosophile (Kuromi and Kidokoro, 2003).

Un rôle des mitochondries dans la PTP est également envisageable, étant donné la réduction de la PTP par le découplage métabolique des mitochondries à la JNM d'écrevisse (Tang and Zucker, 1997). De façon similaire, à la JNM de souris, la dépolarisation mitochondriale transformerait la PTP normalement observée en dépression post-tétanique (David and Barrett, 2003). À la JNM de grenouille, toutefois, la dépolarisation des mitochondries affecterait principalement l'augmentation (Zengel et al., 1994). Par ailleurs, à la JNM de drosophile immature, la stimulation téτανique augmenterait le trafic des mitochondries vers la synapse et l'inhibition du complexe I mitochondrial réduirait la PTP significativement (Tong, 2007). La production d'ATP par les mitochondries serait en outre essentielle à la mobilisation des vésicules de réserves à la JNM de drosophile (Verstreken et al., 2005) et celles-ci pourraient alors enrichir l'ensemble des vésicules rapidement mobilisables pendant la PTP. Une augmentation de cet ensemble a, en effet, été corrélée à la PTP dans certains modèles (Zhao and Klein, 2004; Habets and Borst, 2007).

Bref, jusqu'à maintenant, le seul consensus disponible quant aux mécanismes à l'origine de la PTP et de l'augmentation est l'implication du Ca^{2+} , à une étape ou à une autre du processus. Aussi, il semblerait qu'il existe des différences interspécifiques marquées, de même que des différences entre les systèmes. En outre, différents motoneurons, innervant un même muscle, pourraient recourir à différents mécanismes lors du développement de la PTP (Fox and Lloyd, 2001). Par ailleurs, il est possible que le phénomène généralement désigné par la PTP résulte, en fait, de la sommation de plusieurs modifications présynaptiques, plus ou moins indépendantes les unes des autres.

Tout comme pour la facilitation, le degré de potentialisation serait, lui aussi, fonction de l'efficacité présynaptique initiale. Ainsi, à la JNM de grenouille, les terminaisons nerveuses à contenu quantique élevé par unité de longueur présenteraient une PTP de plus grande amplitude et de durée prolongée par rapport aux terminaisons plus faibles (Pawson and Grinnell, 1990).

1.2.4.2.1.2.3. DÉPRESSION

L'augmentation, à la JNM de grenouille, est généralement camouflée par un phénomène ayant un décours temporel similaire : la dépression. Induite par la stimulation à haute fréquence, la dépression est caractérisée par une diminution de la probabilité de libération de neurotransmetteurs. Cette diminution présente trois composants ayant des cinétiques distinctes, l'une très rapide (>0.5 secondes), l'autre rapide (environ 6 secondes) et la dernière lente (10 secondes à quelques minutes).

La dépression serait principalement le résultat d'une déplétion de l'ensemble des vésicules rapidement mobilisables. À la base de cette hypothèse, il y a l'observation que l'augmentation du nombre de stimuli, de même que l'augmentation du Ca^{2+} extracellulaire, tous deux permettant d'accroître la quantité de neurotransmetteurs libérée, sont à l'origine d'une dépression plus prononcée (Betz, 1970). En outre, une déplétion de l'effectif des vésicules rapidement mobilisables a été observée, à la JNM de grenouille, par imagerie fluorescente, après 10 secondes d'une stimulation à 30 Hz. Les vésicules de réserve ne seraient, quant à elles, mobilisées qu'après 10 à 15 secondes et leur effectif serait réduit avec une constante de temps d'environ 40 secondes. De plus, les deux ensembles se mêleraient peu ou pas après le recyclage des vésicules libérées, de sorte que la récupération de la dépression dépendrait principalement de la réintégration des vésicules rapidement mobilisables à leur ensemble d'origine, une étape qui serait complétée en moins de deux minutes (Richards et al., 2003).

Parallèlement à la dépression de la transmission évoquée, on observe, durant une stimulation tétanique, une augmentation de la fréquence de libération spontanée. À la JNM de grenouille, cette fréquence pourrait, en effet, passer de 3 Hz à 100 Hz au cours d'une stimulation à 20 Hz pendant 20 secondes. L'augmentation de la fréquence de libération spontanée présenterait un décours temporel similaire aux quatre composants de l'augmentation de la probabilité de libération de neurotransmetteurs (la facilitation (F1 et F2), l'augmentation et la PTP) suggérant la coexistence des phénomènes d'augmentation et de dépression. Cette observation a d'ailleurs soulevé un questionnement quant à l'existence d'ensembles vésiculaires ou de mécanismes différents impliqués dans la libération évoquée et spontanée (Zengel and Sosa, 1994). Selon une plus récente étude menée avec des neurones d'hippocampe en culture, il semblerait toutefois que les vésicules impliquées dans ces deux types de libération proviendraient du même ensemble de vésicules rapidement mobilisables, mais une plus grande portion de cet ensemble pourrait être disponible pour la libération spontanée (Hagler and Goda, 2001). Dans cette optique, il a été suggéré qu'une augmentation de la libération spontanée pourrait, en partie, être responsable de la déplétion des vésicules rapidement mobilisables et donc, de la dépression. En effet, à la JNM de souris, une inhibition de la séquestration du calcium dans les mitochondries, suivant leur dépolarisation, serait à l'origine d'une augmentation importante de la libération spontanée et d'une augmentation de la dépression induite par une stimulation à 50 Hz. Dans ces conditions, le taux de libération spontanée surpasserait rapidement la libération évoquée. De plus, la fréquence de libération spontanée diminuerait après l'atteinte d'un maximum, suggérant une déplétion des vésicules impliquées dans ce phénomène (David and Barrett, 2003).

Mis à part la déplétion de l'ensemble des vésicules rapidement mobilisables, il a également été proposé qu'une diminution de la taille des quanta pendant la stimulation à haute fréquence contribuerait à la dépression, dans une proportion de 30%, à la JNM de grenouille (Glavinovic, 1995). Cette diminution pourrait être le résultat d'un remplissage incomplet des vésicules pendant leur recyclage. Cette

observation est toutefois controversée et ne serait pas reproduite dans tous les modèles de dépression à la JNM de grenouille (Zengel and Sosa, 1994). D'une manière plus certaine cependant, l'amplitude de la dépression serait fonction de l'efficacité présynaptique initiale, au même titre que les phénomènes potentialisateurs. Les JNMs phasiques à contenu quantique élevé sont, en effet, plus facilement déprimées que les JNMs de plus faible efficacité présynaptique (Nudell and Grinnell, 1982). De la même façon, les JNMs toniques présentent une plus grande résistance à la dépression que les JNMs phasiques (Atwood, 1976).

Outre sa régulation par le patron d'activité, le contenu quantique d'une JNM peut également être modulé, dans une fenêtre de temps allant de quelques secondes à quelques minutes, par l'activation de différents récepteurs. Ainsi, l'efficacité présynaptique d'une JNM serait, entre autres, sous l'influence d'une modulation cholinergique, purinergique, et peptidergique.

1.2.4.2.1.2.4. MODULATION CHOLINERGIQUE

Au niveau de plusieurs synapses, l'accumulation de neurotransmetteurs dans la fente synaptique entraînerait un phénomène d'auto-inhibition via l'activation de récepteurs présynaptiques. Ainsi, à la JNM de grenouille, l'application d'un agoniste cholinergique nicotinique diminuerait le contenu quantique et la fréquence des événements spontanés. Cette diminution serait consécutive à la réduction de l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques voltage-dépendants de type N, tel que suggéré par l'inhibition de la dépression nicotinique par l'oméga-conotoxine GVIA (Van der Kloot et al., 1997). L'effet dépresseur des agonistes nicotiniques passerait par l'activation d'un récepteur nicotinique présynaptique et serait bloqué par l'antagoniste κ -bungarotoxine, spécifique aux récepteurs nicotiniques neuronaux (Van der Kloot, 1993). L'activation des récepteurs muscariniques pourrait elle aussi réduire le contenu quantique et la fréquence de libération spontanée. Toutefois, ces effets ne seraient observables que dans des conditions où la libération de neurotransmetteurs est réduite par une faible concentration de Ca^{2+} extracellulaire. Aussi, dans des conditions de neurotransmission normale, un antagoniste des

récepteurs muscariniques n'aurait aucun effet sur le contenu quantique ni sur la dépression induite par la stimulation à haute fréquence (Arenson, 1991).

1.2.4.2.1.2.5. MODULATION PURINERGIQUE

À la JNM cholinergique, l'ATP est stockée dans les vésicules synaptiques, au même titre que l'ACh, et agirait donc comme co-transmetteur. Ainsi, chacune des vésicules synaptiques contiendrait de l'ATP, dans un ratio ATP : ACh allant de 1 :10 à 1:1 (Henning, 1997). Suivant sa libération, l'ATP est dégradée en adénosine, sous l'action de plusieurs enzymes (Silinsky, 1975; Silinsky and Redman, 1996). À la JNM de grenouille, l'adénosine endogène inhiberait la libération d'ACh lors d'une stimulation à basse fréquence. En effet, l'inhibition de l'ecto-5'nucléotidase, l'enzyme catalysant la dernière réaction menant à la formation de l'adénosine, de même que l'application d'un antagoniste des récepteurs à l'adénosine préviendrait la dépression induite par une stimulation à 0.5 Hz, tandis que l'administration exogène d'un agoniste de ces mêmes récepteurs viendrait occlure les effets dépresseurs de la stimulation (Redman and Silinsky, 1994). L'effet dépresseur de l'adénosine chez la grenouille ne serait pas relié à une modification des courants calciques, contrairement aux observations faites chez la souris (Silinsky, 2004), mais bien à une altération en aval de l'entrée de Ca^{2+} (Robitaille et al., 1999), laquelle impliquerait spécifiquement l'activation des récepteurs A_1 à l'adénosine (Redman and Silinsky, 1993). L'un des mécanismes proposés pour expliquer, en partie, les effets de l'adénosine sur la transmission synaptique impliquerait la production d'oxyde nitrique (NO) d'une façon dépendante de la guanylate cyclase. La dépression induite par l'adénosine serait, en effet, réduite après traitement avec un donneur de NO et en présence d'un inhibiteur de la guanylate cyclase (Thomas and Robitaille, 2001).

À l'inverse, lors de stimulations soutenues, l'adénosine potentialiserait la libération de neurotransmetteurs via l'activation des récepteurs A_{2A} présynaptiques. Chez la souris, cette potentialisation pourrait passer par le recrutement de nouveaux canaux calciques de type L, qui amplifieraient l'entrée de Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse

(Oliveira et al., 2004). L'effet potentialisateur ou dépresseur de l'adénosine passerait donc par un équilibre entre l'activation des récepteurs A_1 et A_{2A} , lequel dépendrait du niveau d'activité neuronale et, conséquemment, de la quantité d'ATP libéré.

L'ATP aurait aussi la capacité de diminuer directement le contenu quantique d'une JNM, via l'activation des récepteurs P2Y. Les effets directs de l'ATP s'additionneraient à ceux de l'adénosine, suggérant que ces deux molécules modulent la transmission synaptique via l'activation de voies de signalisation distinctes (Giniatullin and Sokolova, 1998). D'ailleurs, l'activation des récepteurs P2Y, à la JNM de grenouille, pourrait stimuler de multiples cascades de signalisation intracellulaire, incluant l'activation de la phospholipase C spécifique à la phosphatidylcholine et de la PKC, de même que l'activation de la phospholipase A_2 et de la cyclooxygénase, tous des seconds messagers non-impliqués dans la signalisation de l'adénosine (Sokolova et al., 2003). L'activation des récepteurs P2Y serait, entre autres, à l'origine d'une inhibition des canaux calciques et d'une altération des mécanismes de libération des neurotransmetteurs. L'inhibition des canaux calciques passerait possiblement par la production d'acide arachidonique (Grishin et al., 2005), une molécule entraînant aussi une réduction du contenu quantique et de la fréquence de libération spontanée et dont les effets impliqueraient probablement la production de prostaglandine E2 (Arkipova et al., 2006). Également, l'activation des récepteurs P2Y par l'ATP stimulerait la production d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS), tels que le superoxyde, et celles-ci participeraient à la dépression du contenu quantique et de la fréquence des événements spontanés. Le superoxyde serait possiblement produit à l'extérieur de la terminaison nerveuse et agirait donc à titre de molécule de signalisation intercellulaire, étant donné que l'application d'une enzyme de destruction du superoxyde, non-perméable aux membranes, réduirait significativement les effets dépresseurs de l'ATP (Giniatullin et al., 2005).

La contribution relative de l'adénosine et de l'ATP à la dépression dans des conditions physiologiques reste à déterminer. Toutefois, la contribution de l'adénosine serait fonction de l'efficacité présynaptique initiale. Ainsi, l'adénosine ne jouerait pas un rôle majeur dans la dépression induite dans les JNMs à contenu quantique élevé. Au contraire, à une fréquence de stimulation de 20 Hz, les effets de l'adénosine seraient apparents dans les JNMs d'efficacité présynaptique faible et intermédiaire. À une fréquence de stimulation plus faible cependant, les JNMs à contenu quantique bas pourraient ne pas libérer suffisamment d'ATP pour qu'un effet de l'adénosine soit détectable. Par conséquent, l'adénosine contribuerait à la dépression dans des conditions où la libération de neurotransmetteurs est suffisamment élevée pour générer des niveaux adéquats d'adénosine, mais pas assez élevée pour observer une déplétion sévère des vésicules rapidement mobilisables (Meriney and Grinnell, 1991).

1.2.4.2.1.2.6. MODULATION PEPTIDERGIQUE

Outre les vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs, on retrouve également des vésicules à cœur dense dans les terminaisons nerveuses. Tel qu'observé à la JNM d'aplysie, celles-ci seraient cependant généralement éloignées de la zone active et très peu seraient arrimées à la membrane synaptique, prêtes à être libérées (Karhunen et al., 2001). D'ailleurs, la libération des vésicules à cœur dense serait beaucoup plus lente que celle des vésicules synaptiques et nécessiterait une activité neuronale élevée et prolongée. Ainsi, à la JNM de drosophile, l'exocytose des vésicules à cœur dense irait de pair avec une augmentation de leur motilité lors d'une stimulation neuronale à des fréquences physiologiques soutenues. Cette augmentation de la motilité serait dépendante du calcium et perdurerait plusieurs minutes après la fin de la stimulation (Shakiryanova et al., 2005). Le mécanisme à l'origine de ce phénomène impliquerait la libération de Ca^{2+} via la stimulation des récepteurs à la ryanodine du réticulum endoplasmique, puis l'activation de la CaMKII (Shakiryanova et al., 2007).

À la JNM de grenouille, les vésicules à cœur dense contiennent au moins deux types de neuropeptides, soit le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP, calcitonin gene-related peptide) et la substance P (Matteoli et al., 1988; Matteoli et al., 1990). Ceux-ci seraient principalement libérés lors d'une activité neuronale élevée et prolongée. D'ailleurs, à la JNM de grenouille, la substance P serait libérée en quantité suffisante pour avoir un effet physiologique, du moins sur les CSPs, lors d'une stimulation à haute fréquence (Bourque and Robitaille, 1998). Au niveau présynaptique, l'application de substance P augmenterait le contenu quantique de même que la fréquence des événements spontanés (Akasu, 1986). Le CGRP, aussi contenu dans les vésicules à cœur dense, augmenterait également le contenu quantique et la fréquence de libération spontanée en plus d'augmenter la taille des quanta, d'une façon dépendante de la PKA, tel que démontré par l'inaltération des quanta en présence d'un inhibiteur de l'activation de la PKA par l'AMPC. Toutefois, l'effet de ce peptide se développerait en plusieurs minutes et sa libération endogène pourrait être insuffisante pour affecter significativement la neurotransmission (Van der Kloot et al., 1998). D'ailleurs, une diminution plutôt qu'une augmentation de la taille des quanta a été démontrée, à la JNM de grenouille, lors d'une stimulation répétée à une fréquence de 10 Hz (Naves and Van der Kloot, 2001).

À l'instar des synapses centrales, la JNM est donc soumise à une modulation fine de son efficacité présynaptique qui requiert l'intégration ponctuelle de signaux multiples et variés. Le résultat de cette intégration affectera le déterminant présynaptique du facteur de sécurité et, par conséquent, modulera le message nerveux perçu par les autres membres de la synapse tripartite.

1.2.4.3. DÉTERMINANTS POSTSYNAPTIQUES DU FACTEUR DE SÉCURITÉ

1.2.4.3.1. ACÉTYLCHOLINESTÉRASE

La fibre musculaire est complètement entourée d'une lame basale, laquelle pénètre dans la fente synaptique, jusque dans les replis postsynaptiques. La lame basale synaptique exprime de nombreuses protéines impliquées dans la stabilisation de la structure et le fonctionnement de la JNM. On y retrouve, entre autres,

l'acétylcholinestérase (AChE), soit l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'ACh. L'AChE serait généralement libre et mobile dans l'espace pérисynaptique, mais ancrée à la membrane basale et agglomérée près des sites de libération, grâce à la formation de complexes protéiques (Peng et al., 1999). Elle limiterait donc, dans le temps et dans l'espace, l'action de l'ACh. De ce fait, le niveau d'activité et la densité des molécules d'AChE agiraient directement sur la taille des quantas et donc, sur le facteur de sécurité.

Le niveau d'activité de l'AChE serait régulé de façon différente dans les muscles phasiques et toniques. Par exemple, l'apolipoprotéine E (apoE) augmenterait l'activité de l'AChE dans le muscle *soleus* de la souris, sans avoir d'effet apparent dans le muscle EDL. Ainsi, chez la souris déficiente en apoE, les JNMs du *soleus* présenteraient des quantas de taille augmentée par rapport aux JNMs témoins, alors que les JNMs de l'EDL ne seraient pas affectées par la mutation. La situation serait toutefois rétablie en présence de néostigmine, un inhibiteur de l'AChE (Everett and Ernst, 2004).

La densité des molécules d'AChE serait, quant à elle, influencée par l'activité synaptique, plus spécifiquement par l'activité musculaire. En effet, chez la souris, la réinsertion initiale des molécules d'AChE dans la lame basale, normalement observée après l'administration d'un inhibiteur de l'AChE, serait réduite de moitié en absence de potentiels d'action musculaires. L'entrée de Ca^{2+} dans la fibre musculaire serait également impliquée dans le phénomène, compte tenu que la dépolarisation directe de la fibre musculaire, en présence d'un bloqueur des canaux calciques voltage-dépendants, ne permettrait pas un taux de réinsertion maximal de la molécule (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2005).

1.2.4.3.2. DENSITÉ, DISTRIBUTION ET SENSIBILITÉ DES NACHRS

Les récepteurs canaux présents sur les crêtes des replis postsynaptiques des JNMs de vertébrés sont les nAChRs. Environ 26 000 nAChRs/ μm^2 sont présents sur la membrane postsynaptique du *c.p.* de la grenouille, au niveau de ces crêtes

(Matthews-Bellinger and Salpeter, 1978). La liaison de deux molécules d'ACh avec ces récepteurs entraîne l'ouverture d'un canal perméable aux cations (Na^+ , Ca^{2+} , K^+). En pénétrant dans la fibre musculaire, ceux-ci en dépolarisent la membrane et mènent donc à la formation d'un potentiel de plaque motrice. Les nAChRs sont généralement présents en excès par rapport au nombre requis pour le déclenchement d'un potentiel d'action et contribuent, de ce fait, à maintenir le facteur de sécurité. D'ailleurs, à la JNM de souris, 25% de ces récepteurs seraient suffisants pour la génération d'un potentiel d'action (Rochel and Robbins, 1987). Cependant, la densité, la distribution et la sensibilité des nAChRs serait appelée à changer en fonction de l'activité synaptique, modulant, par le fait même, le facteur de sécurité.

À la JNM de grenouille, l'administration d'une série de stimuli à moins de 25 msec d'intervalle serait à l'origine d'une désensibilisation des nAChRs (Magleby and Pallotta, 1981). Celle-ci surviendrait en deux étapes et l'une d'elles impliquerait probablement le Ca^{2+} postsynaptique. D'abord, l'ouverture des nAChRs, suivant la liaison de l'ACh, entraînerait une entrée de Ca^{2+} dans la fibre musculaire qui rendrait le récepteur susceptible à la désensibilisation. Cette susceptibilité serait maintenue pendant environ 25 msec, de sorte que la liaison subséquente d'ACh dans cet intervalle de temps désensibiliserait le récepteur. Puis, en absence d'agoniste, les récepteurs recouvreraient une sensibilité normale à l'ACh en quelques secondes à une minute (Magleby and Pallotta, 1981). Ainsi, l'activité synaptique modulerait le facteur de sécurité en régulant la sensibilité des nAChRs.

L'activité synaptique régulerait également la densité des nAChRs à la JNM. Il existerait, en effet, un trafic régulier de ces récepteurs entre la membrane plasmique et le compartiment intracellulaire, de même qu'entre les régions synaptiques et extrasynaptiques. La demi-vie des nAChRs, à la JNM de souris, serait en moyenne de 14 jours, après quoi 50% de la population initiale serait internalisé. Suivant leur internalisation, les nAChRs pourraient être dégradés dans les lysosomes puis remplacés par des récepteurs synthétisés de novo ou recyclés et retournés à la membrane. Les récepteurs recyclés constitueraient d'ailleurs un ensemble distinct,

hautement dynamique et dont la demi-vie serait plus courte que les récepteurs nouvellement synthétisés. De plus, une fois internalisés, les récepteurs recyclés seraient principalement remplacés par d'autres récepteurs appartenant au même ensemble, selon un mécanisme dépendant de la tyrosine phosphatase. En effet, en présence d'un inhibiteur de la tyrosine phosphatase, la distribution des récepteurs recyclés serait altérée de sorte qu'ils seraient relocalisés à l'extérieur de la région synaptique (Bruneau and Akaaboune, 2006). Par conséquent, l'activité de cette enzyme pourrait influencer le facteur de sécurité en agissant sur la distribution des nAChRs. Parallèlement, l'activité synaptique modulerait le facteur de sécurité en régulant le trafic des nAChRs entre la membrane plasmique et le compartiment intracellulaire. Effectivement, quatre jours après un blocage ponctuel des nAChRs membranaires avec l' α -bungarotoxine, quelque 25% de cette population serait normalement constitué de récepteurs recyclés et tout autant de récepteurs nouvellement synthétisés. Toutefois, lors d'un blocage prolongé à l'aide de curare, le recyclage des nAChRs serait fortement inhibé et leur synthèse serait aussi très diminuée (Bruneau et al., 2005). À l'image des synapses du SNC, l'existence de deux ensembles de nAChRs permettrait à la JNM de réguler le facteur de sécurité à court et long-terme. Ainsi, l'ensemble de récepteurs rapidement recyclables constituerait une façon efficace de réguler ponctuellement le facteur de sécurité en fonction des besoins de la synapse, tandis que la synthèse de nouveaux nAChRs l'influencerait à plus long-terme.

1.2.4.3.3. CANAUX Na^+ -VOLTAGE DÉPENDANTS

Au-delà d'un certain seuil, le potentiel de plaque motrice déclenchera l'ouverture des canaux Na^+ voltage-dépendants à l'origine du potentiel d'action. En se propageant ensuite dans la fibre musculaire le potentiel d'action provoquera la contraction musculaire. Les canaux Na^+ voltage-dépendants sont exprimés en très grande densité au fond des replis postsynaptiques (Flucher and Daniels, 1989). D'ailleurs, plus les canaux Na^+ voltage-dépendants seront nombreux, moins la proportion de canaux ouverts devra être grande pour générer le potentiel d'action et plus le seuil de déclenchement de ce dernier sera bas. Ainsi, le nombre de nAChRs qui devront être

activés pour atteindre ce seuil sera également réduit. Par conséquent, la densité des canaux Na^+ voltage-dépendants serait impliquée dans la détermination du facteur de sécurité.

Dans le muscle squelettique de rat, il existerait au moins sept différents types de canaux Na^+ voltage-dépendants issus de gènes distincts ou de l'épissage alternatif (Schaller et al., 1992). En outre, les canaux Na^+ voltage-dépendants exprimés dans les muscles phasiques seraient inactivés plus longtemps que ceux des muscles toniques suivant une dépolarisation membranaire. Cette particularité pourrait limiter la durée des trains de potentiels d'action à haute fréquence associés aux muscles phasiques et permettre aux muscles toniques de décharger à des fréquences plus basses de façon prolongée. De plus, le courant associé à l'ouverture des canaux Na^+ voltage-dépendants serait supérieur dans les muscles phasiques (Ruff, 1996), vraisemblablement à cause de la plus grande densité de ces canaux au niveau de leur plaque motrice. Cette densité serait, par ailleurs, régulée par le patron d'activité nerveuse, de sorte que la transplantation d'un nerf phasique sur un muscle tonique doublerait la densité des canaux Na^+ voltage-dépendants au niveau de ses fibres (Milton and Behforouz, 1995).

1.2.4.3.4. AUTRES PROPRIÉTÉS DE LA FIBRE MUSCULAIRE

Outre l'activité de l'AChE, la distribution et la densité des nAChRs et des canaux Na^+ voltage-dépendants, d'autres propriétés de la fibre musculaire pourraient également contribuer au facteur de sécurité. Par exemple, le diamètre de la fibre musculaire, lequel est inversement relié à la résistance membranaire, influencerait l'amplitude de la dépolarisation induite par une quantité donnée de neurotransmetteurs. Ainsi, les fibres de grand diamètre nécessiteraient un plus grand nombre de quanta de neurotransmetteurs que les fibres de faible diamètre pour une même dépolarisation (Wood and Slater, 2001).

Par ailleurs, les propriétés de l'appareil contractile de même que le métabolisme mitochondrial assureraient une contraction musculaire adaptée aux patrons d'activité

neuronale. L'expression des quatre différents isoformes de la chaîne lourde de myosine, I, IIa, IIx et IIb dicterait, en effet, la vitesse de contraction des fibres musculaires, du plus lent au plus rapide respectivement. Parallèlement, le métabolisme oxydatif mitochondrial décroîsserait, tandis que le métabolisme anaérobique glycolytique, croîsserait dans cet ordre (Quiroz-Rothe and Rivero, 2004). Ainsi, les fibres musculaires associées aux motoneurones phasiques exprimeraient principalement les isoformes de type II et seraient donc aptes à soutenir un patron d'activation à haute-fréquence, mais bref. Au contraire, les fibres musculaires associées aux motoneurones toniques exprimeraient principalement l'isoforme de type I, contiendraient davantage de mitochondries, fatigueraient moins rapidement et pourraient soutenir un patron d'activation prolongé.

1.2.4.4. MODULATION GLIALE DU FACTEUR DE SÉCURITÉ

À l'instar des astrocytes du SNC, les CSPs sont en relation anatomique étroite avec la synapse. Cette relation leur confère donc une position stratégique pour moduler la communication entre la terminaison nerveuse et la fibre musculaire. D'ailleurs, les CSPs expriment une grande variété de récepteurs fonctionnels pour différents neurotransmetteurs et neuromodulateurs, de même que de nombreux canaux ioniques. Les CSPs sont donc réceptives aux messages chimiques en provenance de la terminaison nerveuse et de la fibre musculaire. De plus, comme les récepteurs gliaux sont couplés à différentes cascades de signalisation, impliquant notamment les protéines G et la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires, et que des gliotransmetteurs peuvent être libérés par les CSPs dans différentes conditions, une action réciproque de ces cellules sur les éléments pré et postsynaptiques est à envisager. De ce fait, les CSPs sont de plus en plus considérées comme des éléments importants de la transmission synaptique, capables de réguler le facteur de sécurité.

Les découvertes qui ont mené à l'évolution de ce concept, à la JNM de vertébré, sont d'ailleurs l'objet d'un chapitre dans l'ouvrage Encyclopedia of Neuroscience, dont le texte intégral est présenté dans les sections ci-après et dont la référence complète est la suivante :

- E.-L. Bélair and R. Robitaille. In Larry R. Squire, Editor-in-Chief, Encyclopedia of Neuroscience, Academic Press, Oxford, 2008. Copyright © 2008, with permission from Elsevier Science Inc.

1.2.4.4.1. CHAPITRE TIRÉ DE ENCYCLOPEDIA OF NEUROSCIENCE**Vertebrate Neuromuscular Junctions:****Perisynaptic Schwann cells as modulators of neuromuscular transmission**

Eve-Lyne Bélair and Richard Robitaille

Centre de Recherche en Sciences Neurologiques
Département de physiologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec
Canada
H3C 3J7.

Eve-Lyne Bélair

Email: eve.lyne.belair@umontreal.ca

Phone: (514) 343-6111 ext. 4390

Richard Robitaille

Email: richard.robaille@umontreal.ca

Phone : (514) 343-6111 ext. 1946

Keywords : Perisynaptic Schwann cells Calcium responses
 Neuromuscular junction G-proteins
 Synaptic transmission Potentiation
 Modulation Depression
 Receptors Gliotransmitters
 Ion channels

1.2.4.4.1.1. SYNOPSIS

Perisynaptic Schwann cells (PSCs) are increasingly viewed as important players in synaptic transmission at the vertebrate neuromuscular junction (NMJ). They express receptors for many neurotransmitters and neuromodulators as well as ionic channels and are therefore able to sense synaptic activity and respond to it. In fact, receptor stimulation can activate signalling cascades that involve G proteins and the release of calcium from intracellular stores. The activation of G protein pathways has been shown to decrease transmitter release, whereas calcium signalling in PSCs has been associated with a potentiation of neurotransmission. These results reveal roles for these cells in short-term modulation of synaptic efficacy. Studies have also demonstrated the importance of PSCs for the maintenance of NMJ synaptic properties. Thus, PSCs are believed to be important integrators of synaptic function, hence the necessity to consider the NMJ as a tripartite structure.

1.2.4.4.1.2. INTRODUCTION

The concept of the neuromuscular junction as a tripartite structure, consisting of a nerve terminal (presynaptic component), a muscle fibre and its endplate (postsynaptic component) and a few perisynaptic Schwann cells (glial component), has gained general acceptance over the past decade. Indeed, Schwann cells that were first described as passive cells, implicated in homeostasis functions and NMJ stability, are now believed to actively modulate synaptic transmission. The discoveries that led to the evolution of this concept, mainly evidence that PSCs can detect and respond to synaptic activity and, in return, have the ability to increase or decrease transmitter release, will be discussed in this article.

1.2.4.4.1.3. AN ADVANTAGEOUS POSITION

PSCs lie on top of nerve terminals and extend processes that run along and wrap around them in the vicinity of transmitter release sites (active zones). Although this is true for all vertebrates, differences exist between species. At amphibian NMJs, for example, these processes intrude into the synaptic cleft. In contrast, at mammalian NMJs, PSC processes remain at the edge of the synaptic cleft. Interposition of Schwann cell processes between presynaptic and postsynaptic membranes appears to be negatively correlated with synaptic efficacy, suggesting that glial coverage of synaptic clefts may regulate information processing. Moreover, because of their proximity to active zones, PSCs are well positioned to sense synaptic activity and exert a modulating role on pre- and/or postsynaptic elements.

1.2.4.4.1.4. DETECTORS OF SYNAPTIC TRANSMISSION

1.2.4.4.1.4.1. A COCKTAIL OF PRESYNAPTICALLY RELEASED MOLECULES

During presynaptic activity, many neurotransmitters and neuromodulators can be released from nerve terminals. In fact, at some NMJs, ATP is released synchronously together with the neurotransmitter ACh following a single nerve impulse and is subsequently degraded by enzymatic activity into ADP, AMP and adenosine. In addition, immunoreactivity for peptides (calcitonin-gene related peptide and substance P) was found in large dense core vesicles of amphibian and

mammalian motor nerve terminals and the release of these peptides is elicited by high-frequency nerve stimulation. Synaptic activity also regulates the release of diverse neurotrophins, namely brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophins-3 (NT-3) and -4 (NT-4) that, in turn, act as synaptic regulators. Therefore, according to the level of synaptic activity, a cocktail of molecules can be released into the synaptic environment and the message received by the three synaptic partners varies as a function of the receptors they express.

1.2.4.4.1.4.2. A VARIETY OF RECEPTORS

Using calcium imaging and immunocytochemical techniques, functional receptors for all of the aforementioned molecules have been found on PSCs. The presence of functional receptors on PSCs in situ was first revealed at amphibian NMJs, where PSCs responded to nerve stimulation with an elevation of intracellular Ca^{2+} . This Ca^{2+} rise was greatly reduced by blockade of presynaptic Ca^{2+} entry, was independent of the presence of muscle fibres and could be reproduced by direct application of ATP, adenosine and ACh. This suggests that neurotransmitters released from presynaptic nerve terminals mediated the glial Ca^{2+} responses. Also, because Ca^{2+} responses still occurred in the absence of extracellular Ca^{2+} , intracellular Ca^{2+} stores were involved. The use of specific antagonists later allowed the identification of the receptors mediating ATP and adenosine responses on frog PSCs. ATP triggered Ca^{2+} rises via P2Y and P2X receptors; P2YR activation leading to the release of Ca^{2+} from internal stores through recruitment of a pertussis toxin-sensitive G-protein and P2XR activating L-type Ca^{2+} channels. Adenosine acted on A1 receptors also coupled to a pertussis toxin-sensitive G-protein. The blockade of A1 receptors did not alter calcium rises evoked by nerve stimulation, suggesting that they are not involved in neuron-glia communication during normal neurotransmission. Conversely, blockade of ATP receptors lead to delayed Ca^{2+} elevations with smaller amplitude, indicating that endogenous ATP participates in synapse-glia signalling. The identity of the receptors mediating cholinergic responses in PSCs is, however, less clear. An unconventional muscarinic receptor, insensitive to the general antagonist atropine but inhibited by the non-specific blocker, gallamine, has been identified. These receptors

are coupled to internal Ca^{2+} stores via a pertussis toxin-insensitive G protein mechanism. Hence, owing to the presence of receptors for the neurotransmitters normally released during presynaptic activity, PSCs are well adapted to sense this activity and ultimately to respond to it.

1.2.4.4.1.4.3. AN EVOLUTIONARILY CONSERVED PROPERTY

The ability of PSCs to respond to synaptic activity is well conserved among vertebrates although some evolutionary differences exist. For example, at the skate neuroelectrocyte junction, which has a neuromuscular embryonic origin, receptors for ATP and ADP, but not for adenosine and AMP, were identified on PSCs. This preparation also receives a cholinergic innervation where ATP is coreleased with ACh. Application of ATP was found to trigger a biphasic calcium elevation in PSCs, involving P2Y receptor stimulation and, most likely, activation of phospholipase C, generation of IP_3 and subsequent Ca^{2+} release from IP_3 -sensitive stores. In mammals, ATP-mediated Ca^{2+} responses do not involve P2 receptors, suggesting that ATP acts through its metabolites, mainly adenosine. Moreover, as opposed to frog PSCs, A1 receptors for adenosine participate in nerve-evoked Ca^{2+} rises, but to a lesser extent than receptors for ACh. In addition, the latter are of a conventional muscarinic type since atropine blocks ACh evoked Ca^{2+} responses. Regardless of the interspecies variability in receptor expression, which might contribute to physiological differences between species, the ability of PSCs to respond to the release of transmitters is common to all, reflecting their functional importance. Also, the variety of receptors for a given neurotransmitter and their relative sensitivity will undoubtedly color the signal received by PSCs and adapt their response as a function of synaptic activity.

1.2.4.4.1.4.4. ADAPTED Ca^{2+} RESPONSES

In addition to their receptors for neurotransmitters, PSCs possess receptors for molecules that are preferentially released during elevated synaptic activity. For example, substance P induces the release of Ca^{2+} from intracellular stores of frog PSCs, most likely through its metabolites. These Ca^{2+} elevations are mediated by

neurokinin-1 receptors (NK-1R) coupled to PTX-sensitive G-proteins. NK-1R activity seems to be involved in the modulation of ATP and ACh signalling in PSCs since their previous activation reduces the amplitude of Ca^{2+} responses evoked by nerve stimulation or local application of muscarine and ATP. Some neurotrophin receptors may play similar roles in specific conditions. In fact, NT-3 and BDNF all trigger Ca^{2+} elevations in mouse PSCs, through TrKB (BDNF) and TrKC (NT-3) receptors. An application of BDNF prior to nerve stimulation increases the duration of the evoked Ca^{2+} response. These molecules may be important for the fine tuning of PSC Ca^{2+} responses and may enlarge their scale of responsiveness to ACh and ATP, allowing them to discriminate different degrees of synaptic activity.

1.2.4.4.1.4.5. PRESENCE OF VOLTAGE-GATED ION CHANNELS

In addition to the various receptors for neurotransmitters and neuromodulators, PSCs possess voltage-gated ion channels that also allow them to sense synaptic activity. Depolarization-activated L-type Ca^{2+} channels are found on frog PSC processes, close to the synaptic cleft, while N-type Ca^{2+} channels are presumed to be present on mammalian PSCs. However, the persistence of PSC calcium responses in the absence of extracellular Ca^{2+} suggests that only a small proportion of the response can be accounted for by the activation of Ca^{2+} channels.

Hence, PSCs are kept aware of synaptic activity mainly through G-protein coupled receptor activation and intracellular Ca^{2+} signalling, with Ca^{2+} being released from intracellular stores and, to a lesser extent, entering the cell via voltage-gated ion channels. Therefore, a direct manipulation of G-protein or Ca^{2+} signalling would lead to a modulation of the message received by PSCs which could, in turn, modulate synaptic transmission.

1.2.4.4.1.5. MODULATORS OF SYNAPTIC TRANSMISSION

1.2.4.4.1.5.1. G-PROTEIN SIGNALLING

The first direct evidence of PSCs modulating synaptic transmission came from a study of the frog NMJ, where PSC G-proteins were specifically activated or inactivated via intracellular injection of GTP γ S and GDP β S, respectively. This method avoids the complication of bath-applied drugs acting on cells other than PSCs. GTP γ S injection into PSCs decreased the amplitude of nerve-evoked endplate currents, but had no effect on the frequency, amplitude or kinetics of spontaneous events (Figure 1).

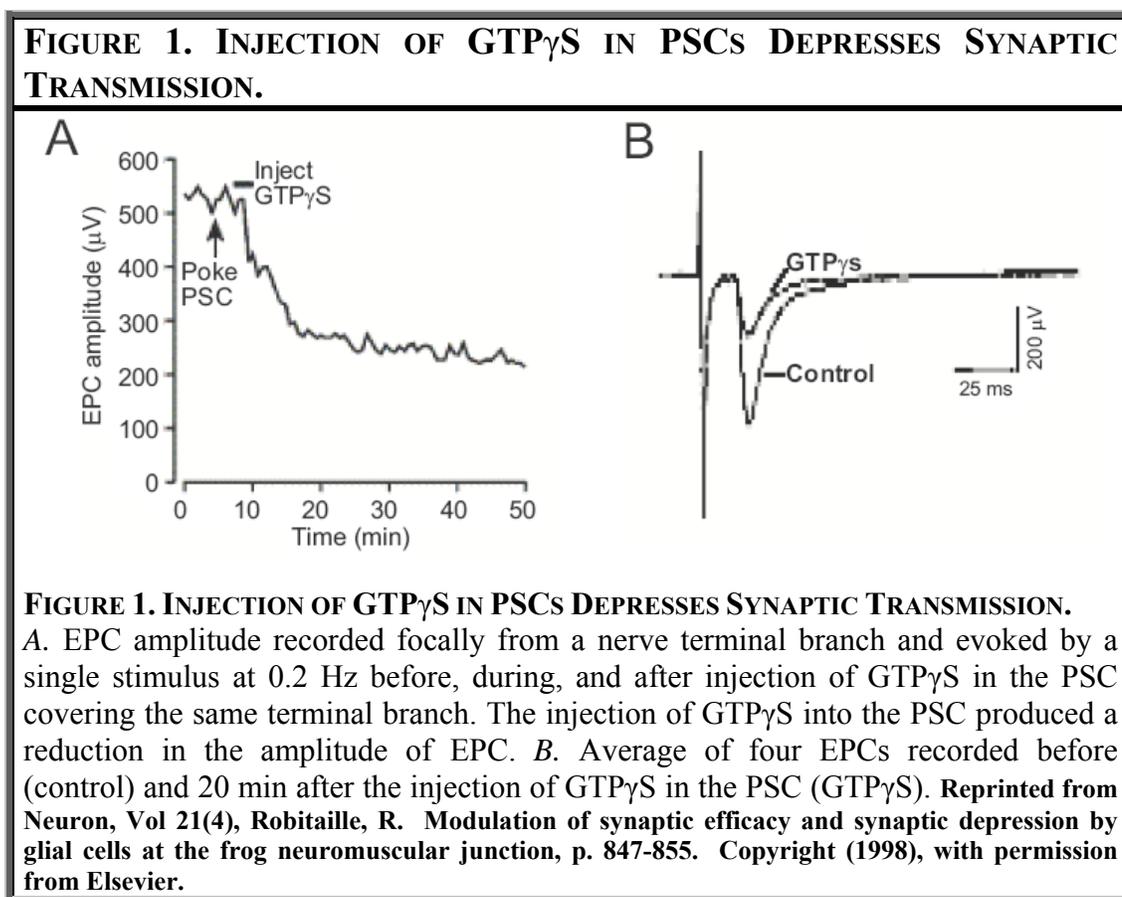


Figure 1. Injection of GTP γ S in PSCs depresses synaptic transmission

Furthermore, paired-pulse facilitation was not altered by the injection, suggesting that the modulation of synaptic efficacy by PSCs does not affect the basic mechanisms required for vesicular fusion but rather involves the synchronization mechanisms that are necessary for quantal release. Moreover, the effect of GTP γ S injection into PSCs was only partially occluded by pre-treatment with pertussis toxin revealing a dual effect of PTX-sensitive and insensitive G-protein activation on the modulation of synaptic efficacy. On the other hand, inhibition of G-proteins, via GDP β S injection, had no effect on transmitter release evoked by 0.2 Hz stimulation. While an increase of synaptic efficacy would have been expected if PSC G-proteins were tonically active, the observed lack of effect is suggestive of an absence of tonic activity. This is consistent with the absence of detectable Ca²⁺ signalling in PSCs with low frequency nerve stimulation and reflects an activity-dependent modulation of transmitter release by PSCs.

In addition to their modulation of transmitter release, PSCs also participate in short-term plasticity of synaptic transmission. Indeed, inhibition of PSC G-proteins decreased synaptic depression in response to high frequency stimulation. Moreover, the depression induced by PSC G-protein activation occluded 75% of high frequency-triggered depression (Figure 2). These results suggest that PSC G-protein might modulate the presynaptic mechanisms causing the depression of transmitter release

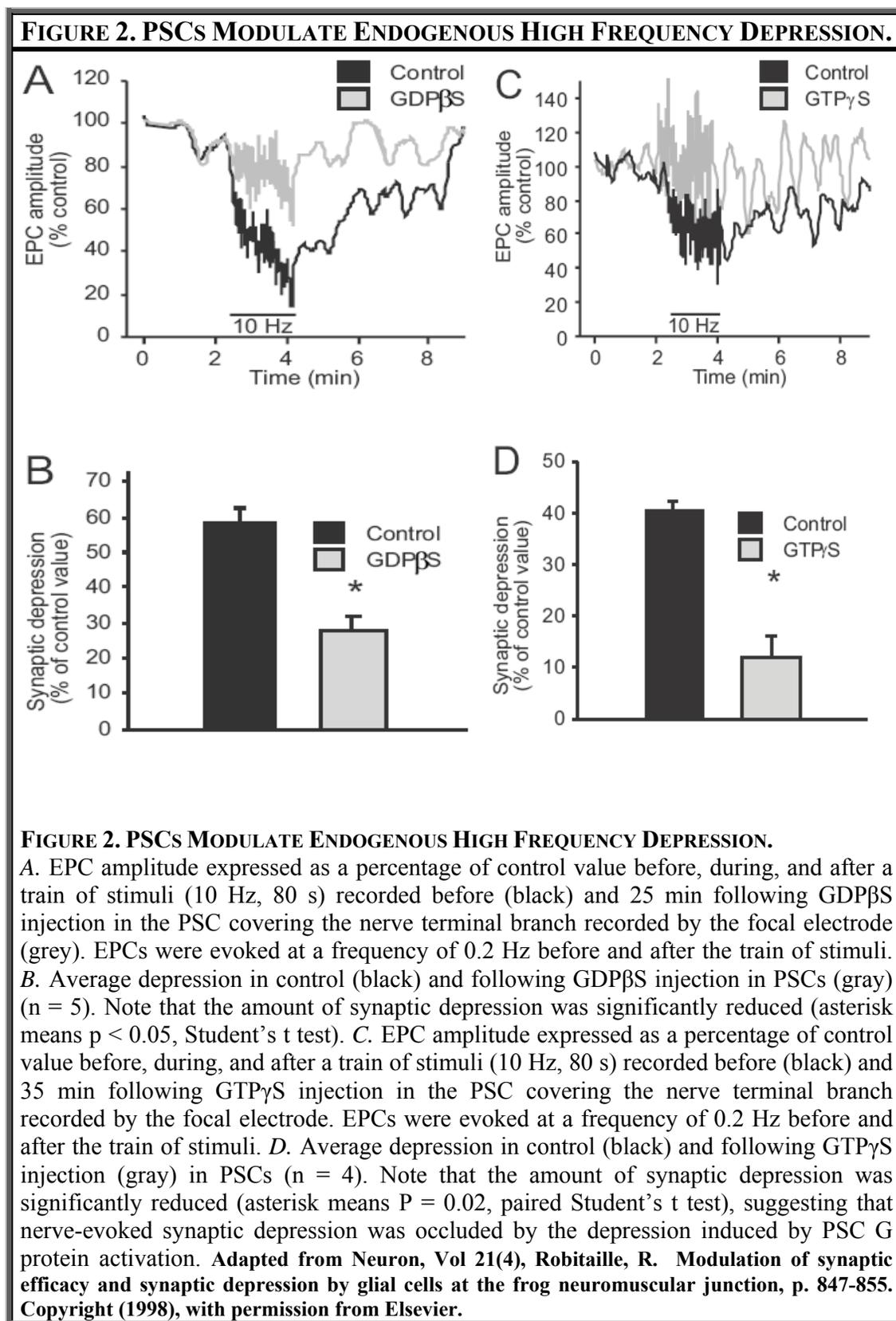
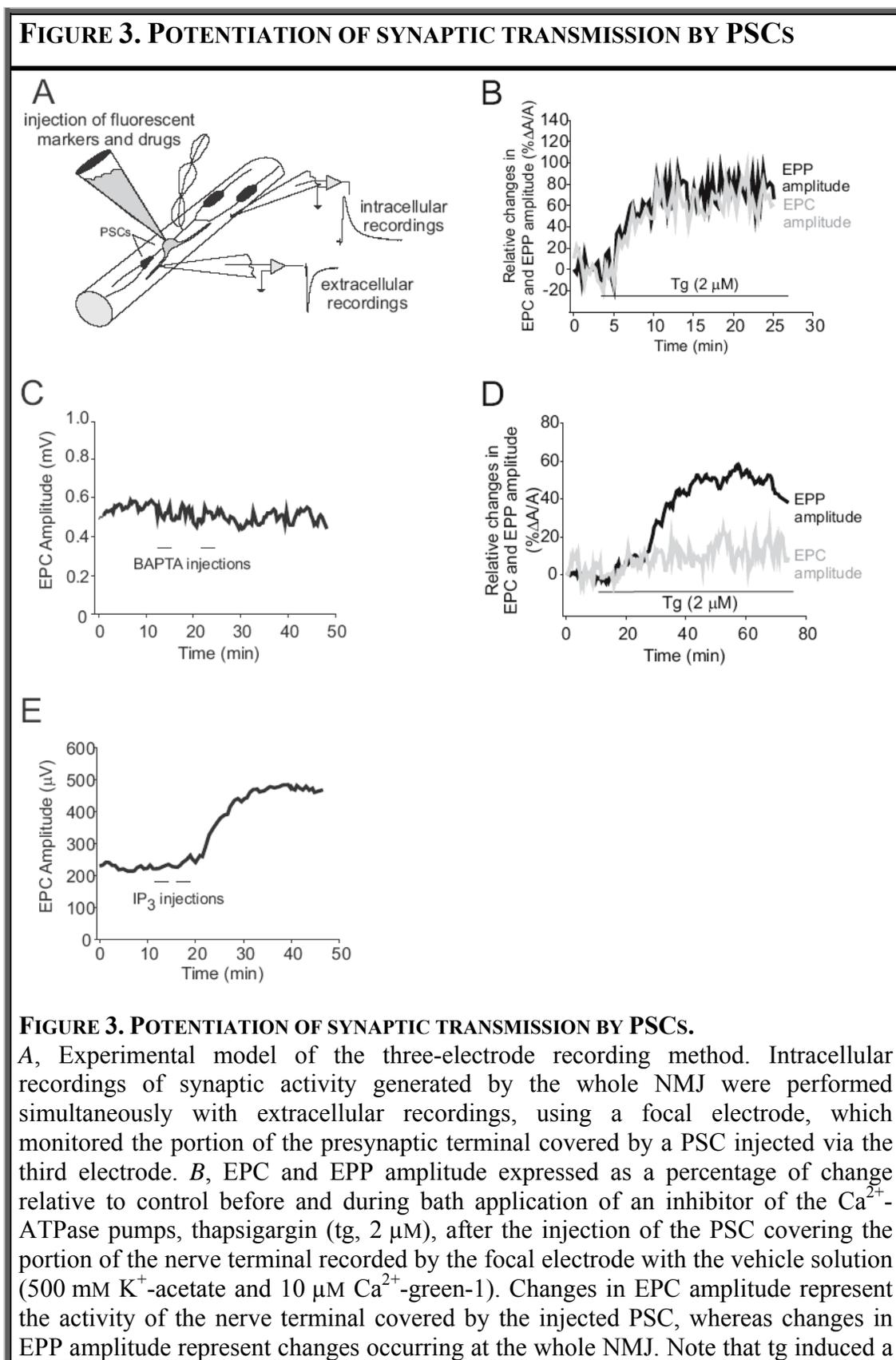


Figure 2. PSCs modulate endogenous high frequency depression

1.2.4.4.1.5.2. CALCIUM SIGNALLING

The effect of PSC Ca^{2+} elevations on transmitter release was later investigated in the same system, using thapsigargin, an inhibitor of Ca^{2+} -ATPase pumps of internal stores. Bath application of thapsigargin induced a transient rise of Ca^{2+} in PSCs as a result of the gradual leak of Ca^{2+} from the internal stores and the incapacity to replenish them. Thapsigargin also prolonged Ca^{2+} responses in presynaptic nerve terminals following single action potentials and caused Ca^{2+} accumulation during high frequency stimulation without altering resting levels of Ca^{2+} . Therefore, presynaptic internal stores were assumed to be empty at rest and to participate to Ca^{2+} clearance during synaptic activity. Correlated with the prolonged Ca^{2+} signal in presynaptic nerve terminals was a rapid increase in transmitter release. After a delay, transmitter release was further increased, transiently and with a slower rate. This delayed and transient increase of transmitter release was associated with PSC Ca^{2+} rise since it was occluded by specific injection of the Ca^{2+} chelator BAPTA into PSCs. Moreover, the release of Ca^{2+} from PSC internal stores, triggered by the injection of inositol 1,4,5-triphosphate, mimicked thapsigargin-induced potentiation of transmitter release (Figure 3).

This potentiation was associated with an increase in the frequency of miniature EPPs. This, together with the lack of effects of thapsigargin on mEPP amplitude and time course, implies that this potentiation is presynaptic in origin.



similar increase in EPP amplitude (whole NMJ activity) and in EPC amplitude (portion of the terminal covered by the injected PSC). *C*, EPC amplitude recorded by a focal electrode located near the portion of a nerve terminal covered by a PSC before, during, and after the injection of the calcium chelator BAPTA (10 mM in the electrode) in the PSC. EPCs were evoked by nerve stimulation at 0.2 Hz. Note that BAPTA injection had no effect on synaptic transmission. *D*, EPC and EPP amplitude expressed as a percentage of changes relative to control before and during bath application of tg (2 μ M) after the injection of BAPTA (10 mM in the electrode) in the PSC covering the portion of the nerve terminal recorded by the focal electrode. Note that tg induced a rapid rise, followed by a second, slower increase in EPP amplitude (whole NMJ activity) but induced only a small and rapid rise in EPC amplitude (portion of the terminal covered by the injected PSC). *E*, EPC amplitude before and after the injection of IP₃ (10 mM in the electrode) in the PSC covering the portion of the nerve terminal recorded by the focal electrode. EPCs were evoked by motor nerve stimulation at 0.2 Hz. Note that the injection of IP₃ in PSCs potentiated transmitter release. Reprinted from *Journal of Neuroscience*, Vol 21(6), Castonguay, A. and Robitaille, R. Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse, p. 1911-1922. Copyright (2001) by the Society for Neuroscience.

Figure 3. Potentiation of synaptic transmission by PSCs

Because Ca²⁺ signalling is undetectable in PSCs at low frequencies of stimulation, their Ca²⁺-dependent potentiation of transmitter release is likely to occur mainly during elevated synaptic activity. Decreasing the availability of free Ca²⁺ by increasing the Ca²⁺ buffering capacity of PSCs, should inhibit this potentiation. As expected, specific BAPTA injection into PSC, prior to high frequency stimulation, enhanced the depression of synaptic transmission, confirming the potentiating role of PSC Ca²⁺ responses (Figure 4).

FIGURE 4. SYNAPTIC DEPRESSION IS MODULATED BY PSCs.

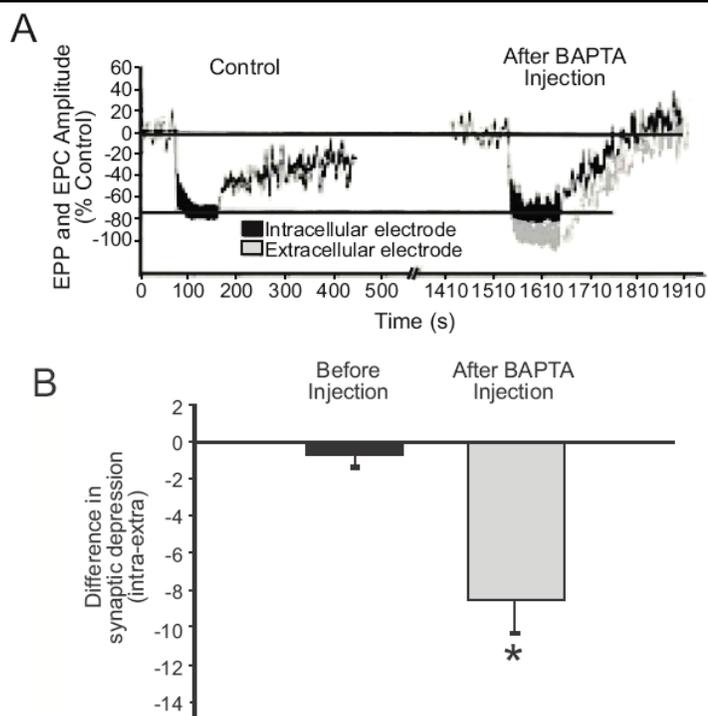


FIGURE 4. SYNAPTIC DEPRESSION IS MODULATED BY PSCs.

A, Changes in EPC (gray trace) amplitude and EPP (black trace) amplitude expressed as a percentage of control before, during, and after the induction of high frequency depression (10 Hz/80 sec) at the frog NMJ. Note that the focal and intracellular recordings show the same amplitude of depression. After the injection of calcium chelator BAPTA into a PSC (break in x -axis) the focal electrode (gray trace), which records synaptic transmission under the injected PSC, shows a bigger depression than the intracellular one, thus suggesting that the presence of BAPTA in PSC blocked the potentiating effect on synaptic transmission. B, Mean \pm SEM of the difference between intracellular and extracellular depression in control and after BAPTA injection into PSCs. Note that, after BAPTA injection, the difference between the amplitude of depression recorded by the intracellular and focal electrodes was significantly greater. Reprinted from *Journal of Neuroscience*, Vol 21(6), Castonguay, A. and Robitaille, R. Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca^{2+} internal stores at the neuromuscular synapse, p. 1911-1922. Copyright (2001) by the Society for Neuroscience.

Figure 4. Synaptic depression is modulated by PSCs

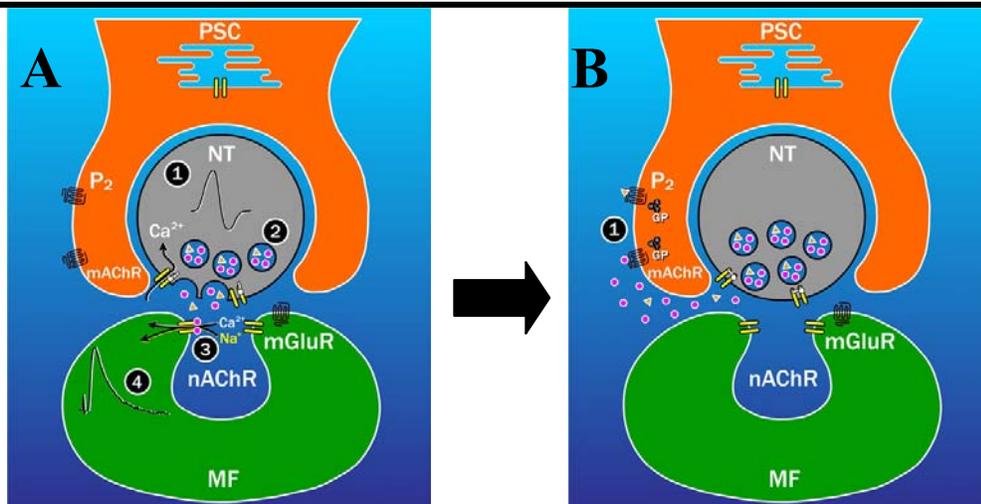
Therefore, PSCs can modulate short-term plasticity either by increasing or decreasing transmitter release, via Ca^{2+} signalling and G-protein activation respectively (Figure 5). As a result, the balance between potentiation and depression by PSCs may vary according to the state of the synapse and the level of its activity.

1.2.4.4.1.5.3. GLUTAMATE CARBOXYPEPTIDASE II

N-acetylaspartylglutamate (NAAG) is a widely distributed neuropeptide in the mammalian CNS. The presence of its hydrolyzing enzyme on PSC membranes, as well as its neuromodulatory role at the rat NMJ have raised the possibility of its release by motor neuron terminals. Indeed, NAAG was found to inhibit non-quantal release of ACh, through the activation of postsynaptic NMDA receptors and synthesis of the retrograde messenger nitric oxide (NO). This effect was mimicked by glutamate application and blocked by the inhibition of the PSC membrane-associated ectoenzyme, glutamate carboxypeptidase II (GCP II), which hydrolyzes NAAG into glutamate. Therefore, PSCs could modulate transmitter release indirectly through the metabolism of presynaptically released neuropeptides. This function may be tightly regulated by synaptic activity as activation of glial type II metabotropic glutamate receptors has been shown to upregulate GCP II activity in crayfish nervous tissue. Thus, previous synaptic activity could provide an important reciprocal modulation of synaptic activity by PSCs.

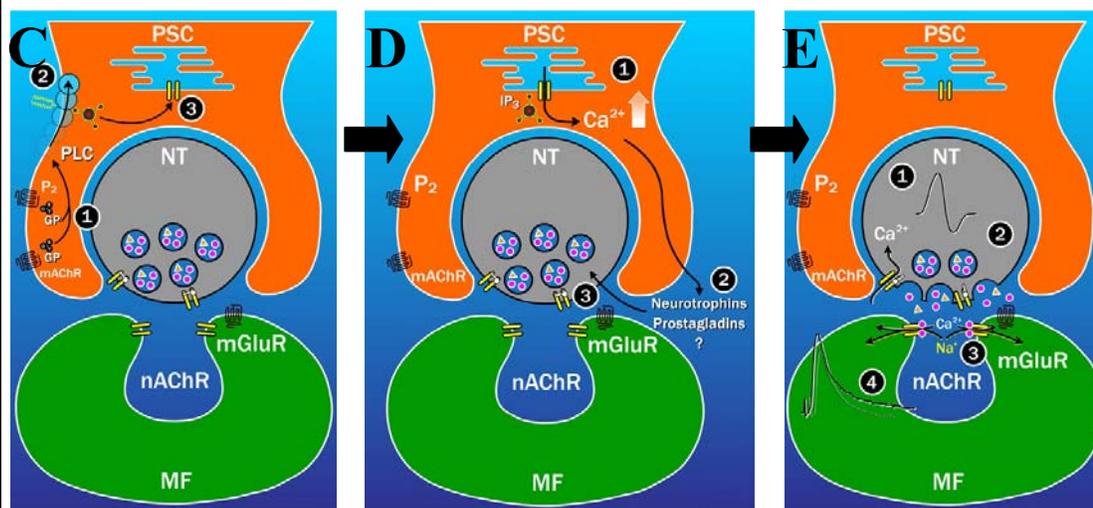
The variety of mechanisms by which PSCs can modulate neurotransmission strongly suggests that the ultimate effect on the synapse is a balance of potentiation and depression. The equilibrium may be displaced according to the state of the synapse and its previous activity, favouring one or another pathway and leading to the release of appropriate gliotransmitters

FIGURE 5. SCHEMATIC REPRESENTATION OF SYNAPSE-GLIA INTERACTIONS AT THE NMJ



Calcium signalling pathway :

Potentiation



G protein pathway :

Depression

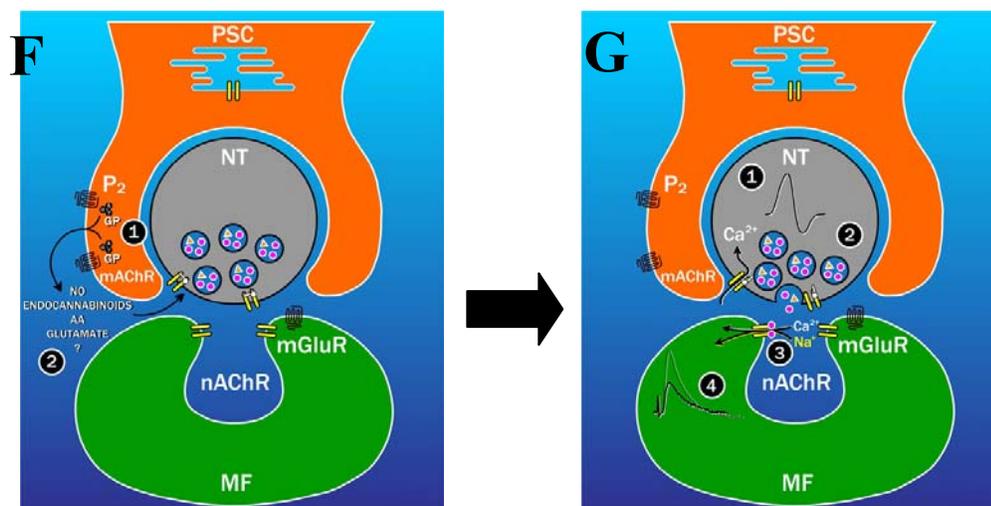


FIGURE 5. SCHEMATIC REPRESENTATION OF SYNAPSE-GLIA INTERACTIONS AT THE NMJ.

A. 1) Upon arrival of an action potential at the nerve terminals (NT), 2) voltage-gated calcium channels open and Ca^{2+} enters the nerve terminals, triggering the release of neurotransmitters, ACh (circles) and ATP (triangles) into the synaptic cleft. 3) ACh binds to nicotinic receptors (nAChR) on muscle fibre (MF) endplate, leading to an influx of Na^+ and Ca^{2+} 4) that causes a depolarisation (endplate potential). B. 1) Neurotransmitters also bind to PSC metabotropic receptors (ACh \rightarrow mAChR, ATP \rightarrow P2R), which activate G proteins. C. Calcium signalling pathway: potentiation. 1) G proteins activate phospholipase C (PLC) 2) which cleaves membrane lipids phosphatidylinositol biphosphate (PIP_2) into diacylglycerol and inositol triphosphate (IP_3). 3) IP_3 then binds to its receptors (IP_3R) on endoplasmic reticulum. D. 1) Activation of IP_3R triggers the release of Ca^{2+} from internal stores. 2) Calcium elevation in PSCs induces the release of gliotransmitters (prostaglandins, neurotrophins and/or unidentified molecules) into the synaptic cleft. 3) These molecules, in turn, act on nerve terminals where, E. 1) following the arrival of an action potential, 2) they increase the release of transmitters through unknown mechanisms. 3) This greater transmitter release results in a stronger activation of nAChR and 4) a larger endplate potential. F. G protein pathway: depression. 1) G protein activity in PSCs also activates a signalling cascade 2) that leads to the release of depressing gliotransmitters (nitric oxide (NO), endocannabinoids, arachidonic acid (AA), glutamate and/or unidentified molecules) into the synaptic cleft. 3) These molecules, in turn, act on nerve terminals where, G. 1) following the arrival of an action potential, 2) they decrease the release of transmitters through unknown mechanisms. 3) This reduction in transmitter release results in a weaker activation of nAChR and 4) a smaller endplate potential.

Figure 5. Schematic representation of synapse-glia interactions at the NMJ

1.2.4.4.1.6. PUTATIVE GLIOTRANSMITTERS

In order to achieve reciprocal communication, PSCs need to release some neuroactive substances that can diffuse to, and activate signalling cascades in, its synaptic partners, just as presynaptic nerve terminals do when releasing neurotransmitters and neuropeptides. Many molecules have been cited as putative gliotransmitters, suspected to be involved in depression or potentiation of transmitter release.

1.2.4.4.1.6.1. POSSIBLE MEDIATORS OF SYNAPTIC DEPRESSION

1.2.4.4.1.6.1.1. Nitric oxide

NO is a ubiquitous neuromodulator of the nervous system. At the frog NMJ, exogenous application of NO causes a reduction of EPP amplitude that is presynaptic in origin. NO is also endogenously produced in a tonic fashion and is implicated in synaptic depression via a cGMP-dependent mechanism. Furthermore, NO is synthesized during elevated synaptic activity and contributes to high-frequency depression independently of soluble guanylate cyclase activation. A form of neuronal NO-synthase (NOS) has been found in PSCs of the frog NMJ. Many NOS enzymes are Ca^{2+} -dependent, therefore it is likely that activity-dependent Ca^{2+} elevations in PSCs could trigger NO production and mediate synaptic depression. This would however be inconsistent with the greater synaptic depression observed with specific injection of BAPTA into PSCs, unless Ca^{2+} activates two different pathways leading either to potentiation or depression, with potentiation prevailing in normal conditions. As an alternative, NOS could be activated through a G-protein pathway, consistent with the effect of G-protein activation in PSCs.

1.2.4.4.1.6.1.2. Glutamate

Like NO, glutamate and (1S,3R)-aminocyclopentanedicarboxylic acid (ACPD), a metabotropic glutamate receptor (mGluR) agonist, decrease transmitter release at the frog NMJ. Glutamate also modulates synaptic transmission in an activity-dependent manner since blockade of mGluRs by (S)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) during high frequency stimulation reduces synaptic depression. This

frequency-dependence of glutamatergic modulation of transmitter release resembles the frequency-dependence of glial regulation of synaptic depression. Therefore, glutamate was suggested to be glial in origin. This proposition is consistent with the observation of glutamate-like immunoreactivity in rat PSCs and the presence of functional glutamate uptake machinery on these cells at the frog NMJ, thus providing an economical mechanism to recycle glutamate. By releasing glutamate, likely in a Ca^{2+} -dependent manner, or by regulating the rate and capacity of glutamate reuptake, PSCs may thus modulate short-term plasticity through postsynaptic mGluR activation and possibly NO synthesis by muscle fibres.

1.2.4.4.1.6.1.3. Endocannabinoids

Endocannabinoids have been found to decrease cholinergic transmission by reducing the release of ACh in several smooth and skeletal muscle preparations. In addition, in the CNS, glial cells express some enzymes of the endocannabinoid metabolism, both in vitro and in situ, suggesting that they may synthesize these molecules. Thus, a role of glial cells in the cannabinergic modulation of synaptic transmission at the NMJ could be envisioned.

1.2.4.4.1.6.1.4. Arachidonic acid

As with endocannabinoids, arachidonic acid (AA), an important component of membrane lipids, and also a degradation product of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol (2-AG), has been shown to inhibit presynaptic Ca^{2+} currents at the frog NMJ. Moreover, AA has a depressive effect on transmitter release. Cultured Schwann cells present an agonist-dependent regulation of AA release, and therefore, AA could be envisaged as a gliotransmitter implicated in synaptic depression. The effects of AA on synaptic transmission at the frog NMJ were shown to be dependent on cyclooxygenase activity and believed to be mediated by prostaglandin E2. Depressive effects on synaptic transmission were also described for prostaglandins E1 and F2 alpha at the frog NMJ.

1.2.4.4.1.6.2. POSSIBLE MEDIATORS OF SYNAPTIC POTENTIATION

1.2.4.4.1.6.2.1. Prostaglandins

In addition to their depressive effect, prostaglandins can also potentiate synaptic transmission. Indeed, at the frog NMJ, inhibition of prostaglandin synthesizing enzyme, cyclooxygenase, decreased quantal release. This decrease was partially restored by subsequent exposure to prostaglandin E2. However, when applied on untreated preparations, prostaglandin E2 decreased the amplitude of evoked EPPs, suggesting that its potentiating effect depends on the state of the synapse and may be unmasked in synapses that are already depressed. Therefore, one could hypothesize a role of prostaglandin E2 in the modulation of high-frequency induced synaptic depression and an appealing possibility would be an activity-dependent release by PSCs. This seems very likely since rat Schwann cells produce different prostanoids in vitro. In addition, AA and prostaglandin E2 synthesizing enzymes, phospholipase A₂ and cyclooxygenase, are found in frog PSCs.

1.2.4.4.1.6.2.2. Neurotrophic factors: BDNF

At developing NMJs, acute exposure to BDNF rapidly potentiates spontaneous and evoked synaptic activity. BDNF also enhances synaptic transmission in the adult rat diaphragm muscle.

Because cultured Schwann cells produce molecules with brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-like activity and possess the mRNA coding for BDNF, this neurotrophic factor may be involved in PSC potentiation of transmitter release.

Thus, many molecules could modulate synaptic transmission and therefore act as gliotransmitters. They may be recruited in different conditions, according to the specific needs of the synapse. For example, activation of a certain pathway following G-protein activation could favour the release of depressing molecules, while the activation of a Ca²⁺ cascade could encourage the release of potentiating molecules. The two pathways may act independently causing the release of both types of molecules with the resulting influence on synaptic transmission being a balance of

depression and potentiation. As another possibility, the G protein pathway and the Ca^{2+} pathway may interact such that Ca^{2+} signalling modulates the activity of proteins downstream of G-protein activation that are involved in the release of depressing molecules.

1.2.4.4.1.7. LONG-TERM MODULATION BY PSCs

In an attempt to elucidate the role of PSCs in synaptic transmission, techniques have been developed to specifically ablate these cells at the NMJ. Using the monoclonal antibody 2A12, specific for PSCs in vivo, complement-mediated lysis was performed to eliminate PSCs from adult frog NMJs without damaging nerve terminals, muscle, or myelinating Schwann cells along axons. Acute ablation of PSCs resulted in no obvious defects in evoked synaptic transmission while the frequency of spontaneous release was slightly increased. Paired-pulse facilitation and synaptic depression of NMJs lacking PSCs were also comparable to control NMJs. Similar results were obtained in mammals where PSCs were acutely ablated using antibodies specific for disialosyl epitopes on gangliosides GD3, which are enriched in the PSC membrane.

In contrast to these acute effects, chronic absence of PSCs leads to long-term morphological and physiological transformations of frog NMJs. After 1 week of PSC ablation, 10% of nerve terminals were retracted, although they were not detached from the muscle. Active zone length, vesicle density and ACh receptor distribution were not altered, ruling out degenerative changes in the nerve terminal or postsynaptic fibre. In contrast, the lack of PSCs altered synaptic transmission, decreasing evoked EPP size and average mEPP frequency, without affecting mEPP amplitude. Thus, synaptic efficacy was decreased in PSC ablated NMJs, but postsynaptic function remained unchanged. Paired-pulse facilitation and synaptic depression were also decreased, supporting a role for PSCs in the maintenance of synaptic function. These results thus raise the possibility of a role for PSCs in long-term synaptic plasticity.

1.2.4.4.1.8. CONCLUSION

Taken together, studies on PSCs have revealed the importance of synapse-glia interactions on NMJ stability and have proven the necessity of considering these cells as major players in short-term and long-term modulation of neuromuscular activity. The ability of PSCs to detect and respond to synaptic activity and to modulate neurotransmission likely allows them to regulate activity levels with the effect of maintaining optimal nerve-muscle communication. Future work will undoubtedly shed light on the patterns of synaptic activity that most efficiently recruit PSCs in physiological conditions and that prompt glial modulation of synaptic transmission. Further insights on PSC function will also arise from comparative studies linking PSC activation and modulation properties to functional differences between mammals and lower vertebrate NMJs.

1.2.4.4.1.9. FURTHER READING

Auld, D.S. and Robitaille, R. (2003). Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* **40**(2): p. 389-400.

Auld, D.S. Colomar, A., Belair, E.L. et al. (2003). Modulation of neurotransmission by reciprocal synapse-glia interactions at the neuromuscular junction. *Journal of Neurocytology* **32**(5-8): p. 1003-1015.

Bourque, M.J. and R. Robitaille (1998). Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology* **512** (Pt 1): p. 197-209.

Castonguay, A. and R. Robitaille (2001). Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. *Journal of Neuroscience* **21**(6), p. 1911-1922.

Colomar, A. and R. Robitaille (2004). Glial modulation of synaptic transmission at the neuromuscular junction. *Glia* **47**(3): p. 284-289.

Green, A.C., Dowdall M.J. and Richardson C.M. (1997). ATP acting on P2Y receptors triggers calcium mobilization in Schwann cells at the neuroelectrocyte junction in skate. *Neuroscience* **80**(2), p. 635-651.

Halstead, S.K., Morrison, I., O'Hanlon, G.M., et al. (2004). Anti-disialosyl antibodies mediate selective neuronal or Schwann cell injury at mouse neuromuscular junctions. *Glia* **52**(3): p. 177-189.

Jahromi, B.S., R. Robitaille, and M.P. Charlton (1992). Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* **8**(6), p. 1069-1077.

Malomouzh, A.I., Nikolsky, E.E., Lieberman E.M. et al. (2005). Effect of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) on non-quantal and spontaneous quantal release of acetylcholine at the neuromuscular synapse of rat. *Journal of Neurochemistry* **94**(1), p. 257-267.

Reddy, L.V., Koirala, S., Sugiura, Y., Herrera, A.A., Ko, C.P. (2003). Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron* **40**(3), p. 563-580.

Robitaille, R., M.J. Bourque, and S. Vandaele (1996). Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience* **16**(1), p. 148-158.

Robitaille, R. (1998). Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* **21**(4), p. 847-855.

Silinsky, E.M. and R.S. Redman (1996). Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog. *Journal of Physiology* **492** (Pt 3), p. 815-822.

1.2.4.5. PLASTICITÉ À LONG-TERME DU FACTEUR DE SÉCURITÉ

Outre les changements à court-terme d'efficacité présynaptique qui modifient le facteur de sécurité de façon ponctuelle, des changements à plus long-terme des différents déterminants présynaptiques, postsynaptiques et gliaux du facteur de sécurité affecteront ce dernier de façon plus prolongée. Ces changements surviendront en réponse à des modifications persistantes de l'activité synaptique qui sera régulée à la baisse ou à la hausse, selon différentes exigences liées, entre autres, à l'âge, aux facteurs hormonaux et à l'environnement. Certaines conditions expérimentales permettent également de diminuer ou d'augmenter chroniquement l'activité synaptique. Les sections qui suivent traitent d'ailleurs de ces différentes conditions et des adaptations des déterminants du facteur de sécurité qui en résultent.

1.2.4.5.1. DIMINUTION CHRONIQUE DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE

D'une part, l'activité synaptique pourra être réduite chroniquement de façon naturelle et conséquente à une diminution de l'activité saisonnière. En effet, pendant la période hivernale, nombreuses espèces subissent un ralentissement de leur métabolisme et, par le fait même, de leur niveau d'activité motrice. Les grenouilles et les écrevisses en sont des exemples. D'autre part, l'activité synaptique pourra être diminuée expérimentalement par diverses interventions agissant sur l'activité nerveuse, musculaire ou sur les deux à la fois. Ainsi, la dénervation, le blocage de la libération vésiculaire ou des canaux Na^+ voltage-dépendants, le découplage de l'excitation et de la contraction musculaire ainsi que le blocage des nAChRs seront utilisés pour l'étude de la plasticité à long-terme des déterminants du facteur de sécurité.

1.2.4.5.1.1. DÉNERVATION

La dénervation, qui consiste généralement en la section d'un nerf avec ou sans excision d'une partie de celui-ci, éliminera la terminaison nerveuse et donc la neurotransmission présynaptique. La dénervation d'un muscle est dite complète si toutes ses innervations sont sectionnées. Elle est dite partielle quand certaines branches d'un nerf innervant un même muscle sont gardées intactes, alors que

d'autres sont sectionnées. Bien que la dénervation constitue une intervention drastique pour réduire la neurotransmission expérimentalement, elle constitue un bon modèle pour l'étude des lésions nerveuses associées à certaines blessures.

1.2.4.5.1.2. BLOCAGE DE LA LIBÉRATION VÉSICULAIRE : TOXINE BOTULINIQUE

Contrairement à la dénervation, l'administration de la toxine botulinique (BoTx) réduirait l'activité synaptique tout en préservant l'intégrité de la terminaison nerveuse. L'administration d'une seule dose subléthale de la BoTx résulterait en une paralysie musculaire qui perdurerait pendant plusieurs mois. Cette paralysie serait consécutive à une inhibition de la libération vésiculaire évoquée de neurotransmetteurs, suivant la protéolyse de certaines protéines du complexe SNARE. Également, la fréquence de libération spontanée serait fortement réduite, de même que l'amplitude de ces événements, dans les stades initiaux de l'intoxication. (Schiavo et al., 2000).

1.2.4.5.1.3. BLOCAGE DES CANAUX Na^+ VOLTAGE-DÉPENDANTS : TTX ET ANESTHÉSQUES LOCAUX

De façon similaire à la BoTx, les bloqueurs des canaux Na^+ voltage-dépendants réduiraient l'activité synaptique tout en préservant l'intégrité de la terminaison nerveuse. Appliqués localement, ces bloqueurs, tels que la TTX ou certains anesthésiques comme la lidocaïne ou la marcaïne, empêcheraient la génération de potentiels d'action dans l'axone et inhiberaient conséquemment la libération évoquée de neurotransmetteurs. La libération spontanée resterait cependant inaltérée, par opposition à la réduction initiale de la fréquence et de l'amplitude des événements spontanés induite par la BoTx.

1.2.4.5.1.4. DÉCOUPLAGE DE L'EXCITATION ET DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE : FORMAMIDE

Les traitements mentionnés précédemment résultent tous en une paralysie musculaire consécutive à une altération de la libération présynaptique de neurotransmetteurs. Au contraire, la formamide bloquerait la contraction musculaire en altérant le

couplage entre l'excitation et la contraction, lequel impliquerait la régulation des réserves calciques intracellulaires. Ce traitement conserverait cependant une transmission synaptique et une activité électrique postsynaptique normales.

1.2.4.5.1.5. BLOCAGE DES nACHRS : CURARE ET α -BUNGAROTOXINE

À l'instar du traitement à la formamide, les bloqueurs des nAChRs préserveraient aussi la libération présynaptique de neurotransmetteurs. Ils empêcheraient cependant la signalisation cholinergique dans la fibre musculaire et inhiberaient conséquemment la génération de potentiels d'action et la contraction musculaire. Deux types de bloqueurs des nAChRs sont généralement utilisés, le curare et l' α -bungarotoxine, dont l'action est réversible et irréversible respectivement. L' α -bungarotoxine serait, par ailleurs, utilisée comme modèle expérimental pour l'étude de la myasthénie grave, dont elle reproduirait le phénotype de faiblesse musculaire. Cette maladie auto-immune est caractérisée par la perte de nAChRs, suivant leur reconnaissance par des auto-anticorps. Il en résulte une augmentation compensatoire de l'activité de la choline acétyltransférase et conséquemment, une augmentation du contenu en ACh. De plus, le contenu quantique des JNMs de patients atteints de la myasthénie grave serait aussi augmenté (Plomp et al., 1995).

1.2.4.5.1.6. PHÉNOTYPES COMMUNS

Bien qu'agissant sur différentes structures, ces traitements induisent certains changements similaires au niveau de la JNM, suggérant que cette dernière réagisse à une diminution de l'activité synaptique par des adaptations stéréotypées. Les traits communs entre le phénotype de la dénervation et celui des traitements à la BoTx et à la TTX suggèrent qu'ils ne sont pas le résultat de la perte de contact présynaptique, mais bien la conséquence d'une réduction de la libération de neurotransmetteurs. Par ailleurs, les phénotypes communs entre les traitements réduisant la libération de neurotransmetteurs et ceux inhibant la signalisation cholinergique postsynaptique et/ou la contraction musculaire résulteraient probablement de l'altération de la signalisation calcique postsynaptique et pourraient impliquer la production calcium-dépendante d'un messenger rétrograde. Ces phénotypes, reliés aux différents

déterminants présynaptiques, postsynaptiques et gliaux du facteur de sécurité, sont décrits dans les sections suivantes.

1.2.4.5.1.6.1. DÉTERMINANT PRÉSYNAPTIQUE DU FACTEUR DE SÉCURITÉ

1.2.4.5.1.6.1.1. Efficacité présynaptique

De façon générale, la diminution de l'activité synaptique augmenterait l'efficacité présynaptique des JNMs. En effet, chez les écrevisses et les grenouilles, la diminution saisonnière de l'activité, associée à l'hibernation, augmenterait l'amplitude des potentiels de plaque motrice et sensibiliserait les motoneurones à la dépression synaptique lors d'une stimulation soutenue (Lnenicka and Zhao, 1991; Wernig et al., 1996). En plus d'une dépression synaptique accentuée, les JNMs des grenouilles d'hiver présenteraient aussi moins de facilitation à des stimuli répétés (Wernig et al., 1996).

Le blocage chronique des canaux Na^+ voltage-dépendants, par l'administration locale de TTX, augmenterait aussi le contenu quantique des JNMs du muscle phasique EDL du rat et ce, dès les 24 premières heures de traitement (Tsujimoto and Kuno, 1988). De la même façon, l'application de lidocaïne ou de marcaine au niveau du nerf sciatique du rat, augmenterait significativement le contenu quantique des JNMs du muscle tonique *soleus* au bout de cinq jours (Lomo and Rosenthal, 1972). Ainsi, la régulation à la hausse de l'efficacité présynaptique aurait lieu autant dans les muscles toniques que dans les muscles phasiques, mais la latence des changements pourrait dépendre des propriétés des JNMs.

L'injection d' α -bungarotoxine à toutes les 48 heures, jusqu'à six semaines, augmenterait également la libération de neurotransmetteurs dans l'hémidiaphragme du rat. Au bout de deux à trois semaines de traitement, alors que les sites de liaison à l' α -bungarotoxine seraient réduits à 58%, la libération d'ACh serait effectivement augmentée de 75%, tel que mesuré par chromatographie. Le contenu quantique serait aussi augmenté de 54%, tandis que la fréquence des événements spontanés serait diminuée (Plomp et al., 1992). Les adaptations du contenu quantique et de la

fréquence de libération spontanée seraient donc indépendantes, bien qu'elles puissent être régulées de façon similaire en réponse à d'autres traitements. En effet, le traitement à la TTX dans les JNMs de l'EDL de rat augmenterait la fréquence des événements spontanés de façon concomitante avec le contenu quantique (Tsujimoto and Kuno, 1988).

Le traitement à la formamide augmenterait également la fréquence des événements spontanés dans les JNMs de souris, sans toutefois altérer la morphologie des potentiels de plaque motrice miniatures (Fulgenzi et al., 1992). Au contraire, les traitements à la BoTx et à la TTX augmenteraient, au bout de quelques jours, l'occurrence d'événements spontanés de large amplitude et de cinétique lente (slow ou giant mEPPs) dans les JNMs de rat (Lomo and Rosenthal, 1972; Cull-Candy et al., 1976; Kim et al., 1984) et de souris (Wang et al., 2006). De façon cohérente avec l'absence de ce phénotype dans les JNMs traitées à la formamide, les événements spontanés géants persisteraient malgré la stimulation chronique des fibres musculaires. Ce phénotype serait donc indépendant de l'activité musculaire et directement relié à la réduction de la libération évoquée (Kim et al., 1984). Parallèlement à leur effet sur la cinétique des événements spontanés, les traitements à la BoTx et à la TTX prolongeraient également le décours temporel des potentiels de plaque motrice évoqués, enregistrés environ une semaine après leur administration, chez la souris (Rogozhin et al., 2008) (Wang et al., 2006).

Ainsi, en règle générale, les adaptations présynaptiques en réponse à une réduction de l'activité synaptique augmenteraient la neurotransmission spontanée ou évoquée, laquelle serait, en outre, susceptible d'augmenter le facteur de sécurité. Les signaux à l'origine de ces adaptations seraient cependant distincts. Par conséquent, différents mécanismes seraient potentiellement impliqués dans leur induction. D'ailleurs, différents changements au niveau de la taille des terminaisons nerveuses, de l'ultrastructure des zones actives et de l'homéostasie du Ca^{2+} surviennent de façon concomitante avec certaines de ces adaptations physiologiques. Ces changements et

leur implication possible dans la détermination du phénotype physiologique sont discutés dans les sections ci-après.

1.2.4.5.1.6.1.1.1. Taille de la terminaison nerveuse

Chez les écrevisses en hibernation, les terminaisons nerveuses des motoneurones arboreraient moins de varicosités que durant l'été, de façon cohérente avec un phénotype plus phasique (Lnenicka and Zhao, 1991), mais en contradiction avec une relation proportionnelle entre la taille des terminaisons nerveuses et l'efficacité présynaptique. Au contraire, chez les grenouilles d'hiver, la longueur des terminaisons nerveuses serait légèrement augmentée en raison d'une augmentation de l'occurrence du bourgeonnement présynaptique (Wernig et al., 1980). Celui-ci constituerait d'ailleurs un phénotype commun à tous les traitements expérimentaux diminuant chroniquement l'activité synaptique.

Selon les différents traitements, les bourgeons formés seraient de deux origines : nodale, c'est-à-dire axonale au niveau d'un nœud de Ranvier, ou terminale (Brown et al., 1980; Santafe et al., 2000) (Wernig et al., 1980; Diaz and Pecot-Dechavassine, 1989). Selon le type de muscle, tonique ou phasique, la prévalence de l'un ou l'autre de ces types de bourgeons serait également différente. En effet, après une dénervation, les muscles phasiques EDL et *peroneus tertius* de la souris présenteraient une plus grande proportion de bourgeons nodaux que le muscle tonique *soleus*, lequel arborerait des bourgeons principalement terminaux (Brown et al., 1980). L'apparition de ces derniers pourrait, par ailleurs, être contrée par la stimulation directe et fréquente des fibres musculaires, alors que cette manipulation ne préviendrait aucunement l'élaboration des bourgeons nodaux (Brown et al., 1980; Kim et al., 1984). Ces deux types de bourgeon dépendraient donc de différents signaux pour leur élaboration. D'ailleurs, l'apparition des bourgeons nodaux pourrait précéder et retarder celle des bourgeons terminaux, de façon cohérente avec le délai plus grand pour l'établissement de ces derniers dans les muscles phasiques (Brown et al., 1980).

En général, une diminution de l'activité synaptique de une à deux semaines serait suffisante pour l'apparition des bourgeons, selon les traitements, les muscles et les espèces (Lomo and Rosenthal, 1972; Holland and Brown, 1980; Wernig et al., 1980; Diaz and Pecot-Dechavassine, 1989). Ainsi, quatre semaines après l'administration de la BoTx, 80% des terminaisons nerveuses du muscle phasique *levator auris longus* (LAL) de la souris présenteraient des bourgeons. Au bout de 12 semaines, le nombre de ces bourgeons décroîtrait et ceux-ci deviendraient parties intégrantes de terminaisons nerveuses élargies (Santafe et al., 2000). Toutefois, la formation des bourgeons ne contribuerait que faiblement au rétablissement graduel de la neurotransmission dans les JNMs traitées à la BoTx. En effet, le contenu quantique estimé des nouveaux prolongements présynaptiques induits par la toxine dans le muscle *epitrochleoanconeus* (ETA) de la souris serait seulement 17% de celui des terminaisons préexistantes. En outre, la surface occupée par les bourgeons serait moindre que celle des terminaisons déjà en place, suggérant que ces dernières contribuent davantage à la récupération de la neurotransmission (Rogozhin et al., 2008). Dans le même ordre d'idées, l'augmentation du contenu quantique et de la fréquence des événements spontanés, dans le muscle EDL de rat traité à la TTX, surviendrait bien avant l'apparition des premiers bourgeons. Ceux-ci ne contribueraient pas non plus à accentuer cette augmentation d'efficacité présynaptique après leur apparition, puisque les changements physiologiques seraient observés autant dans les JNMs présentant des bourgeons que dans les JNMs sans bourgeon et en absence de tout changement significatif dans la longueur de la terminaison nerveuse (Tsujimoto et al., 1990). Différents signaux seraient donc à l'origine de l'adaptation de l'efficacité présynaptique et du bourgeonnement.

Pour l'induction du bourgeonnement, l'inhibition de la réponse cholinergique postsynaptique et, conséquemment, de l'activité électrique musculaire constituerait un signal plus puissant que l'inhibition de l'activité contractile seulement. En effet, la fréquence de bourgeonnement après applications répétées d' α -bungarotoxine sur le muscle *c.p.* de la grenouille serait plus importante que dans les muscles traités à la formamide (Wines and Letinsky, 1991). Par ailleurs, chez le rat, la fréquence de

bourgeoisement induite par le blocage chronique des canaux Na^+ voltage-dépendants serait similaire dans les préparations totalement et partiellement bloquées, ces dernières recevant l'innervation de deux nerfs distincts dont un seul serait traité à la TTX. Par conséquent, des facteurs diffusibles en provenance des fibres musculaires inactives pourraient entraîner le bourgeoisement des terminaisons nerveuses adjacentes non-bloquées (Betz et al., 1980). À l'inverse, d'autres facteurs pourraient prévenir le bourgeoisement présynaptique. En effet, l'administration quotidienne de CGRP dans le muscle EDL du rat, réduirait à 36% le bourgeoisement normalement induit dans 86% des JNMs après 10 jours de blocage à la TTX (Tsujimoto and Kuno, 1988). Ce peptide, aussi contenu dans les vésicules présynaptiques à cœur dense, agirait notamment à titre de facteur neurotrophique régulant l'expression de protéines postsynaptiques telles que celles composant les nAChRs. Une communication réciproque entre les différents éléments de la synapse est donc susceptible de réguler la croissance des terminaisons présynaptiques. Par ailleurs, la lésion d'un nerf, de même que les traitements à la BoTx et à la TTX augmenteraient l'expression de CGRP dans les neurones moteurs du *soleus* de rat (Sala et al. 1995). L'administration de CGRP n'empêcherait toutefois pas la régulation à la hausse de l'efficacité présynaptique, confirmant que celle-ci n'est pas la conséquence de l'élongation des terminaisons nerveuses ni de l'apparition de nouveaux prolongements présynaptiques (Tsujimoto and Kuno, 1988).

1.2.4.5.1.6.1.1.2. Ultrastructure de la terminaison nerveuse

Contrairement à la taille des terminaisons nerveuses, des changements au niveau de l'ultrastructure de la terminaison nerveuse, notamment au niveau de la densité ou de la distribution des vésicules synaptiques pourraient cependant être associés à certaines adaptations physiologiques résultant d'une diminution chronique de l'activité synaptique.

Densité des vésicules synaptiques

L'augmentation du contenu quantique, au niveau du diaphragme de rat, suivant l'administration chronique de TTX, serait accompagnée d'une diminution de la taille

et de la densité des ensembles de vésicules synaptiques ainsi que du nombre de vésicules arrimées à la membrane, après 14 jours de traitement (Mantilla et al., 2007). Ces changements ultrastructuraux confirment donc l'absence de corrélation positive entre l'efficacité présynaptique et la taille des ensembles vésiculaires. Toutefois, ils seraient cohérents avec une augmentation du ratio du contenu quantique par rapport à la taille de l'ensemble des vésicules synaptiques, généralement associé à une augmentation de l'efficacité présynaptique (Reid et al., 2003). Ils pourraient, de plus, expliquer la dépression synaptique augmentée dans les JNMs paralysées à la TTX (Wang et al., 2004).

Par ailleurs, une redistribution des vésicules synaptiques, loin des zones actives, suivant un traitement à la BoTx, a été suggéré pour expliquer la cinétique lente des événements spontanés géants (Lupa et al., 1986) et l'absence d'effet de la concentration intraterminale de Ca^{2+} sur leur fréquence (Thesleff et al., 1983). D'autres changements, entre autres au niveau des canaux calciques voltage-dépendants et des nAChRs, pourraient également avoir un rôle à y jouer (voir section suivante et 1.2.4.5.1.6.2.2).

1.2.4.5.1.6.1.1.3. Homéostasie du calcium

Des changements au niveau de l'homéostasie du Ca^{2+} , notamment au niveau de son influx dans la terminaison nerveuse et de la sensibilité des senseurs de Ca^{2+} pourraient également être associés à certaines adaptations physiologiques résultant d'une diminution chronique de l'activité synaptique.

Influx de calcium

Un changement au niveau de l'expression des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, altérant conséquemment l'influx de Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse, pourrait être impliqué dans la cinétique altérée des potentiels de plaque motrice enregistrés après un traitement à la BoTx (Rogozhin et al., 2008). Des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de types L, N et P/Q fonctionnels seraient effectivement exprimés dans les terminaisons phasiques du muscle *levator auris longus* (LAL) de la souris entre

les semaines 2 et 6 suivant le traitement. Des bloqueurs spécifiques de ces types de canaux seraient ainsi en mesure de réduire la libération évoquée de neurotransmetteurs dans les JNMs du LAL, durant cette période. Au bout de 12 semaines, cependant, seuls les bloqueurs des canaux de type P/Q affecteraient la transmission, comme à la JNM d'adulte normale. Aussi, comme un bourgeonnement présynaptique intense est observable durant les premières semaines de traitement, l'expression des canaux L et N pourrait être associée à ces nouveaux prolongements (Santafe et al., 2000). Par extrapolation, les nouveaux bourgeons pourraient donc contribuer à la cinétique modifiée des potentiels de plaque motrice, quoiqu'une modification des nAChRs puisse aussi être impliquée (voir section 1.2.4.5.1.6.2.2).

Sensibilité au calcium

Les changements d'efficacité présynaptique, de même que la dépression synaptique accentuée dans les JNMs paralysées à la TTX, ne seraient observables que dans des conditions où le Ca^{2+} extracellulaire est réduit, suggérant une augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil de libération vésiculaire (Wang et al., 2004). De façon similaire, l'augmentation du contenu quantique dans les JNMs de l'hémidiaphragme de rat traitées à l' α -bungarotoxine serait dépendante de la concentration de Ca^{2+} . Toutefois, à des concentrations normales, la sensibilité du système pour le Ca^{2+} serait augmentée, alors qu'elle serait diminuée à des concentrations plus faibles, suggérant l'implication d'une molécule dépendante du Ca^{2+} dans le phénomène (Plomp et al., 1994). D'ailleurs, l'augmentation du contenu quantique requerrait l'activité de la protéine kinase II dépendante de la Ca^{2+} -calmoduline (CaMKII). En effet, en présence d'un inhibiteur des kinases à large spectre, le K252a, ou d'un inhibiteur sélectif de la CaMKII, le KN62, le contenu quantique des JNMs traitées à l' α -bungarotoxine serait réduit. L'inhibiteur à large spectre aurait cependant un effet plus prononcé que l'inhibiteur sélectif, suggérant la contribution d'autres kinases. Parmi celles-ci, la PKC ne serait pas impliquée, mais certaines tyrosines kinases possédant un domaine extracellulaire pourraient l'être. L'utilisation d'un inhibiteur des kinases imperméable aux membranes, le K252b,

réduirait effectivement le contenu quantique des JNMs traitées à l' α -bungarotoxine (Plomp and Molenaar, 1996).

Un changement dans l'expression, le type, la sensibilité ou l'activité des senseurs de Ca^{2+} reste donc, à ce jour, la meilleure explication aux changements d'efficacité présynaptique induits par la réduction chronique de l'activité synaptique.

1.2.4.5.1.6.2. DÉTERMINANTS POSTSYNAPTIQUES DU FACTEUR DE SÉCURITÉ

Outre son effet sur l'efficacité présynaptique, la réduction chronique de l'activité synaptique aurait aussi des répercussions sur les déterminants postsynaptiques du facteur de sécurité, notamment sur l'AChE, les nAChRs et leurs régulateurs, les canaux Na^+ voltage-dépendants et le diamètre des fibres musculaires.

1.2.4.5.1.6.2.1. AChE

L'activité de certains isoformes de l'AChE serait altérée par la réduction chronique de l'activité synaptique, de façon différentielle dans le temps, dans l'espace synaptique ou extrasynaptique et selon le type de muscle (Sketelj et al., 1992). Par exemple, l'activité extrasynaptique de l'AChE serait augmentée suivant la dénervation ou le traitement à l' α -bungarotoxine du muscle EDL de rat, de façon concomitante avec une augmentation précoce et transitoire de l'expression de la forme globulaire G4 de l'AChE (Sketelj et al., 1992; Van Kempen et al., 1999). Au contraire, l'expression de cet isoforme de l'AChE serait transitoirement diminuée dans le *soleus* dénervé (Sketelj et al., 1992). Les adaptations de cette enzyme reflèteraient donc possiblement la nécessité de réguler différemment, dans le temps et l'espace, l'action de l'ACh, selon les besoins de la JNM. Une augmentation globale de l'activité des différents isoformes de cette enzyme contribuerait d'ailleurs à réduire le facteur de sécurité.

1.2.4.5.1.6.2.2. nAChRs

La dénervation, de même que le blocage à la TTX, entraîneraient, chez la grenouille, une forte diminution de l'activité de la métalloprotéinase matricielle 3 (MMP3,

matrix metalloproteinase 3,) au niveau de la JNM spécifiquement. Cette enzyme, produite par les fibres musculaires et les CSPs, serait impliquée dans la modification des protéines de la matrice extracellulaire et régulerait la structure de la JNM, notamment en affectant l'activité de l'agrine, elle-même impliquée dans l'aggrégation des nAChRs (VanSaun et al., 2007). D'ailleurs, les deux traitements, de même que la curarisation, la BoTx, la lidocaine et la marcaïne, réduiraient le nombre de nAChRs au niveau de la synapse, mais augmenteraient la sensibilité extrasynaptique à l'ACh (Lomo and Rosenthal, 1972; Cangiano and Lutzemberger, 1980; Wernig et al., 1980; Andreose et al., 1995), suggérant une altération des mécanismes d'aggrégation de ces récepteurs. La latence pour le développement de cette hypersensibilité extrasynaptique serait cependant variable selon les traitements et les espèces, variant de trois à quatre jours chez la souris traitée à la BoTx (Tonge, 1974) et le rat dénervé ou traité à la lidocaine (Lomo and Rosenthal, 1972), jusqu'à quelques mois chez la grenouille traitée à la BoTx (Antony and Tonge, 1980).

Chez la souris, l'hypersensibilité à l'ACh induite par la BoTx persisterait entre six et dix semaines, soit le temps requis pour un rétablissement complet du contenu quantique (Tonge, 1974). Ainsi, une activité synaptique normale serait requise pour l'agglomération des nAChRs à la plaque motrice. Dans le même ordre d'idées, les changements de sensibilité à l'ACh induits par la dénervation seraient prévenus par la stimulation directe chronique des fibres musculaires du rat, suggérant que l'activité du muscle soit responsable de la localisation synaptique des nAChRs (Lomo and Rosenthal, 1972). De plus, le taux avec lequel la sensibilité extrasynaptique à l'ACh retrouverait des valeurs normales après l'initiation de la stimulation serait relié au nombre de stimuli administrés et à l'intervalle entre les périodes d'activité. Ainsi, un nombre élevé de stimuli et un court intervalle entre les périodes de stimulation permettraient aux muscles dénervés de recouvrer plus rapidement une sensibilité normale à l'ACh dans leurs régions extrasynaptiques (Lomo and Westgaard, 1975). De la même façon, la stimulation nerveuse chronique du *soleus* de rat dénervé préviendrait la perte des nAChRs et ce, plus efficacement avec une stimulation de fréquence élevée (Andreose et al., 1995). Au contraire, chez la grenouille, la

stimulation chronique des muscles dénervés, à une fréquence de 50 Hz, pendant 1 seconde à chaque minute, ne préviendrait pas le développement de l'hypersensibilité extrasynaptique à l'ACh (Antony and Tonge, 1980). Ainsi, la relation entre l'activité musculaire et l'établissement de ce phénotype pourrait varier selon les espèces ou nécessiter des patrons d'activité propres à chacune.

L'augmentation de la sensibilité extrasynaptique à l'ACh pourrait impliquer l'insertion de nAChRs, dont la conductance et le temps d'ouverture seraient similaires aux nAChRs fœtaux (Koltgen et al., 1994). Une telle transformation impliquerait probablement le remplacement de la sous-unité epsilon par une sous-unité gamma, qui diminuerait la conductance du canal et augmenterait sa durée d'ouverture. En effet, après une dénervation ou un traitement à la BoTx chez la souris, la conductance des nAChRs serait réduite et le temps d'ouverture de leur canal augmenté (Koltgen et al., 1994). De ce fait, ces nAChRs fœtaux pourraient être impliqués dans la prolongation du décours temporel des potentiels de plaque motrice évoqués et spontanés. D'ailleurs, l'utilisation d'un bloqueur spécifique des nAChRs fœtaux, chez le rat, inhiberait les changements de cinétique induits dans les potentiels de plaque motrice par la TTX (Wang et al., 2006).

À l'opposé de la régulation à la hausse de l'efficacité présynaptique, les changements dans la distribution et la densité des nAChRs, résultant de la diminution chronique de l'activité synaptique, pourraient, d'une part, contribuer à réduire le facteur de sécurité. En effet, en réponse à une réduction du nombre de nAChRs à la plaque motrice, une plus grande proportion d'entre eux devra être activée pour générer une dépolarisation suffisante localement et permettre l'activation des canaux Na^+ voltage-dépendants. Toutefois, la prolongation de leur ouverture pourrait compenser la réduction de leur nombre. D'autre part, la régulation à la hausse des nAChRs extrasynaptiques permettrait possiblement de compenser le faible contenu quantique des nouveaux bourgeons présynaptiques en augmentant le facteur de sécurité de leurs contacts synaptiques. Ils pourraient, de ce fait, participer à la consolidation et à la stabilité de ces derniers.

1.2.4.5.1.6.2.3. Canaux Na⁺ voltage-dépendants

De façon similaire à son effet sur les nAChRs, la dénervation entraînerait également une réduction de la densité des canaux Na⁺ voltage-dépendants au niveau de la plaque motrice, un changement dans le type de canal exprimé et une redistribution extrasynaptique de ces canaux. Ainsi, chez le rat et la souris, la dénervation du muscle *flexor digitorum brevis* (FDB) réduirait de 50% la concentration des canaux Na⁺ voltage-dépendants synaptiques au bout de six semaines, mais augmenterait de 30% leur densité extrasynaptique. De plus, une forme de canaux Na⁺ résistants à la tétrodotoxine (TTX) apparaîtrait dès le troisième jour et ceux-ci représenteraient jusqu'à 43% de la population synaptique des canaux Na⁺ voltage-dépendants (Lupa et al., 1995). La BoTx augmenterait aussi l'expression de ces canaux Na⁺ voltage-dépendants de type foetal, du moins l'expression de leur transcrits d'ARNm, dès le septième jour post-traitement (Yang et al., 1991).

Tout comme pour les nAChRs, les changements ciblant les canaux Na⁺ voltage-dépendants pourraient contribuer à réduire le facteur de sécurité à la plaque motrice. En effet, moins ces canaux sont denses dans une région donnée, plus la proportion de canaux ouverts devra être grande pour générer le potentiel d'action et plus le seuil de déclenchement de ce dernier sera élevé. Toutefois, l'augmentation de la densité extrasynaptique de ces canaux pourrait augmenter le facteur de sécurité des nouveaux contacts synaptiques établis par les bourgeons présynaptiques.

1.2.4.5.1.6.2.4. Diamètre des fibres musculaires

La réduction chronique de l'activité synaptique, associée notamment à une dénervation ou au blocage de la conduction nerveuse résulterait généralement en une atrophie musculaire (Lomo and Rosenthal, 1972). La réduction du diamètre des fibres permettrait donc d'augmenter la résistance membranaire et d'augmenter conséquemment le facteur de sécurité.

1.2.4.5.1.6.3. DÉTERMINANT GLIAL DU FACTEUR DE SÉCURITÉ

Suivant une dénervation ou une lésion axonale, l'expression de la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP, glial fibrillary acidic protein), un filament intermédiaire critique pour l'élaboration de prolongements gliaux, serait rapidement augmentée dans les CSPs de différentes espèces (Georgiou et al., 1994; Ulenkate et al., 1996). D'ailleurs, suivant la section d'un nerf ou le traitement à la BoTx, les CSPs émettraient de longs et nombreux prolongements (Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995; O'Malley et al., 1999), dont la persistance varierait d'une espèce à l'autre. En effet, chez le rat et la grenouille dénervés, ces prolongements persisteraient plusieurs semaines à plusieurs mois en absence de terminaisons nerveuses (Reynolds and Woolf, 1992; Koirala et al., 2000). Au contraire, chez la souris, les prolongements ne seraient observables que transitoirement, *in vivo*, après dénervation du muscle sternomastoïde. Trois jours après le traitement, les CSPs présenteraient effectivement une moyenne de six prolongements, s'étendant au-delà de la plaque motrice, d'une longueur de près de 40 μm chacun. Le nombre et la longueur des prolongements décroîtraient cependant rapidement, de sorte qu'au bout de 10 jours, on observerait environ deux prolongements d'approximativement 9 μm par CSP, puis un seul en moyenne après un mois. La rétraction des prolongements gliaux serait également accompagnée d'une régulation à la baisse de l'expression de la protéine S-100, un antigène spécifique aux cellules de Schwann. Ainsi, dans ce modèle, le rétablissement de l'innervation pourrait être restreint à une étroite fenêtre de temps, compte tenu que les bourgeons des terminaisons nerveuses croîsseraient le long des prolongements gliaux (O'Malley et al., 1999). En effet, lors de la réinnervation ou après un traitement à la BoTx, bien que certains prolongements gliaux puissent se former en absence de bourgeons présynaptiques, chacun des bourgeons émis par une terminaison nerveuse serait associé à un prolongement glial. (Son and Thompson, 1995). Chez la grenouille, une telle association entre les prolongements gliaux et les bourgeons présynaptiques a, d'ailleurs, été observée *in vivo*. Ainsi, suivant la dénervation du muscle *sartorius*, les CSPs émettraient des prolongements s'étendant sur plusieurs dizaines ou centaines de microns, au-delà de leur site synaptique d'origine. Ces prolongements longeraient la fibre musculaire

d'origine ou traverseraient cette dernière perpendiculairement pour aller contacter une fibre musculaire adjacente. Dans tous les cas, les prolongements gliaux précèderaient par quelques dizaines de microns les bourgeons présynaptiques (Koirala et al., 2000). Donc, d'une part, les prolongements gliaux dicteraient le patron de réinnervation. D'autre part, ce serait sans doute l'arrivée d'un bourgeon de terminaison nerveuse qui induirait la formation des prolongements gliaux. Ces derniers ne seraient effectivement pas observés dans une préparation dénervée chroniquement, en absence de toute réinnervation. Il y aurait donc interactions réciproques entre les CSPs et les terminaisons nerveuses en régénération (Koirala et al., 2000). Par ailleurs, l'expression de la semaphorine 3A serait régulée à la hausse dans les CSPs associées aux JNMs phasiques dénervées et ralentirait possiblement le bourgeonnement terminal des motoneurones. Au contraire, ce facteur chémoattractif pour les axones ne serait pas exprimé dans les CSPs des JNMs toniques (De Winter et al., 2006).

Ainsi, les CSPs entreprendraient différents changements en réponse à la réduction chronique de l'activité synaptique. Ces changements auraient, entre autres, pour fonction de rétablir une neurotransmission normale ou de prolonger la stabilité de la JNM, malgré une transmission déficiente. Les conséquences de ces adaptations sur le facteur de sécurité pourraient donc être bidirectionnelles.

En somme, les manipulations réduisant chroniquement l'activité synaptique résulteraient en une adaptation stéréotypée de la JNM comprenant, entre autres, un bourgeonnement présynaptique et glial, un changement d'expression et de distribution des nAChRs et des canaux Na^+ voltage-dépendants, un changement d'activité de l'AChE, une augmentation de l'efficacité présynaptique caractéristique de la transformation des propriétés synaptiques vers un phénotype plus phasique et l'atrophie des fibres musculaires. Ces adaptations affecteraient différenciellement le facteur de sécurité, suggérant sa régulation fine et optimale pour les besoins des JNMs. En outre, ces adaptations seraient hautement conservées dans l'évolution et, par conséquent, seraient sans doute importantes pour la survie des espèces.

1.2.4.5.2. AUGMENTATION CHRONIQUE DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE

Tout comme pour la diminution chronique, l'augmentation chronique de l'activité synaptique pourra survenir de façon naturelle ou être induite expérimentalement. Naturellement, l'activité synaptique sera augmentée conséquemment à un accroissement de l'activité motrice saisonnière, pendant la saison de la reproduction par exemple. Expérimentalement, l'activité synaptique pourra être augmentée par la stimulation du nerf moteur ou la stimulation directe des fibres musculaires, à l'aide d'électrodes de stimulation implantées chroniquement. Ces modèles seront donc utilisés pour l'étude de la plasticité à long-terme des déterminants du facteur de sécurité.

1.2.4.5.2.1. PHÉNOTYPES COMMUNS

À l'image des traitements qui réduisent l'activité synaptique, l'augmentation de l'activité motrice et la stimulation chronique induiraient des transformations phénotypiques similaires. Ces transformations seraient parfois même opposées à celles induites par une diminution chronique de l'activité synaptique. De plus, les phénotypes communs entre la stimulation nerveuse chronique et la dépolarisation directe des fibres musculaires suggèrent qu'ils sont le résultat de l'activité musculaire augmentée plutôt que neuronale. Ces phénotypes, reliés aux différents déterminants présynaptiques et postsynaptiques du facteur de sécurité, sont décrits dans les sections suivantes.

1.2.4.5.2.1.1. DÉTERMINANT PRÉSYPNPTIQUE DU FACTEUR DE SÉCURITÉ

1.2.4.5.2.1.1.1. Efficacité présynaptique

L'augmentation saisonnière de l'activité entraînerait des changements physiologiques caractéristiques d'une baisse d'efficacité présynaptique et opposés à ceux observés durant l'hiver. Ainsi, en été, chez l'écrevisse et la grenouille, les motoneurones phasiques présenteraient des potentiels de plaque motrice de plus faible amplitude et seraient plus résistants à la dépression synaptique lors d'une stimulation soutenue (Lnenicka and Zhao, 1991; Wernig et al., 1996). La facilitation à des stimuli répétés serait également plus grande chez les grenouille d'été (Wernig et al., 1996).

Ces phénotypes pourraient également être reproduits par la stimulation nerveuse chronique. À la JNM d'écrevisse, la stimulation d'un motoneurone phasique pendant deux heures à une fréquence de 5 Hz, résulterait, en effet, en une augmentation de la résistance à la dépression synaptique. Cette résistance persisterait pendant au moins une journée après le stimulus conditionnant et ne requerrait pas la présence du corps cellulaire pour son établissement. La répétition du protocole de stimulation à 5 Hz, pendant trois à cinq jours, diminuerait davantage la dépression synaptique et réduirait l'amplitude des potentiels de plaque motrice, pour une période pouvant durer au-delà de sept jours. Ce phénomène, appelé adaptation à long-terme (long-term adaptation, LTA), nécessiterait la présence du corps cellulaire pour son induction, contrairement aux changements induits par une brève stimulation (Lnenicka and Atwood, 1985). Ainsi, une axotomie précédant la stimulation des terminaisons nerveuses résiduelles, ou survenant un jour après cette stimulation, empêcherait l'expression de la LTA, suggérant que les molécules nécessaires à son induction seraient synthétisées dans le corps cellulaire et transportées le long de l'axone. Après deux jours de stimulation, cependant, une axotomie affecterait uniquement l'expression de la résistance à la dépression. L'établissement de cette dernière requerrait donc plus d'épisodes de stimulation que la réduction de l'amplitude des potentiels de plaque motrice et, par conséquent, ces deux phénomènes seraient temporellement distincts. Toutefois, trois jours de stimulation seraient suffisants pour induire les deux phénomènes, de sorte qu'une axotomie exécutée à ce moment n'altérerait pas l'induction de la LTA (Nguyen and Atwood, 1990). Par contre, la présence du corps cellulaire serait requise pour le maintien de la résistance à la dépression synaptique. Ainsi, une axotomie du motoneurone après l'induction de la LTA accélérerait le retour de la dépression synaptique, alors que l'amplitude des potentiels de plaque motrice serait toujours réduite à 40%, sept jours après le stimulus conditionnant (Nguyen and Atwood, 1992).

En plus de l'intégrité du transport axonal, la synthèse de nouvelles protéines serait nécessaire pour la pleine expression de la LTA. En effet, l'administration d'un

inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide, deux à six heures avant chacune des périodes de stimulation, atténuerait la réduction de l'amplitude des potentiels de plaque motrice et la résistance à la dépression. Lorsqu'administrée en début de stimulation ou à la fin de celle-ci, la cycloheximide faillirait cependant à réduire la LTA. Ainsi, les protéines requises pour l'expression de la LTA seraient possiblement déjà synthétisées, mais leur durée de vie serait courte (Nguyen and Atwood, 1990).

Outre l'aspect temporel différent pour l'induction des changements de transmission synaptique de la LTA, le nombre et la fréquence des stimuli requis seraient également différents. Ainsi, chez l'écrevisse, l'augmentation de la résistance à la dépression se développerait avec seulement 9000 stimuli par jour, administrés à basse fréquence (0.2 ou 0.5 Hz) ou en courts trains de fréquence modérée (2.5 Hz). Au contraire, la diminution de l'amplitude des potentiels de plaque motrice se développerait uniquement à une fréquence de stimulation modérée ou à basse fréquence lorsque le nombre de stimuli est doublé (Mercier et al., 1992). Ces deux phénomènes de plasticité à long-terme seraient donc dissociables et auraient différents pré-requis pour leur induction. Par ailleurs, le type d'adaptation à long-terme serait également fonction du patron d'activité imposé aux motoneurones. En effet, chez le rat, l'imposition d'un patron d'activité tonique (20 Hz, pendant 10 secondes, toutes les 30 secondes, durant 3 à 4 semaines), en aval d'un blocage à la TTX, augmenterait la résistance à la dépression des JNMs phasiques du muscle EDL. Au contraire, l'imposition d'un patron d'activité phasique (150 Hz, pendant une seconde, toutes les 60 secondes, durant 3 à 4 semaines) aux terminaisons nerveuses toniques du muscle *soleus*, augmenterait leur sensibilité à la dépression. Ainsi, les JNMs phasiques stimulées adopteraient un phénotype plus tonique, tandis que les JNMs toniques stimulées présenteraient un phénotype plus phasique. Le ratio du contenu quantique et de la taille de l'ensemble des vésicules synaptiques serait également modifié dans ce sens, de sorte qu'il serait diminué dans les JNMs stimulées de l'EDL et augmenté dans celles du *soleus*. Ce ratio serait d'ailleurs corrélé avec l'amplitude de la dépression. Ainsi, la libération d'un petit nombre de

vésicules synaptiques par rapport à la taille de l'ensemble des vésicules permettrait aux JNMs de l'EDL stimulé de moins déprimer; tandis que la libération d'un plus grand nombre de vésicules par rapport à l'ensemble de vésicules synaptiques disponibles entraînerait une plus grande dépression chez les JNMs du *soleus* stimulé (Reid et al., 2003).

Une forme similaire de LTA pourrait également être induite chez la grenouille, par la stimulation nerveuse chronique. En effet, la stimulation du nerf moteur du muscle *c.p.*, à une fréquence de 10 Hz, pendant 5 à 8 jours, réduirait de moitié le contenu quantique des JNMs. Celles-ci, seraient également moins sensibles à la dépression synaptique et afficheraient une plus grande facilitation, lors d'une stimulation à 40 Hz, pendant deux secondes. Toutefois, ces changements ne pourraient être induits chez les animaux capturés en hiver, probablement à cause des changements opposés résultant de la diminution d'activité saisonnière (Hinz and Wernig, 1988). Ainsi, les molécules impliquées dans ce dernier phénomène pourraient avoir une durée de vie suffisamment longue et être assez stables pour que leurs effets ne soient pas renversés par une stimulation chronique de cette durée.

En règle générale, les adaptations présynaptiques en réponse à une augmentation chronique de l'activité synaptique seraient donc caractéristiques d'une diminution de l'efficacité présynaptique et diminueraient, conséquemment, le facteur de sécurité. Différents changements au niveau de la taille des terminaisons nerveuses, de l'ultrastructure des zones actives et de l'homéostasie du Ca^{2+} surviennent également de façon concomitante avec certaines de ces adaptations physiologiques. Ces changements et leur implication possible dans la détermination du phénotype physiologique sont discutés dans les sections ci-après.

1.2.4.5.2.1.1.1.1. Taille de la terminaison nerveuse

Pendant l'été, les terminaisons nerveuses des motoneurones phasiques de l'écrevisse arboreraient plus de varicosités que durant l'hiver et, en ce sens, ressembleraient davantage aux motoneurones toniques (Lnenicka and Zhao, 1991). Chez les grenouilles d'été, la morphologie des JNMs serait sensiblement la même qu'en hiver, mais elles montreraient plus de signes de régression de leurs terminaisons nerveuses et moins de bourgeonnement présynaptique (Wernig et al., 1980).

Une structure des terminaisons nerveuses similaire à celle des JNMs de l'écrevisse durant l'été pourrait également être reproduite par la stimulation nerveuse chronique. En effet, une stimulation à une fréquence de 10 Hz, deux heures par jour, pendant 7 à 14 jours, augmenterait le nombre, la fréquence et la taille des varicosités synaptiques des motoneurones phasiques d'écrevisse. Chacune de ces varicosités contiendrait une forte concentration de synapses, ce qui représente un changement par rapport à la distribution uniforme des synapses dans les motoneurones non stimulés. Ceux-ci adopteraient donc un phénotype semblable aux motoneurones toniques (Lnenicka et al., 1991). Cependant, les changements dans la taille des terminaisons nerveuses iraient à l'encontre d'une relation directe entre ce facteur et l'efficacité présynaptique. De la même façon, chez le lapin, la taille des JNMs des muscles EDL et *tibialis anterior* du lapin serait aussi réduite après trois semaines de stimulation nerveuse chronique, tel que visualisé par le marquage des nAChRs postsynaptiques à l' α -bungarotoxine (Somasekhar et al., 1996).

1.2.4.5.2.1.1.1.2. Ultrastructure des zones actives

Densité des vésicules synaptiques

Chez le lapin, la stimulation nerveuse chronique augmenterait également la densité des vésicules synaptiques dans les terminaisons nerveuses des muscles EDL et *tibialis anterior* stimulées chroniquement (Somasekhar et al., 1996). Encore une fois, de tels changements ultrastructuraux confirment l'absence de corrélation positive entre l'efficacité présynaptique et la taille des ensembles vésiculaires. Toutefois, ils seraient cohérents avec une diminution du ratio du contenu quantique par rapport à la

taille de l'ensemble des vésicules synaptiques, généralement associé à une diminution de l'efficacité présynaptique (Reid et al., 2003). Ils pourraient, de plus, expliquer la plus grande résistance à la dépression des JNMs stimulées chroniquement.

Mitochondries

La densité des mitochondries serait également augmentée dans les terminaisons nerveuses des muscles EDL et *tibialis anterior* du lapin stimulées chroniquement pendant trois semaines (Somasekhar et al., 1996). De façon similaire chez l'écrevisse, la stimulation nerveuse chronique augmenterait le diamètre des mitochondries présynaptiques et celles-ci se rapprocheraient de la synapse (Lnenicka et al., 1986). De plus, la capacité oxydative des mitochondries serait aussi augmentée dans ce modèle, tel que démontré par un marquage plus intense de ces dernières par la rhodamine-123. Ce plus grand pouvoir oxydatif serait, en outre, corrélé avec la plus grande résistance des motoneurones à la dépression. En effet, la perfusion d'un inhibiteur de la synthèse oxydative d'ATP, le dinitrophénol ou le sodium azide, augmenterait la dépression synaptique induite par une stimulation à 5 Hz, pendant 20 minutes, chez les motoneurones chroniquement stimulés (Nguyen and Atwood, 1994).

1.2.4.5.2.1.1.1.3. Homéostasie du Ca²⁺

Séquestration et extrusion du calcium

La stimulation nerveuse chronique augmenterait aussi la capacité de clairance du Ca²⁺ dans les terminaisons nerveuses d'écrevisse. Ainsi, suivant l'application d'un ionophore, le signal calcique serait plus faible dans les motoneurones phasiques stimulés que dans les témoins et similaire au signal calcique obtenu dans les motoneurones toniques (Fengler and Lnenicka, 2002). L'augmentation de cette capacité de clairance du Ca²⁺ pourrait donc être liée aux changements affectant les mitochondries. De plus, l'altération des différents mécanismes de séquestration et d'extrusion du Ca²⁺ pourrait potentiellement influencer la physiologie présynaptique et contribuer à la plus grande résistance des motoneurones à la dépression synaptique (David and Barrett, 2003; Talbot et al., 2003).

1.2.4.5.2.1.2. DÉTERMINANTS POSTSYNAPTIQUES DU FACTEUR DE SÉCURITÉ

Outre son effet sur l'efficacité présynaptique, l'augmentation chronique de l'activité synaptique aurait aussi des répercussions sur certains déterminants postsynaptiques du facteur de sécurité, notamment sur l'AChE et différentes protéines musculaires.

1.2.4.5.2.1.2.1. AChE

L'activité de l'AChE serait altérée par la stimulation nerveuse chronique. Chez le rat, l'activité des formes globulaires G1 et G4 de l'AChE extrasynaptique serait, en effet, réduite d'un facteur de 4 et 10 respectivement, dans le muscle EDL stimulé pendant 35 jours. Les niveaux d'activité atteints s'apparenteraient à ceux normalement retrouvés dans le muscle *soleus*. Un changement opposé serait par contre observé chez le lapin, mais reflèterait toujours une adaptation de l'EDL vers un phénotype plus tonique. Une adaptation du muscle *soleus* du rat vers un phénotype plus phasique pourrait aussi être induite, suivant son immobilisation pendant 14 jours, et impliquerait une augmentation de l'activité de l'AChE G1 à un niveau semblable à celui retrouvé dans l'EDL (Sketelj et al., 1997). Puisque l'activité des différents isoformes de l'AChE peut être différentiellement régulée dans le temps et l'espace, l'effet de cette régulation sur le facteur de sécurité pourrait être variable. Cependant, une réduction globale de l'activité des différents isoformes de l'AChE permettrait probablement d'augmenter le facteur de sécurité et inversement pour une augmentation globale de leur activité.

1.2.4.5.2.1.2.2. Protéines musculaires

Les changements présynaptiques physiologiques et morphologiques induits par la stimulation nerveuse chronique précéderaient les changements d'expression protéiques dans le muscle. En effet, chez l'écrevisse, alors que la plus grande résistance à la dépression et la réduction de l'amplitude des potentiels de plaque motrice serait pleinement développée après une semaine de stimulation, les changements musculaires prendraient jusqu'à trois semaines pour s'établir. Parmi ces changements, notons l'apparition de protéines normalement exprimées uniquement dans les fibres musculaires toniques, soit certains isoformes de la

paramyosine, des troponines T et I et d'autres protéines encore non-identifiées, mais représentant possiblement des isoformes de la chaîne légère de myosine (Cooper et al., 1998). Des changements similaires dans l'expression des protéines musculaires ont également été observés à la JNM de lapin, stimulée chroniquement. Ainsi, alors que l'expression des isoformes phasiques de la troponine T et de la chaîne légère de myosine 2 serait régulée à la baisse, l'expression de leurs homologues toniques serait augmentée. Il en serait de même pour les isoformes phasiques de la chaîne lourde de myosine, la pompe calcique ATPase du réticulum sarcoplasmique et la calsequestrin. L'expression du transporteur des acides gras, albumine, du transporteur d'oxygène, myoglobine, et de la «heat shock protein» (HSP-B5) serait également augmentée, de même que celle de l'ATP synthase et de la créatine kinase mitochondriales. Au contraire, l'expression de la créatine kinase cytosolique serait diminuée, tout comme celle de la phosphofructokinase et des enzymes glycolytiques, enolase et aldolase. Par conséquent, la transformation induite par la stimulation nerveuse chronique impliquerait, entre autres, une augmentation de l'activité mitochondriale, du métabolisme aérobie et de l'utilisation des acides gras, de même qu'une conversion de l'appareil contractile avec des isoformes caractéristiques des muscles toniques et une stabilisation des protéines myofibrillaires (Donoghue et al., 2005). De façon cohérente avec les changements d'expression des protéines mitochondriales, le volume des mitochondries serait également augmenté dans les fibres musculaires des muscles EDL et *tibialis anterior* du lapin après trois semaines de stimulation nerveuse chronique (Somasekhar et al., 1996).

Outre la stimulation nerveuse, la stimulation directe des fibres musculaires dénervées, selon un patron d'activité tonique, entraînerait aussi des changements phénotypiques au niveau des fibres musculaires phasiques. En effet, après trois semaines de stimulation, les fibres rapides de type IIb et IIx, ainsi nommées selon le type de chaîne lourde de myosine exprimé, constituant normalement 45% et 29% des fibres musculaires de l'EDL du rat, disparaîtraient pour être remplacés par des fibres de type IIa et I, plus lentes. Celles-ci constitueraient alors 75% et 15% des fibres musculaires respectivement, comparativement à 23% et 3% dans les muscles

témoins. Ultiment, avec le maintien de la stimulation pendant deux mois supplémentaires, les fibres IIa seraient graduellement remplacées par des fibres de type I, à l'image du muscle tonique *soleus*. Cette métamorphose serait similaire à celles obtenues par la stimulation du nerf péronéal commun à l'aide d'un patron d'activité identique et par la réinnervation du muscle EDL avec le nerf du *soleus*. Ainsi, l'intégrité du motoneurone ne serait pas essentielle aux changements phénotypiques musculaires observés. Ceux-ci dépendraient cependant du patron d'activité musculaire (Windisch et al., 1998). Néanmoins, les changements de phénotype musculaire auraient pour fonction d'adapter la capacité de contraction des fibres musculaires à l'activité neuronale. Par conséquent, ces adaptations permettraient d'assurer la fidélité de la neurotransmission et augmenteraient donc le facteur de sécurité.

En somme, les patrons d'activité nerveuse et musculaire associée, réguleraient les propriétés phasiques ou toniques des terminaisons nerveuses et des fibres musculaires afin de maintenir un facteur de sécurité optimal pour les besoins de la JNM. Les adaptations caractéristiques d'une augmentation chronique de l'activité synaptique comprendraient une réduction de l'efficacité présynaptique ainsi que des changements au niveau de l'AChE, de l'appareil contractile et du métabolisme des neurones et des fibres musculaires. Ce type d'adaptation serait présent autant chez les invertébrés que chez les vertébrés inférieurs et supérieurs et constituerait donc une caractéristique conservée pendant l'évolution. De ce fait, la plasticité synaptique à long-terme du facteur de sécurité de la JNM serait probablement un facteur de survie.

1.2.4.5.2.1.3. DÉTERMINANT GLIAL DU FACTEUR DE SÉCURITÉ

Contrairement aux adaptations présynaptiques et postsynaptiques, aucune adaptation des CSPs n'a été rapportée, jusqu'à ce jour, en réponse à une augmentation chronique de l'activité synaptique. Or, comme pour la réduction chronique de l'activité, des interactions réciproques entre les trois éléments composant la JNM sont susceptibles d'intervenir dans les différents changements observés et dans la régulation du facteur de sécurité. Aussi, y a-t-il un besoin pour l'étude des propriétés gliales dans ces

conditions de plasticité à long-terme. Une telle étude, comme celle dont il sera question dans cette thèse, pourrait, en effet, contribuer à notre compréhension de l'intégration de l'information nerveuse par la synapse et ces différents composants.

1.3. BUTS DE LA THÈSE

Bien que la plasticité synaptique à court et à long-terme ait été abondamment étudiée à la JNM, les mécanismes qui sous-tendent la régulation présynaptique du facteur de sécurité restent mal définis, malgré l'existence de différents corrélats structuraux et ultrastructuraux. Également, les données concernant la plasticité des CSPs sont insuffisantes pour l'obtention d'une vision intégrée de ce phénomène, à la JNM. Or, une meilleure compréhension de la régulation de l'efficacité présynaptique et des propriétés gliales par l'activité contribuera à améliorer notre compréhension de l'intégration de l'information nerveuse, dans un contexte de synapse tripartite. Elle permettra, en outre, de démystifier le rôle des CSPs dans le fonctionnement de la JNM et le maintien d'un facteur de sécurité optimal. C'est donc dans cette visée que s'inscrit le travail présenté dans cette thèse, dans laquelle les propriétés gliales et les mécanismes déterminant l'efficacité présynaptique sont étudiés, suivant un changement chronique de l'activité synaptique des JNMs.

1.3.1. MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Pour ce faire, la JNM du muscle *c.p.* d'amphibien a été privilégiée, notamment pour la simplicité de sa structure et parce qu'il s'agit d'un système exhaustivement caractérisé. De plus, les JNMs de *Rana pipiens* peuvent présenter une grande différence d'efficacité présynaptique, malgré une structure comparable. Grâce à cette stabilité de leur structure, ces JNMs constituent un bon modèle pour étudier les déterminants physiologiques de l'efficacité présynaptique et les propriétés des CSPs.

Afin d'induire un changement chronique de l'activité synaptique des JNMs, deux modèles expérimentaux de plasticité à long-terme ont été retenus : le blocage chronique des nAChRs à l'aide de l' α -bungarotoxine et la stimulation nerveuse chronique. Tel que décrit dans la section 1.2.4.5, ces deux modèles induisent des

changements fonctionnels et/ou structuraux au niveau des JNMs de différentes espèces. Parmi les changements fonctionnels relatés, notons une régulation opposée de l'efficacité présynaptique, qui serait augmentée dans les JNMs bloquées et diminuée dans les JNMs stimulées (Lnenicka and Atwood, 1985; Hinz and Wernig, 1988; Plomp et al., 1992; Reid et al., 2003). Chez la grenouille, les changements rapportés après une stimulation nerveuse chronique concernent d'ailleurs principalement cette adaptation du contenu quantique et de la plasticité à court-terme (Hinz and Wernig, 1988). Au contraire, les changements décrits suivant un traitement chronique à l' α -bungarotoxine sont plutôt relatifs au bourgeonnement présynaptique (Wines and Letinsky, 1991). Par ailleurs, les méthodes utilisées dans ces études sont relativement invasives. D'une part, le modèle de stimulation requiert l'anesthésie générale quotidienne de l'animal pour toute la durée de la stimulation; d'autre part, la méthode d'application de l' α -bungarotoxine nécessite l'exposition répétée du *c.p.* avec tous les risques d'inflammation que cela comporte. Aussi, dans un premier temps, il était nécessaire de développer un modèle de stimulation chronique adapté à l'animal en mouvement et un modèle de blocage des nAChRs moins invasif. Dans un deuxième temps, il fallait valider et caractériser les changements synaptiques induits par ces modèles, avant d'entreprendre l'étude des propriétés gliales dans ces nouvelles conditions.

1.3.2. OBJECTIFS

Aussi les objectifs de cette thèse sont les suivants :

1. Développer un modèle de stimulation et un modèle de blocage chronique des nAChRs *in vivo*.
2. Déterminer l'efficacité présynaptique et la plasticité synaptique à court terme des JNMs soumises à un changement chronique de l'activité synaptique.
3. Valider les mécanismes à l'origine de la détermination de l'efficacité présynaptique de façon dépendante de l'activité.
4. Caractériser les propriétés gliales dans les JNMs soumises à un changement chronique de l'activité synaptique.

Ces objectifs ont été adressés dans le cadre de deux articles, lesquels font l'objet du chapitre suivant :

- Bélaïr, EL., Vallée, J. and Robitaille, R. Long-term in vivo modulation of synaptic efficacy at the neuromuscular junction of *Rana pipiens* frogs. *J Physiol.* 2005 Nov 15;569(Pt 1):163-78.

- Bélaïr, EL., Vallée, J. and Robitaille, R. Long-term in vivo synaptic plasticity of glial cells. Mis en forme pour *J Neuroscience* (2008)

2. CHAPITRE DEUXIÈME

2.1. PREMIER ARTICLE

2.1.1. INTRODUCTION DU PREMIER ARTICLE

Tel que décrit dans le chapitre précédent, le facteur de sécurité des JNMs est déterminé au niveau présynaptique par l'efficacité présynaptique, laquelle influencera, à son tour, les phénomènes de plasticité à court-terme, observables à la JNM. Aussi, selon leur efficacité présynaptique et les caractéristiques de leur plasticité, les neurones moteurs, de même que les JNMs qui leur sont associées, pourront être qualifiés de phasiques ou toniques. Ainsi, les terminaisons des neurones phasiques présenteront un contenu quantique élevé, mais l'amplitude des potentiels de plaque motrice évoqués déprimera rapidement lors d'une stimulation soutenue et inversement pour les terminaisons des neurones toniques. De façon cohérente avec cette physiologie, les neurones phasiques déchargeront généralement à très haute fréquence, mais pour quelques millisecondes seulement, alors que les neurones toniques déchargeront à une fréquence plus modérée et de façon soutenue. Par conséquent, le patron d'activité neuronale influencerait les propriétés des neurones moteurs de même que celles de leurs JNMs.

D'ailleurs, le changement chronique de ce patron, de façon naturelle ou imposée, entraînerait une modification des propriétés physiologiques, structurales et ultrastructurales des JNMs, tel que décrit dans la section 1.2.4.5. Ces changements suggèrent donc un certain corrélat entre la structure d'une JNM et ses propriétés physiologiques. Cependant, ces corrélations, relatives à la taille des terminaisons nerveuses, à la densité vésiculaire et au nombre de particules transmembranaires des zones actives, à la longueur des zones actives et à la densité des mitochondries, demeurent ambiguës et inconstantes dans la littérature, de sorte qu'aucune d'entre-elles ne semble pouvoir expliquer totalement les différences d'efficacité présynaptique entre deux muscles (Herrera et al., 1985) (Grinnell and Herrera, 1980; Propst and Ko, 1987; Somasekhar et al., 1996; Nguyen et al., 1997; Msghina et al., 1998). Il est donc peu probable que ces facteurs contribuent, à eux seuls, à la

détermination de l'efficacité présynaptique chez la grenouille. Par contre, l'arrangement des particules transmembranaires au niveau des zones actives pourrait être un facteur important (Walrond and Reese, 1985; Propst et al., 1986).

Puisque les particules transmembranaires sont associées principalement aux canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, un tel arrangement pourrait influencer l'influx calcique et conséquemment, l'efficacité présynaptique. D'ailleurs, chez l'écrevisse, de telles différences au niveau de l'influx de Ca^{2+} existeraient entre les terminaisons nerveuses phasiques et toniques (Msghina et al., 1999). Ces JNMs diffèreraient également quant à leur capacité de chélation (Atwood and Lnenicka, 1992) et de clairance du Ca^{2+} (Fengler and Lnenicka, 2002) de même qu'au niveau de leur sensibilité au Ca^{2+} (Millar et al., 2005). Celle-ci pourrait d'ailleurs être associée à l'expression de la protéine de liaison au Ca^{2+} , frequenine (Jeromin et al., 1999). De ce fait, dans ce modèle d'invertébré, l'efficacité présynaptique serait principalement déterminée par l'homéostasie du Ca^{2+} , incluant son entrée, sa gestion et son action sur les différentes protéines qui lui sont sensibles et qui sont impliquées dans la libération de neurotransmetteurs.

Étant donné les différences interespèces, ces observations méritent toutefois d'être vérifiées dans un modèle de vertébré, d'autant plus que les différences importantes de taille et de volume entre les JNMs toniques et phasiques d'écrevisse rendent l'étude des mouvements calciques dans ce modèle très laborieuse. De plus, comme la plupart des études cherchant à expliquer la détermination de l'efficacité présynaptique ont été conduites dans des muscles distincts, les mécanismes à l'origine de la détermination dépendante de l'activité de l'efficacité présynaptique demeurent inconnus.

L'un des objectifs de cette thèse est donc de valider ces mécanismes, dans un modèle de JNM de vertébré soumise à une stimulation nerveuse chronique. Pour ce faire, un modèle de stimulation *in vivo* a été développé chez la grenouille et les changements d'efficacité présynaptique et de plasticité synaptique à court terme induits dans les

JNMs stimulées ont été déterminés. Prenant avantage de ce modèle de JNM, où de grandes différences d'efficacité présynaptique existent sans différence de taille ou de morphologie notable (Herrera et al., 1985), les corrélats entre l'homéostasie présynaptique du Ca^{2+} , le métabolisme mitochondrial, l'expression de la frequine et l'efficacité présynaptique, dans les JNMs phasiques transformées en un phénotype plus tonique, ont pu être vérifiés.

Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans un article, dont le texte intégral est l'objet de la prochaine section et dont la référence complète est la suivante :

- Bélaïr EL., Vallée J. and Robitaille R. Long-term in vivo modulation of synaptic efficacy at the neuromuscular junction of Rana pipiens frogs. J Physiol. (2005) Nov 15;569(Pt 1):163-78. Copyright © 2005, with permission from Blackwell Publishing.
- Lien internet: <http://jp.physoc.org/cgi/content/full/569/1/163>
 - La contribution de l'étudiante à ce travail : Eve-Lyne Bélaïr a développé le modèle de stimulation *in vivo*, a effectué les expériences, leurs analyses, l'interprétation des données obtenues et la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr Richard Robitaille.
 - La contribution de Joanne Vallée à ce travail : Joanne Vallée a effectué les expériences d'immunohistochimie.

2.1.2. TEXTE INTÉGRAL DU PREMIER ARTICLE

LONG-TERM IN VIVO MODULATION OF SYNAPTIC EFFICACY AT THE NEUROMUSCULAR JUNCTION OF *RANA PIPIENS* FROGS

Eve-Lyne Bélair, Joanne Vallée and Richard Robitaille

Centre de Recherche en Sciences Neurologiques
Département de physiologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec
CANADA H3C 3J7.

Running title: *In Vivo* long-term synaptic changes at the NMJ

Total character count: 64 575

Text pages: 37, Figures: 7; Table: 1.

Key words: electrical stimulation, transmitter release, synaptic plasticity

Section: cell physiology

Corresponding author:

Dr. Richard Robitaille

Département de physiologie, Faculté de médecine,
Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville,
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

E-mail: richard.robaille@umontreal.ca

2.1.2.1. SUMMARY

Prolonged changes in motor neuron activity can result in long-term changes in synaptic transmission. We investigated whether mechanisms commonly thought to be involved in determining synaptic efficacy of vertebrate motor neurons are involved in these long-term changes. The nerve supplying the *cutaneus pectoris* muscle was chronically stimulated via skin surface electrodes in freely moving frogs for 5 to 7 days. Chronic stimulation induced a 50% reduction in evoked EPP amplitude at stimulated NMJs. These changes appear to be presynaptic since mEPP amplitude was unchanged while mEPP frequency was decreased by 46% and paired-pulse facilitation was increased by 26%. High frequency facilitation (40 Hz, 2 s) was also increased by 89%. Moreover, stimulated NMJs presented a 92% decrease in synaptic depression (40 Hz, 2 s). An increase in mitochondrial metabolism was observed as indicated by a more pronounced labelling of active mitochondria (Mitotracker) in stimulated nerve terminals, which could account for their greater resistance to synaptic depression. NMJ length visualized by α -bungarotoxin staining of nAChRs was not affected. Presynaptic calcium signals measured with Calcium Green-1 were larger in stimulated NMJs at low frequency (0.2 Hz) and not different from control NMJs at higher frequency (40 Hz, 2 s and 30 s). These results suggest that some mechanisms downstream of calcium entry are responsible for the determination of synaptic output, such as a downregulation of some calcium-binding proteins, which could explain the observed results. The possibility of a change in frequenin expression, a calcium-binding protein that is more prominently expressed in phasic synapses, was however refuted by our results.

2.1.2.2. INTRODUCTION

Motor neurons may be classified as phasic or tonic based on their natural patterns of activity. Phasic neurons fire in brief bursts, whereas tonic ones fire for longer periods at lower frequencies. Synaptic physiology parallels neuronal activity with phasic synapses generating large, rapidly depressing endplate potentials (EPPs), while tonic synapses evoke smaller EPPs that show less depression. Phasic and tonic NMJs can also be differentiated, in some species, on the basis of their structural and ultrastructural properties (King et al., 1996; Msghina et al., 1998).

The maintenance of synaptic phenotypes is dependant on the neuronal pattern of activity and changes in motor activity leads to long-lasting modifications of the synapse. For instance, during winter, frogs have reduced nerve activity, which increases synaptic efficacy and depression while lowering facilitation (Wernig et al., 1996). Conversely, the seasonal increases in activity of crayfish phasic terminals induces a more tonic-like state (Lnenicka and Zhao, 1991). Comparable synaptic changes were obtained in many different species following chronic electrical stimulation of phasic nerve terminals (Lnenicka and Atwood, 1985; Hinz and Wernig, 1988; Somasekhar et al., 1996; Reid et al., 2003). Furthermore, morphological transformations, such as vesicle density, NMJ and mitochondrial size were also described (Lnenicka et al., 1986; Somasekhar et al., 1996). In all cases, chronically stimulated phasic terminals expressed more tonic-like properties.

Considering that morphological changes often accompany changes in physiological properties, it has been suggested that synaptic structure is a strong determinant of synaptic performance. However, structural differences do not seem to fully account for the difference in synaptic output of crayfish tonic and phasic terminals (King et al., 1996; Msghina et al., 1998). One possible alternative is that differential calcium-sensitivity of transmitter release exists between the two types of terminals (Msghina et al., 1999). New evidence at the crayfish NMJ suggest a difference in the Ca^{2+} -dependance of vesicle priming (Millar et al., 2005). Among the priming molecules possibly involved, there is the neuronal calcium sensor-1 (Zucker, 2003) who's

homolog, frequenin in crayfish phasic terminals, is known to facilitate evoked neurotransmission (Jeromin et al., 1999). Although many studies have used invertebrates to investigate the differences in synaptic efficacy between phasic and tonic synapses, little has been done in vertebrate models. Moreover, most studies were conducted in distinct phasic and tonic synapses, leaving the mechanisms underlying activity-dependent synaptic changes unknown.

Thus, the aim of this work is to study changes in synaptic properties of vertebrate motor neurons subjected to prolonged stimulation and to test transformed NMJs for differences in mitochondria, calcium signaling and frequenin expression. Experiments were performed on the frog NMJ, a preparation where large differences in synaptic efficacy exist without correlated structural differences (Herrera et al., 1985; Banner and Herrera, 1986), therefore, allowing for investigation of Ca^{2+} homeostasis and handling. Using a combination of electrophysiology, immunohistochemistry, western blotting and calcium imaging, we show that chronically stimulated NMJs have a decreased probability of transmitter release as well as an increased resistance to synaptic depression. These changes are accompanied by an increase in mitochondrial metabolism while changes in presynaptic Ca^{2+} variations, following the arrival of an action potential, and in the expression of the protein frequenin could not explain differences in synaptic output and plasticity. These data suggest that some mechanisms downstream of calcium entry rather than Ca^{2+} entry are involved in determining synaptic output.

2.1.2.3. MATERIALS AND METHODS

All experimental procedure and protocols were approved by the CDEA (Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux) of the University of Montreal in accordance with CCAC (Canadian Council on Animal Care) policy.

2.1.2.3.1. ANIMALS

Rana pipiens frogs (body length 6 cm, head to tail; Anilab, Wards and Connecticut Valley Biological Supply) were housed individually in a small aqua-terrarium at room temperature and fed with meal worms. Aqua-terrariums were constantly supplied with fresh running water.

2.1.2.3.2. STIMULATING ELECTRODES

Two teflon coated wires (platinum 90% / iridium 10%) (Medwire Corporation) approximately 9 cm in length were used. Each wire was inserted into #10 polyethylene tubing (Becton Dickinson). Uncoated wire was exposed to the skin by passing it through one hole in the tubing, winding it around the tubing and passing it back inside through a second hole. This resulted in a 0.5 cm region of exposed wire coiled around the exterior of the tubing while the rest was on the interior and insulated from the skin. Each end of the tubing was threaded through squares of rubber elastic. These elastic squares prevented tubing-induced skin abrasion, by adhering and preventing slipping (Figure 1A, C).

2.1.2.3.3. POSITIONNING OF STIMULATING ELECTRODES

Animals were anaesthetized with MS-222 (0.28 mg/g of body weight, Sigma) injected subcutaneously. Both uncoated middle parts of the electrode wires were placed parallel to each other over the skin of the left *cutaneus pectoris* (*c.p.*) muscle, one above the *c.p.* insertion line, the other below the *pectoralis proprius* nerve leading to the *c.p.*, and were gently pressed against the skin (Figure 1A). Good stimulating electrode positioning was assessed by tiny skin movements at the *c.p.* insertion line, resulting only from contractions of the *c.p.* muscle. Each electrode wire was then fixed to the skin with 2 stitches, made through the elastic strips, one on

the stimulated left side and the other on the contralateral unstimulated right side of the frog; the upper electrode being fixed at the shoulders level, the lower electrode at the caudal-lateral region of the *c.p.* Electrode extremities were pulled backward and inserted into tubing fixed with stitches to the skin of the dorsolateral folds, so that electrodes surrounded the frog's trunk, one above the shoulders, the other under the arms. A few drops of Permatex® Super Glue were added into the tubing to prevent the electrodes from moving. Uncoated ends of electrodes were wound onto a metal ring, soldered to electrical wire, and connected to the stimulator. Duct tape was used to protect and stabilize the connections (Figure 1B, D).

2.1.2.3.4. CHRONIC *IN VIVO* STIMULATION

Animals implanted with stimulating electrodes were subjected to the following stimulation protocol: 15 minute trains of stimuli (0.5 ms duration, 0.4-0.9 V amplitude) delivered at 10 Hz alternating with 5 minute rest periods during 5 to 7 days. The stimuli were delivered to the left side of the animal, and the opposite, unstimulated right side served as control. At the end of the conditioning period, animals were anaesthetized using MS-222 (Sigma) and killed by double pithing.

FIGURE 1. STIMULATING ELECTRODES FOR CHRONIC LONG-TERM CONDITIONING IN VIVO.

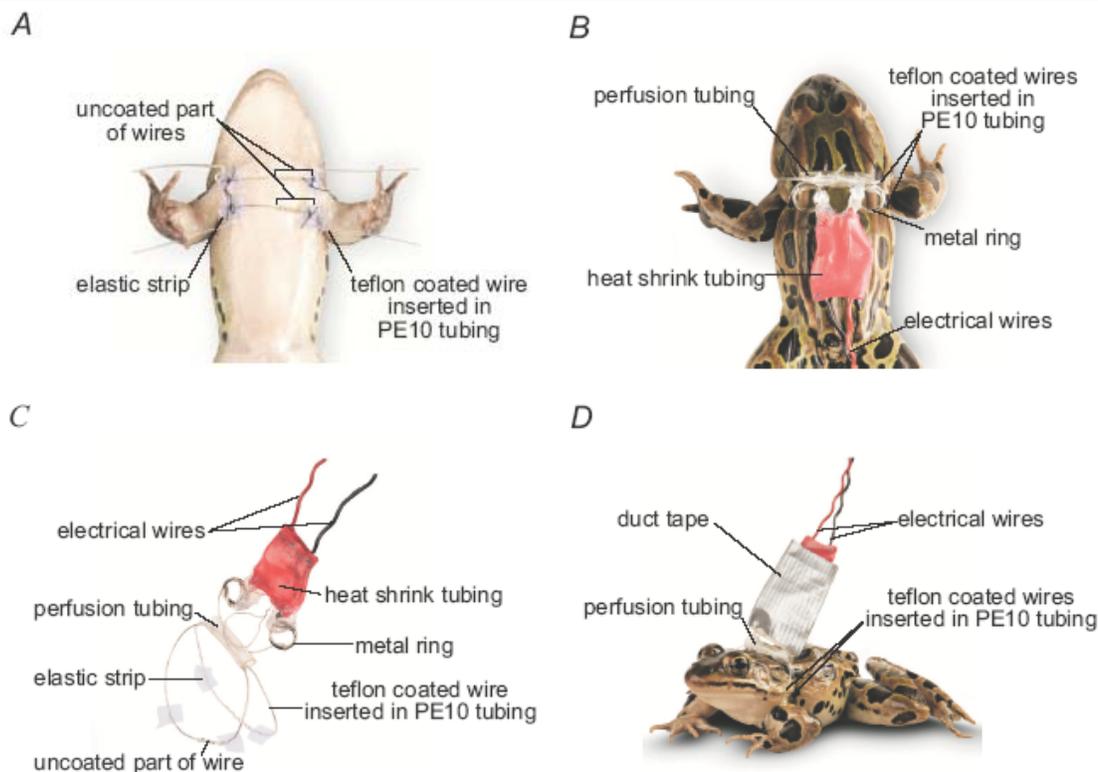


FIGURE 1. STIMULATING ELECTRODES FOR CHRONIC LONG-TERM CONDITIONING IN VIVO. (A) Ventral view. The two stimulating electrodes were placed parallel over the skin so that the *pectoralis proprius* nerve leading to the *c.p.* muscle lay between the uncoated section of the two teflon coated wires. (B) Dorsal view. Electrode extremities were inserted into PE tubing, fixed on the dorsolateral folds, and connected to the stimulator. (C) Stimulation harness. It consists of a two-wire electrode inserted into a tubing and attached to electrical wires via two metal rings. (D) A freely moving frog with harness.

Figure 1. Stimulating electrodes for chronic long-term conditioning in vivo

2.1.2.3.5. ELECTROPHYSIOLOGY

C.p. muscles with their *pectoralis proprius* motor nerve were removed and pinned down at 110 % of resting length on a Sylgard-coated recording chamber. Nerve-muscle preparations were perfused with low calcium high magnesium physiological solution (mM: 120 NaCl; 2.0 KCl; 1.0 NaHCO₃; 0.5 CaCl₂; 3.6 MgCl₂; 5.0 Hepes) or with normal physiological solution (mM: 120 NaCl; 2.0 KCl; 1.0 NaHCO₃; 1.8 CaCl₂; 5.0 Hepes). In the latter case, 4.0-4.7 µg/ml of d-tubocurarine was added to

block muscle contractions. The motor nerve was stimulated using a suction electrode that delivered supra-threshold stimuli. Intracellular recordings of endplate potentials (EPPs) and miniature EPPs (mEPPs) were performed using a Neuroprobe amplifier (A-M systems) with sharp glass microelectrodes (10-20 M Ω , filled with KCl, 2 M). Signals were amplified a further 500-1000 times with a Warner Instruments DC amplifier and filtered at 2 kHz. EPPs and mEPPs were recorded with Tomahacq (T.A. Goldhorpe, University of Toronto) or Winwcp software (John Dempster, University of Strathclyde).

To study the effects of chronic *in vivo* stimulation on transmitter release probability, the nerve was stimulated at 0.2 Hz with paired-pulses of 0.1 ms duration separated by 10 ms, in low calcium, high magnesium solution (n= 26 stimulated NMJs, 26 control NMJs; N= 9 frogs). Episodes of mEPPs were recorded in between stimulation periods. Quantal release (m) was calculated as:

$$m = \text{mean EPP amplitude (n=180)} / \text{mean amplitude of mEPPs (n=50)}$$

Quantal release is then used in the calculation of synaptic efficacy (SE):

$$SE = m/L$$

and paired-pulse facilitation (PPF):

$$PPF = (EPP_2 - EPP_1) / EPP_1 * 100$$

where EPP_1 , EPP_2 = amplitude of first and second EPP of a paired-pulse stimulation and L = NMJ length in μm .

To study the effects of chronic *in vivo* stimulation on high frequency-induced plasticity, high frequency stimulation was performed in normal physiological solution containing d-tubocurarine. Control periods of 0.2 Hz stimulation were separated by a 40 Hz stimulation during 2 s or 30 s (20 minutes resting period was allowed between each recording of high frequency stimulation made in the same muscle). High frequency facilitation was defined as the ratio of the largest EPP amplitude during the 40 Hz train versus mean EPP amplitude during the 0.2 Hz control stimulation. High frequency depression was defined as the ratio of the mean

amplitude of the last 5 EPPs of the 40 Hz train versus the mean EPP amplitude during the 0.2 Hz control stimulation (n=27 stimulated NMJs, 16 control NMJs, N= 7 frogs).

2.1.2.3.6. MEASURE OF NMJ LENGTH

To measure NMJs, postsynaptic nicotinic ACh receptors were stained with α -bungarotoxin coupled to texas red (1:100, 20 min, RT, Molecular Probes). Preparations were observed with a confocal microscope (Zeiss, LSM 510) equipped with a 40 \times water immersion objective (IR-ACHROPLAN 0.8 W). Texas red fluorophore was excited at 543 nm with a helium-neon ion laser and its emission was detected through a long-pass filter (cut off 560 nm). Images were analysed using LSM 510 software. All the branches of each NMJ were measured and added together to give the NMJ length (n= 123 stimulated NMJs, 152 control NMJs; N= 10 frogs).

2.1.2.3.7. IMMUNOHISTOCHEMISTRY FOR FREQUENIN

C.p muscles were fixed with 4% formaldehyde for 10 minutes, rinsed with PBS (phosphate buffer 0.1M containing 9% NaCl) and then permeabilized in 0.3% Triton X-100 solution for 45 minutes. Non-specific labelling was blocked using a PBS solution containing 10% NGS during 15 minutes. Antibody were prepared in a PBS solution with 0.01% triton X-100 and 2% NGS. Muscles were incubated overnight at 4°C with a chicken anti-frequenin polyclonal antibody (1:10 000, Chemicon). After rinsing, frequenin protein was revealed with an anti-chicken secondary antibody coupled to texas red (1:500, 1h, RT, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Postsynaptic nAChRs were labelled with α -bungarotoxin coupled to bodipy (1:100, 20 min, RT, Molecular Probes). Muscles were mounted in Slow-fadeTM medium for imaging (Molecular Probes).

Preparations were observed with a confocal microscope (Zeiss, LSM 510) equipped with a 63 \times oil immersion objective (PLAN-APOCHROMAT 1.4 W). Acquisition was performed using the Multi Track mode for multiple-label experiments. Texas red fluorophore was detected as previously mentioned. Bodipy was excited at 488 nm

with an argon ion laser and detected through a band-pass filter (505-543 nm). Laser intensity was set at 10%, pinhole at 500 μm and detector gain and amplifier offset were adjusted for each preparation to get the best signal to noise ratio.

Regions of interest (ROI) were selected in confocal images (512 \times 512 pixels) by selecting nAChR staining, which is superimposed to presynaptic staining of frequenin. Noise surrounding NMJs was averaged and used to calculate signal to noise ratio, to correct for different settings of gain and offset (n= 92 stimulated NMJs, 68 control NMJs, N= 4 frogs).

2.1.2.3.8. LABELLING OF MITOCHONDRIA

Mitochondria were stained in live preparations by an application of MitoTracker® Green FM dye (50nM, 45 min, RT) or Mitotracker® Red CM-H₂XRos (1200 nM, 45 min, RT) (Molecular Probes), two mitochondrion-selective dyes, the latter fluorescing only when entering an actively respiring cell, where it is oxidized and sequestered. Postsynaptic nAChRs were labelled with α -bungarotoxin coupled to texas red or Bodipy (1:100, 20 min, RT, Molecular Probes).

Live preparations were observed with a confocal microscope (Zeiss, LSM 510) equipped a 40 water \times immersion objective (IR-ACHROPLAN 0.8 W). Acquisition was performed using the Multi Track mode for multiple-label experiments. Texas red fluorophore and Mitotracker® Red CM-H₂XRos were excited at 543 nm with a helium-neon ion laser and their emission was detected through a long-pass filter (cut off 560 nm). Bodipy and MitoTracker® Green FM were excited at 488 nm with an argon ion laser and detected through a band-pass filter (505-543 nm). Laser intensity was set at 10%, pinhole at 500 μm and detector gain and amplifier offset were adjusted for each frog and kept the same for stimulated and control muscles.

Regions of interest (ROI) were selected in confocal images (512 \times 512 pixels) by delimiting nAChRs which staining is superimposed to presynaptic staining of Mitochondria (n= 62 stimulated NMJs, 70 control NMJs; N= 4 frogs).

2.1.2.3.9. WESTERN BLOTTING

Sartorius and *c.p* muscles were processed for immunoblotting (control and stimulated, N=5 frogs). Muscles and nerves were homogenized in RIPA buffer (mM: 50 Tris-HCl, 150 NaCl, 1 EDTA, 1 PMSF, 1 NaF; %: 1 NP-40, 0.1 SDS, 0.001 CLAP) and centrifuged at 14 000 RPM , for 20 minutes at 4°C. Samples were diluted in a buffer (%: 5 B-mercaptoethanol, 2.5 SDS, 10 glycerol; 100 mM Tris pH 6.8; pinch of Bromophenol blue), boiled, loaded (50 µg per lane) and separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (100 V, 2h) and non-specific binding was blocked in 5 % milk diluted in Tris-buffered saline with 0.1% Tween (overnight, 4°C). Frequenin was tagged with chicken anti-frequenin (1:1000, 60 min, 20°C, Chemicon) and revealed with HRP-conjugated anti-chicken IgY (1:25000, 60 min, 20°C, Jackson ImmunoResearch Laboratories, inc.). Membranes were incubated with chemiluminescent substrate (Western lightening chemiluminescence, Perkin Elmer) and exposed to Kodak Biomax film. Analysis of band densities was completed using Quantity One 4.5.2 software (Bio-Rad).

2.1.2.3.10. CALCIUM IMAGING OF NERVE TERMINALS

Frogs were half immersed into a Ca²⁺ Ringer solution (mM: 120 NaCl; 2.0 KCl; 1.0 NaHCO₃; 1.8 CaCl₂; 5.0 Hepes). A small opening was made through the skin, along the external border of *c.p* muscle. The *pectoralis proprius* nerve was cut approximately 1 cm from the *c.p*. muscle and was laid over the skin covering the *c.p*. muscle before being washed with a Mg²⁺ Ringer solution (5 mM MgCl₂, no calcium added). The nerve extremity was re-cut, washed again with Mg²⁺ Ringer, and crystals of Calcium GreenTM-1-dextran (K_d (Ca²⁺) 190 nM, PM 10000, Molecular Probes) were applied at the cut-end. Frogs were covered with wet gauze to prevent dehydration and kept at room temperature for 15 to 18 hours to allow the Ca²⁺ indicator to migrate to the nerve terminals. After the incubation period, nerve-muscle preparations were dissected and pinned down at 110% of resting length on a Sylgard-coated recording chamber. Muscle contractions were blocked with normal Ringer containing 4.0-4.7 µg/ml of d-tubocurarine. Motor nerve was stimulated using a

suction electrode that delivered supra-threshold stimulus (0.2 Hz; 40 Hz, 2 s and 30 s). Simultaneous Ca^{2+} imaging of nerve terminals was completed with a confocal microscope (Zeiss, LSM 510). Dye was excited at 488 nm with an argon ion laser. The intensity of the laser was attenuated to 10 % with neutral density filters, and the emitted light was detected through a band-pass filter (505-543 nm). The line scan mode was used to study Ca^{2+} responses elicited by single pulses at 0.2 Hz. The scanned line at a given Y position over a nerve terminal branch occurred at intervals of 2 ms, and 200 lines in total were acquired at every scan. An average of 5 scans of 200 lines were made for each NMJ recorded (n= 13 stimulated NMJs, 12 control NMJs; N= 6 frogs). When Ca^{2+} changes were monitored over longer periods of time, confocal images (256×256 pixels) were taken every 395 ms at the same focal plane. Presynaptic nerve terminals were monitored at rest and during prolonged motor nerve stimulation (40 Hz for 2 s and 30 s) (40 Hz, 2 s: n=27 stimulated NMJs, 27 control NMJs; N= 5 frogs; 40 Hz, 30 s: n= 44 stimulated NMJs, 32 control NMJs, N= 8 frogs).

Resting fluorescence (F_{rest}) was averaged from 30 images and mean pixel intensity was adjusted around 20. The fluorescence intensity (F) was averaged over all the branches of the nerve terminals since no differences were observed in the responses between branches of a given nerve terminal (data not shown). Relative changes in fluorescence intensities ($\% \Delta F/F$) were expressed as:

$$\% \Delta F/F = (F - F_{\text{rest}}) / F_{\text{rest}} \times 100$$

In some experiments, simultaneous intracellular recordings of EPPs were made with sharp glass microelectrodes (10-20 M Ω , filled with KCl 2 M). The signal was amplified 1000 times with Axoclamp 200B amplifier (Axon Instruments) and filtered at 2 kHz. EPPs were recorded with Clampex software.

2.1.2.3.11. STATISTICAL ANALYSIS

All results are expressed as the mean \pm SEM. Data obtained from NMJs of control and stimulated muscles were compared using a Student's *t* test, when distribution was normal, otherwise, a non-parametric Mann-Whitney Rank Sum Test was used.

2.1.2.4. RESULTS

2.1.2.4.1. CONDITIONNING

As illustrated in figure 1, frogs were harnessed with electrodes allowing precise stimulation of the pectoralis proprius nerve. Direct stimulation of the nerve in vivo was confirmed by injecting α -bungarotoxin under the skin, which blocked muscle contractions evoked with stimulation intensities used for the conditioning (ranging from 0.4 to 0.9 V). In the presence of α -bungarotoxin, muscle contractions were only elicited due to direct muscle fibre depolarisation with stimulations that were more than 3 times above the largest intensity used for nerve stimulation.

Frogs were not agitated during stimulation and behaved and fed normally. The procedure used for chronic nerve stimulation specifically affected the *c.p.* muscle and permitted the visualization of its contractions. Muscle contractions were observed at the beginning of each stimulation period, after which the muscle seemed to fatigue and the contractions became too weak to be visualized in freely moving animals. A five minute resting period was sufficient to allow the muscle to recover and contractions were still visible during the first minutes of the next stimulation period. This was the pattern observed throughout the conditioning period.

More importantly, after 5 to 7 days of stimulation, muscles were still intact, showing neither necrosis nor other damage. There was no obvious production of connective tissue, and thus no apparent proliferation of fibroblasts. Hence, our model appears appropriate for chronic nerve stimulation in freely moving frogs and has the advantage of not requiring repetitive doses of anaesthetic, unlike what was done previously (Hinz and Wernig, 1988).

2.1.2.4.2. EFFECTS OF STIMULATION ON TRANSMITTER RELEASE PROBABILITY

We first looked for changes in transmitter release probability to assess the efficacy of the stimulation to transform the typically phasic synapses of the *c.p.* muscle into a more tonic like-state. As previously shown, such transformation requires a decrease in the probability of release of chronically stimulated phasic synapses (Hinze and Wernig, 1988). Intracellular recordings of mEPPs and EPPs evoked by 0.2 Hz stimulation were performed on both stimulated and control muscles, in low Ca^{2+} /high Mg^{2+} Ringer (Figure 2A, B), and a 50.1% reduction of EPP amplitude in stimulated NMJs was observed ($P < 0.001$) (Figure 2C, Table 1).

To investigate the involvement of pre- or postsynaptic mechanisms in synaptic transformation, mEPP amplitude and frequency were analyzed as well as paired-pulse facilitation. Changes in the amplitude of spontaneous events would suggest postsynaptic mechanisms, whereas changes in their frequency and in paired-pulse facilitation would reflect presynaptic effects. While mEPP amplitude remained unaffected by chronic nerve stimulation ($P = 0.867$), mEPP frequency was reduced by 46.0% in stimulated NMJs ($P = 0.015$) (Figure 2D, Table 1). Paired-pulse facilitation, which is manifested as an increase in transmitter release evoked by a second presynaptic action potential that follows a previous action potential within few milliseconds, is inversely related to the initial release probability (Dobrunz and Stevens, 1997). Results showed a 46.9 % reduction of the amplitude of EPPs evoked by the second stimulus of a pair in stimulated NMJs ($P < 0.001$) (Figure 2E). The reduction of amplitude was less marked for the second EPP than for the first EPP of paired-pulse stimulation. Consequently, paired-pulse facilitation was increased by 26.5 % in stimulated synapses compared to control ($P = 0.032$) (Figure 2F, Table 1). Therefore, these results are consistent with a decrease in transmitter release probability and suggest the involvement of presynaptic mechanisms in synaptic transformation.

When expressed in terms of number of quanta released per impulse (see methods), synaptic output of stimulated NMJs was reduced by 49.5 % ($P = 0.001$). Quantal

release of the second EPP was also reduced by 45.4 % in stimulated NMJs ($P= 0.001$) and consequently, paired-pulse facilitation was still increased in these NMJs when calculated from quantal content values (stimulated: 63.6 ± 3.9 %; control: 52.4 ± 2.4 %; $P = 0.018$). These synaptic changes were consistently observed in all preparations tested, thus supporting the efficacy of our stimulation model at reducing transmitter release probability.

Although we always stimulated the left *c.p.*, control experiments showed no statistically significant differences between left and right muscles of unstimulated frogs (data not shown), and ruled out the possibility of naturally occurring differences.

Since quantal release and mEPP frequency at the frog neuromuscular junction are known to be proportional to nerve terminal size (Kuno et al., 1971), NMJs were measured following electrophysiological recordings by immunolabelling of postsynaptic nAChRs with α -bungarotoxin coupled to texas red (Figure 2G). No statistical difference in NMJ length between control and stimulated synapses was observed ($P = 0.420$) (Table 1).

To take into account the great variability in NMJ length, we corrected quantal release for NMJ length and compared both groups on the basis of their synaptic efficacy (see methods). An average reduction of 56.2 % and 52.3 % was found for synaptic efficacy of stimulated NMJs for the first and second EPPs respectively ($P<0.001$, $P=0.002$) (Figure 2H, Table 1). The weaker reduction in synaptic efficacy of the second EPP resulted from the greater facilitation found in stimulated synapses. When corrected for NMJ length, mEPP frequency was also reduced by 70.6% in stimulated nerve terminals ($P = 0.012$). Taken together these results show a reduction of transmitter release probability in chronically stimulated NMJs.

FIGURE 2. EFFECTS OF STIMULATION ON THE PROBABILITY OF TRANSMITTER RELEASE.

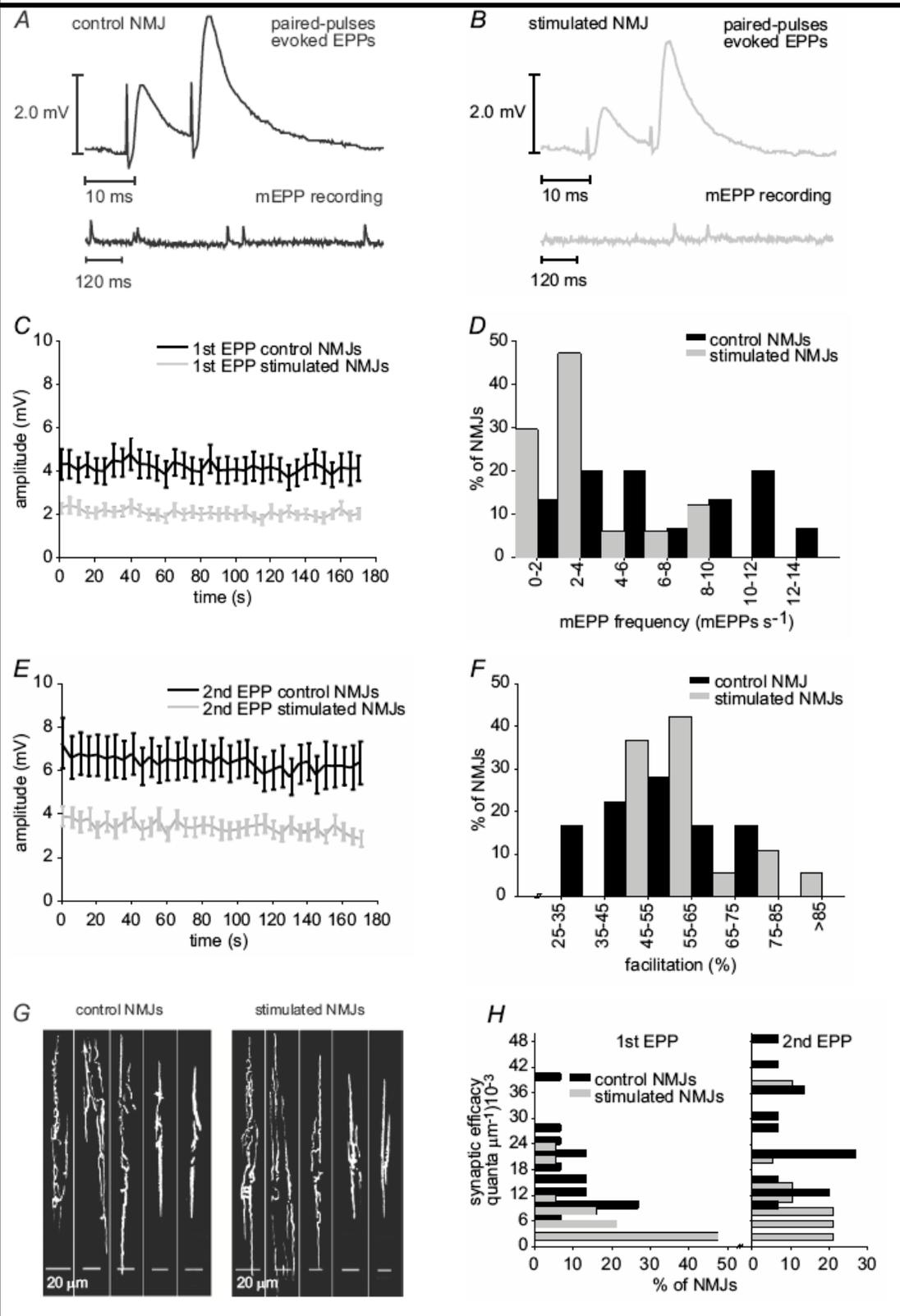


FIGURE 2. EFFECTS OF STIMULATION ON THE PROBABILITY OF TRANSMITTER RELEASE.

(A) Representative electrophysiological recordings of mEPPs (bottom) and EPPs evoked by paired-pulse stimulation (top) in control (B) and stimulated NMJs. (C) Mean amplitude of the first EPP evoked by paired-pulse stimulation in control (black) and stimulated (grey) NMJs. Mean amplitude of EPPs was reduced in stimulated NMJs ($P < 0.001$, Student's t-test; $N = 9$ frogs, $n = 26$ stimulated NMJs, 26 control NMJs). (D) Frequency histogram depicting the distribution of mEPP frequency in control (black) and stimulated (grey) NMJs. MEPP frequency of stimulated NMJs was shifted toward smaller values ($P = 0.015$, Student's t-test) ($N = 6$ frogs, $n = 19$ stimulated NMJs, 18 control NMJs). (E) Mean amplitude of the second EPP evoked by paired-pulse stimulation in control (black) and stimulated (grey) NMJs. Mean amplitude of EPPs was reduced in stimulated NMJs ($P < 0.001$, Student's t-test; $N = 9$ frogs, $n = 26$ stimulated NMJs, 26 control NMJs). (F) Frequency histogram depicting the distribution of paired-pulse facilitation in control (black) and stimulated (grey) NMJs. Paired-pulse facilitation of stimulated NMJs was shifted toward greater values ($P = 0.032$, Student's t-test; $N = 9$ frogs, $n = 26$ stimulated NMJs, 26 control NMJs). (G) Postsynaptic nicotinic AChRs labelled with α -bungarotoxin coupled to texas red, showing the configuration of nerve terminals in control and stimulated *c.p.* muscles. Both muscle groups had nerve terminal morphology ranging from complex, with many branches, to very simple. No significant differences were found in NMJ length between control and stimulated NMJs ($P = 0.420$; Student's t-test; $N = 10$ frogs, $n = 152$ stimulated NMJs, 123 control NMJs). (H) Frequency histogram depicting the distribution of synaptic efficacy (number of quanta of neurotransmitter/ μm of NMJ length) in control (black) and stimulated (grey) NMJs. Synaptic efficacy of stimulated NMJs was shifted toward smaller values for first ($P < 0.001$; Mann-Whitney Rank Sum Test) and second EPP ($P = 0.002$; Mann-Whitney Rank Sum Test; $N = 6$ frogs, $n = 19$ stimulated NMJs, 15 control NMJs).

Figure 2. Effects of stimulation on the probability of transmitter release

TABLE 1.**EFFECTS OF STIMULATION ON TRANSMITTER RELEASE PROBABILITY.**

	Control NMJs	Stimulated NMJs	$\alpha=0.05$
EPP ₁ amplitude (mV)	4.17 ± 0.22	2.08 ± 0.16	P<0.001*
EPP ₂ amplitude (mV)	6.41 ± 0.30	3.40 ± 0.27	P<0.001*
mEPP amplitude (mV)	0.47 ± 0.04	0.49 ± 0.06	P= 0.867
mEPP frequency (mEPPs/s)	6.3 ± 0.9	3.4 ± 0.6	P = 0.015*
Paired-pulse facilitation (%)	50.1 ± 3.2	63.4 ± 4.9	P = 0.032*
Quantal content EPP ₁ (quanta)	10.5 ± 1.1	5.3 ± 0.5	P=0.001*
Quantal content EPP ₂ (quanta)	15.4 ± 1.6	8.4 ± 0.8	P= 0.001*
NMJ length (μm)	677.79 ± 27.53	639.49 ± 36.38	P = 0.420
Synaptic efficacy EPP ₁ (quanta/μm)	16.2E-03 ± 2.3E-03	7.1E-03 ± 1.5E-03	P<0.001*
Synaptic efficacy EPP ₂ (quanta/μm)	24.1E-03 ± 3.4E-03	11.5E-03 ± 2.5E-03	P=0.002*
mEPP frequency (mEPP/s· μm)	8.5E-03 ± 1.9E-03	2.5E-03 ± 9.8E-03	P = 0.012*

Mean values and standard error for different electrophysiological parameters measured in control and chronically stimulated NMJs. * indicates significant P values.

Table 1. Effects of stimulation on transmitter release probability

2.1.2.4.3. EFFECTS OF STIMULATION ON SYNAPTIC DEPRESSION

Periods of elevated neuronal activity often lead to decreased neurotransmission due to depletion of the readily-releasable pool of vesicles (reviewed by (Zucker and Regehr, 2002). Generally, the larger the initial probability of release, the more pronounced the depression. Thus, tonic motor neurons display less depression than phasic motor neurons (Atwood, 1976), as do chronically stimulated synapses (Lnenicka and Atwood, 1985; Hinz and Wernig, 1988). We therefore expected similar changes in synaptic transmission in our model. To investigate this during tetanic nerve stimulation (40 Hz for 2 s), we recorded EPPs in partially curarized preparations (Figure 3A, B). Transmitter release of all control NMJs tested was facilitated at the beginning of the stimulation train. High frequency facilitation was defined as the ratio of the largest EPP of the 40 Hz train over the mean amplitude of EPPs recorded at 0.2 Hz. However, in 81.3% of NMJs from control muscles, synaptic transmission was depressed at the end of the high frequency stimulation.

All stimulated NMJs were also facilitated at the beginning of the stimulation train, but average high frequency facilitation was greater than control, with an increase of 88.9% (stimulated: 59.7 ± 4.9 %; control: 31.6 ± 4.3 %, $P < 0.001$) (Figure 3B, C). These results are consistent with paired-pulse facilitation obtained in low Ca^{2+} , high Mg^{2+} and suggest that this phenomenon is still present in normal Ca^{2+} conditions.

In contrast with control NMJs, only 51.9% of stimulated NMJs were depressed at the end of the stimulation train. The other 48.1% of stimulated NMJs showed a potentiated transmission after the 40 Hz train. When put together, these data reveal a 92.3% reduction in high frequency depression for stimulated muscles (stimulated: 2.3 ± 5.3 %; control: 29.1 ± 6.5 %, $P = 0.003$) (Figure 3B, D). These results suggest an increased resistance to synaptic depression in stimulated NMJs, providing further evidence of their transformation into a more tonic-like state.

FIGURE 3. EFFECTS OF STIMULATION ON SHORT-TERM PLASTICITY: HIGH FREQUENCY FACILITATION AND DEPRESSION.

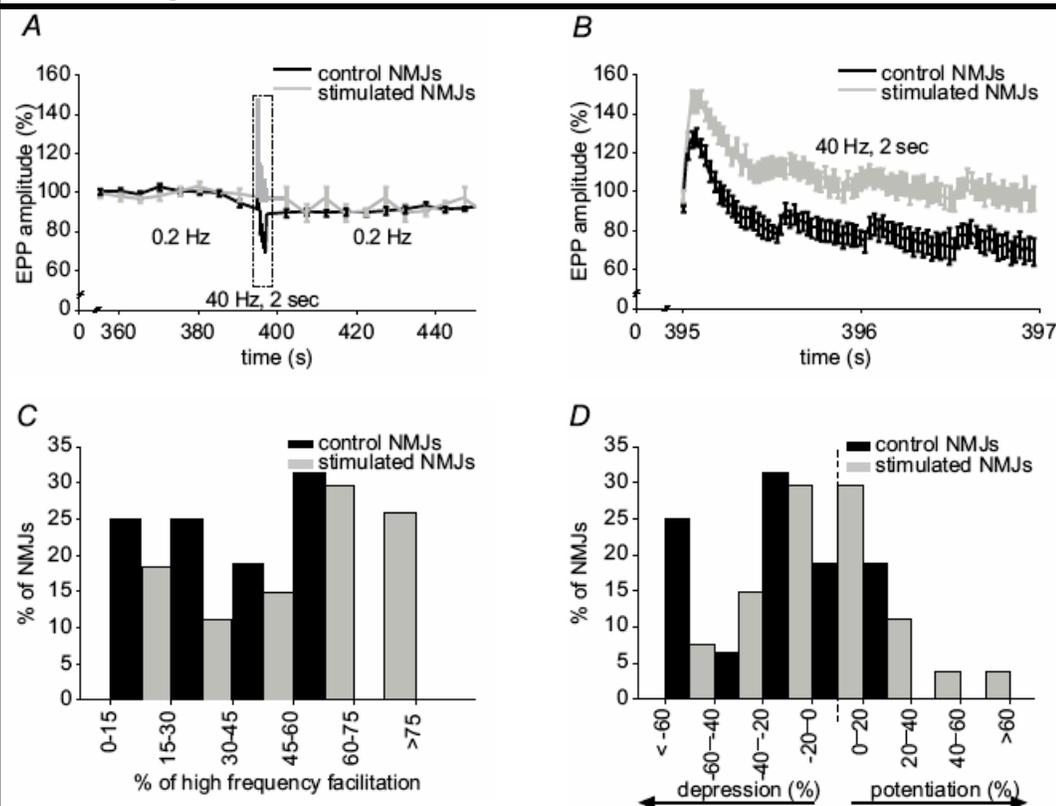


FIGURE 3. EFFECTS OF STIMULATION ON SHORT-TERM PLASTICITY: HIGH FREQUENCY FACILITATION AND DEPRESSION.

(A) Mean EPP amplitude before, during and after high frequency stimulation (40 Hz, 2 s) for control (black) and stimulated (grey) NMJs. Mean amplitude is normalized to the mean EPP amplitude during the initial 0.2 Hz control period. (B) Enlarged view of the 40 Hz, 2 s stimulation period. On average, stimulated NMJs presented a greater facilitation at the beginning of the stimulation train and less depression at the end. (C) Frequency histogram depicting the distribution of high frequency facilitation at the beginning of the 40 Hz, 2 second stimulation train in control (black) and stimulated (grey) NMJs. High frequency facilitation of stimulated NMJs was shifted toward greater values ($P < 0.001$, Student's *t*-test). (D) Frequency histogram depicting the distribution of depression/potentiality at the end of the 40 Hz, 2 second stimulation train in control (black) and stimulated (grey) NMJs. The distribution of stimulated NMJs is shifted toward potentiation ($P = 0.003$, Student's *t*-test; $N = 8$ frogs, $n = 27$ stimulated NMJs, 16 control NMJs).

Figure 3. Effects of stimulation on short-term plasticity : high frequency facilitation and depression

2.1.2.4.4. EFFECTS OF STIMULATION ON MITOCHONDRIA

Crayfish tonic neurons have a higher mitochondrial content and a greater oxidative activity than phasic neurons, and this is correlated with greater resistance to synaptic depression (Nguyen et al., 1997). In addition, chronic nerve stimulation was shown to increase the mitochondrial oxidative competence of crayfish NMJs (Nguyen and Atwood, 1994). We therefore expected a comparable increase in mitochondrial content and/or activity in our model following chronic nerve stimulation. To test this hypothesis, we used a mitochondrion-selective dye that is concentrated by active mitochondria. A greater accumulation of Mitotracker® Red CM-H2XRos (Molecular Probes) in mitochondria of stimulated NMJs would suggest a higher metabolic activity in these NMJs. Results showed that the average intensity of mitochondria staining was significantly higher in stimulated NMJs than in control (stimulated: 159.0 ± 8.3 pixels; control: 118.9 ± 6.8 pixels, $P < 0.001$) (Figure 4). Similar results were obtained when staining with MitoTracker® Green FM, a marker that reflects mitochondrial mass (data not shown). Hence, these results suggest either that mitochondrial content or oxidative activity of existing mitochondria is increased by chronic stimulation, resulting in an overall higher metabolic activity.

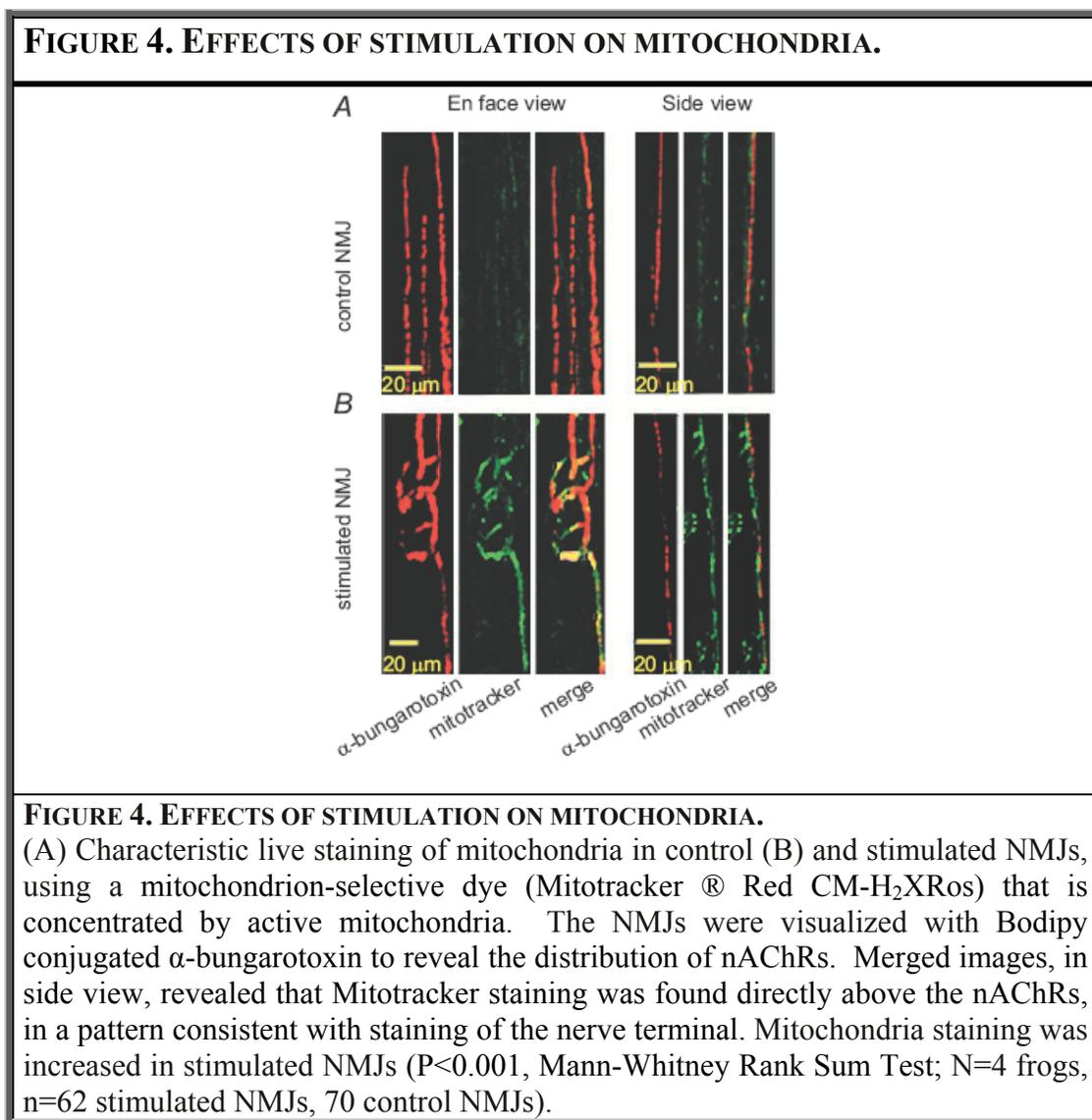


Figure 4. Effects of stimulation on mitochondria

2.1.2.4.5. EFFECTS OF STIMULATION ON PRESYNAPTIC CALCIUM HOMEOSTASIS

Transmitter release is known to be dependant on calcium (Dodge and Rahamimoff, 1967; Zucker and Lara-Estrella, 1983; Augustine and Charlton, 1986; Zucker, 1996). Therefore, we asked whether the differences seen in synaptic efficacy between control and stimulated synapses were due to changes in calcium homeostasis following chronic nerve stimulation. Because stimulated synapses presented a weaker synaptic efficacy, we hypothesized that these transformed synapses admitted less calcium following a nerve impulse.

To test this hypothesis, calcium imaging of presynaptic nerve terminals loaded with Ca^{2+} green dextran was performed at 0.2 Hz (pulse duration 0.1 ms) in curare-blocked preparations (Figure 5A). This allowed us to analyze Ca^{2+} entry induced by single action potentials. Surprisingly, as illustrated in Figure 5B, the amplitude of presynaptic calcium responses ($\% \Delta F/F$) of stimulated NMJs was significantly increased by 80.4 % compared to control NMJs (stimulated: $30.2 \pm 3.7 \%$; control: $16.7 \pm 1.8 \%$, $P=0.004$). This suggests that a larger amount of calcium enters the nerve terminal and/or is available for binding to Ca^{2+} green dextran following the arrival of an action potential. Moreover, since the slope of rise of calcium responses from stimulated NMJs was greater than control, with a 90.1% increase (stimulated: $1273.5 \pm 181.8 \%/s$; control: $669.9 \pm 135.0 \%/s$; $P=0.015$) while the rise time was not different from control, it appears that calcium entry and/or calcium binding to the dye was greater per unit of time in stimulated NMJs. Decay slope (100-20%) of stimulated NMJ calcium responses was also increased by 91.2% (stimulated: $-435.5 \pm 70.1 \%/s$; control, $-227.8 \pm 25.7 \%/s$, $P=0.047$) while decay time did not differ from control. Thus, it seems that calcium handling was modified by chronic nerve stimulation and that clearance of calcium and/or unbinding to the dye was greater per unit of time in stimulated NMJs. Total calcium available for binding to the indicator was measured by calculating the area under the curve of response. Stimulated NMJs showed a 116.7% increase in area under the curve (stimulated: $1.3 \pm 0.2 \%/s$; control: $0.6 \pm 0.1 \%/s$; $P=0.005$), indicating greater total calcium binding to the dye. These results are opposite to what was expected, suggesting that synaptic efficacy could be modified by some mechanisms downstream of calcium entry.

Because calcium signals were found to be greater in stimulated NMJs at 0.2 Hz, we presumed that, with high frequency stimulation, calcium accumulation would be greater in these NMJs, thus leading to a bigger calcium signal. A greater calcium accumulation in stimulated NMJs would in turn explain the greater high frequency facilitation at the beginning of the stimulation train. However, no statistically significant differences were found in presynaptic calcium responses of stimulated and control NMJs evoked by a 2 s, 40 Hz train. Calcium responses were similar

regarding their amplitude (stimulated: 132.3 ± 13.5 %; control: 116.8 ± 14.1 %, $P=0.430$), mean slope of rise (stimulated: 139.0 ± 26.6 %/s; control: 138.7 ± 31.3 %/s; $P=0.742$), decay slope 100-20% (stimulated: -82.9 ± 8.6 %/s; control: -76.5 ± 11.8 %/s; $P=0.667$) and area under the curve (stimulated: 312.7 ± 42.5 %·s; control: 215.5 ± 28.5 %·s; $P=0.063$) (Figure 5C). The analysis of these parameters suggests that the same amount of Ca^{2+} is available for binding to the calcium indicator during the stimulation paradigm in both control and stimulated NMJs.

To further investigate a potential difference in calcium homeostasis in stimulated NMJs, the duration of the 40 Hz stimulation was increased to 30 seconds. However, calcium responses of stimulated and control NMJs were still not significantly different from each other, regarding peak amplitude (stimulated: 130.0 ± 9.7 %; control: 209.4 ± 68.6 %, $P=0.581$), mean rise slope (stimulated: 92.5 ± 10.0 %/s; control: 157.2 ± 60.6 %/s; $P=0.756$), mean slope during plateau (stimulated: 0.5 ± 0.2 %/s; control: 0.7 ± 0.6 %/s; $P=0.559$), mean decay slope (stimulated: -82.3 ± 12.8 %/s; control: -99.5 ± 25.6 %/s; $P=0.699$) and area under the curve (stimulated: 3246.9 ± 258.1 %·s; control: 5172.6 ± 1686.8 %·s; $P=0.699$) (Figure 5D).

FIGURE 5. PRESYNAPTIC CALCIUM IMAGING

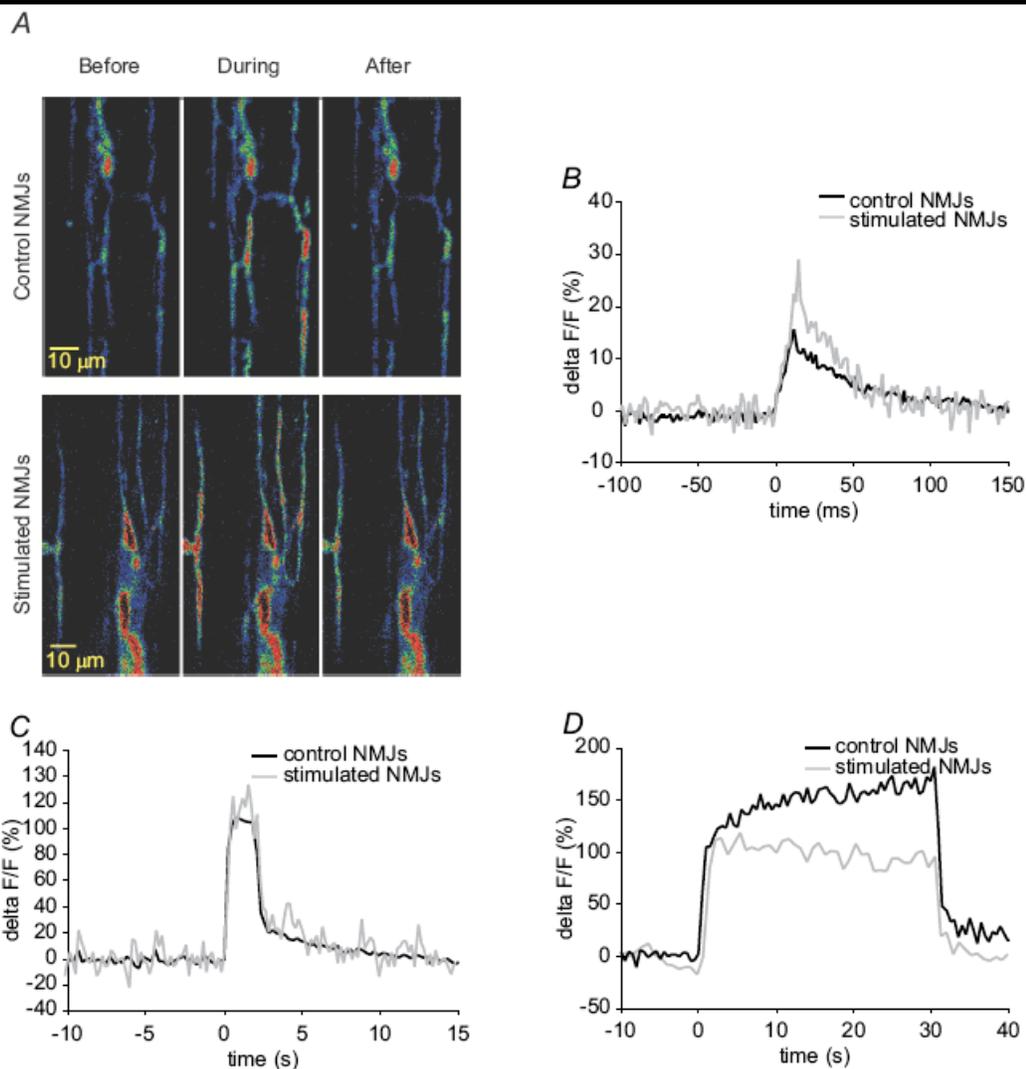


FIGURE 5. PRESYNAPTIC CALCIUM IMAGING.

(A) False colour confocal images of representative loading of control and stimulated NMJs with the calcium indicator Calcium green before, during and after stimulation where red represents high level of Ca^{2+} , blue represents low level. White dashed boxes surround regions of interest (in blue) where calcium variations were measured, each box surrounds one NMJ. White arrows indicate myelinated nerve

(B) Characteristic presynaptic calcium response evoked by a 0.2 Hz stimulation in a control (black) and a stimulated (grey) NMJs. Mean calcium response of stimulated NMJs differed from control regarding amplitude ($P=0.004$, Student's t-test), mean slope of rise ($P=0.015$, Student's t-test), 100-20% decay slope ($P=0.047$, Mann-Whitney Rank Sum Test) and area under the curve ($P=0.005$, Student's t-test). ($N=6$ frogs, $n=13$ stimulated NMJs, 12 control NMJs).

(C) Representative presynaptic calcium response evoked by a 40 Hz, 2 seconds stimulation in a control (black) and a stimulated (grey) NMJ of a single frog. Mean calcium responses of stimulated

NMJs were not statistically different from control in terms of amplitude ($P=0.430$, Student's t-test), mean slope of rise ($P=0.742$, Mann-Whitney Rank Sum Test), 100-20% decay slope ($P=0.667$, Student's t-test) and area under the curve ($P=0.063$, Student's t-test). (N=5 frogs, n=27 stimulated NMJs, 27 control NMJs). (D) Representative presynaptic calcium response evoked by a 40 Hz, 30 seconds stimulation in a control (black) and a stimulated (grey) NMJs. Mean calcium responses were not statistically different from control regarding amplitude ($P=0.581$, Mann-Whitney Rank Sum Test), mean slope of rise ($P=0.756$, Mann-Whitney Rank Sum Test), mean slope during plateau ($P=0.559$, Mann-Whitney Rank Sum Test), 100-20% decay slope ($P=0.699$, Mann-Whitney Rank Sum Test) and area under the curve ($P=0.699$, Mann-Whitney Rank Sum Test; N=8 frogs, n=44 stimulated NMJs, 32 control NMJs).

Figure 5. Presynaptic calcium imaging

Our chronic nerve stimulation paradigm was shown to induce synaptic changes in 100% of the stimulated muscles, as revealed by electrophysiological recordings. To ensure that the same stimulation-induced changes were occurring in imaged NMJs, a few experiments were performed where calcium imaging was paired with electrophysiological recordings. For example, in some cases similar Ca^{2+} responses were associated with EPPs of different amplitudes (Figure 6A). Similar results were found in paired experiments done with 40 Hz, 2 s (Figure 6 B) and 40 Hz, 30 s stimulations (Figure 6 C), where similar calcium signals were associated with greater high frequency facilitation and less depression in stimulated NMJs. The results support the previously observed lack of correlation between EPP amplitude and changes in presynaptic Ca^{2+} (Figure 5). These data suggest that, although triggered by calcium entry, the difference in the amount of transmitter released is not entirely determined by calcium entry and thus, other mechanisms are likely to be involved.

FIGURE 6. SIMULTANEOUS PRESYNAPTIC CALCIUM IMAGING AND RECORDING OF SYNAPTIC TRANSMISSION

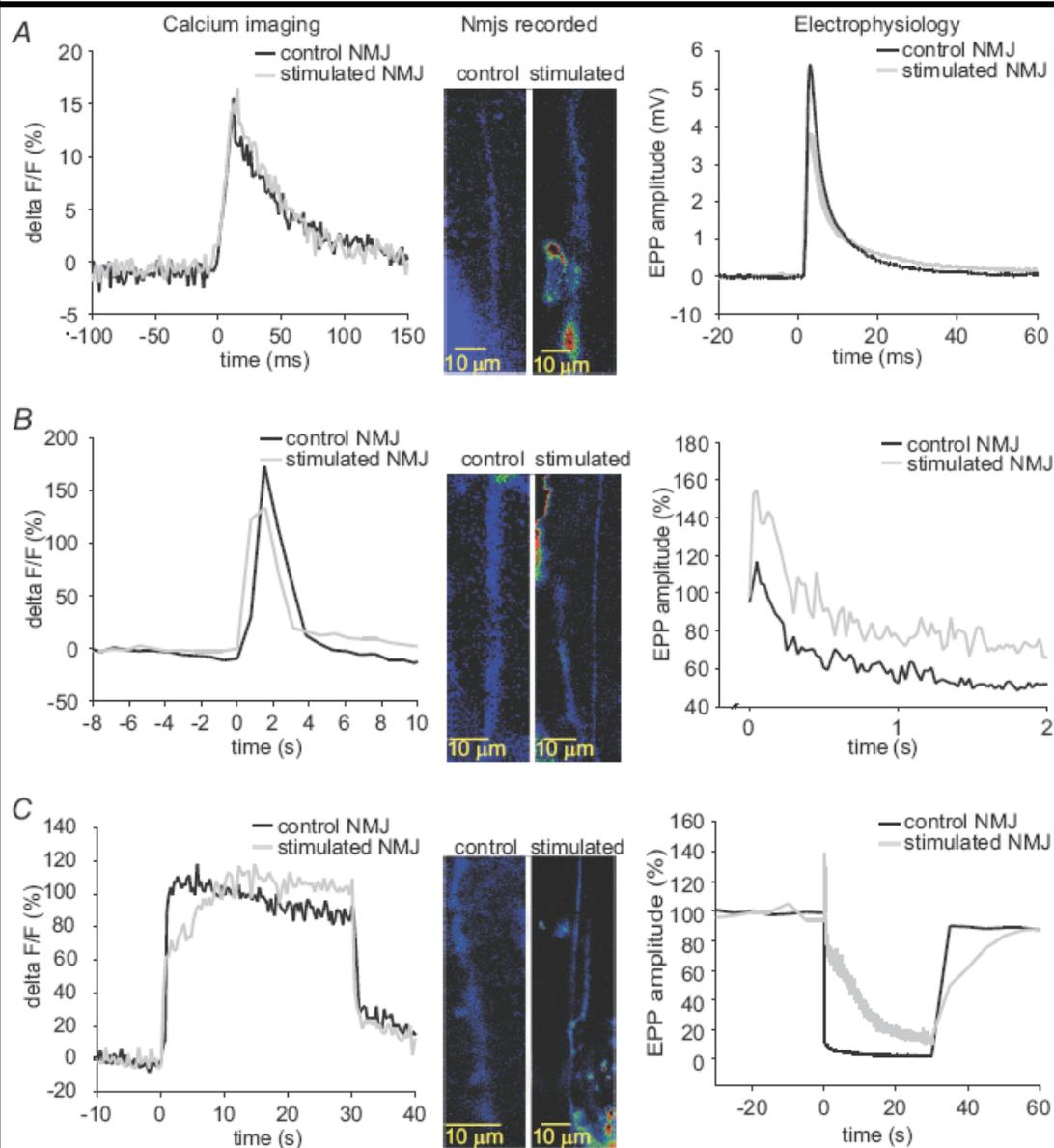


FIGURE 6. SIMULTANEOUS PRESYNAPTIC CALCIUM IMAGING AND RECORDING OF SYNAPTIC TRANSMISSION.

(A) Examples of simultaneous recordings of presynaptic calcium responses and EPPs evoked by 0.2 Hz (B) 40 Hz, 2 s and (C) 40 Hz, 30 s stimulation in control (black) and stimulated NMJs (grey). Differences in calcium responses cannot account for differences in electrophysiological properties.

Figure 6. Simultaneous presynaptic calcium imaging and recording of synaptic transmission

2.1.2.4.6. EFFECTS OF STIMULATION ON FREQUENIN EXPRESSION

Differential expression of regulatory proteins could be a mechanism by which synaptic output is modulated. For example, frequenin, a well-conserved Ca^{2+} -binding protein is known to enhance transmitter release in *Drosophila* and *Xenopus* nerve terminals (Pongs et al., 1993; Olafsson et al., 1995). Frequenin is also likely to play a role in synaptic transmission of the crayfish, since it is more prominently expressed in phasic nerve terminals compared to tonic (Jeromin et al., 1999).

First, we wondered whether differential expression of frequenin can be found in muscles with large differences in synaptic output. We performed a Western blot analysis on *sartorius* and *c.p.* muscles, with quantal content of *c.p.* NMJs being 3-4 times greater than that of the *sartorius* (Grinnell and Herrera, 1980), to compare their level of frequenin expression. Consistent with the data obtained from crayfish terminals (Jeromin et al., 1999), we found a greater amount of frequenin protein in *c.p.* muscles (Figure 7A).

Since chronic nerve stimulation reduces synaptic output, we looked for changes in frequenin expression at NMJs of stimulated *c.p.* muscles. Western blot analysis of band densities showed a decrease in frequenin expression in stimulated muscles of three frogs (frog 2, control: 38.39 intensity (INT)/ mm^2 , stimulated: 31.04 INT/ mm^2 ; frog 3, control: 156.90 INT/ mm^2 , stimulated: 102.02 INT/ mm^2 ; frog 6, control: 66.06 INT/ mm^2 , stimulated: 37.26 INT/ mm^2). However, two other frogs presented no clear difference between control and stimulated muscles (frog 1, control: 63.50 INT/ mm^2 , stimulated: 64.55 INT/ mm^2 ; frog 4, control: 37.31 INT/ mm^2 , stimulated: 37.03 INT/ mm^2) and one frog showed an increase of frequenin expression in the stimulated muscle (frog 5, control: 25.88 INT/ mm^2 , stimulated: 174.28 INT/ mm^2) (Figure 7B).

We then performed immunohistochemistry to specifically determine frequenin expression at the nerve terminal, where it is believed to exert its function. As shown in Figure 7C, frequenin staining was only observed at the NMJ and along axons. In three out of four frogs, a trend towards lower immunoreactivity to the anti-frequenin

antibody was observed in stimulated NMJs compared to control. However, for these three frogs the differences in signal to noise ratio were not statistically significant (frog 1: stimulated: 1.954 ± 0.170 , control: 2.361 ± 0.203 , $P=0.143$; frog 2: stimulated: 0.946 ± 0.0340 , control: 1.159 ± 0.112 , $P=0.088$; frog 3: stimulated: 1.829 ± 0.0641 , control: 1.961 ± 0.132 , $P=0.313$). Furthermore, one frog presented a greater anti-frequenin immunoreactivity in stimulated NMJs and this difference was statistically significant (stimulated: 1.436 ± 0.0643 , control: 1.033 ± 0.0760 , $P=<0.001$). Therefore, these results do not allow us to conclude that frequenin plays a major role in determining synaptic output in chronically stimulated NMJs.

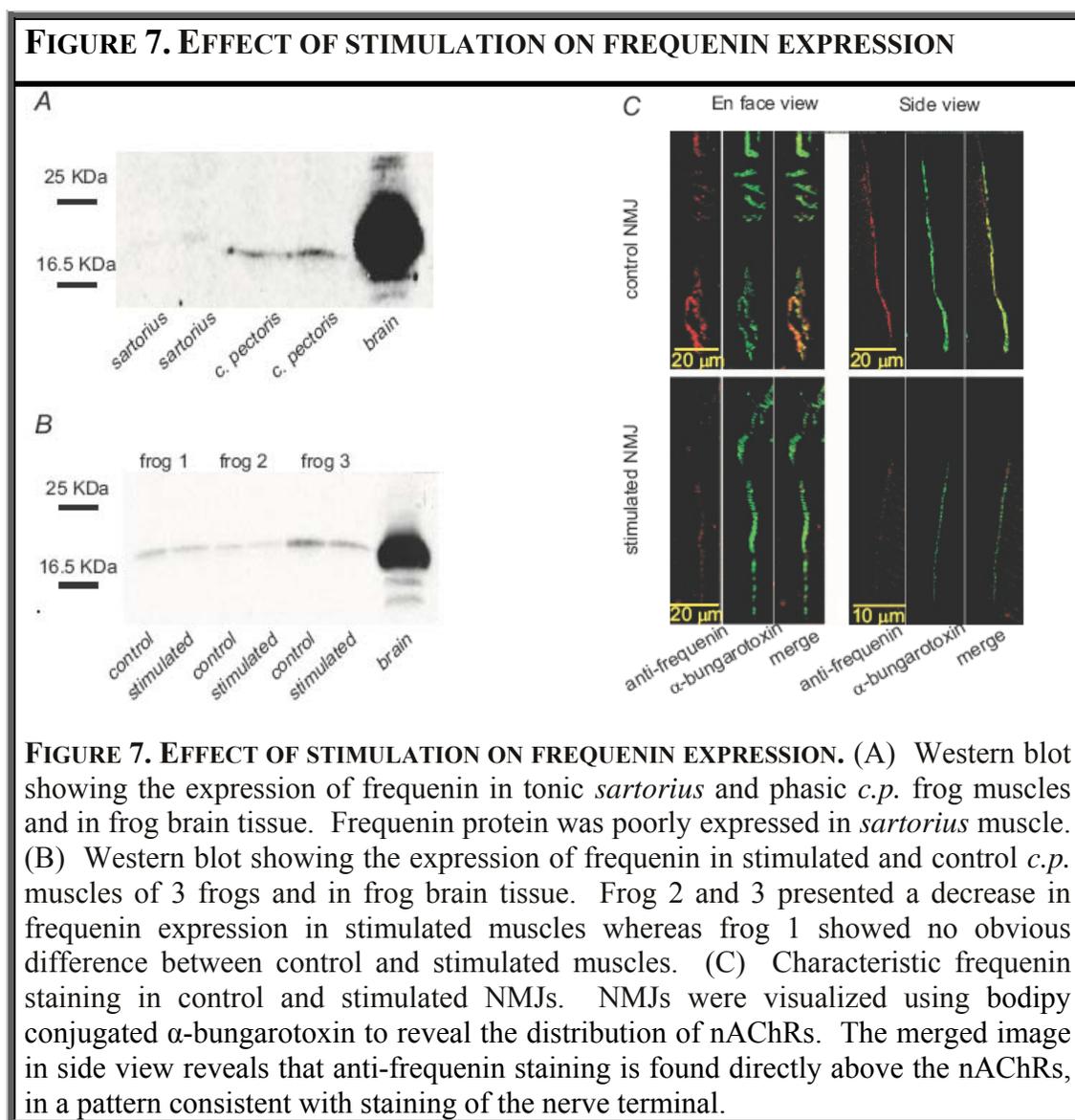


Figure 7. Effects of stimulation on frequenin expression

2.1.2.5. DISCUSSION

This work aimed at characterizing the modifications of synaptic properties, induced by chronic nerve stimulation and investigating potential mechanisms that might be involved in the determination of synaptic output.

2.1.2.5.1. MODIFICATION OF TRANSMITTER RELEASE AND PLASTICITY

Our data indicate that transmitter release probability is reduced by chronic nerve stimulation resulting in decreased synaptic efficacy and mEPP frequency. Short-term plasticity is also affected by chronic nerve stimulation as shown by the increased paired-pulse facilitation, greater high frequency facilitation and resistance to high frequency depression. Similar synaptic changes were reported in a previous study (Hinz and Wernig, 1988), thus supporting the efficacy of our model at transforming phasic NMJs into more tonic-like synapses.

These changes in short-term plasticity are consistent with the observed changes in transmitter release probability, such as the inverse relationship with paired-pulse facilitation and the direct relationship with depression (Dobrunz and Stevens, 1997). Recent evidence in rat suggests that the greater resistance of stimulated synapses to synaptic depression results from a modulation of the ratio of quantal content over vesicle pool size, which is decreased by chronic stimulation (Reid et al., 2003). Another possibility would be that an initial low rate of asynchronous release would lead to a less marked depression, since it was hypothesized that depression resulted from an increased rate of asynchronous release during high frequency stimulation, that would reduce the availability of releasable vesicles (Talbot et al., 2003).

Transmitter release probability was proposed to be determined by structural and ultrastructural features of NMJs, since tonic and phasic NMJs of many species differ highly on this basis. Furthermore, the transformation induced by chronic nerve stimulation has been correlated with these features (Lnenicka et al., 1986; Wojtowicz et al., 1994; Somasekhar et al., 1996). However, it was concluded at the crayfish

NMJ that structural or ultrastructural differences could not explain the large difference in synaptic output of tonic and phasic NMJs (King et al., 1996; Msghina et al., 1998; Msghina et al., 1999). Consistent with this, frog NMJs with large difference in synaptic output are similar in size and shape (Herrera et al., 1985) and these observations corroborate our finding that NMJ length is not altered by chronic nerve stimulation. However, synapses with a large synaptic output possess larger active zones (Herrera et al., 1985; Propst et al., 1986; Propst and Ko, 1987). Nevertheless, as in the crayfish, the correlation between active zone size of frog NMJs and probability of transmitter release may not be sufficient to fully account for the differences seen in phasic and tonic NMJs. Therefore, other mechanisms could be implicated in the determination of synaptic output.

2.1.2.5.2. MITOCHONDRIA

Mitochondria can influence transmitter release (reviewed in (Rizzuto, 2003) as illustrated by increased spontaneous release and quantal content following inhibition of mitochondrial calcium uptake (Alnaes and Rahamimoff, 1975; Zengel et al., 1994; David and Barrett, 2003). The reduction of mEPP frequency and EPP amplitude in our model could result from an increased calcium uptake by mitochondria since we found a greater staining of active mitochondria in stimulated NMJs, revealing a greater mitochondrial metabolism. Also, by limiting the increase in $[Ca^{2+}]_i$, mitochondrial Ca^{2+} uptake would keep a high ratio of phasic to asynchronous release and help sustain transmitter release during repetitive stimulation (Talbot et al., 2003).

An increased mitochondrial activity following chronic stimulation would be in line with studies of crayfish phasic and tonic muscles (Nguyen et al., 1997) and changes occurring during chronic stimulation (Lnenicka et al., 1986). Furthermore, energy demands are related to synaptic depression, where disruption of ATP synthesis accelerates synaptic depression in phasic NMJs of the crayfish and leads to an increased synaptic depression in tonic synapses and in chronically stimulated phasic NMJs (Nguyen and Atwood, 1994; Nguyen et al., 1997). Hence, the suggested

increase in mitochondrial activity in stimulated NMJs may be responsible for their increased resistance to synaptic depression.

2.1.2.5.3. CALCIUM ENTRY AND HOMEOSTASIS

We hypothesized that a reduction in calcium entry and/or homeostasis would result in a change in the probability of transmitter release, since there is a strong relationship between calcium entry and synaptic output (Zucker and Lara-Estrella, 1983; Augustine and Charlton, 1986; Zucker, 1996). In fact, both spontaneous transmitter release and phasic release of transmitter are dependent on Ca^{2+} concentration near release sites. While spontaneous release is proportional to the steady-state average intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ss}}$) (Mulkey and Zucker, 1993; Ravin et al., 1997; Angleson and Betz, 2001), evoked release is dependent on both $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ss}}$ and the changes in local Ca^{2+} concentrations at the release site (Ravin et al., 1999). Thus, a change in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ss}}$ following chronic nerve stimulation could account for the observed changes in mEPP frequency and EPP amplitude. Although the calcium imaging technique used in our study did not allow us to measure basal level of calcium in nerve terminals, stimulated NMJs appeared to consistently have less basal fluorescence than control NMJs, which could reflect a lower basal $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$.

Our results showed a difference between control and stimulated NMJs in the calcium response elicited by a single action potential evoked at 0.2 Hz stimulation. However, this difference was opposite to what was expected, the stimulated NMJ calcium response being larger in amplitude, with greater rising and decay slope. However, we found no significant differences between control and stimulated NMJ calcium response evoked with 40 Hz, 2 seconds and 30 seconds stimulation, while electrophysiological data differ significantly. Perhaps the calcium imaging was not sensitive enough to detect small changes in free calcium occurring in microdomains responsible for transmitter release, since calcium signals evoked at 40 Hz reflect the build up of calcium beyond these microdomains. However, the fact remains that the difference in transmitter release between control and stimulated NMJs may not be accounted for by differential calcium signalling. This is supported by results from

the crayfish NMJ showing that differences in synaptic output cannot be readily explained by a difference in calcium entry (Msghina et al., 1998; Msghina et al., 1999). Instead, new evidence suggests a difference in the Ca^{2+} -dependence of vesicle priming (Millar et al., 2005), which would involve a differential expression of regulatory proteins that binds calcium.

Calcium signals can be influenced by the number and affinity of endogenous buffers and Ca^{2+} -binding proteins regulating the availability of free calcium for binding to the calcium indicator. Considering this, the greater calcium response of stimulated NMJs evoked by a 0.2 Hz stimulation could result from a greater calcium entry or reflect a down-regulation of Ca^{2+} -binding proteins. The former hypothesis is unlikely since synapses with a small synaptic output possess smaller active zones and should have proportionally less calcium channels (Herrera et al., 1985; Propst et al., 1986).

Hence, a more likely explanation for the greater calcium response obtained at stimulated NMJs would be a decrease in Ca^{2+} buffering capacity. Indeed a down-regulation of buffer and regulatory calcium-binding proteins or a reduction of their affinity for Ca^{2+} could result in changes of amplitude and on and off rates of calcium signals due to less competition for free Ca^{2+} . The typical pattern of calcium signals observed in stimulated NMJs (increased rate of rise and decreased rate of decay) suggests a change in Ca^{2+} -binding protein expression following chronic nerve stimulation.

Another possibility may be that calcium signals could be modulated by increased calcium clearance by mitochondria. Indeed, mitochondrial Ca^{2+} uptake can be important for the clearance of small calcium loads in frog motor nerve terminal (Suzuki et al., 2002). Moreover, mitochondrial modulation of intracellular calcium was shown to be stronger with low frequency stimulation (Peng, 1998). Therefore, the greater rate of decay found in stimulated NMJ calcium responses could result from increased mitochondrial calcium clearance. This is consistent with results from

the crayfish where Ca^{2+} ionophore induces larger rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in phasic compared to tonic NMJs, while blockade of mitochondrial calcium clearance eliminates this difference. Also, chronically stimulated NMJs present a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase that is similar to tonic synapses (Fengler and Lnenicka, 2002).

2.1.2.5.4. BUFFER AND REGULATORY PROTEINS

Regulatory proteins and buffer proteins that bind calcium may be differentially expressed in stimulated and control NMJs. A potential candidate for that function could be the Ca^{2+} -binding protein frequenin. Frequenin is believed to modulate neurotransmitter release (Pongs et al., 1993; Olafsson et al., 1995) and is differentially expressed in tonic and phasic motoneurons of the crayfish (Jeromin et al., 1999). However, we found no statistically significant changes in frequenin immunoreactivity and protein levels in stimulated preparations. It is possible that our techniques were not sensitive enough or that functional changes occur rather than changes in expression.

Also, other regulatory proteins may be differentially expressed or may have different sensitivities in stimulated and control NMJs. For example, alpha and beta CaMKII were shown to be inversely regulated by activity in hippocampal neurons in culture. Over-expression of alphaCaMKII or beta CaMKII resulted in opposing effects on unitary synaptic strength and mEPSC frequency (Thiagarajan et al., 2002). As well, other Ca^{2+} sensors implicated in transmitter release, such as the Ca^{2+} -binding protein synaptotagmin I (Fernandez-Chacon et al., 2001), may be modulated by chronic stimulation, in a way that reduces their affinity for calcium.

2.1.2.6. CONCLUSION

This study presents a new *in vivo* model of chronic nerve stimulation that induces long-term synaptic changes in amphibian NMJs. It is an excellent model to study the mechanisms involved in the determination of vertebrate phasic and tonic NMJ properties, since large differences occur in synaptic output without correlated morphological changes. Our results suggest that some mechanisms downstream of

calcium entry are likely involved. Notably, mitochondrial metabolism and calcium buffering and clearance may be modulated following chronic nerve stimulation.

2.1.2.7. REFERENCE LIST

Alnaes E, Rahamimoff R (1975) On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. *J Physiol* 248:285-306.

Amzica F, Massimini M (2002) Glial and neuronal interactions during slow wave and paroxysmal activities in the neocortex. *Cereb Cortex* 12:1101-1113.

Angleson JK, Betz WJ (2001) Intraterminal Ca²⁺ and spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 85:287-294.

Aoki C, Pickel VM (1992) C-terminal tail of beta-adrenergic receptors: immunocytochemical localization within astrocytes and their relation to catecholaminergic neurons in N. tractus solitarii and area postrema. *Brain Res* 571:35-49.

Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6822-6829.

Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443-2450.

Arenander AT, de Vellis J (1982) Glial-released proteins in neural intercellular communication: molecular mapping, modulation, and influence on neuronal differentiation. *Prog Clin Biol Res* 79:243-269.

Atwood HL (1976) Organization and synaptic physiology of crustacean neuromuscular systems. *Prog Neurobiol* 7:291-391.

Augustine GJ, Charlton MP (1986) Calcium dependence of presynaptic calcium current and post-synaptic response at the squid giant synapse. *J Physiol* 381:619-640.

Bal A, Bachelot T, Savasta M, Manier M, Verna JM, Benabid AL, Feuerstein C (1994) Evidence for dopamine D2 receptor mRNA expression by striatal astrocytes in culture: in situ hybridization and polymerase chain reaction studies. *Brain Res Mol Brain Res* 23:204-212.

Banker GA (1980) Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* 209:809-810.

Banner LR, Herrera AA (1986) Differences in synaptic efficacy at neuromuscular junctions in frog twitch muscles. *J Physiol* 379:205-215.

Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40:648-677.

Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6:983-992.

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.

Corvalan V, Cole R, de Vellis J, Hagiwara S (1990) Neuronal modulation of calcium channel activity in cultured rat astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4345-4348.

D'Alonzo AJ, Grinnell AD (1985) Profiles of evoked release along the length of frog motor nerve terminals. *J Physiol* 359:235-258.

Danbolt NC (1994) The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog Neurobiol* 44:377-396.

Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429-440.

David G, Barrett EF (2003) Mitochondrial Ca²⁺ uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol* 548:425-438.

Deecher DC, Wilcox BD, Dave V, Rossman PA, Kimelberg HK (1993) Detection of 5-hydroxytryptamine₂ receptors by radioligand binding, northern blot analysis, and Ca²⁺ responses in rat primary astrocyte cultures. *J Neurosci Res* 35:246-256.

Dobrunz LE, Stevens CF (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18:995-1008.

Dodge FA, Jr., Rahamimoff R (1967) Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol* 193:419-432.

Dreyer F, Peper K, Akert K, Sandri C, Moor H (1973) Ultrastructure of the "active zone" in the frog neuromuscular junction. *Brain Res* 62:373-380.

Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729-743.

Fengler BT, Lnenicka GA (2002) Activity-dependent plasticity of calcium clearance from crayfish motor axons. *J Neurophysiol* 87:1625-1628.

Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Sudhof TC (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410:41-49.

Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:722-732.

Gerschenfeld HM, Wald F, Zadunaisky JA, De Robertis ED (1959) Function of astroglia in the water-ion metabolism of the central nervous system: an electron microscope study. *Neurology* 9:412-425.

Gilman AG, Schrier BK (1972) Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate in fetal rat brain cell cultures. I. Effect of catecholamines. *Mol Pharmacol* 8:410-416.

Grinnell AD, Herrera AA (1980) Physiological regulation of synaptic effectiveness at frog neuromuscular junctions. *J Physiol* 307:301-317.

Henn FA, Hamberger A (1971) Glial cell function: uptake of transmitter substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2686-2690.

Herrera AA, Grinnell AD, Wolowske B (1985) Ultrastructural correlates of naturally occurring differences in transmitter release efficacy in frog motor nerve terminals. *J Neurocytol* 14:193-202.

Hinz I, Wernig A (1988) Prolonged nerve stimulation causes changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 401:557-565.

Hof PR, Pascale E, Magistretti PJ (1988) K^+ at concentrations reached in the extracellular space during neuronal activity promotes a Ca^{2+} -dependent glycogen hydrolysis in mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 8:1922-1928.

Jensen AM, Chiu SY (1991) Differential intracellular calcium responses to glutamate in type 1 and type 2 cultured brain astrocytes. *J Neurosci* 11:1674-1684.

Jeromin A, Shayan AJ, Msghina M, Roder J, Atwood HL (1999) Crustacean frequenins: molecular cloning and differential localization at neuromuscular junctions. *J Neurobiol* 41:165-175.

Keyser DO, Pellmar TC (1994) Synaptic transmission in the hippocampus: critical role for glial cells. *Glia* 10:237-243.

King MJ, Atwood HL, Govind CK (1996) Structural features of crayfish phasic and tonic neuromuscular terminals. *J Comp Neurol* 372:618-626.

Ko CP (1984) Regeneration of the active zone at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 98:1685-1695.

Ko CP (1985) Formation of the active zone at developing neuromuscular junctions in larval and adult bullfrogs. *J Neurocytol* 14:487-512.

Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK (1966) Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:768-787.

Kuno M, Turkanis SA, Weakly JN (1971) Correlation between nerve terminal size and transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 213:545-556.

Lnenicka GA, Atwood HL (1985) Long-term facilitation and long-term adaptation at synapses of a crayfish phasic motoneuron. *J Neurobiol* 16:97-110.

Lnenicka GA, Zhao YG (1991) Seasonal differences in the physiology and morphology of crayfish motor terminals. *J Neurobiol* 22:561-569.

Lnenicka GA, Atwood HL, Marin L (1986) Morphological transformation of synaptic terminals of a phasic motoneuron by long-term tonic stimulation. *J Neurosci* 6:2252-2258.

Lopes-Cardozo M, Larsson OM, Schousboe A (1986) Acetoacetate and glucose as lipid precursors and energy substrates in primary cultures of astrocytes and neurons from mouse cerebral cortex. *J Neurochem* 46:773-778.

Martin DL (1992) Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5:81-94.

McCarthy KD, de Vellis J (1978) Alpha-adrenergic receptor modulation of beta-adrenergic, adenosine and prostaglandin E1 increased adenosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in primary cultures of glia. *J Cyclic Nucleotide Res* 4:15-26.

McCarthy KD, Salm AK (1991) Pharmacologically-distinct subsets of astroglia can be identified by their calcium response to neuroligands. *Neuroscience* 41:325-333.

Milani D, Facci L, Guidolin D, Leon A, Skaper SD (1989) Activation of polyphosphoinositide metabolism as a signal-transducing system coupled to excitatory amino acid receptors in astroglial cells. *Glia* 2:161-169.

- Millar AG, Zucker RS, Ellis-Davies GC, Charlton MP, Atwood HL (2005) Calcium sensitivity of neurotransmitter release differs at phasic and tonic synapses. *J Neurosci* 25:3113-3125.
- Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ (1996) Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17:203-215.
- Mitterauer B (1998) An interdisciplinary approach towards a theory of consciousness. *Biosystems* 45:99-121.
- Msghina M, Govind CK, Atwood HL (1998) Synaptic structure and transmitter release in crustacean phasic and tonic motor neurons. *J Neurosci* 18:1374-1382.
- Msghina M, Millar AG, Charlton MP, Govind CK, Atwood HL (1999) Calcium entry related to active zones and differences in transmitter release at phasic and tonic synapses. *J Neurosci* 19:8419-8434.
- Mulkey RM, Zucker RS (1993) Calcium released by photolysis of DM-nitrophen triggers transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol* 462:243-260.
- Muller T, Fritschy JM, Grosche J, Pratt GD, Mohler H, Kettenmann H (1994) Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABA_A receptor expression in Bergmann glial cells. *J Neurosci* 14:2503-2514.
- Mulligan SJ, MacVicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199.
- Narumi S, Kimelberg HK, Bourke RS (1978) Effects of norepinephrine on the morphology and some enzyme activities of primary monolayer cultures from rat brain. *J Neurochem* 31:1479-1490.
- Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.
- Newburgh RW, Rosenberg RN (1972) Effect of norepinephrine on glucose metabolism in glioblastoma and neuroblastoma cells in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1677-1680.
- Nguyen PV, Atwood HL (1994) Altered impulse activity modifies synaptic physiology and mitochondria in crayfish phasic motor neurons. *J Neurophysiol* 72:2944-2955.
- Nguyen PV, Marin L, Atwood HL (1997) Synaptic physiology and mitochondrial function in crayfish tonic and phasic motor neurons. *J Neurophysiol* 78:281-294.

Nudell BM, Grinnell AD (1982) Inverse relationship between transmitter release and terminal length in synapses on frog muscle fibers of uniform input resistance. *J Neurosci* 2:216-224.

Olafsson P, Wang T, Lu B (1995) Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca(2+)-binding protein frequenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8001-8005.

Oliet SH, Piet R, Poulain DA (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292:923-926.

Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:788-806.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.

Peng YY (1998) Effects of mitochondrion on calcium transients at intact presynaptic terminals depend on frequency of nerve firing. *J Neurophysiol* 80:186-195.

Poitry-Yamate CL, Poitry S, Tsacopoulos M (1995) Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci* 15:5179-5191.

Pongs O, Lindemeier J, Zhu XR, Theil T, Engelkamp D, Krah-Jentgens I, Lambrecht HG, Koch KW, Schwemer J, Rivosecchi R (1993) Frequenin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 11:15-28.

Porter JT, McCarthy KD (1995) GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in [Ca²⁺]_i. *Glia* 13:101-112.

Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16:5073-5081.

Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51:439-455.

Propst JW, Ko CP (1987) Correlations between active zone ultrastructure and synaptic function studied with freeze-fracture of physiologically identified neuromuscular junctions. *J Neurosci* 7:3654-3664.

Propst JW, Herrera AA, Ko CP (1986) A comparison of active zone structure in frog neuromuscular junctions from two fast muscles with different synaptic efficacy. *J Neurocytol* 15:525-534.

Pumplin DW, Reese TS, Llinas R (1981) Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7210-7213.

Rakic P (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J Comp Neurol* 141:283-312.

Ransom BR, Goldring S (1973) Slow hyperpolarization in cells presumed to be glia in cerebral cortex of cat. *J Neurophysiol* 36:879-892.

Ransom BR, Goldring S (1973) Slow depolarization in cells presumed to be glia in cerebral cortex of cat. *J Neurophysiol* 36:869-878.

Ravin R, Spira ME, Parnas H, Parnas I (1997) Simultaneous measurement of intracellular Ca^{2+} and asynchronous transmitter release from the same crayfish bouton. *J Physiol* 501 (Pt 2):251-262.

Ravin R, Parnas H, Spira ME, Volfovsky N, Parnas I (1999) Simultaneous measurement of evoked release and $[Ca^{2+}]_i$ in a crayfish release bouton reveals high affinity of release to Ca^{2+} . *J Neurophysiol* 81:634-642.

Reid B, Martinov VN, Nja A, Lomo T, Bewick GS (2003) Activity-dependent plasticity of transmitter release from nerve terminals in rat fast and slow muscles. *J Neurosci* 23:9340-9348.

Rizzuto R (2003) Calcium mobilization from mitochondria in synaptic transmitter release. *J Cell Biol* 163:441-443.

Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847-855.

Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S (1990) slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* 4:2169-2187.

Shao Y, McCarthy KD (1995) Receptor-mediated calcium signals in astroglia: multiple receptors, common stores and all-or-nothing responses. *Cell Calcium* 17:187-196.

Somasekhar T, Nordlander RH, Reiser PJ (1996) Alterations in neuromuscular junction morphology during fast-to-slow transformation of rabbit skeletal muscles. *J Neurocytol* 25:315-331.

Sontheimer H, Minturn JE, Black JA, Ransom BR, Waxman SG (1991) Two types of Na^{+} -currents in cultured rat optic nerve astrocytes: changes with time in culture and with age of culture derivation. *J Neurosci Res* 30:275-287.

Sorg O, Magistretti PJ (1991) Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain Res* 563:227-233.

Suzuki S, Osanai M, Mitsumoto N, Akita T, Narita K, Kijima H, Kuba K (2002) Ca(2+)-dependent Ca(2+) clearance via mitochondrial uptake and plasmalemmal extrusion in frog motor nerve terminals. *J Neurophysiol* 87:1816-1823.

Talbot JD, David G, Barrett EF (2003) Inhibition of mitochondrial Ca²⁺ uptake affects phasic release from motor terminals differently depending on external [Ca²⁺]. *J Neurophysiol* 90:491-502.

Thiagarajan TC, Piedras-Renteria ES, Tsien RW (2002) alpha- and betaCaMKII. Inverse regulation by neuronal activity and opposing effects on synaptic strength. *Neuron* 36:1103-1114.

Trussell LO, Grinnell AD (1985) The regulation of synaptic strength within motor units of the frog cutaneous pectoris muscle. *J Neurosci* 5:243-254.

Tsacopoulos M, Veuthey AL, Saravelos SG, Perrottet P, Tsoupras G (1994) Glial cells transform glucose to alanine, which fuels the neurons in the honeybee retina. *J Neurosci* 14:1339-1351.

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661.

van Calker D, Muller M, Hamprecht B (1980) Regulation by secretin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin of cyclic AMP accumulation in cultured brain cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6907-6911.

Van Der Zee EA, De Jong GI, Strosberg AD, Luiten PG (1993) Muscarinic acetylcholine receptor-expression in astrocytes in the cortex of young and aged rats. *Glia* 8:42-50.

Verkhratsky A, Steinhauser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32:380-412.

Walrond JP, Reese TS (1985) Structure of axon terminals and active zones at synapses on lizard twitch and tonic muscle fibers. *J Neurosci* 5:1118-1131.

Wernig A, Dorlochter M, Palazis P (1996) Differential sensitivity to Mg(2+)-and tubocurarine-block of frog neuromuscular junctions in summer and winter. *Neurosci Lett* 207:41-44.

Whitaker-Azmitia PM, Clarke C, Azmitia EC (1993) Localization of 5-HT_{1A} receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action. *Synapse* 14:201-205.

Wojtowicz JM, Marin L, Atwood HL (1994) Activity-induced changes in synaptic release sites at the crayfish neuromuscular junction. *J Neurosci* 14:3688-3703.

Zengel JE, Sosa MA, Poage RE, Mosier DR (1994) Role of intracellular Ca^{2+} in stimulation-induced increases in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Gen Physiol* 104:337-355.

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.

Zucker RS (1996) Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17:1049-1055.

Zucker RS (2003) NCS-1 stirs somnolent synapses. *Nat Neurosci* 6:1006-1008.

Zucker RS, Lara-Estrella LO (1983) Post-tetanic decay of evoked and spontaneous transmitter release and a residual-calcium model of synaptic facilitation at crayfish neuromuscular junctions. *J Gen Physiol* 81:355-372.

Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.

2.1.3. DISCUSSION DU PREMIER ARTICLE

Les objectifs de ce premier article étaient de trois ordres. D’abord, il s’agissait de développer un modèle de stimulation chronique *in vivo* chez la grenouille; puis de caractériser ce modèle en termes de changements d’efficacité présynaptique et de plasticité synaptique à court terme; et enfin de valider les mécanismes à l’origine de la détermination de l’efficacité présynaptique de façon dépendante de l’activité.

2.1.3.1. DÉVELOPPER UN MODÈLE DE STIMULATION CHRONIQUE IN VIVO CHEZ LA GRENOUILLE

La création d’un modèle de stimulation chronique *in vivo* chez la grenouille répondait au besoin de comparer des JNMs issues d’un même environnement, compte tenu des différences intrinsèques aux types musculaires, en regard notamment de la taille des fibres, de la grosseur des unités motrices ou de la fréquence de polyinnervation (Yao and Weakly, 1986). Le développement d’un tel modèle répondait également à la nécessité de limiter les effets potentiellement délétères de l’administration chronique d’anesthésique sur le muscle et la fonction synaptique (Herr et al., 1995). Le modèle décrit en détail dans l’article de la section 2.1.2 remplit bien ce mandat, en permettant la stimulation nerveuse chez l’animal éveillé et en mouvement. Ce modèle permet également une stimulation spécifique et sûre du nerf *pectoralis proprius*, qui préserve l’intégrité du muscle *c.p.*

2.1.3.2. CARACTÉRISER LE MODÈLE DE STIMULATION EN TERMES DE CHANGEMENTS D’EFFICACITÉ PRÉSYNAPTIQUE ET DE PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À COURT-TERME

Les changements induits par la stimulation nerveuse chronique à l’aide du modèle développé permettent également de valider ce dernier. En effet, nos résultats concernant la réduction de l’efficacité présynaptique, la facilitation augmentée et la plus grande résistance à la dépression des JNMs stimulées corroborent les changements rapportés dans la littérature (Lnenicka and Atwood, 1985; Hinz and Wernig, 1988; Cooper et al., 1998; Reid et al., 2003). De plus, les changements de

plasticité observés sont cohérents avec une efficacité présynaptique plus faible (Atwood, 1976; Nudell and Grinnell, 1982; Bradacs et al., 1997).

2.1.3.3. VALIDER LES MÉCANISMES À L'ORIGINE DE LA DÉTERMINATION DE L'EFFICACITÉ PRÉSYPNAPTIQUE DE FAÇON DÉPENDANTE DE L'ACTIVITÉ

Nos résultats démontrent différents changements induits par l'activité synaptique au niveau des mécanismes de gestion du Ca^{2+} . Cependant, ils réfutent l'hypothèse selon laquelle l'influx calcique ou la capacité de chélation du Ca^{2+} seraient à l'origine des changements d'efficacité présynaptique observés chez les JNMs stimulées chroniquement. Un mécanisme en aval de l'entrée et de la chélation du Ca^{2+} serait donc plus susceptible d'être impliqué. Celui-ci serait d'ailleurs cohérent avec le fait que, à signal calcique égal, les JNMs phasiques d'écrevisse libèreraient toujours plus de neurotransmetteurs que les JNMs toniques (Msghina et al., 1999). Nos résultats supportent toutefois l'augmentation de la clairance du Ca^{2+} dans les JNMs stimulées et favorisent une implication des mitochondries dans ce phénomène, via un métabolisme mitochondrial augmenté. Ces conclusions sont d'ailleurs cohérentes avec les différences dans le nombre et la fonction des mitochondries, observées entre les JNMs phasiques et les JNMs toniques ou les JNMs phasiques stimulées chroniquement (Fengler and Lnenicka, 2002) (Somasekhar et al., 1996) (Nguyen et al., 1997). De plus, le métabolisme mitochondrial augmenté supporte un rôle de ces organelles dans la résistance à la dépression (Bradacs et al., 1997; Nguyen et al., 1997; David and Barrett, 2003).

Malgré tout, nos résultats suggèrent que les différences d'efficacité présynaptique résident davantage dans la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil de libération vésiculaire, tel que conclut chez l'écrevisse (Msghina et al., 1999; Millar et al., 2005). Cependant, les changements d'expression de la frequenine ne joueraient pas un rôle prédominant dans la détermination de l'efficacité présynaptique chez la grenouille. Toutefois, nos résultats n'excluent pas les modifications de cette protéine ni l'implication d'autres senseurs de Ca^{2+} . D'ailleurs, le fait que les terminaisons

nerveuses appartenant à une même unité motrice affichent une grande variabilité de leur efficacité présynaptique (Grinnell and Trussell, 1983; Trussell and Grinnell, 1985) suggère que la détermination de celle-ci puisse être dépendante de la cible postsynaptique ou de facteurs environnementaux. De ce fait, des modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles des senseurs de Ca^{2+} impliqués dans la facilitation et l'amorçage de la fusion vésiculaire (Millar et al., 2005; Matveev et al., 2006) pourraient survenir de manière dépendante de l'activité dans les JNMs stimulées chroniquement et ainsi altérer leur efficacité présynaptique et leur plasticité.

2.1.4. CONCLUSION DU PREMIER ARTICLE

Bien que les mécanismes de gestion du Ca^{2+} puissent être altérés par la stimulation nerveuse chronique, l'efficacité présynaptique est plus susceptible d'être régulée au niveau de la sensibilité au Ca^{2+} des senseurs impliqués dans la libération de neurotransmetteurs. Ceux-ci restent cependant à identifier, mais leur régulation dépendante de l'activité pourrait résulter autant d'un changement d'expression que de modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles. Ces changements pourraient, par ailleurs, être dépendants de signaux rétrograde en provenance de la fibre musculaire ou même des CSPs. L'identification de ces changements et des signaux à leur origine permettra de mieux comprendre les interactions entre les éléments de la synapse tripartite qui contribuent au maintien d'un facteur de sécurité optimal.

2.2. DEUXIÈME ARTICLE

2.2.1. INTRODUCTION DU DEUXIÈME ARTICLE

Les facteurs pré et postsynaptiques impliqués dans la détermination du facteur de sécurité ont été largement étudiés et leur plasticité est aussi généralement acceptée. Ainsi, tel que décrit dans le chapitre premier, l'efficacité présynaptique sera facilitée, augmentée ou déprimée de façon dépendante de l'activité (Betz, 1970; Magleby and Zengel, 1976; Zengel and Magleby, 1982) ou par l'action de différents agonistes (Akasu, 1986; Redman and Silinsky, 1994; Van der Kloot et al., 1997; Giniatullin and Sokolova, 1998). Également, l'activité, la sensibilité et la densité de l'AChE, des nAChRs et des canaux Na^+ voltage-dépendants, de même que l'expression des protéines musculaires seront régulées par l'activité synaptique (Everett and Ernst, 2004; Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2005) (Magleby and Pallotta, 1981) (Milton and Behforouz, 1995; Cooper et al., 1998; Windisch et al., 1998; Bruneau et al., 2005; Donoghue et al., 2005). Cependant, la contribution des CSPs dans la détermination du facteur de sécurité ou dans son maintien a très peu été considérée. Or, à l'instar des astrocytes du SNC, ces cellules auraient la capacité de moduler l'efficacité présynaptique de façon bidirectionnelle (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001). De plus, les CSPs possèdent une grande variété de récepteurs pour différents neurotransmetteurs et neuromodulateurs, les rendant aptes à détecter l'activité synaptique. Qui plus est, ces récepteurs sont couplés à différentes cascades de signalisation intracellulaire, dont certaines entraînent une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire (Robitaille et al., 1997; Bourque and Robitaille, 1998; Georgiou et al., 1999; Rochon et al., 2001; Todd et al., 2007), propice à l'activation de différents phénomènes dépendants du Ca^{2+} , tels que la libération de gliotransmetteurs, l'activation de certaines protéines ou la transcription de gènes. De ce fait, les propriétés gliales sont susceptibles d'être modifiées par l'activité synaptique. Une modification morphologique et d'expression génique a d'ailleurs été démontrée en réponse à une baisse d'activité synaptique (Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995; Ulenkate et al., 1996; Georgiou et al., 1999; O'Malley et al., 1999). Une différence au niveau de la signalisation calcique gliale est également envisageable suivant une modification chronique de l'activité synaptique, dans

l'optique où cette signalisation contribue au maintien d'une efficacité présynaptique et d'un facteur de sécurité adaptés aux besoins de la JNM.

L'un des objectifs de cette thèse est donc de caractériser les propriétés gliales dans les JNMs soumises à un changement chronique de l'activité synaptique. Pour ce faire, deux modèles *in vivo* ont été développés chez la grenouille. Dans le premier, l'activité synaptique a été réduite par le blocage chronique des nAChRs du muscle *c.p.*, à l'aide de l' α -bungarotoxine. Dans le deuxième, l'activité synaptique a été augmentée par la stimulation chronique du nerf innervant le muscle *c.p.*. Des traitements similaires ont démontré leur efficacité à induire différents changements au niveau des déterminants pré- et postsynaptiques du facteur de sécurité. Ils altéreraient d'ailleurs l'efficacité présynaptique et la plasticité à court-terme de façon opposée (Lnenicka and Atwood, 1985; Hinz and Wernig, 1988; Plomp et al., 1992; Reid et al., 2003). L'activité gliale, en termes de réponse calcique induite par la stimulation nerveuse ou l'application locale d'agonistes, a donc été caractérisée dans ces conditions.

Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans un article, dont le texte intégral est l'objet de la prochaine section et dont la référence complète est la suivante :

- Bélaïr EL., Vallée J. and Robitaille R. Long-term *in vivo* synaptic plasticity of glial cells. Mis en forme pour une soumission à J Neurosci. (2008).
 - La contribution de l'étudiante à ce travail : Eve-Lyne Bélaïr a développé le modèle de stimulation *in vivo*, a effectué les expériences d'électrophysiologie et d'imagerie, leurs analyses, l'interprétation des données obtenues et la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr Richard Robitaille.
 - La contribution de Joanne Vallée à ce travail : Joanne Vallée a développé le modèle de blocage chronique des nAChRs, a effectué et analysé les expériences d'imagerie calcique gliale avec ce modèle.

2.2.2. TEXTE INTÉGRAL DU DEUXIÈME ARTICLE

LONG –TERM *IN VIVO* SYNAPTIC PLASTICITY OF GLIAL CELLS

Eve-Lyne Bélair, Joanne Vallée and Richard Robitaille

Département de physiologie
Groupe de recherche FRSQ sur le système nerveux central
Université de Montréal
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec
CANADA H3C 3J7.

Corresponding author:

Dr. Richard Robitaille
Département de physiologie, Faculté de médecine,
Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville,
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7
E-mail: richard.robaille@umontreal.ca

Journal section: Development/Plasticity/Repair

Abbreviated title: Plasticity of glial cells

Number of figures: 6

Contents of supplemental material: 4 tables

Number of pages: 27

Number of words: Abstract: 248, Introduction: max 493, Discussion: 1575

Key words: electrical stimulation, α -bungarotoxin blockade, perisynaptic Schwann cell, calcium response, neuromuscular junction, synaptic plasticity

2.2.2.1. SUMMARY

Evidence showing the ability of glial cells to detect and respond to synaptic transmission and to modulate synaptic activity and plasticity, has contributed to the notion of glial cells as active synaptic partners. However, plasticity of glia themselves has rarely been investigated. Here we used the amphibian NMJ to study plasticity of perisynaptic Schwann cells (PSC) following long-term modifications of synaptic activity. We worked with two *in vivo* models that oppositely altered synaptic activity. Chronic blockade of postsynaptic nicotinic receptors using α -bungarotoxin (α -btx) decreased facilitation, increased synaptic depression and decreased PTP. On the other hand, chronic nerve stimulation increased facilitation and resistance to synaptic depression, while leaving PTP unaltered. Our results do not support a direct relationship between transmitter release and PSC calcium responses. In fact, despite a reduced amount of transmitter released in stimulated NMJs, nerve-evoked PSC calcium responses were similar to control. Similarly, PSC calcium responses in α -btx treated NMJs were delayed and smaller in amplitude, even though transmitter release was increased. Also, when isolating purinergic and muscarinic components of PSC calcium responses, we found an increased sensitivity to ATP and a decreased sensitivity to muscarine in stimulated NMJs. Conversely, in α -btx treated NMJs, PSC sensitivity remained unaffected, but ATP and muscarine-induced calcium responses were prolonged. Thus, our results reveal complex adaptations of PSC properties, with differential modulation of signalling pathways that might underlie receptor regulation or changes in Ca^{2+} handling. Thus, similar to neurons, perisynaptic glial cells undergo plastic changes induced by synaptic activity.

2.2.2.2. INTRODUCTION

There is now a growing body of evidence indicating that glial cells play an active role in synaptic communication throughout the nervous system. They are indeed involved in the regulation of synaptic transmission and plasticity (reviewed by (Auld and Robitaille, 2003)), which is believed to be the functional basis of learning and memory. Hence, glial cells are full participants at synapses and contribute actively to neuronal processing and integration.

Complementary to their active role in regulating synaptic plasticity, glial cells themselves exhibit activity-dependent changes in their properties during development (Pasti et al., 1997). However, there is no direct evidence that glial cell adaptations are specific to the level of synaptic activity and can occur in mature systems. Such adaptation, concomitant with pre and postsynaptic plasticity, would be essential to maintain appropriate communication between all components of the tripartite synapse. Hence, the goal of this work was to test whether the properties and activation of perisynaptic glial cells adapt differentially to opposite changes in synaptic activity.

To achieve this goal we used the neuromuscular junction (NMJ), a simple model to study synapse-glia interactions. Glial cells at this synapse, perisynaptic Schwann cells (PSCs), are known to modulate synaptic transmission and plasticity by increasing or decreasing transmitter release (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001). Moreover, pre and postsynaptic properties are dependent on the level of synaptic activity and can be modified by either a decrease or an increase in activity. For instance, lowering nerve-muscle communication increased quantal content following long-term presynaptic blockade of transmitter release (Snider and Harris, 1979; Tsujimoto et al., 1990) or chronic blockade of postsynaptic nicotinic receptors (nAChRs) with α -bungarotoxin (Plomp *et al.*, 1992). Also sprouting of nerve terminals and PSC processes has been observed when synaptic activity was lowered (Snider and Harris, 1979; Wernig et al., 1980; Wines and Letinsky, 1988; Diaz et al., 1989; Diaz and Pecot-Dechavassine, 1989; Tsujimoto et al., 1990). On

the other hand, phasic nerve terminals adapt to higher patterns of neuronal activity by decreasing their synaptic efficacy and increasing their resistance to synaptic depression (Lnenicka and Zhao, 1991; Wernig et al., 1996) (Lnenicka and Atwood, 1985; Hinz and Wernig, 1988; Mercier et al., 1992; Somasekhar et al., 1996; Cooper et al., 1998; Reid et al., 2003; Belair et al., 2005). Changes in protein expression and morphological transformations have also been reported (Lnenicka *et al.*, 1986; Somasekhar *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1998). Thus, both presynaptic and postsynaptic as well as some morphological changes of PSCs were observed in response to alterations of synaptic activity.

Here we tested PSCs for adaptations of their calcium signaling following long-term *in vivo* decrease or increase in synaptic activity, using chronic blockade of nAChRs with α -bungarotoxin and prolonged nerve stimulation respectively. Our data reveal that PSCs undergo bidirectional plasticity involving a fine tuning of calcium response properties within specific subset of PSCs. These results suggest that PSC adapt to the synapse they are associated with and may adjust their feedback accordingly.

2.2.2.3. METHODS

All experimental procedures and protocols were approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux of the Université de Montréal in accordance with the Canadian Council on Animal Care policy.

2.2.2.3.1. ANIMALS

Experiments were performed on *Rana pipiens* frogs (body length 6-9 cm; Connecticut Valley Biological Supply). During chronic treatments, frogs were housed individually in aqua-terrarium supplied with fresh running water, and fed with meal worms.

2.2.2.3.2. CHRONIC IN VIVO NERVE STIMULATION

Animals were prepared as previously described (Belair et al., 2005). Briefly, frogs were harnessed with two electrodes made with teflon coated wires (platinum 90% /

iridium 10%) (Medwire Corporation, Mount Vernon, NY) and polyethylene tubing (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Electrodes were fixed over the skin, ventrally and dorsally, parallel to each other, one at the shoulders level, the other at the caudal-lateral region of the *cutaneus pectoris* (*c.p.*) muscle. Stimulation of the nerve supplying the left *c.p.* was performed trans-cutaneously through a small uncoated portion of the wires, placed on either side of the nerve. Specific contractions of the left *c.p.* could be visually assessed during stimulation. The right unstimulated *c.p.* served as control. Stimulation protocol alternated 15 minute trains of stimuli (0.5 ms duration, 0.4-0.9 V amplitude) delivered at 10 Hz with 5 minute rest periods, during 7 days. Animals were anaesthetized using MS-222 (Sigma, Oakville, ON) and killed by double pithing, at the end of the conditioning period.

2.2.2.3.3. CHRONIC IN VIVO α -BUNGAROTOXIN BLOCKADE OF NACHRS

Animals were anaesthetized with MS-222 (0.28 mg/g of body weight; Sigma, Oakville, ON) injected subcutaneously. Skin incision was made, approximately 1 cm long, perpendicular to the medial line, 2 cm below the sternum. Two pieces of chromatography paper (0.5 cm \times 0.5 cm), soaked with 40 μ l of α -bungarotoxin solution (260 nM; Invitrogen, Burlington, ON) or normal Ringer solution (sham animals), were inserted between the skin and muscles and were left over the two *c.p.* muscles for 30 minutes, allowing a complete blockade of muscle contractions. Papers were then removed and skin stitched up. A second blockade was performed on day 3 or 4, using the same procedure. On day 6 or 7, animals were anaesthetized using MS-222 (Sigma, Oakville, ON) and killed by double pithing.

2.2.2.3.4. ELECTROPHYSIOLOGY

Experiments were performed on NMJs of *c.p.* nerve-muscle preparations, pinned down on a Sylgard-coated recording chamber equipped with a suction electrode that delivered supra-threshold stimuli to the motor nerve. Except for chronically blocked preparations, muscles were incubated with α -bungarotoxin solution (65 nM; Invitrogen, Burlington, ON) until contractions were abolished. Nerve-muscle preparations were then perfused with normal physiological solution (mM: 120 NaCl;

2.0 KCl; 1.0 NaHCO₃; 1.8 CaCl₂; 5.0 Hepes). Intracellular recordings of endplate potentials (EPPs) were performed using sharp glass microelectrodes (10-20 MΩ, filled with KCl, 2 M) and a Neuroprobe amplifier (A-M systems, Carlsborg, WA). Signals were further amplified a 1000 times with a Warner Instruments DC amplifier and filtered at 2 kHz. EPPs were recorded with Winwcp software (John Dempster, University of Strathclyde).

To study the effects of chronic treatments on high frequency-induced plasticity, the motor nerve was stimulated at 40 Hz during 30 s, between two periods of 0.2 Hz stimulation (square pulses of 0.1 ms duration).

High frequency facilitation, high frequency depression and post-tetanic potentiation (PTP) were calculated relatively to the mean EPP amplitude during the 0.2 Hz control period. High frequency facilitation refers to the largest EPP amplitude recorded at the beginning of the 40 Hz train; high frequency depression refers to the mean amplitude of the last 5 EPPs of the train; and PTP refers to the mean amplitude of 5 EPPs surrounding the peak EPP, after the 40 Hz train.

2.2.2.3.5. CALCIUM IMAGING OF PSCs

C.p. muscles with their *pectoralis proprius* motor nerve were removed and pinned down on a Sylgard-coated recording chamber. Fluo-4 AM (10 μM; Invitrogen, Burlington, ON), a membrane-permeant form of calcium indicator was dissolved in normal Ringer containing 0.02 % pluronic acid, and 1% dimethyl sulfoxide (Sigma, Oakville, ON). The preparation was incubated in this solution, in the dark, for 90 min, at room temperature. Muscle contractions were blocked with normal Ringer containing α-bungarotoxin (15 μg/ml; Invitrogen, Burlington, ON). After complete blockade, preparations were perfused with normal Ringer containing *N,N,N_i,N_i*-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN, 20 μM; Invitrogen, Burlington, ON) with 0.01% EtOH, 20 minutes prior to calcium imaging and during the whole experiment to chelate heavy metals that can affect fluo-4 responses.

PSCs were activated either by transmitter release following motor nerve stimulation or by local application of agonists. Motor nerve was stimulated using a suction electrode that delivered supra-threshold stimulus (square pulses of 0.1 ms duration, 40 Hz, 30 s). For local application of agonists (ATP (10 or 20 μ M) or muscarine (10 or 75 μ M); Sigma, Oakville, ON), a glass pipette with an internal diameter of less than 1 μ m was placed in close vicinity of PSC cell body, and pulses of gas pressure (10-20 psi, 100 ms; Picospritzer II, Parker Instrumentation, Cleveland, OH) were applied to deliver the drug. The agonist solutions were prepared with the same solution used for bath perfusion.

Fluo-4 was excited at 488 nm with an argon ion laser and Ca^{2+} imaging of PSCs was performed using a confocal microscope (Zeiss, LSM 510, Toronto, ON or Biorad MRC600, Hercules, CA). Laser intensity was attenuated with neutral density filters, and the emitted light was detected through a band-pass filter (505-543 nm). Confocal images of PSCs were taken repeatedly at the same focal plane, at rest, during and after motor nerve stimulation or local application of neurotransmitters. Resting fluorescence (F_{rest}) was averaged from 20 images and mean pixel intensity was adjusted around 20. The fluorescence intensity (F) was averaged over PSC cell body. Relative changes in fluorescence intensities ($\% \Delta F/F$) were expressed as:

$$\% \Delta F/F = (F - F_{\text{rest}}) / F_{\text{rest}} \times 100$$

2.2.2.3.6. STATISTICAL ANALYSIS

Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean. Data obtained from NMJs of treated muscles and their respective control were compared using a Student's t test, $\alpha=0.05$. Distributions of PSC sensitivities to neurotransmitters were compared using a Chi-square test. Due to the use of different experimental conditions (setups and drug concentrations) for the two treatments, comparisons were only made between treated muscles and their respective control.

2.2.2.4. RESULTS

We monitored intracellular Ca^{2+} dynamics in PSCs and used changes in calcium response properties as an indicator of PSC plasticity following changes in synaptic activity.

2.2.2.4.1. IN VIVO CONDITIONING

Frogs were not agitated, behaved and fed normally during chronic in vivo stimulation and following postsynaptic receptor blockade. The procedures specifically affected the *c.p.* muscle such that chronic nerve stimulation allowed the visualization of its contractions throughout the conditioning period (Belair et al., 2005) while α -bungarotoxin blockade of nAChRs prevented its contractions specifically, leaving surrounding muscles unaffected. Importantly, after 7 days of either treatment, muscles were still intact, showing no obvious signs of necrosis or other damage. Muscles presenting signs of inflammation were automatically discarded.

2.2.2.4.2. EFFECTS OF TREATMENTS ON SHORT-TERM PLASTICITY

Considering the direct relationship between the level of transmitter release and PSC activation, we first characterized neurotransmission in chronically treated NMJs by recording EPPs before, during and after a 40 Hz, 30 s stimulation (bungarotoxin: n=8 NMJs, N=6 frogs; sham: n=9 NMJs, N=6 frogs; stimulated: n=10 NMJs, control: n=7 NMJs, N=10 frogs). Such sustained synaptic activity results in a number of plasticity events occurring with different time courses (Zucker and Regehr, 2002). Facilitation is generally observed first and is followed by a period of synaptic depression that recovers at the end of the tetanus and even potentiates after longer trains (the so-called post-tetanic potentiation (PTP)(Kamiya and Zucker, 1994). The extent of these changes in transmitter release is normally correlated with the basal quantal content of the NMJ (Nudell and Grinnell, 1982; Pawson and Grinnell, 1990).

Consistent with an increase in synaptic efficacy, high frequency facilitation was decreased in α -bungarotoxin treated NMJs compared to sham (bungarotoxin: 26.9 ± 5.0 %; sham: 57.9 ± 12.3 %, $P = 0.042$), while synaptic depression was more

pronounced (bungarotoxin: 85.2 ± 1.8 %; sham: 71.5 ± 3.8 %, $P = 0.008$). On the other hand, PTP was reduced, (bungarotoxin: 43.5 ± 3.6 %; sham: 65.3 ± 9.1 %, $P = 0.049$) and EPP amplitude returned to basal level within seven minutes, whereas sham NMJs were still potentiated at this time ($t = 455$ s) (bungarotoxin: 5.0 ± 4.4 %; sham: 24.6 ± 5.8 %, $P = 0.019$) (Fig 1A, C).

Conversely, high frequency facilitation was increased in stimulated NMJs compared to control (stimulated: 52.3 ± 7.8 %; control: 28.0 ± 3.7 %, $P = 0.028$) and high frequency depression was less pronounced (stimulated: 68.9 ± 3.8 %; control: 80.9 ± 1.8 %, $P = 0.026$), consistent with a decrease in synaptic efficacy. PTP was not affected by chronic nerve stimulation neither in amplitude (stimulated: 55.0 ± 8.6 %; control: 62.4 ± 12.9 %, $P = 0.626$) nor in duration. EPP amplitude remained elevated within the time course of the experiment ($t = 455$ s) in both preparations (stimulated: 15.8 ± 5.9 %; control: 22.7 ± 8.8 %, $P = 0.511$) (Fig. 1B, C).

As a whole, this analysis confirms that the two *in vivo* models resulted in opposite alterations in short-term plasticity and supports parallel changes in synaptic efficacy. We then focused our attention on PSCs to determine how these changes affected their function.

FIGURE 1. EFFECTS OF TREATMENTS ON SHORT-TERM PLASTICITY: HIGH FREQUENCY FACILITATION, DEPRESSION AND PTP

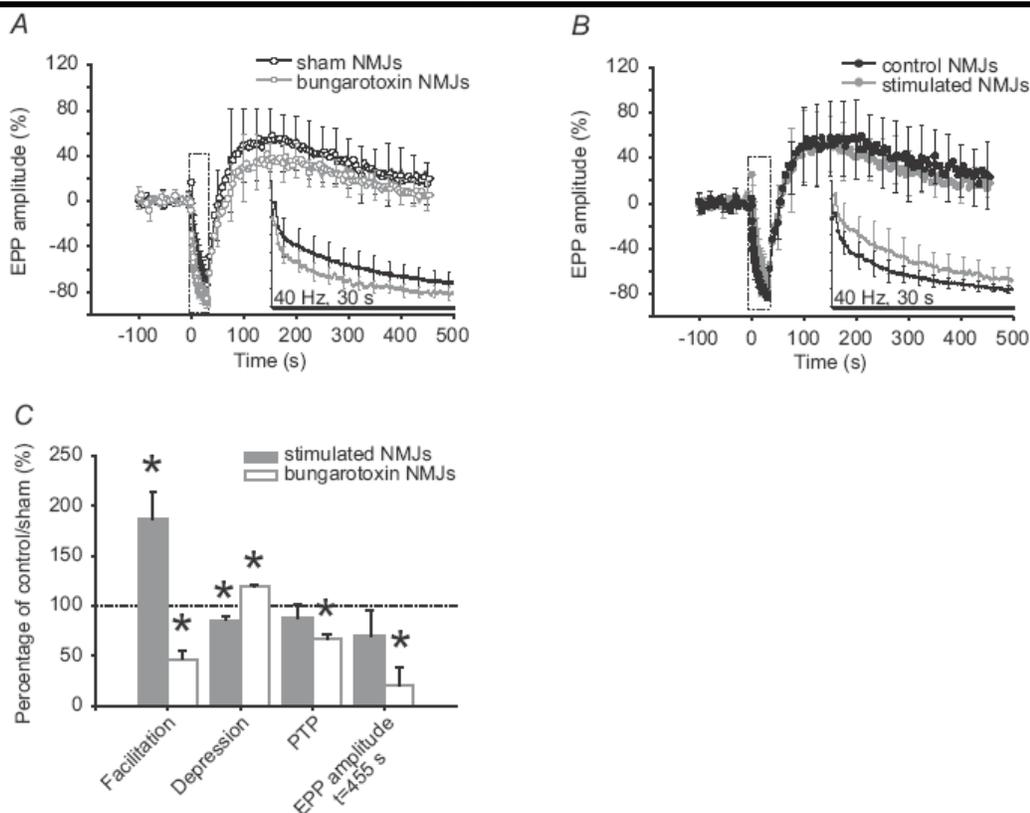


FIGURE 1. EFFECTS OF TREATMENTS ON SHORT-TERM PLASTICITY: HIGH FREQUENCY FACILITATION, DEPRESSION AND PTP.

(A) Mean EPP amplitude before, during and after high frequency stimulation (40 Hz, 30 s) for sham (black, open circles) and α -bungarotoxin-treated NMJs (grey, open circles) and (B) for control (black, filled circles) and stimulated NMJs (grey, filled circles). Mean amplitude is normalized to the mean EPP amplitude during the initial 0.2 Hz control period. Inset: Enlarged view of the 40 Hz, 30 s stimulation period. (C) Histogram depicting opposite changes in short-term synaptic plasticity for α -bungarotoxin-treated (white) and stimulated NMJs (grey) relative to sham and control NMJs (100%, dotted line) respectively. Asterisks show statistically significant changes. On average, α -bungarotoxin-treated NMJs presented weaker facilitation at the beginning of the stimulation train, more pronounced depression at the end and smaller PTP that did not last as long as sham NMJs. Stimulated NMJs presented greater facilitation at the beginning of the stimulation train and less depression at the end while PTP remained unchanged compared to control.

Figure 1. Effects of treatments on short-term plasticity: high frequency facilitation, depression and PTP

2.2.2.4.3. EFFECTS OF TREATMENTS ON NERVE-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES

Considering the opposite regulation of synaptic plasticity and efficacy by chronic blockade of nAChRs and chronic nerve stimulation (Plomp et al., 1992), we also expected opposite changes in nerve-evoked PSC activation for the two treatments.

As shown in Fig. 2(A, C, E, F) and Table 1, properties of PSC calcium responses, evoked with 40 Hz, 30 s stimulation, were altered by chronic blockade of nAChRs with α -bungarotoxin (bungarotoxin: n= 24 PSCs; N= 8 frogs; sham: n= 18 PSCs; N = 8 frogs). PSC calcium responses of α -bungarotoxin-treated NMJs were significantly delayed by 140% compared to sham. Calcium release from PSC internal stores and/or binding to Fluo-4 dye also appeared to be slower in α -bungarotoxin-treated NMJs, as the slope of rise was significantly reduced by 63%. Moreover, the significant reduction of calcium response amplitude and area under the curve, by 51% and 75% respectively, suggests that a smaller amount of calcium is released from PSC internal stores and/or is available for binding to Fluo-4. Besides, duration of PSC calcium responses in α -bungarotoxin-treated NMJs was not different from sham; however duration expressed per unit of amplitude was significantly increased by 173% in these NMJs, revealing a prolonged action of calcium for a given response amplitude. Taken together, these results suggest that the neuronal message perceived by PSCs is altered following chronic blockade of nAChRs and elevated synaptic activity.

Interestingly, the properties of synaptically-evoked PSC calcium responses were not affected by chronic nerve stimulation. Indeed, all parameters measured in stimulated NMJs were not significantly different from control NMJs (stimulated: n= 40 PSCs; control: n= 37 PSCs; N = 19 frogs) (Table 1, Fig. 2B, D, G and H). These results suggest that the neuronal message perceived by PSCs, in conditions of elevated synaptic activity, might not be altered by chronic nerve stimulation.

TABLE 1.
EFFECTS OF TREATMENTS ON NERVE-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES

	Treatments			
	Chronic <i>in vivo</i> α -bungarotoxin blockade of nAChRs		Chronic <i>in vivo</i> nerve stimulation	
PSC calcium response	Sham	Bungarotoxin	Control	Stimulated
Amplitude (%)	913.8 \pm 148.1	440.3 \pm 95.7 P = 0.008 *	400.3 \pm 111.1	305.2 \pm 56.4 P = 0.438
Duration (s)	82.9 \pm 7.3	76.0 \pm 6.8 P = 0.498	57.1 \pm 3.7	55.8 \pm 3.0 P = 0.795
Duration /amplitude (s/%)	0.18 \pm 0.04	0.5 \pm 0.1 P = 0.044 *	0.51 \pm 0.09	0.41 \pm 0.06 P = 0.340
Area under the curve (%/s ²)	36153.7 \pm 8586.0	8789.1 \pm 1705.7 P <0.001 *	7929.4 \pm 2224.8	5459.3 \pm 1297.9 P = 0.329
Half-width (s)	34.5 \pm 4.3	21.0 \pm 1.9 P = 0.003 *	18.9 \pm 1.2	18.2 \pm 1.2 P = 0.674
Delay (s)	5.8 \pm 1.1	13.8 \pm 3.3 P = 0.046 *	5.7 \pm 0.8	7.3 \pm 1.8 P = 0.425
Time-to-peak (s)	17.5 \pm 2.2	15.9 \pm 2.4 P = 0.631	14.0 \pm 1.3	11.9 \pm 0.7 P = 0.156
Rise slope (10-90 %) (%/s)	176.1 \pm 39.3	64.9 \pm 21.0 P = 0.011 *	74.4 \pm 27.6	46.7 \pm 10.6 P = 0.329
Rise time (10-90 %) (s)	8.8 \pm 1.7	14.8 \pm 3.8 P = 0.221	8.7 \pm 1.0	6.8 \pm 0.6 P = 0.109
Decay slope (10-90%) (%/s)	-25.1 \pm 4.3	-21.3 \pm 6.1 P = 0.631	-20.7 \pm 6.1	-18.9 \pm 5.4 P = 0.830
Decay time (10-90 %) (s)	31.1 \pm 3.5	28.9 \pm 6.1 P = 0.771	20.1 \pm 1.6	21.0 \pm 1.9 P = 0.704

Mean values and standard error for different PSC calcium response parameters measured in sham, α -bungarotoxin-treated, control and chronically stimulated NMJs. * indicates significant P values.

Table 1. Effects of treatments on nerve-evoked PSC calcium responses

FIGURE 2. EFFECTS OF TREATMENTS ON NERVE-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES

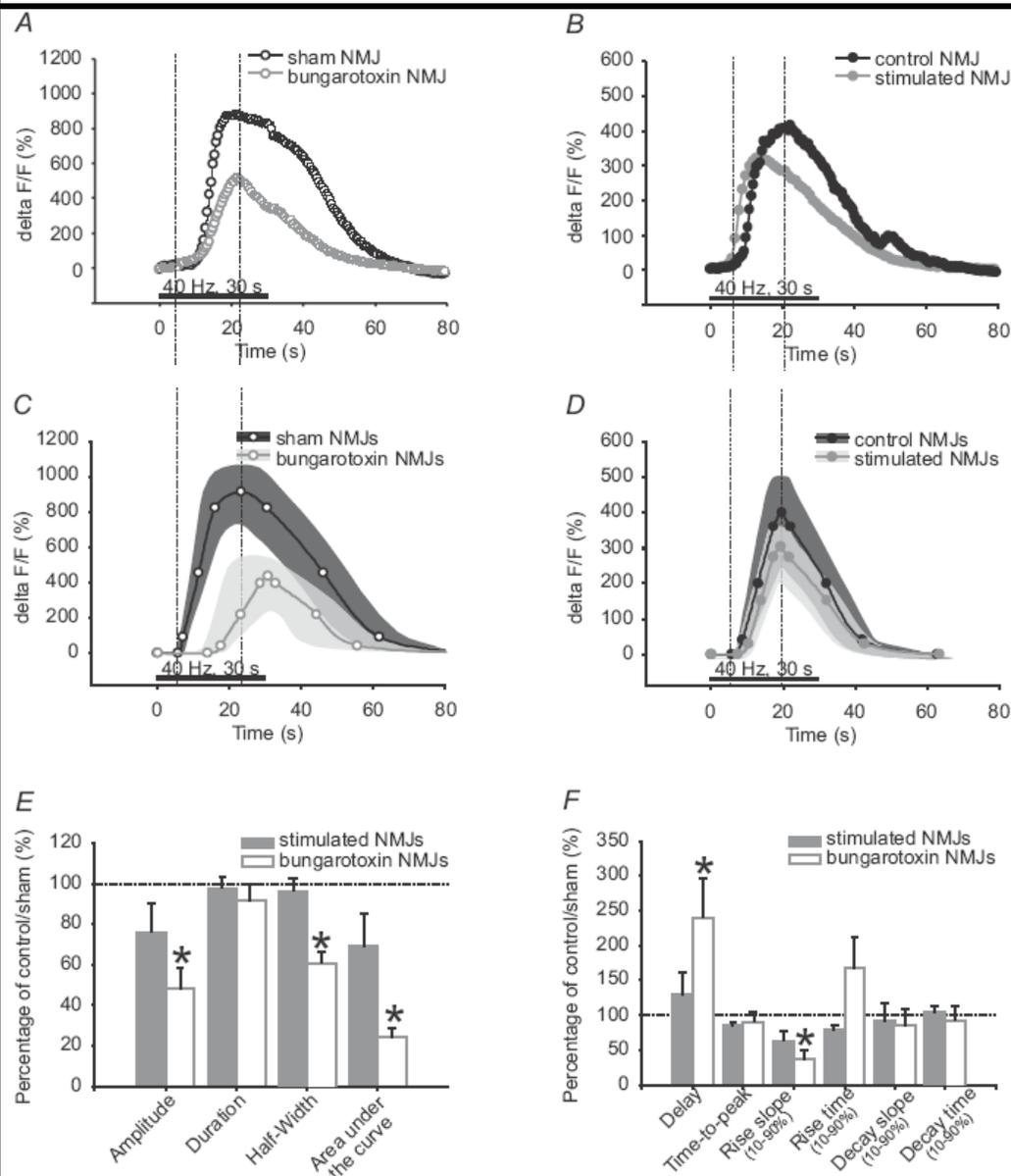


FIGURE 2. EFFECTS OF TREATMENTS ON NERVE-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES.

(A) Characteristic calcium responses evoked by 40 Hz, 30 s stimulation in PSCs of α -bungarotoxin-treated (grey, open circles) and sham NMJs (black, open circles) and (B) stimulated (grey, filled circles) and control NMJs (black, filled circles). (C) Mean calcium responses evoked by 40 Hz, 30 s stimulation in PSCs of α -bungarotoxin-treated (grey, open circles) and sham NMJs (black, open circles) and (D) stimulated (grey, filled circles) and control NMJs (black, filled circles). Variability for control and treated NMJs is represented as dark grey and light grey-filled regions surrounding the mean. (E) (F) Histograms depicting changes in nerve-

evoked PSC calcium responses of α -bungarotoxin-treated (white) and stimulated NMJs (grey) relative to sham and control NMJs (100%, dotted line) respectively. Asterisks show statistically significant changes. Only α -bungarotoxin-treated NMJs show altered nerve-evoked PSC calcium responses, in terms of amplitude, half-width, area under the curve, delay and rise slope, compared to sham.

Figure 2. Effects of treatments on nerve-evoked PSC calcium responses

2.2.2.4.4. CHANGES IN TRANSMITTER RELEASE CANNOT ACCOUNT FOR CHANGES IN PSC CALCIUM RESPONSES

Because our chronic treatments are believed to modify quantal release concomitantly with synaptic plasticity, we wondered if the total amount of transmitter released, during the time course of PSC calcium responses, could correlate their properties. To evaluate this, we modeled changes in transmitter release during the stimulation protocol. We attributed relative values to initial quantal release and calculated the cumulative amount of transmitter released as a function of the relative changes in EPP amplitude during the 40 Hz, 30 s stimulation. Initial transmitter release was set to 1 for sham NMJs and to 1.5 for α -bungarotoxin treated NMJs, according to observations by others showing a 50% increase in quantal release with such treatment (Plomp et al., 1992) and consistent with our observations of decreased facilitation and increased depression. Similarly, we set initial transmitter release to 1 for control NMJs and to 0.5 for stimulated NMJs, since we previously showed a 50% reduction in quantal release following chronic nerve stimulation (Belair et al., 2005).

With such differences in basal synaptic strength, α -bungarotoxin treated NMJs would have released a greater amount of neurotransmitter than sham NMJs, at least within the first 6 seconds of stimulation, which correspond to the mean time of PSC calcium response onset in control conditions (Fig. 3A). Hence, if PSC activation was proportional to the amount of transmitter released, one would have expected calcium responses with earlier onset and greater amplitude in α -bungarotoxin-treated NMJs. Nevertheless, PSC calcium responses in these conditions were markedly delayed and smaller in amplitude. Conversely, stimulated NMJs would have released fewer transmitters than control NMJs, which would result in delayed or smaller calcium

responses, according to a proportional stimulus-response relationship. However, PSC calcium responses displayed similar properties in stimulated and control NMJs. These observations strongly argue against a linear stimulus-response relationship between PSC activation and transmitter release and support more complex adaptations of PSCs that depend on the level of synaptic activity.

FIGURE 3. MODEL OF TRANSMITTER RELEASE DURING 40 HZ, 30 S STIMULATION

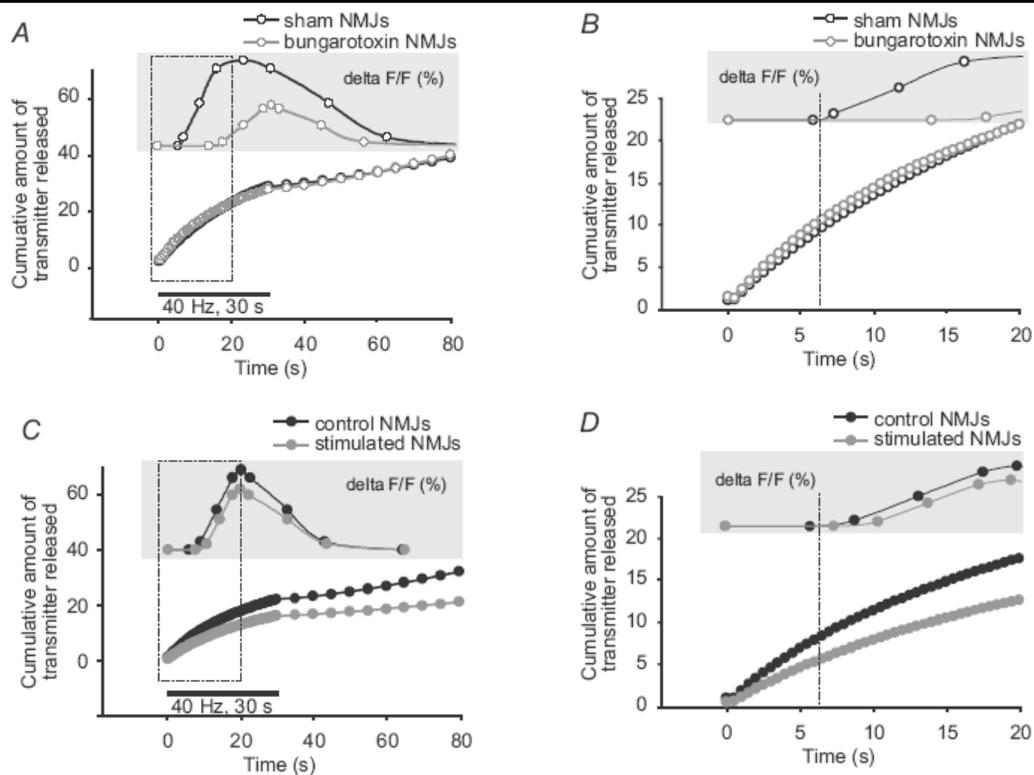


FIGURE 3. MODEL OF TRANSMITTER RELEASE DURING 40 HZ, 30 S STIMULATION. (A) Mean PSC calcium response (upper trace) and putative amount of transmitter released by α -bungarotoxin-treated NMJs (grey open circles), relative to sham NMJs (black, open circles) (B) Enlarged view of A showing the first 20 seconds of stimulation. Note the delay of PSC calcium response onset in α -bungarotoxin-treated NMJs, despite putative larger amount of transmitter released. (C) Mean PSC calcium response (upper trace) and putative amount of transmitter released by stimulated NMJs (grey, filled circles) relative to control NMJs (black, filled circles) during the time course of PSC calcium responses. (D) Enlarged view of C showing the first 20 seconds of stimulation. Note the similarities between PSC calcium responses in stimulated and control NMJs, despite putative smaller amount of transmitter released in stimulated NMJs.

Figure 3. Model of transmitter release during 40 Hz, 30 s stimulation

2.2.2.4.5. CHANGES IN ATP-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES

Because PSC activation, in treated preparations, cannot be explained directly by changes in the level of transmitter released, we next investigated whether the properties of PSC themselves were altered. At the frog NMJ, PSCs are primarily activated by ACh and ATP, two neurotransmitters that are co-released by the presynaptic terminal. While ACh activates muscarinic receptors of an unknown type (Robitaille et al., 1997), ATP triggers Ca^{2+} rises in PSCs mainly via P2Y and, to a lesser extent, via P2X receptors (Robitaille, 1995). To characterize the effect of chronic treatments on these two components of PSC calcium responses, we performed calcium imaging of PSCs following local application of ATP or muscarine to their soma, using a puff micropipette.

ATP-induced calcium responses in PSCs are concentration dependent, with amplitude, duration and proportion of responding cells increasing with concentration (data not shown). Using a maximal effective concentration (10 μM) that evoked calcium rises in 100% of sham PSCs, we found that calcium responses were comparable for almost all parameters tested (bungarotoxin: n= 36 PSCs; N= 4 frogs; sham: n= 31 PSCs; N = 3 frogs). Duration was, however, significantly increased by 44% in PSCs of α -bungarotoxin treated NMJs, suggesting a prolonged action of calcium in these cells (Table 2, Fig. 4A, C, E and F). On the other hand, the ratio of duration over amplitude was not significantly altered. Therefore, duration of calcium responses for a given increase in amplitude was unchanged.

Conversely, maximal effective concentration of ATP (20 μM) induced calcium responses in PSCs, from stimulated and control NMJs, that were not statistically different for all parameters tested (Table 2, Fig. 4B, D, E and F) (stimulated: n=13 PSCs; control: n=17 PSCs; N= 5 frogs). These results suggest that PSC properties can be differentially regulated by opposite changes in synaptic activity.

TABLE 2.
EFFECTS OF TREATMENTS ON PSC CALCIUM RESPONSES EVOKED WITH
MAXIMAL EFFECTIVE ATP CONCENTRATION

	Treatments			
	Chronic <i>in vivo</i> α -bungarotoxin blockade of nAChRs		Chronic <i>in vivo</i> nerve stimulation	
PSC calcium response	Sham	Bungarotoxin	Control	Stimulated
Amplitude (%)	189.1 \pm 16.9	211.3 \pm 17.7 P = 0.370	726.4 \pm 194.6	672.4 \pm 100.1 P = 0.823
Duration (s)	71.2 \pm 7.2	102.7 \pm 12.0 P = 0.033 *	44.2 \pm 6.3	47.6 \pm 8.0 P = 0.739
Duration /amplitude (s/%)	0.42 \pm 0.04	0.6 \pm 0.1 P = 0.091	0.11 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01 P = 0.231
Area under the curve (%/s ²)	8336.7 \pm 1608.4	13866.6 \pm 2734.4 P = 0.096	23471.7 \pm 10155.1	22531.3 \pm 6716.1 P = 0.943
Half-width (s)	34.7 \pm 5.1	52.9 \pm 8.1 P = 0.071	23.0 \pm 3.7	26.8 \pm 5.6 P = 0.555
Delay (s)	3.7 \pm 0.3	3.4 \pm 0.4 P = 0.599	1.2 \pm 0.4	1.2 \pm 0.4 P = 0.969
Time-to-peak (s)	12.3 \pm 2.1	18.5 \pm 3.6 P = 0.631	6.7 \pm 1.4	3.7 \pm 0.3 P = 0.082
Rise slope (10-90 %) (%/s)	53.8 \pm 9.6	57.9 \pm 8.6 P = 0.753	480.5 \pm 168.0	356.5 \pm 94.4 P = 0.582
Rise time (10-90 %) (s)	6.1 \pm 1.2	6.5 \pm 1.5 P = 0.818	3.1 \pm 1.2	1.5 \pm 0.3 P = 0.313
Decay slope (10-90%) (%/s)	-4.7 \pm 0.6	-5.3 \pm 0.6 P = 0.464	-29.5 \pm 6.4	-24.9 \pm 3.6 P = 0.551
Decay time (10-90 %) (s)	41.5 \pm 4.3	50.6 \pm 9.5 P = 0.381	24.2 \pm 3.5	25.3 \pm 4.3 P = 0.847

Mean values and standard error for different PSC calcium response parameters measured in sham, α -bungarotoxin-treated, control and chronically stimulated NMJs. * indicates significant P values.

Table 2. Effects of treatments on PSC calcium responses evoked with maximal effective ATP concentration

FIGURE 4. EFFECTS OF TREATMENTS ON PSC CALCIUM RESPONSES EVOKED WITH MAXIMAL EFFECTIVE ATP CONCENTRATION

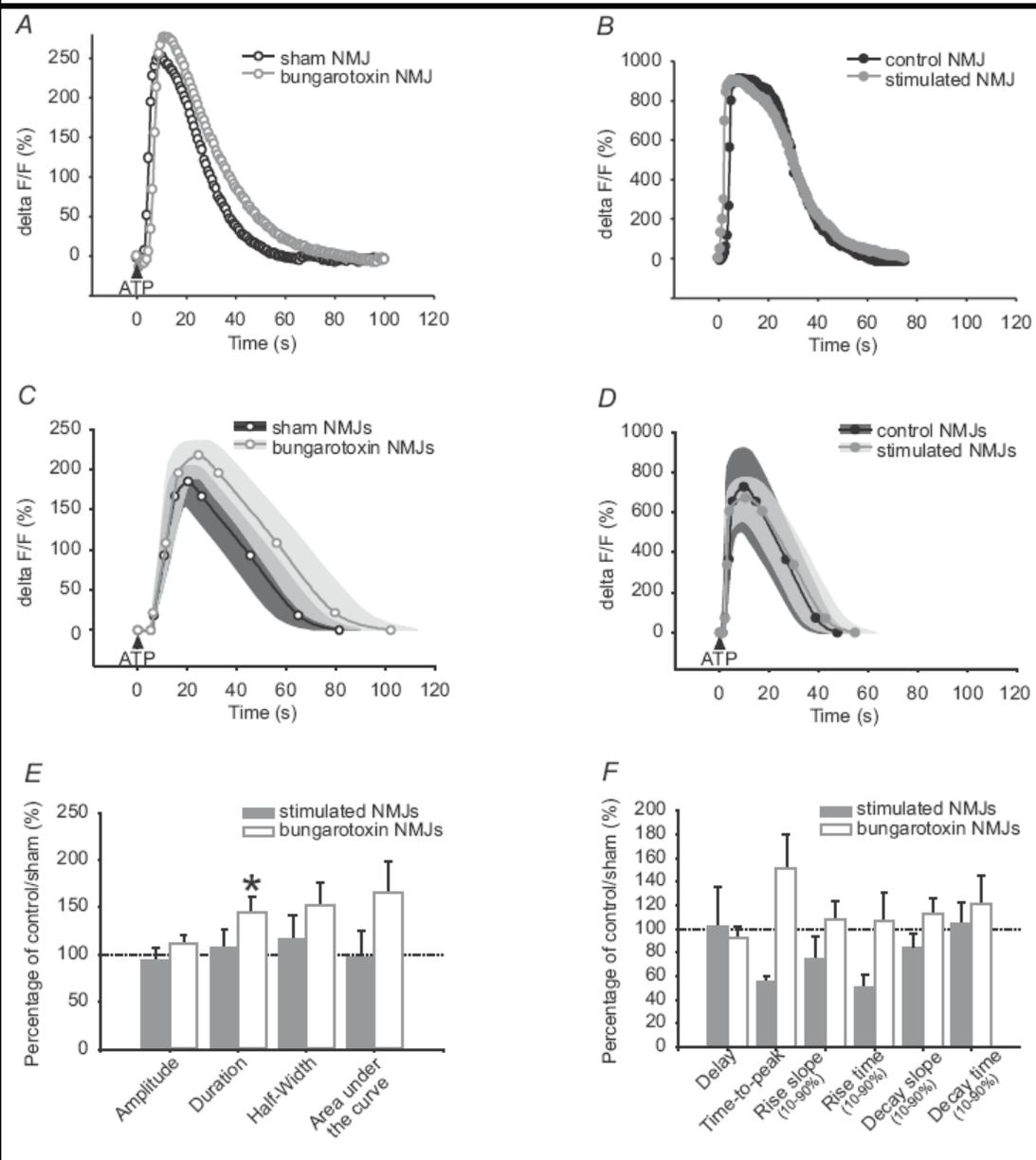


FIGURE 4. EFFECTS OF TREATMENTS ON PSC CALCIUM RESPONSES EVOKED WITH MAXIMAL EFFECTIVE ATP CONCENTRATION.

(A) Characteristic PSC calcium responses evoked with maximal effective ATP concentration (giving 100% cell responsiveness) in α -bungarotoxin-treated (grey, open circles) and sham NMJs (black, open circles) and (B) stimulated (grey, filled circles) and control NMJs (black, filled circles). (C) Mean calcium responses evoked with maximal effective ATP concentration in α -bungarotoxin-treated (grey, open circles) and shams NMJs (black, open circles) and (D) stimulated (grey, filled circles) and control NMJs (black, filled circles). Variability for control and treated NMJs is represented as dark grey and light grey-filled regions surrounding the mean. (E) (F) Histograms depicting changes in ATP evoked PSC calcium responses of α -bungarotoxin-treated (white) and stimulated NMJs (grey) relative to sham and control NMJs (100%, dotted line) respectively. Asterisks show statistically significant changes. Only α -bungarotoxin-treated NMJs show altered PSC calcium responses, in terms of duration, compared to sham at this maximal effective concentration.

Figure 4. Effects of treatments on PSC calcium responses evoked with maximal effective ATP concentration

We next tested whether chronic stimulation induced a change in the excitability of PSCs that could be masked by a supra-maximal concentration of ATP. This was achieved by using a concentration of ATP with sub-maximal effectiveness (10 μ M), activating only a third of the cells in control NMJs. We found that PSCs could be grouped into three categories: high, moderate or low sensitivity, according to the number of ATP applications required for inducing a calcium response (1; 2 to 3; more than 3). With this grouping method, we found a shift in the distribution of PSC responsiveness in stimulated NMJs (Fig. 5A). Indeed, chronic nerve stimulation increased by 50% the proportion of cells belonging to the highly sensitive group (stimulated: 51.6%, n=64 PSCs; control: 34.5%, n=58 PSCs; N= 13 frogs, P=0.0039, Chi-square test), suggesting an increased sensitivity of PSCs to ATP.

When compared together, calcium rises evoked in highly and moderately sensitive PSCs were similar in control and stimulated NMJs. However, within the low sensitive group, PSCs of stimulated NMJs presented calcium responses with significant 38% and 125% increases in duration and area under the curve, respectively (Table 3, Fig. 5B, C, D and E). This increase in duration indicates a

prolonged action of calcium. However, the ratio of duration over amplitude remained unchanged, meaning that for a given amplitude, the duration of calcium response is the same. Group specific modulation of PSC calcium responses indicates that PSC properties are finely regulated by synaptic activity.

TABLE 3.
EFFECTS OF CHRONIC NERVE STIMULATION ON PSC CALCIUM RESPONSES EVOKED WITH SUB-MAXIMAL EFFECTIVE ATP CONCENTRATION

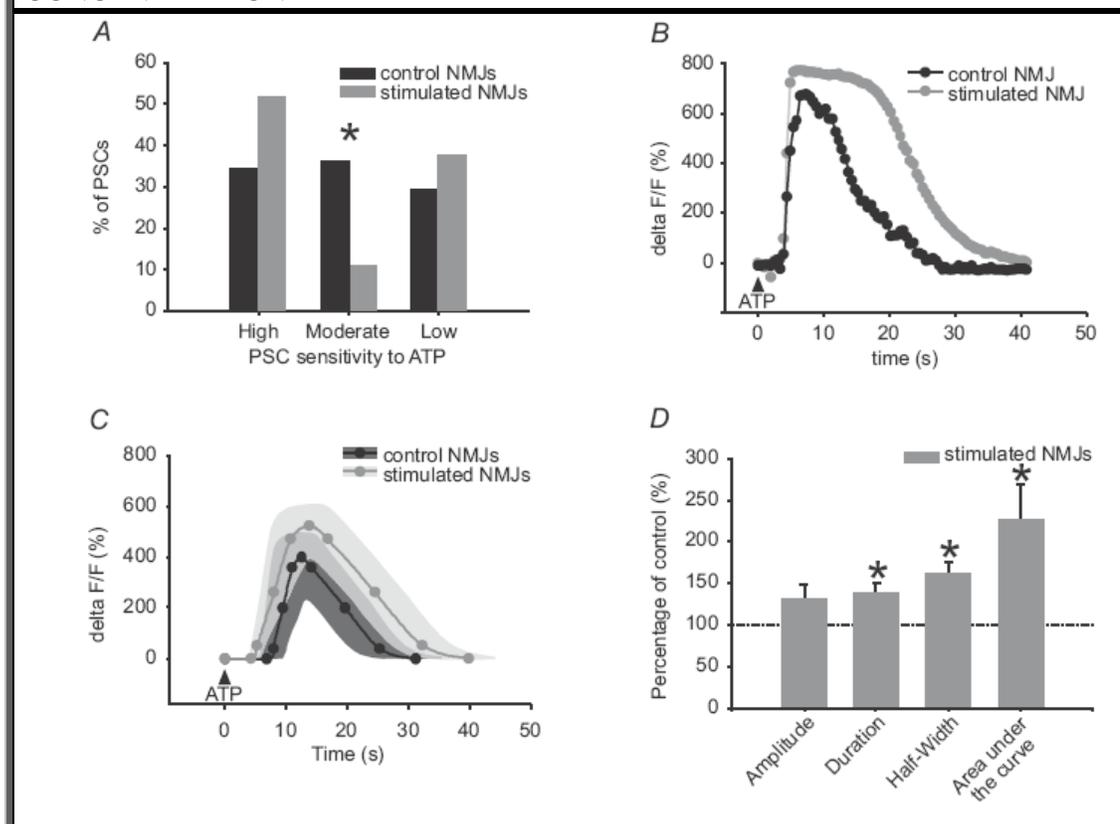
	Chronic <i>in vivo</i> nerve stimulation—ATP (10 μ M)					
	Highly sensitive PSCs		Moderately sensitive PSCs		Weakly sensitive PSCs	
PSC calcium response	Control	Stimulated	Control	Stimulated	Control	Stimulated
Amplitude (%)	457.7 \pm 68.1	364.5 \pm 57.1	289.2 \pm 52.7	305.8 \pm 77.7	400.4 \pm 80.9	522.5 \pm 72.8
	P = 0.308		P = 0.872		P = 0.274	
Duration (s)	25.2 \pm 2.9	28.1 \pm 3.5	22.1 \pm 2.1	29.6 \pm 4.2	23.3 \pm 2.2	32.2 \pm 3.0
	P = 0.571		P = 0.102		P = 0.034 *	
Duration/Amplitude (s/%)	0.09 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.15 \pm 0.03	0.13 \pm 0.03	0.15 \pm 0.06	0.12 \pm 0.04
	P = 0.068		P = 0.734		P = 0.684	
Area under the curve (%/s ²)	7373.1 \pm 1743.2	7293.1 \pm 1754.3	3166.2 \pm 720.8	5022.8 \pm 1898.3	4148.5 \pm 791.5	9349.9 \pm 1809.5
	P = 0.976		P = 0.269		P = 0.027 *	
Half-width (s)	14.4 \pm 2.0	15.3 \pm 2.1	10.4 \pm 1.4	13.0 \pm 2.2	10.3 \pm 0.9	16.5 \pm 1.6
	P = 0.751		P = 0.336		P = 0.003 *	
Delay (s)	1.5 \pm 0.3	1.6 \pm 0.3	3.1 \pm 0.9	2.7 \pm 0.8	6.9 \pm 1.9	4.3 \pm 0.8
	P = 0.837		P = 0.783		P = 0.175	
Time-to-peak (s)	4.8 \pm 0.9	5.9 \pm 0.7	6.3 \pm 0.8	7.7 \pm 1.7	4.6 \pm 0.5	6.1 \pm 1.2
	P = 0.358		P = 0.431		P = 0.295	
Rise slope (10-90 %) (%/s)	227.5 \pm 57.3	159.6 \pm 52.9	96.7 \pm 37.5	47.6 \pm 15.0	179.1 \pm 55.5	215.5 \pm 51.5
	P = 0.397		P = 0.537		P = 0.660	
Rise time (10-90 %) (s)	3.6 \pm 1.3	2.7 \pm 2.2	4.8 \pm 0.9	7.1 \pm 1.8	3.1 \pm 0.9	5.4 \pm 1.9
	P = 0.763		P = 0.235		P = 0.403	

Decay slope (10-90%) (%/s)	-36.3 ± 6.5 P = 0.331	-27.8 ± 5.3	-27.8 ± 5.7 P = 0.286	-17.6 ± 3.3	-46.7 ± 15.8 P = 0.330	-32.1 ± 5.4
Decay time (10-90%) (s)	15.2 ± 2.1 P = 0.504	18.2 ± 3.1	10.3 ± 1.1 P = 0.127	13.4 ± 1.6	11.2 ± 1.5 P = 0.085	15.5 ± 1.7

Mean values and standard error for different PSC calcium response parameters measured in sham, α -bungarotoxin-treated, control and chronically stimulated NMJs. * indicates significant P values.

Table 3. Effects of chronic nerve stimulation on PSC calcium responses evoked with sub-maximal effective ATP concentration

FIGURE 5. EFFECTS OF CHRONIC NERVE STIMULATION ON PSC CALCIUM RESPONSES EVOKED WITH SUB-MAXIMAL EFFECTIVE ATP CONCENTRATION



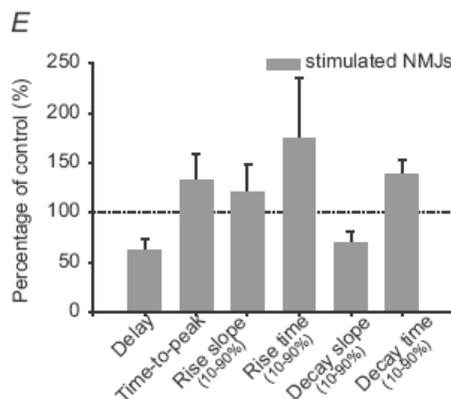


FIGURE 5. EFFECTS OF CHRONIC NERVE STIMULATION ON PSC CALCIUM RESPONSES EVOKED WITH SUB-MAXIMAL EFFECTIVE ATP CONCENTRATION.

(A) Frequency histogram depicting the distribution of PSC sensitivity to sub-maximal effective ATP concentration (allowing sensitivity categorization) in stimulated (grey) and control (black) NMJs. The proportion of highly sensitive PSCs is increased in stimulated NMJs, likely at the expense of moderately sensitive cells. (B) Characteristic calcium responses evoked with sub-maximal effective ATP concentration in low sensitive PSCs of stimulated (grey, filled circles) and control NMJs (black, filled circles). (C) Mean calcium response evoked with sub-maximal effective ATP concentration in low sensitive PSC of stimulated (grey, filled circles) and control NMJs (black, filled circles). Variability for control and stimulated NMJs is represented as dark grey and light grey-filled regions surrounding the mean. (D) (E) Histograms depicting changes in ATP evoked PSC calcium responses of stimulated NMJs (grey) relative to control NMJs (100%, dotted line). Asterisks show statistically significant changes. PSC calcium responses evoked with sub-maximal effective concentration of ATP are altered by chronic nerve stimulation, in terms of duration, half-width and area under the curve.

Figure 5. Effects of chronic nerve stimulation on PSC calcium responses evoked with sub-maximal effective ATP concentration

2.2.2.4.6. CHANGES IN MUSCARINE-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES

PSC calcium responses to muscarine are also concentration-dependent, with proportion of responding cells increasing with concentration, while the amplitude remained constant regardless of the concentration (Robitaille *et al.*, 1997). Because of these all-or-none types of responses, we used a sub-maximal effective concentration of muscarine (10 μ M) that decreased the proportion of responding PSCs below 100% to unmask an actual difference in sensitivity distribution. We classified PSCs of sham and α -bungarotoxin treated NMJs into highly, moderately and weakly sensitive PSCs, according to the number of muscarine applications required for inducing a calcium response (Fig. 6A). We found no difference in the

distribution of α -bungarotoxin treated NMJ PSCs in comparison to sham (bungarotoxin: n= 37 PSCs; N= 8 frogs; sham: n= 36 PSCs; N = 6 frogs; P=0.1784, Chi-square test). However, when comparing calcium responses within each group, we found that highly sensitive PSCs of α -bungarotoxin treated NMJs presented a significant increase in amplitude and area under the curve of 66% and 171% respectively, suggesting that a greater amount of calcium is released from internal stores in these cells. Moreover, duration of PSC calcium responses was significantly increased by 69% following chronic blockade of nAChRs, indicating a prolonged action of calcium in these cells which might be accounted for by the significant prolongation of decay time by 210% (Fig. 6C, E, G, H). However, when expressing duration of PSC calcium responses in function of amplitude, significance was lost, indicating that the prolonged action of calcium might be the direct consequence of the greater amount of calcium released. Moreover, the slope of rise of these PSC calcium responses was almost 4 times steeper than in sham NMJ PSCs, suggestive of a faster calcium release from PSC internal stores and/or binding to Fluo-4 dye (Table 4). Opposite to the highly sensitive group of PSCs, calcium responses evoked in moderately and weakly sensitive PSCs were not affected by chronic blockade of nAChRs indicating that a modulation occurred in a sub-population of PSCs. These results also suggest that muscarinic signalling in PSCs of α -bungarotoxin treated NMJs might be altered mainly in conditions of low transmitter release, where only highly sensitive PSCs respond with a calcium elevation.

When comparing the sensitivity of PSCs from stimulated and control NMJs, we observed a greater proportion of weakly sensitive cells in the treated group (stimulated: 50%, n=36 PSCs; control: 24.4%, n=45 PSCs; N= 15 frogs; P=0.0468), suggesting that chronic nerve stimulation decreases PSC sensitivity to muscarine (Fig. 6B). Thus, in conditions of low transmitter release, less PSCs might be able to respond to synaptic activity with a calcium elevation. However, PSC calcium responses evoked in each group were statistically similar in stimulated and control NMJs (Fig. 6D, F, G, H).

TABLE 4.
EFFECT OF TREATMENTS ON CALCIUM RESPONSES EVOKED, IN HIGHLY SENSITIVE PSCs, WITH SUB-MAXIMAL EFFECTIVE MUSCARINE CONCENTRATION

PSC calcium response	Treatments			
	Chronic <i>in vivo</i> α -bungarotoxin blockade of nAChRs		Chronic <i>in vivo</i> nerve stimulation	
	Sham	Bungarotoxin	Control	Stimulated
Amplitude (%)	119.9 \pm 28.2	199.1 \pm 23.3 P = 0.037 *	552.2 \pm 79.5	409.6 \pm 65.2 P = 0.230
Duration (s)	95.0 \pm 18.7	160.9 \pm 14.2 P = 0.008 *	110.4 \pm 13.9	113.3 \pm 20.1 P = 0.904
Duration /amplitude (s/%)	1.8 \pm 0.6	1.0 \pm 0.1 P = 0.140	0.27 \pm 0.04	0.29 \pm 0.04 P = 0.769
Area under the curve (%/s ²)	7217.5 \pm 2188.4	19624.4 \pm 2188.4 P = 0.038 *	44758.8 \pm 10562.9	32704.7 \pm 9541.9 P = 0.450
Half-width (s)	41.0 \pm 12.7	72.8 \pm 9.0 P = 0.046 *	61.9 \pm 12.2	58.4 \pm 9.7 P = 0.844
Delay (s)	8.8 \pm 2.1	6.1 \pm 1.1 P = 0.255	7.4 \pm 1.4	5.0 \pm 0.8 P = 0.232
Time-to-peak (s)	17.1 \pm 4.5	20.1 \pm 4.2 P = 0.633	15.7 \pm 3.1	12.4 \pm 2.3 P = 0.461
Rise slope (10-90 %) (%/s)	11.4 \pm 8.5	56.7 \pm 18.8 P = 0.048 *	217.3 \pm 50.8	194.0 \pm 86.6 P = 0.806
Rise time (10-90 %) (s)	21.2 \pm 8.3	4.2 \pm 0.6 P = 0.079	3.1 \pm 0.6	5.1 \pm 1.2 P = 0.114
Decay slope (10-90%) (%/s)	-2.8 \pm 1.0	-1.8 \pm 0.3 P = 0.245	-7.1 \pm 1.6	-5.9 \pm 1.3 P = 0.633
Decay time (10-90 %) (s)	28.8 \pm 8.1	89.4 \pm 14.5 P = 0.003 *	61.4 \pm 12.1	80.2 \pm 21.7 P = 0.420

Mean values and standard error for different PSC calcium response parameters measured in sham, α -bungarotoxin-treated, control and chronically stimulated NMJs. * indicates significant P values.

Table 4. Effect of treatments on calcium responses evoked, in highly sensitive PSCs, with sub-maximal effective muscarine concentration

FIGURE 6. EFFECT OF TREATMENTS ON MUSCARINE-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES

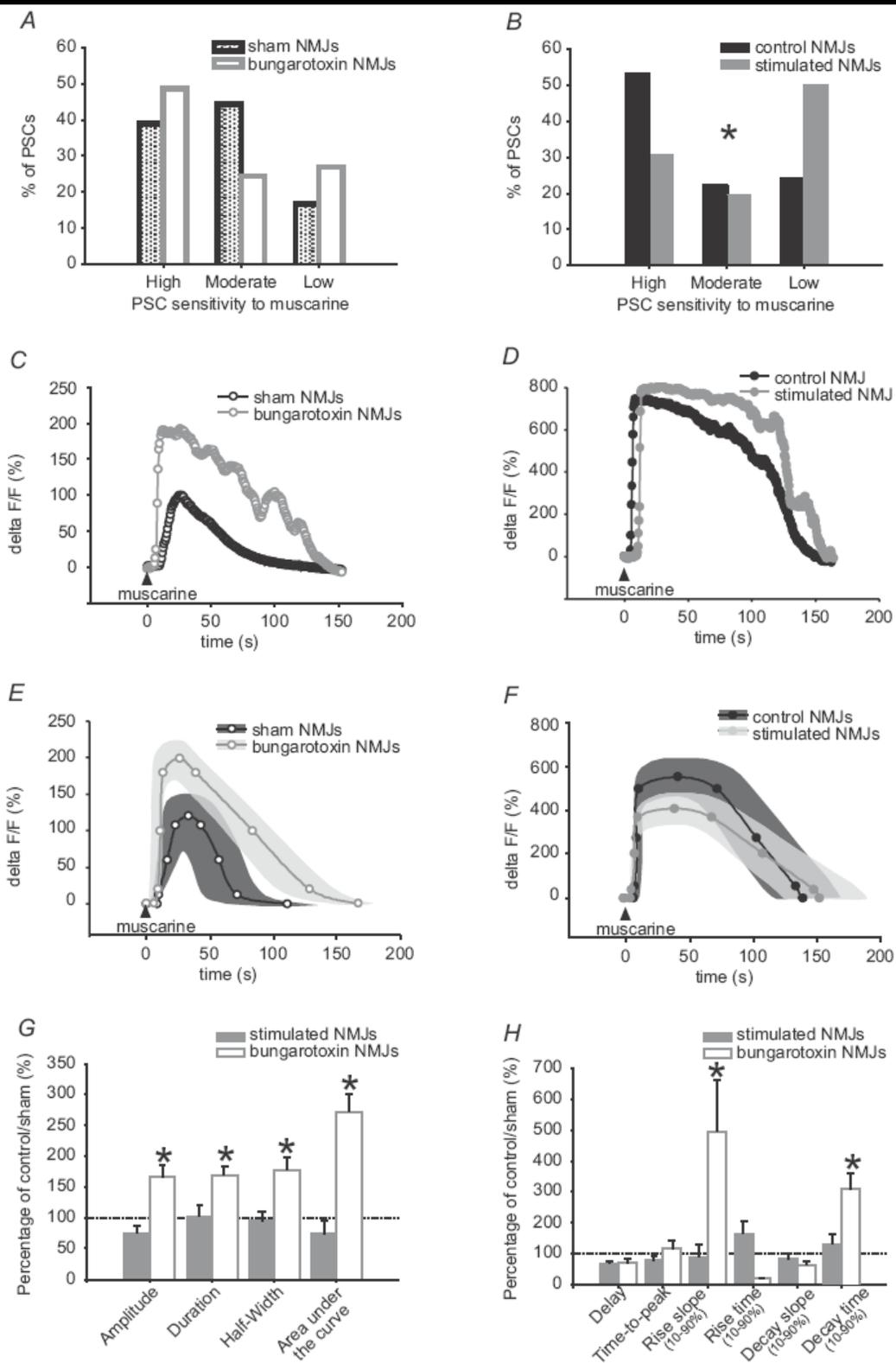


FIGURE 6. EFFECT OF TREATMENTS ON MUSCARINE-EVOKED PSC CALCIUM RESPONSES. (A) Frequency histogram depicting the distribution of PSC sensitivity to sub-maximal effective muscarine concentration (allowing sensitivity categorization) in α -bungarotoxin-treated (grey outline) and sham NMJs (black outline) and (B) stimulated (grey) and control NMJs (black). The distribution of PSCs in the different sensitivity groups is only altered for stimulated NMJs. The proportion of weakly sensitive PSCs is increased in stimulated NMJs, likely at the expense of highly sensitive cells. (C) Characteristic calcium responses evoked with sub-maximal effective muscarine concentration in weakly sensitive PSCs of α -bungarotoxin-treated (grey, open circles) and sham NMJs (black, open circles) and (D) stimulated (grey, filled circles) and control NMJs (black, filled circles). (E) Mean calcium responses evoked with sub-maximal effective concentration in weakly sensitive PSCs of α -bungarotoxin-treated (grey, open circles) and shams NMJs (black, open circles) and (F) stimulated (grey, filled circles) and control NMJs (black, filled circles). Variability for control and treated NMJs is represented as dark grey and light grey-filled regions surrounding the mean. (G) (H) Histograms depicting changes in calcium responses evoked by muscarine in weakly sensitive PSCs of α -bungarotoxin-treated (white) and stimulated NMJs (grey) relative to sham and control NMJs (100%, dotted line) respectively. Asterisks show statistically significant changes. Only α -bungarotoxin-treated NMJs show altered PSC calcium responses compared to sham at this sub-maximal effective concentration, in terms of amplitude, duration, half-width, area under the curve, rise slope and decay time.

Figure 6. Effect of treatments on muscarine-evoked PSC calcium responses

2.2.2.5. DISCUSSION

The active role of PSCs in regulating synaptic efficacy and plasticity (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001; Todd and Robitaille, 2007) imply their ability to adapt to their associated synapses. Therefore, synaptic plasticity must underlie PSC plasticity. Our results confirm this hypothesis by showing activity-dependent PSC adaptations that are coincident with adaptations of synaptic transmission.

2.2.2.5.1. NATURE OF PSC ADAPTATIONS

Our results reveal that PSC adapt to changes in synaptic activity by adjusting their sensitivity to neurotransmitters. We found a bidirectional shift in the distribution of PSC sensitivity to ATP and muscarine, where ATP sensitivity was increased and muscarinic sensitivity, decreased in stimulated NMJs. Importantly, this adaptation was activity-dependent and occurred only in response to chronic nerve stimulation. PSCs also adapt to changes in synaptic activity by regulating the properties of their

calcium response in a treatment-dependent manner. In addition, modifications were specific for a given signalling pathway and depended on initial PSC sensitivity, as suggested by the selective purinergic and muscarinic changes in sub-populations of PSCs. Thus, PSCs undergo complex adaptations that are specific to their initial state and to the level of synaptic activity, suggesting they adjust their activity or excitability to that level. Hence, activity-dependent plasticity of PSCs might be part of their active role at synapses.

An interesting consequence of these sensitivity adaptations might be to alter the number of PSCs activated by a given stimulus or the number of stimuli required for their activation. On the other hand, changes in PSC calcium response properties are likely to alter calcium-dependent processes within a single cell. In both cases, the outcome of PSC synaptic regulation, which could be local or global, might be affected. A local regulation of synaptic function will occur if PSCs work independently from each other and if their range of action is limited to a few active zones. In that case, any changes in calcium response properties of a single PSC would affect the active zones it covers. Conversely, a global regulation of whole NMJs is likely to occur if PSCs work as a functional unit of 4 to 5 cells per NMJ. In the latter case, calcium responses of all the PSCs associated with a single NMJ will act as a population code. The extent of glial regulation would be related to the level of transmitter release, whereby conditions of elevated transmitter release would activate PSCs of all sensitivity, thus providing a global regulation, whereas during low transmitter release, only PSCs with higher sensitivity will be activated, resulting in more local regulation.

Global regulation of whole NMJs by PSCs is supported by the observation that PSC number is correlated with endplate area. This relationship is also maintained whenever endplates enlarge or shrink and is the same for different muscles (Lubischer and Bebinger, 1999). Besides, molecular properties of PSCs were shown to be adapted to muscle fibre subtype (De Winter *et al.*, 2006). On the other hand, individual PSCs can influence a small region of a NMJ as indicated by alterations of

endplate currents by specific injections of GTP analogs or BAPTA into a single PSC (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001). Moreover, PSC processes penetrate the synaptic cleft to enwrap the terminal every three to four active zones (Wu and Betz, 1999). Local synapse-glia interactions are also supported by our findings of the heterogeneity in PSC sensitivity to agonists along the same NMJ. Thus, PSC properties might vary in function of the strength of the NMJ or the active zones they are associated with and their calcium responses might adapt to their specific needs. Hence, PSCs are likely to work both individually and within a functional unit, so that the extent of their adaptations may be local and global and regulated by the level of transmitter release.

2.2.2.5.2. PHYSIOLOGICAL RELEVANCE OF PSC ADAPTATIONS

Changes in properties of nerve-evoked PSC calcium responses cannot only be accounted for by the changes in transmitter release following chronic treatments. The correlation between transmitter release and PSC activation is, indeed, more complex than a linear relationship and should reflect the specific adaptations for muscarine and ATP in conditions of elevated transmitter release. However, the striking differences we found in delay and amplitude of nerve-evoked PSC calcium responses in α -bungarotoxin-treated NMJs is suggestive of an extensive modification of neuron-glia communication parameters, which might go beyond ATP or muscarinic signalling. In fact, the glial output may result from the integration of many interacting signals adjusted to the efficiency of synapse-glia interactions.

2.2.2.5.3. MECHANISMS OF PSC ADAPTATIONS

Changes in sensitivity are likely to be related to the availability of functional receptors and/or the efficiency of their coupling to intracellular mechanisms of calcium release. A decrease in muscarinic sensitivity and functional mAChRs is supported by studies showing a strict regulation of these receptors by agonists (van Koppen and Kaiser, 2003). Moreover, repeated activation of PSC mAChRs was shown to result in successively smaller Ca^{2+} signals until no signal could be triggered (Jahromi *et al.*, 1992; Georgiou *et al.*, 1999). On the other hand, ATP-induced

calcium responses in frog PSCs are highly reproducible and show little or no fatigue (Georgiou *et al.*, 1999). Besides, recent evidence obtained from cultured astrocytes supports an agonist-dependent upregulation of metabotropic ATP receptor P2Y(2), which is associated with an increased UTP-mediated intracellular calcium response (D'Alimonte *et al.*, 2007). Therefore, tonic release of ACh and ATP during chronic nerve stimulation could decrease the number of functional mAChR and increase the expression of P2Y receptors by similar mechanisms.

On the other hand, changes in calcium response properties are likely to be related to the regulation of InsP₃R and mitochondria distribution. Indeed, in cultured astrocytes, distribution of mitochondria and regions of high density of InsP₃R are correlated with sites of calcium response amplification (Sheppard *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 1998). Also, intracellular calcium oscillations in these cells result in similar mitochondrial calcium oscillations and inhibition of mitochondrial activity decreases the amplitude of InsP₃-induced calcium responses (Simpson *et al.*, 1998). Thus, such mechanisms could be involved in the modulation of purinergic and muscarinic calcium signalling in PSCs subjected to chronic changes in synaptic activity.

Other signalling pathways could also be modulated by chronic blockade of nAChRs and chronic nerve stimulation. Indeed, during presynaptic activity, nerve terminals release a variety of peptides and neurotrophins that, in turn, act as synaptic regulators (Matteoli *et al.*, 1988; Matteoli *et al.*, 1990; Bourque and Robitaille, 1998) (Zhan *et al.*, 2003). Moreover, PSCs possess receptors for these neuromodulators and some of them were shown to elicit and modulate calcium responses in PSCs (Bourque and Robitaille, 1998) (Todd *et al.*, 2007). Thus, the activity-dependent release of neuromodulators could be implicated in the fine tuning of nerve-evoked PSC Ca²⁺ responses. Another possibility to explain the striking effect of α -bungarotoxin treatment on nerve-evoked PSC calcium responses would be a redistribution of PSC purinergic and muscarinic receptors farther from release sites that would result in weaker activation of PSC receptors.

2.2.2.5.4. ROLES OF CALCIUM RESPONSES IN PSCs

Along with the modulation of PSC calcium responses, PSC calcium-dependent functions might also be altered. Among these functions, the regulation of transmitter release was suggested by a study showing that PSC calcium elevations are associated with delayed and transient increase of transmitter release. Increasing calcium buffering capacity with specific BAPTA injection into PSC, prior to high frequency stimulation, also enhanced synaptic depression (Castonguay and Robitaille, 2001). Such a role could be coherent with physiological properties of α -bungarotoxin-treated NMJs, which present stronger high-frequency depression and weaker PTP and are associated with smaller PSC calcium responses. Specific roles for purinergic and muscarinic signalling can also be envisaged, as different pathways are activated by different receptors.

In astrocytes, P2Y(2) signalling stimulates neuroprotective pathways, notably through the induction of genes for neurotrophins (Chorna *et al.*, 2004). The induction of such neuroprotective pathways in PSCs would be plausible considering their expression of neurotrophin mRNA and their ability to produce, internalize and release these molecules in culture (Yamamoto *et al.*, 1993) (Acheson *et al.*, 1991) (Alderson *et al.*, 2000). Moreover, the triggering of neuroprotective mechanisms in chronically stimulated NMJs would be consistent with exercise-induced neuroprotection (Charbonnier, 2007) and activity-dependent release of neurotrophic factors (Funakoshi *et al.*, 1995; Wehrwein *et al.*, 2002). Therefore, an increased sensitivity to ATP or an increased duration of ATP signalling in PSCs may result in a greater activation of neuroprotective mechanisms or reflect the need for such activation.

Among other roles, purinergic receptors were also found to regulate the synthesis of prostaglandin (Gebicke-Haerter *et al.*, 1988) and thromboxane A₂ (Pearce *et al.*, 1989) in cultured astrocytes. These molecules can also be produced by Schwann cells in vitro (Constable *et al.*, 1994) and arachidonic acid and prostaglandin synthesizing enzymes were found in frog PSCs (A. Pinard and D. Pappas,

unpublished observations). Besides, a potentiating effect on already depressed NMJs was shown for prostaglandin in frog preparations (Madden and van der Kloot, 1982), favouring its hypothetical role in the modulation of high-frequency induced synaptic depression.

On the other hand, muscarinic signalling in PSCs was shown to regulate glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression (Georgiou et al., 1994). Increasing the duration of muscarine-induced calcium responses could prevent the upregulation of GFAP and prevent the sprouting of PSC processes and successively, of nerve terminals. Considering that the sprouting frequency during the first 8 days of α -bungarotoxin blockade was shown not to be different than the sprouting normally associated with synaptic remodelling in frog *c.p.* muscle (Wines and Letinsky, 1991), it is likely that GFAP expression is maintained at low levels in these preparations, within this time window.

2.2.2.6. CONCLUSION

This study revealed that PSCs are highly plastic cells. They have the potential to adapt their properties to the level of synaptic activity. Their adaptation is bidirectional and underlies different functional roles for purinergic and muscarinic signalling in the regulation of synaptic structure and function. Our work also raised the need for understanding the functioning mode of PSCs as a coordinated ensemble regulating whole NMJs or as independent cells adapted to the specific needs of specific active zones and their associated postsynaptic densities.

2.2.2.7. REFERENCES

- Acheson A, Barker PA, Alderson RF, Miller FD, Murphy RA (1991) Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* 7:265-275.
- Alderson RF, Curtis R, Alterman AL, Lindsay RM, DiStefano PS (2000) Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. *Brain Res* 871:210-222.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.
- Belair EL, Vallee J, Robitaille R (2005) Long-term in vivo modulation of synaptic efficacy at the neuromuscular junction of *Rana pipiens* frogs. *J Physiol* 569:163-178.
- Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 512 (Pt 1):197-209.
- Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21:1911-1922.
- Charbonnier F (2007) Exercise-induced neuroprotection in SMA model mice: a means for determining new therapeutic strategies. *Mol Neurobiol* 35:217-223.
- Chorna NE, Santiago-Perez LI, Erb L, Seye CI, Neary JT, Sun GY, Weisman GA, Gonzalez FA (2004) P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J Neurochem* 91:119-132.
- Constable AL, Armati PJ, Toyka KV, Hartung HP (1994) Production of prostanoids by Lewis rat Schwann cells in vitro. *Brain Res* 635:75-80.
- Cooper RL, Warren WM, Ashby HE (1998) Activity of phasic motor neurons partially transforms the neuronal and muscle phenotype to a tonic-like state. *Muscle Nerve* 21:921-931.
- D'Alimonte I, Ciccarelli R, Di Iorio P, Nargi E, Buccella S, Giuliani P, Rathbone MP, Jiang S, Caciagli F, Ballerini P (2007) Activation of P2X(7) receptors stimulates the expression of P2Y(2) receptor mRNA in astrocytes cultured from rat brain. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20:301-316.
- De Winter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bar PR, Niclou SP, van Muiswinkel FL, Verhaagen J (2006) The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci* 32:102-117.

- Diaz J, Pecot-Dechavassine M (1989) Terminal nerve sprouting at the frog neuromuscular junction induced by prolonged tetrodotoxin blockade of nerve conduction. *J Neurocytol* 18:39-46.
- Diaz J, Molgo J, Pecot-Dechavassine M (1989) Sprouting of frog motor nerve terminals after long-term paralysis by botulinum type A toxin. *Neurosci Lett* 96:127-132.
- Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, Ibanez CF (1995) Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268:1495-1499.
- Gebicke-Haerter PJ, Wurster S, Schobert A, Hertting G (1988) P2-purinoceptor induced prostaglandin synthesis in primary rat astrocyte cultures. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 338:704-707.
- Georgiou J, Robitaille R, Charlton MP (1999) Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci* 19:3836-3846.
- Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP (1994) Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12:443-455.
- Hinz I, Wernig A (1988) Prolonged nerve stimulation causes changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 401:557-565.
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069-1077.
- Kamiya H, Zucker RS (1994) Residual Ca²⁺ and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371:603-606.
- Lnenicka GA, Atwood HL (1985) Long-term facilitation and long-term adaptation at synapses of a crayfish phasic motoneuron. *J Neurobiol* 16:97-110.
- Lnenicka GA, Zhao YG (1991) Seasonal differences in the physiology and morphology of crayfish motor terminals. *J Neurobiol* 22:561-569.
- Lnenicka GA, Atwood HL, Marin L (1986) Morphological transformation of synaptic terminals of a phasic motoneuron by long-term tonic stimulation. *J Neurosci* 6:2252-2258.
- Lubischer JL, Bebinger DM (1999) Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:RC46.
- Madden KS, van der Kloot W (1982) At the frog neuromuscular junction prostaglandin synthase inhibitors depress and PGE partially restores quantal acetylcholine release. *Brain Res* 234:464-468.

Matteoli M, Haimann C, De Camilli P (1990) Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 37:271-275.

Matteoli M, Haimann C, Torri-Tarelli F, Polak JM, Ceccarelli B, De Camilli P (1988) Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7366-7370.

Mercier AJ, Bradacs H, Atwood HL (1992) Long-term adaptation of crayfish neurons depends on the frequency and number of impulses. *Brain Res* 598:221-224.

Nudell BM, Grinnell AD (1982) Inverse relationship between transmitter release and terminal length in synapses on frog muscle fibers of uniform input resistance. *J Neurosci* 2:216-224.

Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17:7817-7830.

Pawson PA, Grinnell AD (1990) Physiological differences between strong and weak frog neuromuscular junctions: a study involving tetanic and posttetanic potentiation. *J Neurosci* 10:1769-1778.

Pearce B, Murphy S, Jeremy J, Morrow C, Dandona P (1989) ATP-evoked Ca²⁺ mobilisation and prostanoid release from astrocytes: P₂-purinergic receptors linked to phosphoinositide hydrolysis. *J Neurochem* 52:971-977.

Plomp JJ, van Kempen GT, Molenaar PC (1992) Adaptation of quantal content to decreased postsynaptic sensitivity at single endplates in alpha-bungarotoxin-treated rats. *J Physiol* 458:487-499.

Reid B, Martinov VN, Nja A, Lomo T, Bewick GS (2003) Activity-dependent plasticity of transmitter release from nerve terminals in rat fast and slow muscles. *J Neurosci* 23:9340-9348.

Robitaille R (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 15:7121-7131.

Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847-855.

Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP (1997) Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 504 (Pt 2):337-347.

Sheppard CA, Simpson PB, Sharp AH, Nucifora FC, Ross CA, Lange GD, Russell JT (1997) Comparison of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor distribution and

subcellular Ca²⁺ release sites that support Ca²⁺ waves in cultured astrocytes. *J Neurochem* 68:2317-2327.

Simpson PB, Mehotra S, Lange GD, Russell JT (1997) High density distribution of endoplasmic reticulum proteins and mitochondria at specialized Ca²⁺ release sites in oligodendrocyte processes. *J Biol Chem* 272:22654-22661.

Simpson PB, Mehotra S, Langley D, Sheppard CA, Russell JT (1998) Specialized distributions of mitochondria and endoplasmic reticulum proteins define Ca²⁺ wave amplification sites in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 52:672-683.

Snider WD, Harris GL (1979) A physiological correlate of disuse-induced sprouting at the neuromuscular junction. *Nature* 281:69-71.

Somasekhar T, Nordlander RH, Reiser PJ (1996) Alterations in neuromuscular junction morphology during fast-to-slow transformation of rabbit skeletal muscles. *J Neurocytol* 25:315-331.

Todd KJ, Robitaille R (2007) The outcome of synaptic plasticity is determined by pattern-dependent endogenous glial activity. *Society for Neuroscience Abstracts* 252.7/K23.

Todd KJ, Auld DS, Robitaille R (2007) Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci* 25:1287-1296.

Tsujimoto T, Umemiya M, Kuno M (1990) Terminal sprouting is not responsible for enhanced transmitter release at disused neuromuscular junctions of the rat. *J Neurosci* 10:2059-2065.

van Koppen CJ, Kaiser B (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* 98:197-220.

Wehrwein EA, Roskelley EM, Spitsbergen JM (2002) GDNF is regulated in an activity-dependent manner in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 26:206-211.

Wernig A, Pecot-Dechavassine M, Stover H (1980) Sprouting and regression of the nerve at the frog neuromuscular junction in normal conditions and after prolonged paralysis with curare. *J Neurocytol* 9:278-303.

Wernig A, Dorlochter M, Palazis P (1996) Differential sensitivity to Mg²⁺-and tubocurarine-block of frog neuromuscular junctions in summer and winter. *Neurosci Lett* 207:41-44.

Wines MM, Letinsky MS (1988) Motor nerve terminal sprouting in formamide-treated inactive amphibian skeletal muscle. *J Neurosci* 8:3909-3919.

Wines MM, Letinsky MS (1991) Inactivity-induced motor nerve terminal sprouting in amphibian skeletal muscles chronically blocked by alpha-bungarotoxin. *Exp Neurol* 111:115-122.

Wu LG, Betz WJ (1999) Spatial variability in release at the frog neuromuscular junction measured with FM1-43. *Can J Physiol Pharmacol* 77:672-678.

Yamamoto M, Sobue G, Li M, Arakawa Y, Mitsuma T, Kimata K (1993) Nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) mRNA levels in cultured rat Schwann cells; differential time- and dose-dependent regulation by cAMP. *Neurosci Lett* 152:37-40.

Zhan WZ, Mantilla CB, Sieck GC (2003) Regulation of neuromuscular transmission by neurotrophins. *Sheng Li Xue Bao* 55:617-624.

2.2.3. DISCUSSION DU DEUXIÈME ARTICLE

Les objectifs de ce deuxième article étaient de trois ordres. D'abord, il s'agissait de développer un modèle de blocage *in vivo* des nAChRs chez la grenouille; puis de déterminer la plasticité synaptique à court terme des JNMs soumises à un changement chronique de l'activité synaptique; et enfin de caractériser les propriétés gliales dans ces JNMs.

2.2.3.1. DÉVELOPPER UN MODÈLE DE BLOCAGE *IN VIVO* DES NACHRS

Le modèle de blocage *in vivo* des nAChRs a été développé chez la grenouille en réponse à une lacune du modèle existant, qui multipliait les incisions cutanées en périphérie du muscle *c.p.* et augmentait ainsi les risques d'inflammation (Wines and Letinsky, 1991). Le modèle développé, décrit en détail dans l'article et représenté à la Figure 1, remplit bien ce mandat, en permettant le blocage des nAChRs par l'entremise d'une incision cutanée distale au *c.p.* qui préserve l'intégrité de ce dernier.

FIGURE 1. MODÈLE DE BLOCAGE *IN VIVO* DES NACHRS CHEZ LA GRENOUILLE

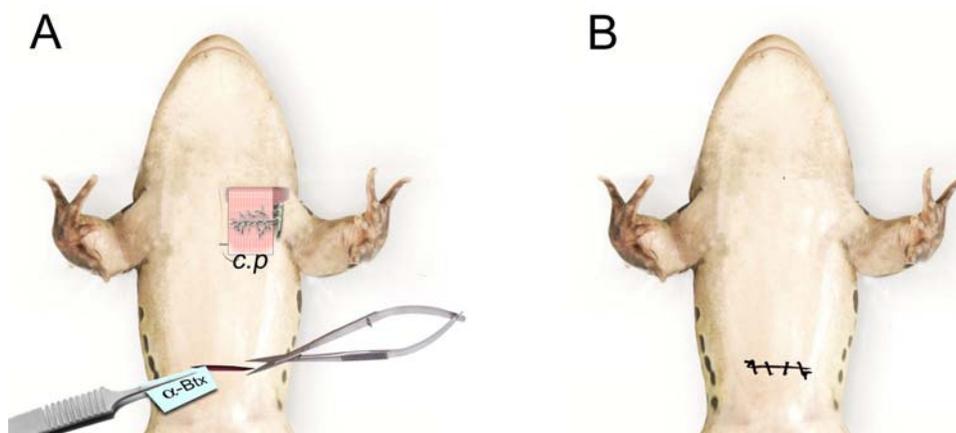


FIGURE 1. MODÈLE DE BLOCAGE *IN VIVO* DES NACHRS CHEZ LA GRENOUILLE.

(A) Un papier buvard imbibé d' α -bungarotoxine est inséré entre la peau et le muscle *c.p.* via une incision distale à ce dernier. Le papier est déposé délicatement sur le muscle et y est laissé pendant 30 minutes. (B) Au bout de cette période, le papier est retiré par l'incision et celle-ci est refermée au moyen de 3 à 4 points de suture. La même intervention est répétée au bout de trois jours.

Figure 1. Modèle de blocage *in vivo* des nAChRs chez la grenouille

2.2.3.2. DÉTERMINER LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À COURT-TERME DES JNMs SOUMISES À UN CHANGEMENT CHRONIQUE DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE

Les changements induits par le blocage chronique des nAChRs et la stimulation nerveuse chronique à l'aide des modèles développés permettent également de valider ces derniers. D'une part, nos résultats concernant la facilitation diminuée et la dépression accentuée dans les JNMs chroniquement bloquées sont cohérents avec l'augmentation de l'efficacité présynaptique relatée dans la littérature (Plomp et al., 1992). D'autre part, la facilitation augmentée et la plus grande résistance à la dépression des JNMs stimulées corroborent aussi les changements rapportés dans la littérature (Lnenicka and Atwood, 1985; Hinz and Wernig, 1988; Cooper et al., 1998; Reid et al., 2003) et sont en accord avec une réduction d'efficacité présynaptique (Atwood, 1976; Nudell and Grinnell, 1982; Bradacs et al., 1997).

Cependant, nos résultats concernant la PTP inchangée dans les JNMs stimulées et réduite dans les JNMs bloquées chroniquement vont à l'encontre de l'observation selon laquelle l'amplitude et la durée de la PTP seraient directement proportionnelles à l'efficacité présynaptique, à la JNM de grenouille (Pawson and Grinnell, 1990), et suggèrent que les mécanismes à l'origine de ces deux phénomènes sont dissociables, de façon cohérente avec l'hypothèse de senseurs de Ca^{2+} distincts pour la neurotransmission basale et la PTP.

2.2.3.3. CARACTÉRISER LES PROPRIÉTÉS GLIALES DANS LES JNMs SOUMISES À UN CHANGEMENT CHRONIQUE DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE

Nos résultats démontrent le grand potentiel de plasticité des CSPs, lesquelles adapteraient leur signalisation calcique au niveau d'activité synaptique, d'une part, en ajustant leur sensibilité aux neurotransmetteurs et, d'autre part, en ajustant la cinétique de leurs réponses calciques. Ces deux types d'adaptation pourraient

survenir de façon concomitante, mais également de façon indépendante, suggérant que leur induction requiert une signalisation distincte.

L'ajustement de la sensibilité aux neurotransmetteurs impliquerait probablement une régulation de l'expression, de l'affinité ou du couplage des récepteurs gliaux. Cette régulation serait bidirectionnelle et pourrait donc résulter en une augmentation ou une diminution de la sensibilité. La conséquence d'un tel changement de sensibilité serait principalement liée au nombre de CSPs répondant à l'activité neuronale par une élévation calcique (Figure 2). Par ailleurs, la sensibilité aux différents neurotransmetteurs pourrait être régulée de façon opposée et impliquerait donc des signaux distincts. Cette régulation opposée suggère, en outre, que les voies de signalisation muscarinique et purinergique remplissent des rôles spécifiques et que ceux-ci doivent être finement ajustés aux besoins de la synapse.

L'ajustement de la cinétique des réponses calciques gliales impliquerait, quant à lui, la régulation des mécanismes de gestion du Ca^{2+} . Cette régulation serait fonction de la sensibilité initiale de la cellule et affecterait différents paramètres de la réponse calcique. La mobilisation, la chélation, la séquestration et l'extrusion du Ca^{2+} seraient donc étroitement et sélectivement régulés par l'activité synaptique dans des populations de CSPs ayant une sensibilité donnée aux neurotransmetteurs.

Enfin, la plasticité des CSPs laisse supposer que leur rétroaction à la synapse puisse être modifiée par l'activité synaptique et que, à son tour, l'activité synaptique puisse être modifiée en réponse à cette rétroaction. Le maintien d'une activité synaptique dans des limites physiologiquement acceptables serait donc le résultat d'une communication réciproque et continue entre les différents éléments de la synapse et impliquerait la plasticité de chacun des éléments. Ce niveau d'activité synaptique pourrait, par ailleurs, être encodé dans le nombre de CSPs répondant par une élévation calcique et dans l'amplitude et la durée des réponses.

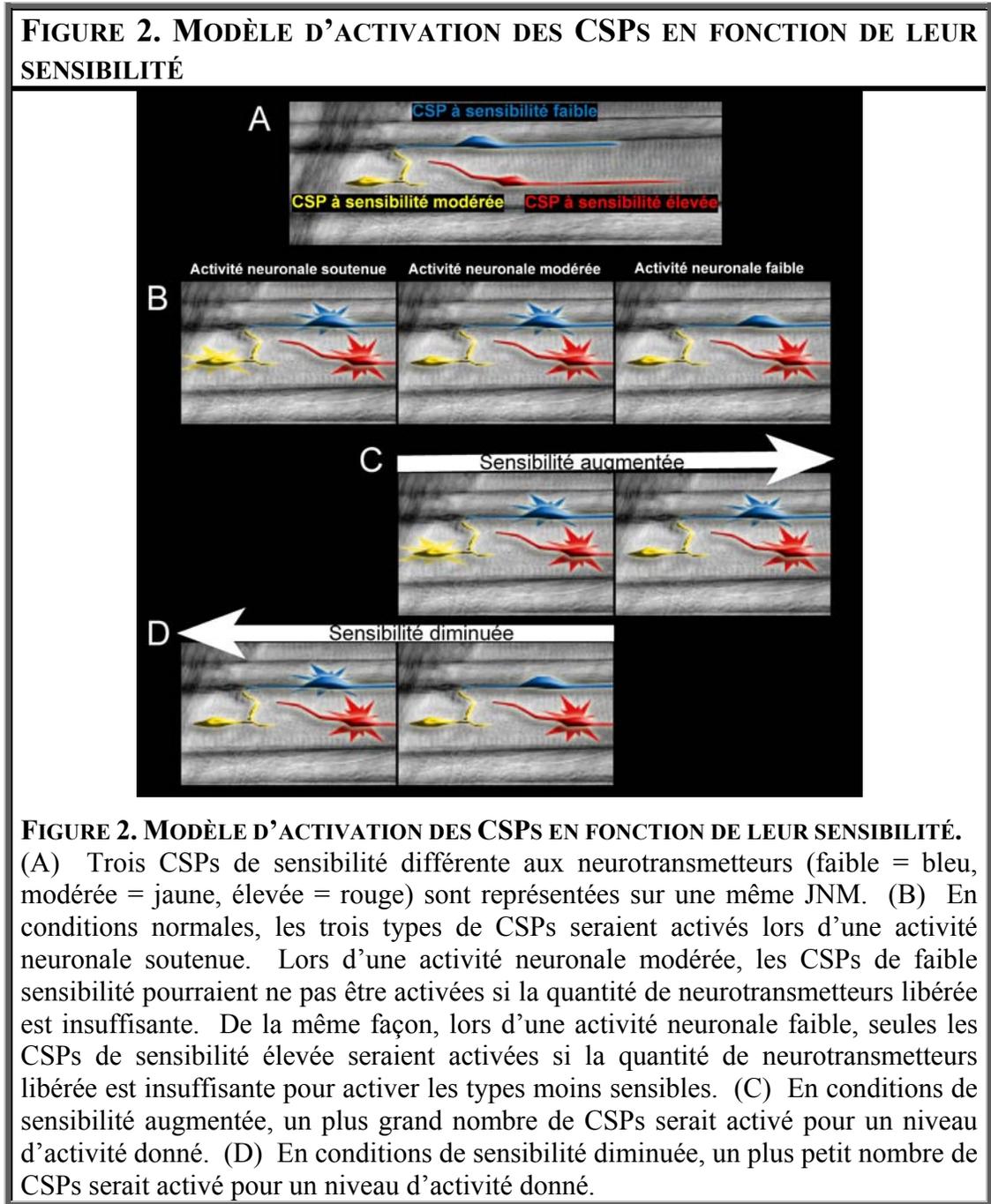


Figure 2. Modèle d'activation des CSPs en fonction de leur sensibilité

2.2.4. CONCLUSION DU DEUXIÈME ARTICLE

La diversité des adaptations gliales en réponse à une altération chronique de l'activité synaptique laisse supposer une étroite communication entre la synapse et la CSP et un encodage complexe de l'information synaptique dans la signalisation calcique gliale. Entendu que les changements de concentration de Ca^{2+} intracellulaire soient à l'origine d'une variété de réponses biologiques dans la plupart des types cellulaires, les élévations calciques gliales et leur régulation fine suggèrent l'importance de ce phénomène pour la fonction gliale. Aussi, l'identification des rôles des différentes voies de signalisation intracellulaire permettra sans doute de mieux comprendre la contribution des CSPs au bon fonctionnement de la synapse, au maintien d'un facteur de sécurité optimal et à l'intégration de l'information.

3. DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans cette thèse, nous avons fait un survol des facteurs présynaptiques, postsynaptiques et gliaux qui déterminent le facteur de sécurité et assurent ainsi la fidélité de la neurotransmission dans la plupart des situations, même pathologiques. Nous avons également passé en revue les adaptations de ces différents facteurs, en réponse à un changement aigu ou chronique de l'activité synaptique. Celles-ci témoignent de l'immense potentiel de plasticité des JNMs et suggèrent l'importance d'une régulation fine du facteur de sécurité pour le maintien de la fonction neuromusculaire. Afin d'assurer cette régulation, les trois composants de la JNM doivent être en mesure d'intégrer les informations relatives au niveau d'activité synaptique et d'ajuster leurs propriétés conséquemment. Les expériences présentées mettent principalement en relation les adaptations présynaptiques et gliales en réponse à une augmentation ou une réduction chronique de l'activité synaptique. Ces adaptations sont discutées dans les sections suivantes en termes d'efficacité présynaptique et de signalisation calcique présynaptique et gliale. De plus, un parallèle entre les mécanismes présynaptiques et gliaux, possiblement impliqués dans ces adaptations est établi. Enfin, l'hétérogénéité des CSPs, le rôle de leurs réponses calciques, la succession temporelle des changements synaptiques et les implications cliniques des adaptations gliales sont examinés.

3.1. ADAPTATIONS DES SIGNAUX CALCQUES PRÉSYNAPTQUES ET GLIAUX EN RÉPONSE AUX CHANGEMENTS D'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE

L'importance du Ca^{2+} dans la physiologie des cellules est bien connue, ses mouvements à l'intérieur et hors du cytoplasme constituant un signal pour de nombreux processus cellulaires, tels que la sécrétion, la libération de vésicules synaptiques, la contraction et la régulation de la transcription génique. Dans le système nerveux, le Ca^{2+} constitue d'ailleurs l'un des principaux messagers seconds impliqué dans la plasticité synaptique. Dans cette thèse nous renforçons son

importance en démontrant la régulation de cet ion au niveau présynaptique et glial dans les phénomènes de plasticité à long-terme.

Nos résultats d'imagerie calcique supportent, en effet, des changements dépendants de l'activité synaptique au niveau des mécanismes de gestion du Ca^{2+} . Ces mécanismes comprennent son entrée dans le cytoplasme par les canaux calciques voltage-dépendants, sa chélation par différentes protéines de liaison, sa séquestration dans les organelles, sa mobilisation à partir de ceux-ci et son extrusion.

3.1.1. ADAPTATIONS DU SIGNAL CALCIQUE PRÉSYNAPTIQUE

Au niveau présynaptique, l'augmentation chronique de l'activité synaptique accentuerait l'influx ou la disponibilité du Ca^{2+} pénétrant dans la terminaison nerveuse par unité de temps, suivant l'arrivée d'un potentiel d'action. À basse fréquence de stimulation, il en résulte un signal calcique d'amplitude supérieure dans les JNMs stimulées chroniquement. Par contre, le taux d'extrusion ou de séquestration du Ca^{2+} serait augmenté, de sorte que la déclinaison du signal calcique suivant l'atteinte d'un maximum est accélérée dans les JNMs stimulées. Toutefois, lors d'une stimulation à plus haute fréquence, les différences de signal calcique entre les JNMs stimulées et témoins s'estompent, suggérant que les mécanismes d'extrusion ou de séquestration du Ca^{2+} puissent être recrutés davantage dans les premières. Parmi ces mécanismes possibles, notons une facilitation de la séquestration mitochondriale du Ca^{2+} .

3.1.1.1. MITOCHONDRIES

Chez la grenouille, la séquestration du Ca^{2+} par les mitochondries serait dépendante de la concentration intracellulaire de cet ion. En outre, l'inhibition de ces organelles prolongerait significativement le décours temporel des signaux calciques induits par une stimulation nerveuse à fréquence élevée (Suzuki et al., 2002). Par conséquent, une plus grande contribution des mitochondries dans la séquestration du Ca^{2+} permettrait d'estomper les différences de signal calcique entre les JNMs stimulées et témoins à haute fréquence de stimulation. Une telle adaptation des mécanismes de

clairance du Ca^{2+} est d'ailleurs à envisager étant donné que nous avons démontré une augmentation du métabolisme mitochondrial dans les JNMs stimulées. Cette adaptation serait également supportée par les observations faites chez l'écrevisse, où les motoneurones phasiques stimulés chroniquement présentent un signal calcique de plus faible amplitude suivant l'application d'un ionophore (Fengler and Lnenicka, 2002). De plus, dans cette préparation, le diamètre des mitochondries serait doublé et elles seraient localisées plus près de la synapse (Lnenicka et al., 1986). De même, la densité des mitochondries serait augmentée dans les terminaisons nerveuses des JNMs de lapin stimulées chroniquement (Somasekhar et al., 1996).

3.1.1.2. LIEN ENTRE LE CALCIUM ET LA PHYSIOLOGIE DU NEURONE

Compte tenu de l'importance du Ca^{2+} dans les fonctions cellulaires et de la gestion rigoureuse de ses mouvements à l'intérieur et hors du cytoplasme, les adaptations du signal calcique présynaptique sont susceptibles d'affecter la physiologie du neurone. D'ailleurs, la chélation du Ca^{2+} par les mitochondries limiterait l'augmentation de la fréquence de libération spontanée pendant la stimulation à haute fréquence, préviendrait ainsi la déplétion vésiculaire et augmenterait conséquemment la résistance à la dépression des JNMs stimulées (David and Barrett, 2003; Talbot et al., 2003). De même, la production d'ATP par les mitochondries pourrait favoriser la mobilisation des vésicules synaptiques et prévenir leur déplétion lors de stimulations soutenues (Nguyen et al., 1997; Verstreken et al., 2005). Nos résultats ne supportent toutefois pas un lien direct entre le signal calcique et la détermination de l'efficacité présynaptique. En effet, malgré un signal calcique supérieur à basse fréquence de stimulation, les JNMs stimulées auraient un contenu quantique deux fois plus petit que les JNMs témoins. Des effecteurs en aval du signal calcique devraient donc être impliqués dans sa détection et sa transduction, puis être capables de moduler directement ou indirectement la machinerie exocytotique. Les protéines potentiellement impliquées dans la transduction du signal calcique sont présentées dans les sections suivantes.

3.1.1.3. TRANSDUCTEURS DU SIGNAL CALCIQUE

Parmi les transducteurs possibles du signal calcique, notons certaines protéines de liaison au Ca^{2+} , telles que la frequenine et la calmoduline, de même que la CaMKII, dont l'activité est régulée par la calmoduline.

3.1.1.3.1. FREQUENINE

Dans cette thèse, nous avons vérifié l'implication possible de la frequenine dans la détermination de l'efficacité présynaptique. Nos résultats suggèrent toutefois que l'expression de cette protéine n'est pas affectée par la stimulation nerveuse chronique. Son association avec la membrane cytoplasmique pourrait cependant être régulée par l'activité synaptique et moduler son interaction avec d'autres protéines capables de modifier l'efficacité de la synapse. D'ailleurs, l'homologue de la frequenine, le NCS-1, activerait directement certaines cibles de la calmoduline et potentialiserait l'activité de cette dernière (Schaad et al., 1996).

Par contre, en raison de sa haute affinité pour le Ca^{2+} ($K_d = 100$ nM) la frequenine pourrait être plus adaptée pour détecter les faibles variations de concentration de cet ion. Elle pourrait ainsi permettre aux neurones de réagir rapidement lors de changements aigus et subtils dans les signaux calciques. Aussi, la calmoduline pourrait constituer un meilleur candidat pour la détermination à long-terme de l'efficacité présynaptique, à cause de son affinité 10 fois plus faible pour le Ca^{2+} et sa capacité à détecter des augmentations soutenues dans la concentration de cet ion (Burgoyne and Weiss, 2001).

3.1.1.3.2. CALMODULINE

La calmoduline, tout comme la frequenine, appartient au groupe de protéines de liaison au Ca^{2+} possédant des domaines hélice-boucle-hélice (EF-hand domain). Elle change aussi de conformation suivant sa liaison au Ca^{2+} , ce qui lui confère son activité et lui permet d'interagir avec de nombreuses protéines effectrices. La calmoduline peut également être sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation. Sa

localisation cellulaire serait, de plus, régulée par le Ca^{2+} . Ainsi, au repos, elle serait liée à différentes protéines, alors que son activation par le Ca^{2+} la libèrerait de ces liens et favoriserait sa mobilisation vers différents compartiments cellulaires où elle pourrait réguler l'activité de ses effecteurs (Chin, 2005). Des modifications, dépendantes de l'activité, de sa conformation, de sa composition moléculaire, de sa localisation ou de sa mobilité pourraient donc influencer ses interactions avec ses effecteurs et participer à la détermination de l'efficacité présynaptique. D'ailleurs, l'introduction de la calmoduline dans les terminaisons nerveuses du muscle *sartorius* de grenouille, à l'aide de liposomes, augmenterait la libération quantique, possiblement en augmentant le nombre de sites occupés par les vésicules synaptiques. Au contraire, l'introduction d'un anticorps contre la calmoduline endogène réduirait cette libération. L'effecteur impliqué dans ces effets serait probablement un membre de la famille des kinases dépendantes de la Ca^{2+} /calmoduline, la CaMKII (Brailoiu et al., 2002).

3.1.1.3.3. CAMKII

La CaMKII forme des complexes de 6 à 12 sous-unités, constituants des holoenzymes homo- ou hétéro-multimériques. Il existe, en effet, différents isoformes de la CaMKII (α , β , γ , δ) présentant chacun une affinité différente pour la Ca^{2+} /calmoduline. En absence de cette dernière, le domaine régulateur des kinases inhibent leur activité. Suivant la liaison de deux calmodulines à leur domaine d'association, les CaMKII activées s'autophosphorylent les unes les autres. Cette autophosphorylation augmente leur affinité pour le complexe Ca^{2+} /calmoduline et leur permet de demeurer actives de façon autonome (Chin, 2005), prolongeant ainsi les effets d'une élévation calcique. En raison de cette activité autonome, les CaMKII constituent d'excellents candidats pour détecter l'activité synaptique, encodée dans le signal calcique. Les CaMKII pourraient, de plus, réguler l'efficacité présynaptique et le métabolisme mitochondrial. Ces fonctions sont discutées, en regard de nos résultats, dans les sections suivantes.

3.1.1.3.3.1. DÉTERMINATION DE L'EFFICACITÉ PRÉSYPNAPTIQUE

Un changement d'expression de la CaMKII pourrait être impliqué dans la détermination de l'efficacité présynaptique des JNMs stimulées chroniquement. En effet, dans les neurones hippocampiques en culture, l'expression de l' α -CaMKII serait augmentée et celle de la β -CaMKII, diminuée en réponse à une augmentation chronique de l'activité synaptique, induite par la bicuculline. Également, la transfection de l' α -CaMKII dans ces neurones diminuerait la fréquence de libération spontanée (Thiagarajan et al., 2002), de façon cohérente avec nos résultats. En outre, l'injection de CaMKII dans l'axone géant de calmar faciliterait la libération évoquée de neurotransmetteurs, possiblement via la phosphorylation de la synapsine I et la dissociation de cette dernière d'avec le cytosquelette ou les vésicules synaptiques (Llinas et al., 1991). Ainsi, la CaMKII produirait son effet en augmentant le nombre de sites occupés par les vésicules synaptiques, en accord avec sa régulation par la calmoduline (Brailoiu et al., 2002). Dans cette optique, un changement au niveau de l'activité constitutive des CaMKII pourrait aussi être impliqué dans la détermination de l'efficacité présynaptique. D'ailleurs, chez le rat, l'augmentation chronique de l'activité synaptique par l'exercice physique, augmenterait la proportion de CaMKII autophosphorylées (Fluck et al., 2000).

Une régulation des CaMK serait aussi susceptible d'intervenir dans l'augmentation de l'efficacité présynaptique résultant du traitement chronique à l' α -bungarotoxine. En effet, une réduction prolongée de l'activité synaptique modulerait l'expression de la γ -CaMKII à la JNM de rat dénervé. Celle-ci serait effectivement augmentée dans le *soleus* au bout de 20 jours après la transection du nerf sciatique (Chin, 2004). Dans les neurones hippocampiques en culture, un blocage de l'activité synaptique par la TTX diminuerait également l'expression de l' α -CaMKII et augmenterait celle de la β -CaMKII. En outre, la transfection de la β -CaMKII dans ces neurones augmenterait la fréquence de libération spontanée (Thiagarajan et al., 2002). Enfin, chez le rat, l'augmentation du contenu quantique induit par l' α -bungarotoxine requerrait l'activité de la CaMKII. Ainsi, en présence d'un inhibiteur des kinases à large spectre, le K252a, ou d'un inhibiteur sélectif de la CaMKII, le KN62, le contenu

quantique des JNMs traitées à l' α -bungarotoxine serait réduit (Plomp and Molenaar, 1996).

Par conséquent, l'activité synaptique pourrait réguler différemment l'expression et le taux d'autophosphorylation des CaMK et ainsi modifier l'efficacité présynaptique et les phénomènes de plasticité dans les JNMs traitées chroniquement.

3.1.1.3.3.2. RÉGULATION DES MITOCHONDRIES

Parallèlement à leur effet sur l'efficacité présynaptique, les CaMKII pourraient être impliquées dans la biogénèse des mitochondries. En effet, chez l'humain, l'exercice unilatéral de la jambe pendant trois semaines augmenterait, de façon corrélée, l'expression des gènes mitochondriaux et l'expression des isoformes β , γ et δ de la CaMKII, de même que l'activité de cette dernière dans le muscle entraîné. Le taux d'autophosphorylation de la CaMKII serait également augmenté, signe de son activité constitutive, c'est-à-dire indépendante de la Ca^{2+} /calmoduline (Rose et al., 2007). La surexpression d'un autre isoforme des CaMK, la CaMKIV, normalement peu ou pas exprimée dans le muscle squelettique, augmenterait aussi l'expression des gènes mitochondriaux et le volume occupé par les mitochondries dans les fibres musculaires de souris transgéniques. Elle induirait également l'expression d'un régulateur important de la biogénèse des mitochondries, soit le PGC1 (peroxysome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1) (Wu et al., 2002).

Ainsi, par leur régulation dépendante de l'activité, leur rôle dans la biogénèse des mitochondries et dans la libération de neurotransmetteurs, les CaMK seraient susceptibles d'être impliquées dans les changements calciques et de neurotransmission observés dans les JNMs stimulées chroniquement.

3.1.1.3.3.3. DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE

La CaMKII constituerait également un candidat de choix pour détecter le niveau d'activité synaptique, encodé dans les propriétés spatio-temporelles des réponses calciques. L'autophosphorylation des CaMKII serait, en effet, sensible à la

concentration de Ca^{2+} /calmoduline et à l'aspect cinétique des réponses calciques. Ainsi, chez les CaMKII immobilisées *in vitro*, l'autophosphorylation serait directement reliée à la fréquence de stimulation à l'aide de la calmoduline. Aussi, à une fréquence de stimulation élevée, la calmoduline pourrait être accumulée sur les CaMKII, augmentant ainsi la probabilité d'autophosphorylation et le pourcentage d'autonomie atteint. Ce dernier serait également proportionnel à la durée de la stimulation et à la concentration de calmoduline. L'induction de l'autonomie des CaMKII serait, de plus, influencée par leur taux initial d'autophosphorylation. En effet, une autophosphorylation partielle des CaMKII abaisserait le seuil de stimulation requis pour une augmentation subséquente de l'autonomie. De ce fait, les CaMKII pourraient garder en mémoire l'activité antérieure d'une synapse (De Koninck and Schulman, 1998).

Par ailleurs, la proportion des différents isoformes de CaMKII dans les complexes multimériques influencerait aussi la probabilité d'autophosphorylation, compte tenu de leur affinité différente pour la calmoduline. Par exemple, l' α -CaMKII serait sélective pour les concentrations élevées de Ca^{2+} /calmoduline, tandis que la β -CaMKII serait effective à des concentrations plus faibles (De Koninck and Schulman, 1998). De ce fait, l'augmentation de l'expression de l' α -CaMKII et la diminution de la β -CaMKII résultant de l'augmentation de l'activité synaptique dans les neurones d'hippocampe en culture leur permettrait de détecter des niveaux élevés de Ca^{2+} , en plus de réguler à la baisse leur efficacité présynaptique. À l'inverse, les neurones bloqués chroniquement auraient une plus grande efficacité présynaptique et seraient plus efficaces pour détecter de faibles concentrations de Ca^{2+} , par la régulation à la hausse de la β -CaMKII et la régulation à la baisse de l' α -CaMKII (Thiagarajan et al., 2002). En outre, les produits de l'épissage alternatif pour chacun de ces isoformes présenteraient différentes affinités pour la calmoduline et différents taux d'autophosphorylation (Bayer et al., 2002). Ainsi, les CaMKII seraient sensibles à la fréquence des oscillations calciques et l'expression de leurs isoformes ainsi que leurs modifications post-transcriptionnelle permettraient de réguler cette sensibilité.

De par leur capacité à détecter l'activité synaptique encodée dans les mouvements du Ca^{2+} , les CaMK et leurs régulateurs pourraient bien orchestrer les adaptations présynaptiques résultant d'un changement chronique de l'activité synaptique. L'étude de leurs changements d'expression et de leur régulation dans les JNMs stimulées ou bloquées chroniquement pourrait donc nous en dire davantage sur la détermination de l'efficacité présynaptique et la modulation des phénomènes de plasticité.

3.1.2. ADAPTATIONS DU SIGNAL CALCIQUE GLIAL

Au niveau glial, l'augmentation chronique de l'activité synaptique augmenterait et diminuerait la sensibilité des CSPs pour l'ATP et la muscarine, respectivement. Les mécanismes de gestion du Ca^{2+} seraient également altérés de façon dépendante de la voie de signalisation et de la sensibilité initiale de la cellule au neurotransmetteur. Ainsi, la durée des réponses calciques gliales et la quantité de Ca^{2+} libéré suivant l'application locale d'ATP seraient augmentées spécifiquement dans les CSPs de faible sensibilité pour cet agoniste. Au contraire, les réponses calciques muscariniques ne seraient pas altérées. Ces adaptations spécifiques des voies purinergiques et muscariniques n'auraient toutefois pas un effet significatif sur les propriétés des réponses calciques induites par la stimulation nerveuse à 40 Hz puisque ces réponses seraient similaires à celles évoquées dans les JNMs témoins.

La réduction chronique de l'activité synaptique augmenterait, elle aussi, la durée des réponses calciques gliales induites par l'ATP. Elle augmenterait également la pente ascendante, l'amplitude et la durée des réponses calciques muscariniques dans les CSPs de sensibilité élevée pour cet agoniste. En dépit de ces adaptations, les réponses calciques évoquées par la stimulation nerveuse à 40 Hz seraient étonnamment réduites et retardées par rapport aux JNMs témoins.

3.1.2.1. MÉCANISMES DES ADAPTATIONS GLIALES

Les CSPs possèdent une variété de récepteurs pour les différents neurotransmetteurs et neuromodulateurs. Les récepteurs couplés à la PLC et à la production d' IP_3 sont

impliqués dans la mobilisation du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires et sont généralement à l'origine des réponses calciques gliales (Robitaille, 1995) (Robitaille et al., 1997). Ces dernières peuvent donc être régulées à plusieurs niveaux : d'abord au niveau de la sensibilité, de la densité, de la distribution et de l'expression des récepteurs aux neurotransmetteurs, puis au niveau des IP_3Rs . Ceux-ci sont également sensibles à la concentration de Ca^{2+} et donc sous l'influence des mécanismes de séquestration de cet ion. De ce fait, les mitochondries, de même que la protéine de liaison au Ca^{2+} , calréticuline, moduleront l'activité des IP_3Rs et la réponse calcique gliale. De plus, différentes accessibilités aux réserves calciques des voies de signalisation et diverses interactions ces dernières affecteront aussi les paramètres de cette réponse. Celle-ci pourra, enfin, être influencée par la morphologie des prolongements gliaux et leur pénétration plus ou moins importante dans la fente synaptique. Par conséquent, des modifications dépendantes de l'activité de ces différents niveaux de régulation pourraient être à l'origine des adaptations gliales décrites précédemment. Ces mécanismes potentiels sont décrits dans les sections qui suivent.

3.1.2.1.1. RÉCEPTEURS AUX NEUROTRANSMETTEURS

Chez les astrocytes, l'expression des récepteurs purinergiques serait très sensible à l'activité synaptique. Par exemple, dans les astrocytes de rat en culture, la stimulation des récepteurs P_2X_7 augmenterait l'expression de l'ARNm codant pour les récepteurs P_2Y_2 . Cette augmentation serait également accompagnée d'une potentialisation des réponses calciques induites par un agoniste des récepteurs P_2Y_2 (D'Alimonte *et al.*, 2007). Une réduction drastique de l'activité synaptique, résultant d'une dégénérescence axonale du nerf optique chez le rat juvénile, serait également à l'origine d'un changement dans le profil purinergique des astrocytes. Ceux-ci exprimeraient normalement les récepteurs P_2 dans la proportion suivante : $\text{P}_2\text{Y}_1 \gg \text{P}_2\text{Y}_{2/4} \gg \text{P}_2\text{X}$. Après dénervation, l'expression des récepteurs P_2Y_1 , $\text{P}_2\text{Y}_{2/4}$ et P_2X serait équivalente. Aussi, comme ces récepteurs possèdent une affinité différente pour les agonistes purinergiques, la sensibilité à l'ATP des astrocytes s'en trouverait modifiée. De ce fait, la durée des réponses induites par l'ATP serait

significativement augmentée (James and Butt, 2001). Chez les CSPs, une régulation similaire des récepteurs P₂ par l'activité synaptique est donc envisageable. Ainsi, l'augmentation de leur sensibilité pour l'ATP dans les JNMs stimulées chroniquement pourrait résulter d'une régulation à la hausse du nombre de récepteurs P₂ ou d'un changement dans le type de récepteurs exprimé. En ce sens, il serait intéressant de mesurer l'expression de ces différents récepteurs et de leurs ARNm dans les CSPs des JNMs traitées chroniquement et de départager la contribution des récepteurs métabotropiques et ionotropiques au signal calcique.

Dans le même ordre d'idées, la réduction de la sensibilité des CSPs pour la muscarine pourrait impliquer un changement dans l'expression ou l'activité des récepteurs muscariniques. Ces récepteurs sont en effet hautement régulés suivant leur activation par un agoniste. Ainsi, leur phosphorylation par différentes kinases les découplerait d'avec les protéines G et terminerait donc précocement leur activation par un agoniste ou les rendrait insensibles à une activation ultérieure. La phosphorylation des récepteurs muscariniques pourrait également faciliter leur internalisation après une activation soutenue (van Koppen and Kaiser, 2003). Par conséquent, la libération tonique d'ACh pendant la stimulation nerveuse chronique pourrait être à l'origine d'une réduction du nombre de récepteurs muscariniques fonctionnels dans les CSPs.

Par ailleurs, la stimulation nerveuse chronique pourrait modifier ou induire l'oligomérisation des récepteurs muscariniques. En effet, la pharmacologie atypique des récepteurs muscariniques des CSPs de grenouille pourrait résulter de la formation de dimères ou d'oligomères (van Koppen and Kaiser, 2003). Dans ce modèle, les récepteurs muscariniques sont normalement insensibles à l'atropine. Or, une réduction de l'activité synaptique changerait cette pharmacologie. Ainsi, la dénervation du *c.p.* n'affecterait pas l'amplitude des réponses calciques induites par la muscarine, mais les rendrait sensibles à l'atropine qui les inhiberait alors complètement (Robitaille et al., 1997). L'arrangement ou la conformation des récepteurs muscariniques pourrait donc être régulé par l'activité synaptique. Cet

arrangement pourrait, de plus, affecter la sensibilité des récepteurs muscariniques pour la muscarine. Aussi, serait-il intéressant de vérifier la sensibilité à l'atropine des réponses muscariniques gliales dans les JNMs traitées chroniquement. Quoiqu'il en soit, les adaptations de la pharmacologie des récepteurs muscariniques révèlent leur grande plasticité dans les CSPs de grenouille et permettent d'envisager leur modulation lors d'un changement chronique de l'activité synaptique.

3.1.2.1.2. RÉCEPTEURS À L'IP₃

Les cultures d'astrocytes, provenant de cortex de rats néonataux, exprimeraient les IP₃R de types 1, 2 et 3, selon différentes distributions : les types 1 et 3 se retrouveraient principalement autour de la région nucléaire alors que le type 2 serait aussi enrichi dans les prolongements astrocytaires (Sheppard et al., 1997). Chez le rat adulte, il n'existe pas encore de consensus quant aux types d'IP₃R exprimés par les astrocytes *in situ*. Différentes études ont cependant démontré la présence exclusive des types 2 (Holtzclaw et al., 2002) ou 3 (Yamamoto-Hino et al., 1995). L'absence de consensus sur le ou les types d'IP₃R exprimés par les astrocytes pourrait être la conséquence des techniques expérimentales utilisées, mais pourrait également refléter la plasticité de ces récepteurs. Aussi, un changement dans l'expression des IP₃R pourrait modifier leur seuil d'activation et ainsi affecter la sensibilité des cellules pour les différents neurotransmetteurs (Sheppard et al., 1997).

Par ailleurs, dans les astrocytes en culture, la distribution des IP₃R de type 2 le long du réticulum endoplasmique serait non-uniforme. Aussi, une grande densité locale de ces récepteurs serait corrélée avec une accélération de la libération de Ca²⁺ et une plus grande amplitude des réponses calciques induites par un agoniste (Sheppard et al., 1997). Par conséquent, l'amplification des réponses calciques induites par l'ATP ou la muscarine, dans les CSPs des JNMs traitées, pourrait impliquer un changement au niveau de la distribution et de la densité des IP₃R.

Ainsi, l'identification des IP₃R exprimés par les CSPs de même que la caractérisation de leur distribution dans les JNMs témoins et traitées chroniquement pourrait

améliorer notre compréhension des mécanismes régulant les réponses calciques gliales.

3.1.2.1.3. MITOCHONDRIES

L'amplification des réponses calciques gliales pourrait également faire intervenir un changement au niveau de la distribution, de la densité ou de l'activité des mitochondries. En effet, les IP₃R étant inactivés par le Ca²⁺, la présence de mitochondries actives à proximité des zones de haute densité en IP₃R permettrait d'abaisser la concentration de Ca²⁺ à leur embouchure et de prolonger leur durée d'ouverture. D'ailleurs, la localisation des mitochondries dans les astrocytes et les oligodendrocytes en culture serait corrélée avec les sites d'amplification des signaux calciques (Simpson et al., 1997; Simpson et al., 1998). De plus, les oscillations calciques induites par l'IP₃ dans les astrocytes seraient accompagnées d'oscillations similaires dans les mitochondries. Également, l'inhibition de l'activité mitochondriale réduirait considérablement l'amplitude des réponses calciques induites par l'IP₃ (Simpson et al., 1998). Enfin, une diminution de la capacité de séquestration mitochondriale du Ca²⁺ dans les astrocytes de souris vieillissantes serait responsable de l'augmentation de l'amplitude des réponses calciques induites par l'ATP (Lin et al., 2007).

3.1.2.1.4. CALRÉTICULINE

L'amplification des réponses calciques gliales pourrait aussi faire intervenir un changement au niveau de la distribution et de la densité de la protéine de liaison au Ca²⁺, calréticuline. Cette protéine permettrait, en effet, de concentrer le Ca²⁺ près de ses sites de libération et modulerait l'activité des IP₃R. De plus, une grande densité locale de cette protéine serait corrélée avec une réponse calcique de grande amplitude dans les astrocytes et les oligodendrocytes en culture. Ces zones de forte expression de la calréticuline colocaliseraient d'ailleurs avec la distribution des mitochondries (Simpson et al., 1997; Simpson et al., 1998).

3.1.2.1.5. ACCESSIBILITÉ AUX RÉSERVES CALCIQUES DES VOIES DE SIGNALISATION

La spécificité des changements de mobilisation calcique pour une voie de signalisation donnée nécessiterait cependant une accessibilité différente aux réserves calciques sensibles à l'IP₃. Une telle différence d'accessibilité a notamment été observée pour les récepteurs P2U et P2Y des astrocytes en culture. Ainsi, malgré l'activation d'une cascade de signalisation similaire, impliquant des protéines G insensibles à la toxine pertussique, l'activation de la PLC et la production d'IP₃, les récepteurs P2U auraient seulement accès à une partie des réserves calciques mobilisées par les récepteurs P2Y (Idestrup and Salter, 1998). De la même façon, dans les cellules pinéales de rat, les réserves calciques recrutées par les récepteurs muscariniques représenteraient une fraction seulement de celles recrutées par les récepteurs adrénergiques (Marin et al., 1996). Suivant ce modèle d'accessibilité différentielle aux réserves intracellulaires, les propriétés des réponses calciques induites par l'ATP pourraient être régulées indépendamment de celles induites par la muscarine, tel qu'observé suivant la stimulation nerveuse chronique.

La différence d'accessibilité pourrait découler de la relation spatiale entre les récepteurs des neurotransmetteurs, les enzymes responsables de la production d'IP₃, les IP₃R et les mitochondries. Par exemple, la facilitation spécifique des réponses calciques gliales à l'ATP dans les JNMs chroniquement stimulées pourrait résulter d'une plus grande densité de la PLC, des IP₃R ou des mitochondries à proximité des récepteurs purinergiques par rapport aux récepteurs muscariniques. Une autre possibilité consisterait en une distribution différentielle de la calréticuline, au niveau du réticulum endoplasmique. Enfin, la différence d'accessibilité aux réserves calciques pourrait impliquer l'activation d'autres effecteurs par les protéines G ou l'activation de récepteurs pour des neuromodulateurs, capables de moduler spécifiquement la signalisation calcique d'une voie donnée. La caractérisation des voies de signalisation, en termes de distribution relative des récepteurs et des effecteurs, dans les CSPs, de même que l'étude des interactions entre les différentes voies permettrait sans doute d'élucider cette question. Jusqu'à maintenant, des interactions de la signalisation des peptides, des neurotrophines et de l'adénosine

avec les voies purinergiques et muscariniques ont été suggérées. Ces interactions sont discutées dans les sections suivantes.

3.1.2.1.6. MODULATION NEUROTROPHIQUE, PURINERGIQUE ET PEPTIDERGIQUE, DES RÉPONSES CALCIFIQUES GLIALES

3.1.2.1.6.1. NEUROTROPHINES

Un mécanisme par lequel les réponses calciques gliales pourraient être altérées suivant un changement chronique de l'activité synaptique impliquerait la libération de neurotrophines. En effet, chez la souris, l'incubation préalable des préparations nerf-muscles avec le NT-3 augmenterait l'amplitude des réponses calciques induites dans les CSPs par une stimulation nerveuse à 50 Hz pendant 30 secondes. De façon similaire, le BDNF augmenterait la durée des réponses évoquées dans les CSPs par la stimulation. Plus spécifiquement, le NT-3 potentialiserait les réponses calciques muscariniques, tel que suggéré par l'augmentation de la durée des réponses induites par l'application locale de muscarine. Au contraire, le BDNF potentialiserait la voie purinergique et augmenterait ainsi l'amplitude et la durée des réponses induites par l'ATP (Todd et al., 2007). Cette dernière observation est intéressante compte tenu de l'augmentation de la durée des réponses calciques induites par l'ATP dans les CSPs des JNMs bloquées chroniquement à l' α -bungarotoxine et considérant la possibilité d'une libération accrue de BDNF dans ces JNMs. En effet, l'expression du BDNF serait augmentée pendant la régénération neuronale et le bourgeonnement présynaptique suivant une lésion du nerf sciatique du rat (Xu et al., 2008). De plus, le BDNF inhiberait le regroupement des nAChRs à la JNM, favorisant la localisation extrasynaptique de ces récepteurs (Wells et al., 1999). Or, compte tenu que le traitement chronique à l' α -bungarotoxine induit le bourgeonnement des terminaisons nerveuses (Holland and Brown, 1980; Wines and Letinsky, 1991) et que la plupart des manipulations diminuant l'activité synaptique de la JNM augmentent la sensibilité extrasynaptique à l'ACh (Lomo and Rosenthal, 1972; Tonge, 1974; Antony and Tonge, 1980; Cangiano and Lutzemberger, 1980; Andreose et al., 1995),

il est probable que l'expression du BDNF soit augmentée dans les JNMs bloquées à l' α -bungarotoxine.

3.1.2.1.6.2. ADÉNOSINE

Dans les astrocytes en culture, de même que dans les cellules gliales de Müller de la rétine, l'adénosine potentialiserait les réponses calciques induites par l'ATP, via l'activation des récepteurs A_{2B} (Alloisio et al., 2004; Newman, 2005). L'activation des récepteurs A₁ amplifierait, quant à elle, les élévations calciques induites par la muscarine dans les astrocytes corticaux de rat en culture (Ferroni et al., 2002). À la JNM de grenouille, les CSPs possèderaient des récepteurs A₁ fonctionnels, dont l'activation serait couplée à une élévation du Ca²⁺ intracellulaire (Robitaille, 1995). L'existence de récepteurs A₂ a également été démontrée dans les cellules de Schwann en culture (Stevens et al., 2004). À l'inverse des récepteurs A₁, cependant, ces derniers ne sont pas couplés à la signalisation calcique intracellulaire, ce qui les rend plus difficile à identifier avec des techniques physiologiques.

Aussi, puisque l'ATP est libérée de façon concomitante avec l'ACh par les terminaisons nerveuses et que les CSPs, elles-mêmes, libèrerait de l'ATP (Todd and Robitaille, 2007), l'adénosine résultant de sa dégradation enzymatique pourrait contribuer au réglage fin des réponses calciques gliales en fonction de l'activité synaptique. En outre, un changement chronique de la production d'ATP modifierait la balance d'activation des récepteurs A₁ et A₂ gliaux par l'adénosine et pourrait ainsi moduler les réponses calciques induites par l'ATP ou la muscarine.

3.1.2.1.6.3. SUBSTANCE P

Tout comme les neurotrophines et l'adénosine, la substance P serait aussi en mesure de réguler les propriétés des réponses calciques gliales à la JNM. En effet, à la JNM de grenouille l'application préalable de la substance P diminuerait la proportion de cellules répondant à une application locale de muscarine par une élévation calcique. La substance P réduirait également l'amplitude de ces réponses. De plus, les effets de la substance P sur la signalisation muscarinique seraient relativement rapides. La

substance P réduirait aussi l'amplitude des réponses calciques induites par l'ATP, mais cette fois avec un plus long délai d'action (Bourque and Robitaille, 1998). Aussi, la libération présynaptique de substance P de même que la sensibilité, la distribution ou l'expression des récepteurs NK-1 gliaux pourrait être régulée par l'activité synaptique. Sa libération accrue par les terminaisons des JNMs bloquées chroniquement ou une plus grande densité de ses récepteurs sur les CSPs pourrait fournir un mécanisme par lequel les réponses calciques évoquées par la stimulation seraient diminuées, malgré l'amplification des réponses à l'ATP et à la muscarine.

3.1.2.1.7. INTRUSION DES PROLONGEMENTS GLIAUX DANS LA FENTE SYNAPTIQUE

Un dernier mécanisme pouvant expliquer la disparité entre les réponses évoquées par la stimulation nerveuse et les réponses induites par l'application locale d'agonistes impliquerait la redistribution des récepteurs pour les neurotransmetteurs loin des zones actives. Une telle redistribution pourrait, par exemple, passer par la rétraction des prolongements gliaux qui normalement font intrusion dans la fente synaptique. Un changement dans la morphologie des CSPs est d'ailleurs envisageable dans notre modèle de blocage à l' α -bungarotoxine étant donné qu'un bourgeonnement des terminaisons nerveuses survient normalement après plus de huit jours de traitement (Wines and Letinsky, 1988) et que l'extension des terminaisons nerveuses est généralement précédé de l'extension des prolongements gliaux (Son et al., 1996; O'Malley et al., 1999). Une rétraction des prolongements astrocytaires serait également observée de façon dépendante de l'activité dans la neurohypophyse de rat. Ces changements surviendraient en quelques heures seulement (Theodosis et al., 2008). Des modifications similaires sont donc susceptibles de survenir à plus long-terme chez les CSPs et seraient cohérents avec une augmentation de l'efficacité présynaptique dans les JNMs chroniquement bloquées. En effet, à la JNM de grenouille, l'intrusion des prolongements gliaux dans la fente synaptique serait négativement corrélée avec l'efficacité présynaptique (Herrera et al., 1985). Aussi, à l'opposé, une plus grande intrusion des prolongements gliaux pourrait être envisagée suivant la stimulation nerveuse chronique. Celle-ci serait cohérente avec la réduction de l'efficacité présynaptique et pourrait expliquer l'absence de différence dans les

réponses calciques gliales évoquées par la stimulation, malgré une réduction de la quantité de neurotransmetteur libéré et une réduction de la sensibilité à la muscarine. Par ailleurs, puisque l'intrusion des prolongements gliaux dans la fente synaptique serait régulée par des interactions répulsives avec la laminine (Patton et al., 1998), des changements dépendants de l'activité au niveau de cette protéine pourraient être impliqués dans les adaptations de la réponse calcique gliale. L'étude de l'expression des laminines ainsi que de l'ultrastructure des JNMs traitées chroniquement pourraient donc s'avérer utile pour notre compréhension des changements dans la signalisation calcique gliale.

3.1.3. PARALLÈLE ENTRE LES ADAPTATIONS PRÉSYNAPTQUES ET GLIALES

Compte tenu de la présence de récepteurs similaires sur la terminaison nerveuse, la CSP et la fibre musculaire, les molécules libérées par l'un ou l'autre de ces éléments, en réponse à un changement d'activité synaptique, sont susceptibles d'être perçues par les trois éléments et d'y activer des cascades de signalisation semblables. Par conséquent, les mécanismes responsables des adaptations présynaptiques sont potentiellement aussi impliqués dans les adaptations des CSPs. Ainsi, la possibilité que les mitochondries et les CaMKII puissent intervenir autant dans les adaptations présynaptiques que gliales est discutée dans les sections qui suivent.

3.1.3.1. MITOCHONDRIES

Puisque la stimulation nerveuse chronique augmente le métabolisme mitochondrial dans les terminaisons nerveuses, de même que dans les fibres musculaires (Nguyen and Atwood, 1994; Somasekhar et al., 1996), il est plausible qu'il soit également augmenté dans les CSPs de ces JNMs. Dans ce cas, la régulation à la hausse du métabolisme mitochondrial pourrait dépendre de signaux similaires perçus par les trois types cellulaires. Également, une relocalisation des mitochondries, à l'image de celle observée dans les terminaisons nerveuses stimulées chroniquement (Lnenicka et al., 1986), pourrait être envisagée dans les CSPs. D'ailleurs, chez les astrocytes, la motilité des mitochondries serait régulée par la concentration intracellulaire de Ca^{2+} .

Ainsi, elles s'immobiliseraient en présence de fortes concentrations de cet ion et s'accumuleraient, par conséquent, près des sites de forte libération de Ca^{2+} (Rizzuto et al., 2004; Kolikova et al., 2006). Leur localisation et leur activité pourraient donc être régulées par l'activité synaptique.

Dans les astrocytes du cervelet, le contenu en mitochondries et la capacité d'emmagasinage du Ca^{2+} serait, en outre, supérieurs à ceux des neurones (Bambrick et al., 2006). Une telle distinction entre les contenus présynaptiques et gliaux en mitochondries n'a pu être faite dans nos expériences. Cependant, la présence de nombreuses mitochondries dans les CSPs est indéniable (Figure 1). Étant donné la motilité et la régulation des mitochondries par l'activité synaptique, la possibilité d'un changement de leur métabolisme dans les CSPs, suivant une altération de l'activité synaptique, est plus que raisonnable.

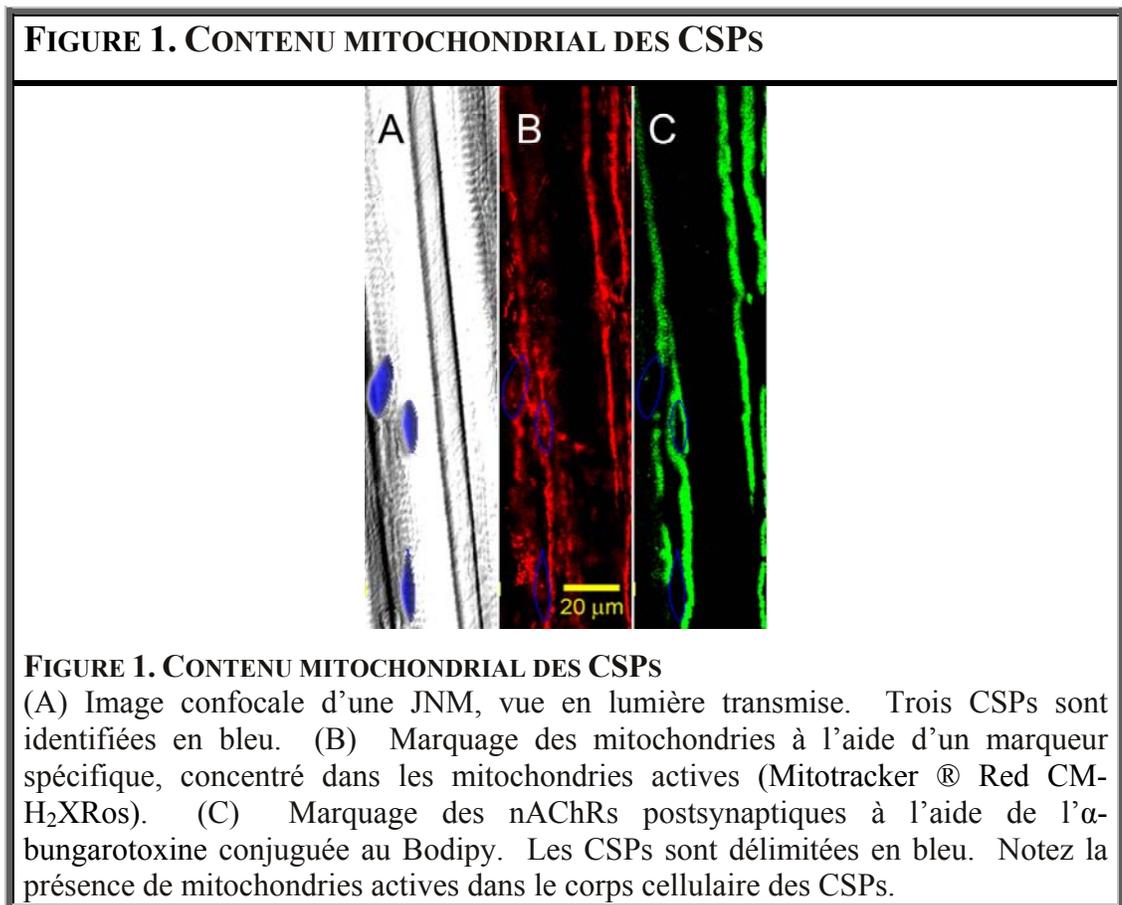


Figure 1. Contenu mitochondrial des CSPs

3.1.3.2. CAMK

Selon la même logique, puisque que l'augmentation et la diminution de l'activité synaptique altèrent l'expression des CaMK dans les neurones et les fibres musculaires (Plomp and Molenaar, 1996; Fluck et al., 2000; Thiagarajan et al., 2002; Chin, 2004), de tels changements dépendants de l'activité synaptique sont aussi plausibles dans les CSPs. D'ailleurs, les études ayant démontré un changement d'expression ou d'activité des CaMK musculaires ne peuvent démentir la contribution possible des CSPs dans ces modifications. Également, une altération de l'expression de la CaMKII par un agoniste glutamatergique a été démontrée dans les astrocytes de l'aire CA3 de l'hippocampe (Suh et al., 2005). Tel que décrit pour l'élément présynaptique à la section 3.1.1.3.3.3, une adaptation des CaMK permettrait, en fait, aux CSPs d'ajuster leur capacité à détecter le niveau d'activité synaptique, encodé dans les réponses calciques gliales. Cet encodage est d'ailleurs discuté dans la prochaine section.

3.1.3.2.1. ENCODAGE DE L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE DANS LES PROPRIÉTÉS DES RÉPONSES CALCIFIQUES GLIALES

Les propriétés des réponses calciques gliales encoderaient effectivement le niveau d'activité synaptique. Ainsi, à la JNM de souris, un protocole de stimulation neuronale en bouffée résulterait en des oscillations calciques dans les CSPs. Au contraire, une stimulation continue induirait une réponse unique de grande amplitude (Todd and Robitaille, 2007). De façon similaire chez les astrocytes de préparations en tranche, l'augmentation de l'intensité ou de la fréquence de stimulation des afférences neuronales serait réflétée dans l'augmentation de la fréquence des oscillations calciques astrocytaires (Pasti et al., 1997). L'activité synaptique pourrait donc être encodée dans les caractéristiques spatio-temporelles des réponses calciques des cellules gliales, qui adapteraient alors leur rétroaction à la synapse en fonction de cette activité. Chez les astrocytes, le niveau d'activité synaptique serait susceptible d'être encodé dans la fréquence des oscillations calciques puisque celle-ci peut être modifiée à long-terme, selon l'activité neuronale antérieure (Pasti et al., 1997). Chez les CSPs, le nombre de cellules recrutées par une stimulation et le délai d'initiation

des réponses calciques, tous deux déterminés par la sensibilité des CSPs aux neurotransmetteurs, ainsi que les propriétés des réponses calciques pourraient servir le même dessein et permettre l'encodage du niveau d'activité synaptique. Un tel encodage nécessiterait cependant la présence de senseurs de Ca^{2+} , sensibles à la concentration de Ca^{2+} et à l'aspect cinétique des réponses calciques, soit à leur fréquence, leur durée, leur amplitude ou leur nombre : un rôle qui pourrait fort bien être rempli par la CaMKII (De Koninck and Schulman, 1998).

3.2. HÉTÉROGÉNÉITÉ DES CSPs

L'étude des réponses calciques gliales a permis de révéler l'hétérogénéité des CSPs. Celles-ci sont, en effet, différentes du point de vue de leur sensibilité aux neurotransmetteurs, ce qui suggère une expression différentielle de certaines molécules, laquelle serait possiblement déterminée par l'environnement et l'activité synaptique. Cette hétérogénéité pourrait, par ailleurs, caractériser différentes populations de CSPs, dont les fonctions seraient distinctes. Ces questions sont adressées dans les sections qui suivent.

3.2.1. SENSIBILITÉ AUX NEUROTRANSMETTEURS

La sensibilité des CSPs aux différents neurotransmetteurs varie énormément au sein d'un même muscle et fort probablement au sein d'une même JNM. En effet, nos résultats démontrent que les CSPs d'un muscle donné nécessiteront une seule à plusieurs applications répétées d'un agoniste avant de répondre par une élévation de leur Ca^{2+} intracellulaire. De la même façon, lors d'une stimulation nerveuse, le délai avec lequel les CSPs d'une même JNM répondront par une élévation calcique peut différer de plusieurs secondes (Figure 2). Les plus lentes à répondre pourraient donc nécessiter un nombre supérieur de stimuli et, par conséquent, une plus forte accumulation de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Également, certaines CSPs pourraient ne pas être recrutées lors d'une première stimulation, mais répondre par une élévation calcique aux stimulations subséquentes et vice versa. Ces cellules pourraient donc être classifiées en différentes catégories selon leur sensibilité aux neurotransmetteurs.

La caractérisation des CSPs en termes de densité et distribution des récepteurs aux neurotransmetteurs, d'efficacité du couplage entre les protéines G et les récepteurs métabotropiques ou de sensibilité des IP₃R pourrait sûrement révéler l'hétérogénéité moléculaire de ces cellules.

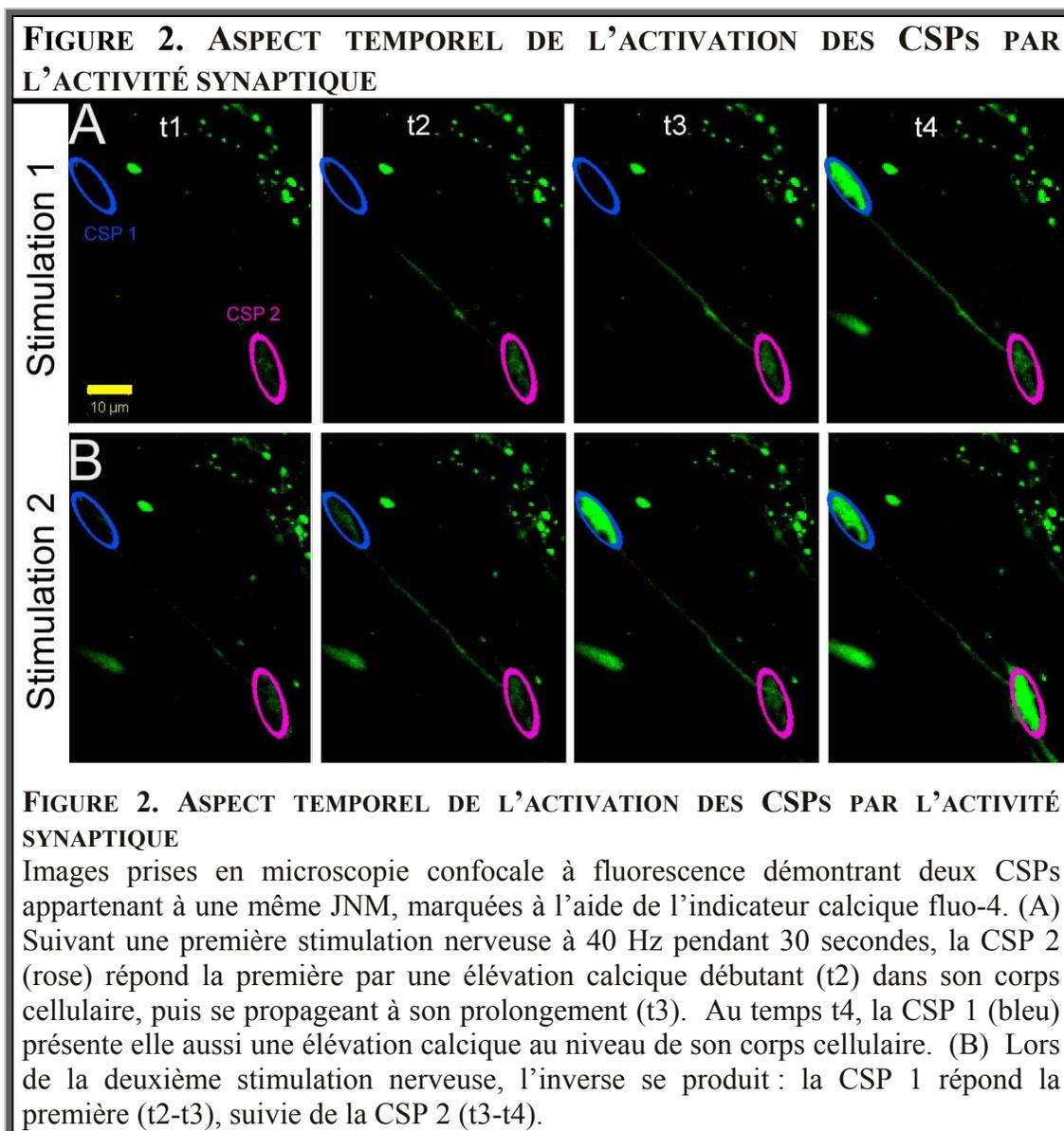


Figure 2. Aspect temporel de l'activation des CSPs par l'activité synaptique

3.2.2. DÉTERMINATION DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ MOLÉCULAIRE DES CSPs

De telles différences moléculaires entre les CSPs seraient d'ailleurs en ligne avec celles déjà rapportées dans la littérature. En effet, les propriétés des CSPs dépendraient du type musculaire avec lequel elles sont associées. Ainsi, les CSPs des muscles phasiques et toniques du rat diffèreraient quant à leur expression du facteur chimotactique répulsif, sémaphorine 3A (De Winter et al., 2006). Aussi, dans l'optique d'une détermination postsynaptique des propriétés gliales, la grande variabilité dans l'expression des chaînes légères et lourdes de myosine, le long d'une même fibre musculaire de grenouille, suggère une variabilité similaire dans les propriétés gliales (Lutz *et al.*, 2001). D'ailleurs, le changement de sensibilité aux agonistes suivant la stimulation nerveuse chronique supporte une corrélation entre les propriétés moléculaires des CSPs et le type de fibre musculaire auxquelles elles sont associées, compte tenu que les fibres musculaires stimulées entameraient une transition de leurs isoformes phasique de la myosine vers des isoformes plus toniques (Pette and Staron, 2001). Les propriétés des CSPs pourraient donc dépendre de celles de leurs partenaires postsynaptiques.

Les propriétés des CSPs pourraient également être influencées par celles de leurs partenaires présynaptiques. En effet, au sein du muscle *c.p.*, les JNMs les plus fortes libèreraient jusqu'à 100 fois plus de neurotransmetteurs que les JNMs les plus faibles (Trussell and Grinnell, 1985). Cette grande variabilité d'efficacité présynaptique suggère que les besoins individuels des JNMs d'un même muscle soient différents. Aussi, une adaptation des propriétés gliales à ces besoins particuliers est plausible. D'ailleurs, la régulation du nombre de CSPs en fonction de la taille de la JNM chez le rat et la constance de cette relation entre les JNMs de différents muscles irait dans ce sens et suggèrerait que l'activité des CSPs puisse être coordonnée et adaptée aux besoins de toute la JNM (Lubischer and Bebinger, 1999).

Les propriétés des CSPs pourraient aussi être adaptées aux besoins spécifiques des zones actives auxquelles elles sont associées. Il existerait effectivement une certaine variabilité dans la probabilité de libération de neurotransmetteurs des différentes

zones actives, le long d'une même JNM de grenouille (D'Alonzo and Grinnell, 1985; Robitaille and Tremblay, 1987; Bennett et al., 1989). Une telle adaptation des CSPs aux besoins locaux est d'ailleurs suggérée par l'observation d'une modulation locale de l'activité synaptique par les CSPs. Ainsi, l'injection de BAPTA ou d'un analogue du GTP ou du GDP dans le corps cellulaire d'une CSP affecterait les courants de plaque motrice enregistrés par une électrode focale extracellulaire, sans altérer l'activité globale de la JNM, enregistrée par une électrode intracellulaire (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001). Ces résultats supporteraient donc une action individuelle des CSPs sur une portion de JNM.

En outre, une même CSP pourrait potentiellement réguler les propriétés de chacun de ses prolongements de façon indépendante, en fonction des besoins des zones actives englobées par ces derniers. Les prolongements gliaux pénétreraient, en effet, dans la fente synaptique à intervalle régulier, correspondant à trois ou quatre zones actives (Wu and Betz, 1999). Aussi, des résultats non publiés du laboratoire (Panatier et Robitaille) démontrent qu'une stimulation minimale des afférences neuronales peut induire une réponse calcique localisée dans un microdomaine d'un prolongement astrocytaire, suggérant la régulation indépendante de ceux-ci. En ce sens, l'établissement d'une corrélation entre l'efficacité d'une JNM ou de ses zones actives et les propriétés des réponses calciques, induites dans les prolongements des CSPs ou leur corps cellulaire, pourrait être utile pour évaluer la contribution présynaptique dans la détermination des propriétés gliales. Une telle corrélation pourrait également servir d'indice quant au mode de fonctionnement des CSPs, individuel ou en unité fonctionnelle de plusieurs CSPs associées à une même JNM. Néanmoins, que les propriétés des réponses calciques soient déterminées par les partenaires pré ou postsynaptiques, les deux à la fois ou une portion de ces derniers, nos résultats démontrent que ces propriétés sont maléables et régulées par l'activité synaptique. Cette régulation est d'ailleurs l'objet de la prochaine section.

3.2.3. RÉGULATION DES PROPRIÉTÉS GLIALES PAR L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE

Les propriétés des CSPs seraient plastiques et régulées par l'activité antérieure de la JNM. En accord avec ce postulat, une augmentation de l'expression de la sémaphorine 3A dans les CSPs des muscles phasiques de rat à été démontrée suivant une réduction de l'activité synaptique (De Winter et al., 2006). L'expression de la GFAP serait également augmentée dans les CSPs de grenouille et de rat après une dénervation (Georgiou et al., 1994; Ulenkate et al., 1996). Chez la grenouille, cette intervention augmenterait aussi la sensibilité des récepteurs muscariniques gliaux pour l'antagoniste spécifique atropine. En conditions basales, les récepteurs muscariniques des CSPs de cette préparation seraient effectivement insensibles à l'atropine. Au contraire, après dénervation du *c.p.*, les réponses calciques induites par la muscarine seraient complètement inhibées par cet antagoniste (Robitaille et al., 1997).

Les changements de sensibilité aux neurotransmetteurs et de cinétique des réponses calciques relatés dans cette thèse seraient donc cohérents avec une telle régulation dépendante de l'activité des propriétés moléculaires des CSPs. Ces changements seraient également cohérents avec la modification des réponses calciques astrocytaires en réponse à une stimulation répétée des afférences neuronales, dans le cortex visuel et l'aire CA1 de l'hippocampe de rat en développement. En effet, suivant l'administration de deux trains de stimulation, ou deux applications de t-ACPD dans les préparations en tranche, la fréquence des oscillations calciques astrocytaires serait augmentée significativement, pour une durée allant jusqu'à trois heures. Cette modification affecterait principalement les astrocytes présentant des oscillations calciques de basse fréquence en conditions basales (Pasti et al., 1997). Ainsi, à l'image de nos résultats, les changements induits par l'activité synaptique dépendraient des propriétés moléculaires des cellules gliales et seraient donc spécifiques à certains groupes de cellules.

3.2.4. POPULATIONS DE CSPs

Dans le SNP, l'existence de trois types de cellules de Schwann, de même origine cellulaire est bien connue: il y a les cellules de Schwann myélinisantes, non-myélinisantes et les CSPs. Les CSPs ont généralement été décrites comme appartenant à une seule population. Or, nos résultats et ceux d'autres groupes supportent l'hétérogénéité moléculaire des CSPs (De Winter et al., 2006), tel que décrit précédemment. À l'image des astrocytes, cette variabilité moléculaire pourrait également s'accompagner de différences électrophysiologiques et morphologiques, délimitant ainsi différents groupes ou populations de CSPs aux propriétés distinctes (Walz, 2000). À l'opposé, l'hétérogénéité des CSPs pourrait résulter simplement de la très grande plasticité d'un même type cellulaire. Ces possibilités doivent cependant être investiguées et ce n'est que par le biais des techniques de biologie moléculaire que cette question pourra être élucidée. Par exemple, pendant le stade embryonnaire, l'introduction virale d'un gène codant pour une protéine fluorescente, dont la transcription serait contrôlée par le promoteur d'un gène glial, permettrait de suivre la descendance d'un précurseur des CSPs. Par la suite, le développement de la PCR sur une cellule (single-cell PCR) permettrait d'étudier les transcrits d'une cellule unique, obtenue par patch-clamp, et de comparer les gènes exprimés par les cellules de même origine ou d'origine différente.

3.3. RÔLE DES RÉPONSES CALCIQUES GLIALES

Que l'hétérogénéité des CSPs résulte de leur plasticité ou représente des populations de cellules distinctes, elle suggère tout de même, dans les deux cas, leur diversité fonctionnelle. D'ailleurs, le rôle possible des réponses calciques gliales dans la régulation de la libération de neurotransmetteurs de même que les rôles spécifiques des voies purinergiques et muscariniques sont discutées dans les sections suivantes, en regard des adaptations gliales observées.

3.3.1. RÉGULATION DE LA LIBÉRATION DE NEUROTRANSMETTEURS

À titre de partenaires actifs de la synapse, suivant leur détection de l'activité synaptique, les CSPs devraient composer une réponse adaptée aux besoins de la

synapse. L'une de ces réponses consisterait à réguler la libération de neurotransmetteurs et par conséquent, le facteur de sécurité. Un tel rôle des réponses calciques gliales a d'ailleurs été suggéré à la JNM de grenouille. En effet, dans ce système, l'élévation calcique induite dans les CSPs par l'application de thapsigargine serait responsable d'une augmentation tardive et transitoire de la libération de neurotransmetteurs, laquelle serait inhibée par l'injection spécifique de BAPTA dans les CSPs. Dans le même ordre d'idées, l'injection d'IP₃ dans les CSPs augmenterait la libération de neurotransmetteurs. En outre, la chélation du Ca²⁺ glial pendant la stimulation nerveuse à haute fréquence accentuerait la dépression synaptique (Castonguay and Robitaille, 2001). Une potentialisation de la neurotransmission par les réponses calciques des CSPs a également été démontrée à la JNM de souris. Dans cette préparation, une élévation calcique unique, induite dans les CSPs par la photolyse de Ca²⁺ encagé (NP-EGTA-AM), augmenterait la libération de neurotransmetteurs. Également, la PTP résultant d'une stimulation neuronale à haute fréquence serait inhibée par la photolyse d'un chélateur de Ca²⁺ (Diaz-2 AM) dans les CSPs (Todd and Robitaille, 2007).

Les réponses calciques gliales pourraient donc être impliquées dans les phénomènes de plasticité à court-terme tels que la dépression et la PTP. Toutefois, compte tenu du délai de près de six secondes pour l'initiation des réponses calciques gliales par la stimulation nerveuse à 40 Hz, les phénomènes précoces de plasticité comme la facilitation et l'augmentation seraient sans doute peu ou pas influencés par ces réponses. D'ailleurs, dans le muscle *c.p* de grenouille, l'ablation aiguë des CSPs à l'aide d'un anticorps spécifique au 2A12 et du système du complément n'altérerait pas la facilitation à des stimuli pairés. La dépression synaptique, induite par une stimulation à 10 Hz, pendant 80 secondes, serait également similaire en absence des CSPs (Reddy et al., 2003), un résultat contradictoire avec les observations de Castonguay et Robitaille (2001). À l'aide du même modèle animal, ces derniers avaient, en effet, observé que la chélation du Ca²⁺ glial, par l'injection de BAPTA dans une CSP, avant une stimulation à haute fréquence, augmentait la dépression des courants de plaque motrice enregistrés à l'aide d'une électrode extracellulaire focale.

Au contraire, les potentiels de plaque motrice enregistrés à l'aide d'une électrode intracellulaire, reflétant l'activité globale de la JNM, demeuraient inchangés. Ces résultats suggèrent donc que la CSP injectée soit en mesure de réguler un domaine restreint de la JNM. La divergence entre les résultats de ces deux études pourrait s'expliquer par l'établissement d'un équilibre entre les mécanismes dépresseurs et potentialisateurs de la glie.

3.3.1.1. ÉQUILIBRE ENTRE LES MÉCANISMES DÉPRESSEURS ET POTENTIALISATEURS

Les résultats de Reddy et al. (2003) et ceux de Castonguay et Robitaille (2001) pourraient être réconciliés par l'hypothèse d'une activation préférentielle de mécanismes dépresseurs dans la glie, en absence de Ca^{2+} . En effet, compte tenu que les CSPs déprimerait la neurotransmission via l'activation des protéines G (Robitaille, 1998), mais qu'elles potentialiseraient la libération de neurotransmetteurs via l'élévation de leur calcium intracellulaire (Castonguay and Robitaille, 2001), le produit de l'activation des récepteurs métabotropiques gliaux devrait être un équilibre entre les mécanismes dépresseurs et potentialisateurs. Aussi est-il possible qu'avec une stimulation à une fréquence de 10 Hz pendant 80 sec, les effets dépresseurs et potentialisateurs s'annulent. Ainsi, la dépression serait essentiellement la même en absence de CSPs, tel qu'observé par Reddy et al. (2003). Toutefois, la chélation du Ca^{2+} dans les CSPs déplacerait l'équilibre vers la dépression, tel que démontré par Castonguay et Robitaille (2001). Au contraire, l'injection d'un analogue non-hydrolysable du GDP, le GDP β s, empêcherait l'activation des protéines G par le GTP et déplacerait donc l'équilibre vers la potentialisation, tel que démontré par Robitaille (1998).

FIGURE 3. ÉQUILIBRE ENTRE LES MÉCANISMES POTENTIALISATEURS ET DÉPRESSEURS.

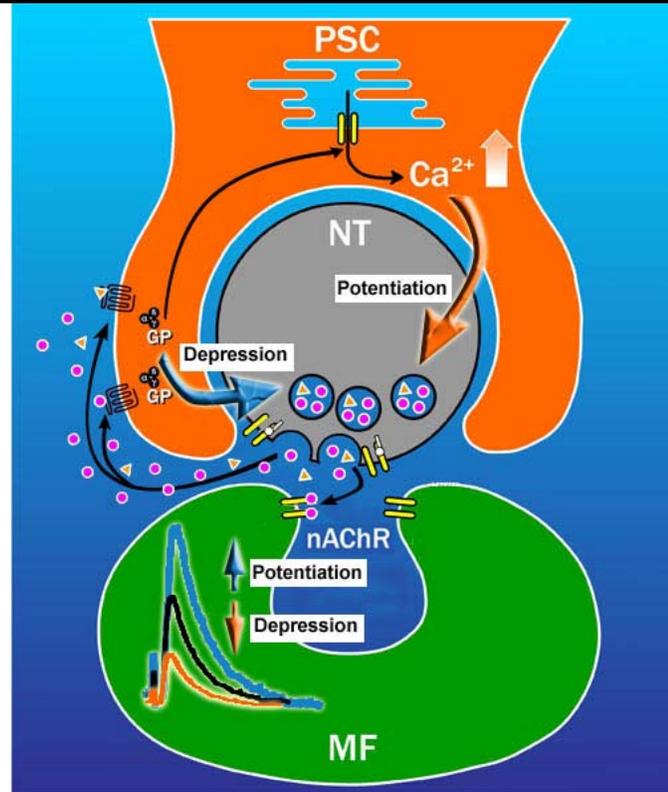


FIGURE 3. ÉQUILIBRE ENTRE LES MÉCANISMES POTENTIALISATEURS ET DÉPRESSEURS.

La modulation de l'activité synaptique par les CSPs passerait par deux voies de signalisation parallèles : l'une impliquant la mobilisation du Ca²⁺ à partir des réserves intracellulaires, l'autre impliquant une cascade de signalisation en aval de l'activation des protéines G (GP). La première potentialiserait la neurotransmission (Potentiation), alors que la seconde la déprimerait (Depression). Le résultat de cette modulation serait un équilibre entre la potentialisation et la dépression, lequel pourrait être déplacé en fonction des besoins de la synapse.

Figure 3. Équilibre entre les mécanismes potentialisateurs et dépresseurs

Bien qu'avec une stimulation à 10 Hz pendant 80 secondes, les mécanismes potentialisateurs et dépresseurs des CSPs puissent s'annuler, il est possible qu'il en soit autrement avec des stimulations à différentes fréquences. L'équilibre de la modulation gliale pourrait ainsi être déplacé en fonction des patrons d'activité synaptique et gliale. D'ailleurs, à la JNM de souris, la régulation de la libération de neurotransmetteurs par les CSPs dépendrait de l'activité synaptique et des propriétés spatio-temporelles des réponses calciques gliales. En effet, l'induction d'oscillations

calciques dans les CSPs, par photolyse de Ca^{2+} encagé, déprimerait la libération de neurotransmetteurs contrairement à une réponse calcique unique. De telles oscillations calciques seraient également induites par la stimulation neuronale en bouffées. Celle-ci résulterait en une dépression post-tétanique pouvant être inhibée par la photolyse d'un chélateur de Ca^{2+} (Diazo-2 AM) dans les CSPs (Todd and Robitaille, 2007).

3.3.1.2. L'ATP COMME GLIOTRANSMETTEUR

Une telle implication des réponses calciques gliales dans la PTP ou la dépression synaptique nécessiterait cependant l'activation d'un messenger rétrograde. Chez les astrocytes, l'ATP a été proposée maintes fois pour ce rôle, agissant directement sur les neurones via l'activation des récepteurs P_2 ou indirectement via sa dégradation en adénosine et l'activation des récepteurs A_1 ou A_2 (Haydon and Carmignoto, 2006; Todd et al., 2006). À la JNM de souris, Todd et Robitaille (2007) ont démontré que l'ATP, ultérieurement dégradée en adénosine, serait impliquée, à la fois, dans la PTP et la dépression post-tétanique. Les effets potentialisateurs d'une élévation calcique unique, induite dans les CSPs par photolyse de NP-EGTA-AM seraient effectivement abolis par un inhibiteur de la dégradation de l'ATP. De plus, la potentialisation serait inhibée par un antagoniste des récepteurs à l'adénosine $\text{A}_{2\text{A}}$ (Todd and Robitaille, 2007). Ces derniers sont couplés aux protéines G_s et stimulent la synthèse d'AMPc par l'adénylate cyclase. À l'inverse, les effets dépresseurs des oscillations calciques, induites dans les CSPs par photolyse de NP-EGTA-AM seraient abolis par un antagoniste des récepteurs A_1 . Ceux-ci sont couplés aux protéines G_i et inhibent la synthèse d'AMPc par l'adénylate cyclase (Todd and Robitaille, 2007). L'effet potentialisateur ou dépresseur de l'adénosine dépendrait donc d'un équilibre entre l'activation des récepteurs $\text{A}_{2\text{A}}$ et A_1 régulant la production d'AMPc. D'ailleurs, un rôle de la cascade de signalisation AMPc/PKA a été démontré dans le recrutement des vésicules de réserve chez la drosophile, lequel serait corrélé avec la PTP (Kuromi and Kidokoro, 2003). La libération d'ATP par la CSP, sa dégradation en adénosine et l'activation des récepteurs $\text{A}_{2\text{A}}$ ou A_1 neuronaux pourraient donc être impliqués dans la modulation de la PTP. De la même façon, compte tenu de leur recrutement

lors d'une stimulation neuronale à haute-fréquence, les vésicules de réserve pourraient limiter la déplétion des vésicules synaptiques (Richards et al., 2003). De ce fait, l'équilibre dans l'activation des récepteurs A_{2A} ou A_1 neuronaux pourrait moduler l'amplitude de la dépression synaptique.

3.3.1.3. AUTRES GLIOTRANSMETTEURS

Outre l'ATP, d'autres molécules d'origine gliale pourraient intervenir dans l'établissement de l'équilibre entre la dépression et la potentialisation. Entre autres, les prostaglandines (Madden and van der Kloot, 1982; Pappas, 1999; Arkhipova et al., 2006) et les neurotrophines (Lohof et al., 1993; Mantilla et al., 2004), dont il est aussi question dans la section 3.3.2, le glutamate (Pinard et al., 2003), le NO (Thomas and Robitaille, 2001), les endocannabinoids (Lindgren, 2005) et l'acide arachidonique (Arkhipova et al., 2006) pourraient être libérés par les CSPs dans différentes conditions (voir section 1.2.4.4.1).

3.3.1.4. CONSÉQUENCES D'UNE ALTÉRATION DES RÉPONSES CALCIQUES GLIALES

Compte tenu du rôle potentiel des réponses calciques des CSPs dans la régulation de la neurotransmission, la modification à long-terme de leurs propriétés est susceptible d'altérer cette rétroaction gliale envers la synapse. De ce fait, les changements des propriétés gliales pourraient être impliqués dans la modification de la plasticité à court-terme des JNMs traitées chroniquement. Par exemple, la PTP réduite dans les JNMs bloquées à l' α -bungarotoxine pourrait être la conséquence des réponses calciques gliales retardées et de plus faible amplitude. Cette hypothèse est d'ailleurs cohérente avec la réduction de la PTP par la photolyse d'un chélateur de Ca^{2+} dans les CSPs (Todd and Robitaille, 2007). Advenant un rôle des réponses calciques gliales dans la résistance à la dépression synaptique, la plus grande dépression observée dans les JNMs traitées à l' α -bungarotoxine pourrait également être expliquée, du moins en partie, par un changement dans les propriétés de ces réponses. Une réponse calcique de plus faible amplitude pourrait réduire la libération gliale d'ATP, limiter conséquemment la génération d'adénosine et diminuer la mobilisation

des vésicules de réserve. Une telle diminution augmenterait la dépression et réduirait la PTP, de façon cohérente avec nos résultats. Afin de mesurer la contribution de la réponse calcique gliale dans la modulation des phénomènes de plasticité synaptique des JNMs bloquées chroniquement, il serait intéressant d'inhiber cette réponse pendant la stimulation à haute fréquence. Dans le cas d'une contribution gliale importante dans la dépression et la PTP, une telle manipulation abolirait les différences entre les JNMs traitées chroniquement et les JNMs témoins.

Cependant, dans le modèle de stimulation chronique, la résistance à la dépression des JNMs stimulées ne pourrait être expliquée uniquement par l'amplitude des réponses calciques gliales évoquées par la stimulation nerveuse. Les CSPs des JNMs stimulées chroniquement présentent, en effet, des réponses calciques similaires à celle des JNMs témoins. Ainsi, d'autres mécanismes, tels que ceux impliquant les mitochondries, sont susceptibles d'intervenir dans ce phénomène (voir sections 1.2.4.2.1.1.4 et 1.2.4.2.1.1.5.4.2). Il est également possible que les réponses calciques induites par l'activation spécifique des différentes voies de signalisation régulent différemment la libération de gliotransmetteurs. De ce fait, la modulation spécifique des voies purinergiques ou muscariniques pourrait avoir différentes conséquences sur les phénomènes de plasticité synaptique. Les rôles de ces voies sont d'ailleurs abordés dans les sections suivantes.

3.3.2. VOIE PURINERGIQUE

L'activation des récepteurs purinergiques stimulerait différentes voies de signalisation, impliquées notamment dans la synthèse et la libération de prostaglandines et de facteurs neurotrophiques, capables de moduler la transmission synaptique. Ces voies de signalisation sont l'objet des sections suivantes.

3.3.2.1. SYNTHÈSE ET LIBÉRATION DE PROSTAGLANDINES

Dans les astrocytes en culture, l'activation des récepteurs P₂ activerait de multiples voies de signalisation, selon le sous-type de récepteurs impliqué. Parmi celles-ci notons l'activation de la phospholipase A₂ et de la cyclooxygénase, la synthèse

d'acide arachidonique et de différents eicosanoïdes, de même que leur libération (James and Butt, 2002). Un tel rôle des récepteurs P₂ des CSPs dans la production des eicosanoïdes, notamment des prostaglandines, pourrait donc être envisagé. Des prostaglandines pourraient, en effet, être générées dans les cellules de Schwann en culture (Constable *et al.*, 1994). De plus, les enzymes de synthèse de l'acide arachidonique et des prostaglandines, respectivement la phospholipase A₂ et la cyclooxygénase, seraient présentes dans les CSPs des JNMs de grenouille (Pappas, 1999). Aussi, la production de prostaglandines serait dépendante du Ca²⁺ (Knapp *et al.*, 1977; Kawada *et al.*, 1992), de sorte que les élévations calciques gliales pourraient réguler l'activité des enzymes de synthèse et augmenter la libération de ces molécules. L'inhibition de la cyclooxygénase réduirait, par ailleurs, l'amplitude des potentiels de plaque motrice et la dépression synaptique à la JNM de grenouille (Pinard *et coll.*, données non publiées). Également, les prostaglandines potentialiseraient la libération de neurotransmetteurs dans les JNMs dont le contenu quantique est déjà déprimé (Madden and van der Kloot, 1982). Par conséquent, des prostaglandines d'origine gliale pourraient moduler la dépression synaptique induite par une stimulation à haute fréquence.

De ce fait, l'augmentation de la sensibilité à l'ATP des CSPs des JNMs stimulées chroniquement pourrait permettre une plus grande libération de prostaglandines par ces cellules. De la même façon, l'augmentation de l'amplitude des réponses calciques induites par l'ATP dans les cellules de faible sensibilité pour cet agoniste pourrait aussi favoriser la libération de prostaglandines et ainsi contribuer à la plus grande résistance des JNMs stimulées à la dépression.

3.3.2.2. SYNTHÈSE ET LIBÉRATION DE NEUROTROPHINES

Les neurotrophines, ou facteurs neurotrophiques, sont des molécules normalement impliquées dans la survie des neurones et le développement des synapses, dont l'action passe par l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase. À la JNM, certains de ces facteurs, comme le BDNF, le NT-3, le NT-4 et le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF, glial cell line-derived neurotrophic

factor) sont également impliqués dans la régulation de la neurotransmission. En effet, le GDNF augmenterait la fréquence de libération spontanée dans les JNMs de souris néonatales à des concentrations produisant une survie maximale des motoneurones *in vitro* et *in vivo* (Ribchester et al., 1998). Dans les co-cultures nerf-muscle de grenouille, le GDNF augmenterait également la probabilité de libération spontanée et évoquée de neurotransmetteurs (Wang et al., 2001), diminuerait la variabilité dans la libération évoquée et augmenterait légèrement la taille des quanta, en augmentant la densité des nAChRs postsynaptiques (Wang et al., 2002). Dans ces mêmes préparations, la surexpression du NT-4 dans les myocytes potentialiserait aussi la neurotransmission (Wang et al., 1998) et le NT-3 augmenterait la fréquence de libération spontanée (Xie et al., 1997). De même, l'administration aiguë de BDNF dans les préparations neuromusculaires *in vitro* en développement faciliterait la libération spontanée et évoquée (Lohof et al., 1993). Dans le diaphragme de rat adulte, le BDNF augmenterait aussi le facteur de sécurité, en minimisant les échecs de neurotransmission pendant une stimulation nerveuse téτανique (Mantilla et al., 2004). Cette potentialisation passerait possiblement par l'activation de la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) et la phosphorylation de la synapsine I, laquelle augmenterait la disponibilité des vésicules synaptiques pour exocytose (Jovanovic et al., 2000). Ainsi, de façon générale, les neurotrophines auraient un effet positif sur l'efficacité présynaptique.

Ces facteurs neurotrophiques seraient libérés de façon dépendante de l'activité. Différents mécanismes de neuroprotection seraient d'ailleurs induits par l'exercice physique (Charbonnier, 2007). De plus, les niveaux de l'ARNm codant pour le NT-4 seraient augmentés après une stimulation électrique, alors qu'ils seraient diminués lors d'un blocage chronique des nAChRs à l'aide de l' α -bungarotoxine (Funakoshi et al., 1995). De la même façon, l'entraînement et l'immobilisation d'un muscle augmenterait et diminuerait, respectivement, les niveaux de l'ARNm codant pour le GDNF (Wehrwein et al., 2002). L'expression de l'ARNm du BDNF serait également augmentée après une lésion nerveuse (Xu et al., 2008), de façon cohérente avec son rôle dans l'inhibition du regroupement des nAChRs (Wells et al., 1999) et

l'apparition de nAChRs extrasynaptiques qui caractérise les diminutions chroniques de l'activité synaptique (Lomo and Rosenthal, 1972; Cangiano and Lutzemberger, 1980; Wernig et al., 1980; Andreose et al., 1995).

À la JNM, les facteurs neurotrophiques pourraient être synthétisés par la terminaison nerveuse et par la fibre musculaire, mais également par les CSPs. Les cellules de Schwann en culture exprimeraient effectivement différents ARNm codant pour des neurotrophines (Yamamoto *et al.*, 1993) et seraient capables d'internaliser et de libérer ces molécules (Alderson *et al.*, 2000). La production de molécules possédant une activité apparentée à celle du facteur neurotrophique BDNF a d'ailleurs été démontrée dans les cultures de cellules de Schwann (Acheson *et al.*, 1991). En outre, la synthèse et la libération de certaines neurotrophines passerait par l'activation des récepteurs P₂ dans les cellules gliales. En effet, dans les cultures mixtes de cellules de Schwann et de neurones vestibulaires, la libération d'ATP par les neurones et l'activation des récepteurs P₂X₇ des cellules de Schwann déclencherait la libération de BDNF par ces dernières (Verderio et al., 2006). Les récepteurs P₂Y₂ des astrocytes en culture activeraient quant à eux différents gènes encodant, entre autres, les neurotrophines NT-3, 4, 5 et 6 (Chorna *et al.*, 2004). Compte tenu des changements dans la signalisation purinergique gliale survenant après une altération chronique de l'activité synaptique, la production de facteurs neurotrophiques par cette voie pourrait donc être modifiée. Par exemple, l'augmentation de la durée des réponses calciques gliales, induites par l'ATP dans les JNMs chroniquement bloquées, pourrait faciliter la sécrétion de BDNF et jouer un rôle dans l'augmentation de l'efficacité présynaptique. De la même façon, l'augmentation de la sensibilité des CSPs pour l'ATP dans les JNMs chroniquement stimulées pourrait également modifier l'expression ou la libération de facteurs neurotrophiques et agir sur l'efficacité ou la plasticité synaptique à court-terme de ces JNMs.

Une combinaison de multiples molécules, dont l'ATP, les prostaglandines et les facteurs trophiques, libérés par les cellules de Schwann pourrait donc être impliquée dans les phénotypes des JNMs traitées chroniquement. L'étude de l'expression des

facteurs trophiques ou l'imagerie de l'ATP dans les JNMs traitées chroniquement pourrait sans doute nous en dire davantage à ce sujet.

3.3.3. VOIE MUSCARINIQUE

La signalisation muscarinique dans les CSPs de grenouille serait quant à elle impliquée dans la régulation de l'expression de la GFAP (Georgiou et al., 1999). Il s'agit d'un filament intermédiaire constituant le cytosquelette et impliqué, entre autres, dans la morphologie, l'adhésion et différentes voies de signalisations (Galou *et al.*, 1997). Après une dénervation, l'expression de la GFAP serait rapidement augmentée dans les CSPs de grenouille. Le maintien de l'activité neuronale, de même que l'application locale de muscarine préviendrait toutefois cette régulation à la hausse. De plus, le blocage des récepteurs muscariniques à l'aide de la gallamine empêcheraient les effets de la stimulation nerveuse et augmenteraient l'expression de la GFAP. Cette augmentation résulterait, par conséquent, de la diminution de la signalisation muscarinique dans les CSPs (Georgiou et al., 1994). Compte tenu du rôle de la GFAP dans la morphologie cellulaire et de sa régulation à la hausse pendant les épisodes de bourgeonnement gliaux et neuronaux, celle-ci pourrait intervenir dans la régénération neuronale.

L'augmentation de la durée des réponses calciques induites par la muscarine dans les CSPs des JNMs bloquées chroniquement pourrait donc prévenir la régulation à la hausse de la GFAP ainsi que le bourgeonnement glial et présynaptique. Cette possibilité est attrayante compte tenu que la fréquence de bourgeonnement des terminaisons nerveuses, durant les huit premiers jours de traitement à l' α -bungarotoxine, ne serait pas différente de celle retrouvée dans les JNMs témoins du muscle *c.p* de la grenouille. Aussi, les adaptations de la réponse muscarinique pourraient servir à compenser la réduction de l'activité synaptique et assurer une certaine stabilité morphologique de la JNM. En ce sens, l'étude des réponses calciques muscariniques dans un stade plus avancé du blocage, où le bourgeonnement massif est entamé, pourrait en dire plus sur cette fonction.

3.4. SUCCESSION TEMPORELLE DES CHANGEMENTS SYNAPTIQUES DÉPENDANTS DE L'ACTIVITÉ

Les changements synaptiques dépendants de l'activité sont temporellement distincts. Par exemple, la réduction de l'amplitude des potentiels de plaque motrice, résultant de la stimulation nerveuse chronique, précéderait l'augmentation de la résistance à la dépression (Nguyen and Atwood, 1990). Puis, les changements postsynaptiques succéderaient aux changements présynaptiques (Cooper et al., 1998). La position des changements gliaux dans la succession temporelle des événements reste cependant à déterminer. Toutefois, compte tenu de la durée de nos traitements chroniques établie à une semaine, il est très probable que les modifications entreprises par les CSPs précèdent les changements musculaires. En effet, chez la plupart des espèces soumises à la stimulation nerveuse chronique, les changements musculaires prendraient au-delà de deux semaines à s'établir (Somasekhar et al., 1996; Sketelj et al., 1997; Cooper et al., 1998; Donoghue et al., 2005). De la même façon, les changements musculaires rapportés chez plusieurs espèces après une dénervation, un blocage à la BoTx, un traitement à la TTX ou à l' α -bungarotoxine nécessiteraient plus d'une semaine pour leur établissement (Lomo and Rosenthal, 1972; Antony and Tonge, 1980; Andreose et al., 1995; Lupa et al., 1995). Au contraire, dans les stades précoces d'une dénervation ou d'un traitement à la BoTx, la GFAP serait rapidement régulée à la hausse dans les CSPs et celles-ci émettraient de nombreux prolongements (Georgiou et al., 1994; Son and Thompson, 1995; O'Malley et al., 1999).

Quant à la relation temporelle entre les changements présynaptiques et gliaux, peu d'indications sont présentement disponibles. Toutefois, dans les préparations dénervées, la formation d'un bourgeon de terminaison nerveuse déclencherait probablement la formation des prolongements gliaux (Koirala et al., 2000). Ainsi, dans ce cas, les changements présynaptiques précéderaient les changements gliaux. Dans le même ordre d'idées, l'augmentation de la fréquence des oscillations calciques astrocytaires, observée après un épisode de stimulation nerveuse, aurait une

cinétique d'induction très lente comparativement à la potentialisation à long-terme de la neurotransmission (Pasti et al., 1997).

D'autre part, les changements gliaux pourraient précéder les changements présynaptiques, compte tenu que ces cellules sont essentielles pour la stabilité de la fonction synaptique. Aussi, leur ablation chronique diminuerait l'efficacité présynaptique des JNMs, chez la grenouille (Reddy et al., 2003). Des changements plus subtils dans les propriétés des CSPs pourraient donc être à l'origine de modifications présynaptiques dépendantes de l'activité.

Les changements présynaptiques et gliaux pourraient également être concomitants et résulter d'un même signal. Le développement d'outils permettant d'inhiber sélectivement la CSP pendant les différents traitements chroniques permettrait sans doute de déterminer si les changements gliaux initient ou sont la conséquence des adaptations présynaptiques ou postsynaptiques. Par exemple, l'utilisation d'anticorps spécifiques contre le 2A12, un épitope exprimé par les CSPs, et du système du complément permettrait d'éliminer ces cellules à différents moments pendant les traitements chroniques (Reddy et al., 2003). De même, l'utilisation d'un système d'expression génique régulé par la tétracycline permettrait de contrôler le moment où un gène ciblé serait exprimé (Gossen and Bujard, 1992). Dans ce système la tétracycline activerait un facteur de transcription, dont l'expression serait sous le contrôle d'un promoteur exclusivement glial. L'activation du facteur de transcription permettrait sa liaison avec le promoteur du gène cible et induirait l'expression de ce dernier au moment désiré. Ainsi, des récepteurs tronqués, des chélateurs endogènes de Ca^{2+} , des protéines G non-fonctionnelles pourraient être exprimés de cette façon et nuire à l'activation des CSPs.

3.5. IMPLICATIONS CLINIQUES

L'étude de la plasticité de la signalisation calcique gliale et de sa corrélation avec l'efficacité présynaptique prend tout son sens quand vient le temps d'aborder des conditions pathologiques de la JNM. Par exemple, dans le cas de la myasthénie

grave, l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs qui caractérise la maladie est susceptible de s'accompagner de changements au niveau de la réponse calcique gliale. C'est donc ici qu'il devient important de comprendre le rôle de cette réponse calcique et de départager ses effets délétères ou bénéfiques sur la neurotransmission. De la même façon, les changements calciques gliaux induits par l'activité nerveuse chronique et leur rôle possible dans la neuroprotection pourraient trouver une application directe dans de nombreuses pathologies neurodégénératives, telles que le parkinson, l'Alzheimer et la chorée de Huntington, et ouvrir la voie à de nouvelles avenues thérapeutiques. D'ailleurs, l'homologie entre les CSPs et les astrocytes du SNC pourrait favoriser l'extrapolation de nos découvertes à la JNM vers ce système plus complexe et encore mal caractérisé.

4. CONCLUSIONS DE LA THÈSE

Cette thèse avait pour objectifs principaux de valider les mécanismes à l'origine de la détermination de l'efficacité présynaptique et de caractériser les propriétés gliales dans les JNMs soumises à une augmentation ou à une diminution expérimentale de l'activité synaptique, caractérisée respectivement par une diminution et une augmentation de l'efficacité présynaptique. Aussi nos résultats ont-ils permis de démontrer la plasticité concomitante des éléments présynaptiques et gliaux, une qualité essentielle pour un rôle actif des CSPs dans la régulation de la neurotransmission et du facteur de sécurité. La plasticité des CSPs suggère donc une régulation différente de la transmission synaptique et des phénomènes de plasticité synaptique par ces cellules. En ce sens, l'activation sélective des CSPs permettrait de vérifier si l'équilibre entre les mécanismes potentialisateurs et dépresseurs gliaux a été déplacé en réponse au changement chronique de l'activité synaptique. À l'inverse, l'inactivation des CSPs permettrait de vérifier la contribution gliale aux phénomènes de plasticité à court-terme dans ces mêmes conditions. En plus de l'étude de la modulation gliale de la neurotransmission, nos travaux ouvrent également la voie à l'étude des mécanismes responsables des adaptations gliales et appelle à la caractérisation des voies de signalisations, à l'identification de leurs rôles respectifs, et à la compréhension de leur régulation et de leurs interactions

dépendantes de l'activité synaptique. Également, notre étude soulève le besoin de comprendre le mode de fonctionnement des CSPs, individuel ou en unité fonctionnelle de plusieurs CSPs associées à une même JNM. Par conséquent, la caractérisation du profil génétique des CSPs et de leur hétérogénéité serait intéressante et permettrait, en outre, le développement d'outils moléculaires ciblant spécifiquement ces cellules.

La plasticité coordonnée des éléments présynaptiques, postsynaptiques et gliaux soulève donc l'importance de considérer ces trois éléments dans l'étude de la plasticité synaptique. Aussi, puisque celle-ci est à la base de l'intégration de l'information nerveuse, le rôle essentiel des cellules gliales dans ce phénomène est maintenant inéluctable. Également, puisque la synapse est le siège de plusieurs pathologies (schizophrénie, dépression, troubles bipolaires...), souvent associées à une plasticité délétère, une contribution positive ou négative des cellules gliales dans cet état est à envisager. Par conséquent, la compréhension des interactions neurone-glie devient primordiale pour une vision intégrée de la synapse, de son fonctionnement et de sa plasticité normale ou pathologique et ce, à travers tout le système nerveux.

5. RÉFÉRENCES DE LA THÈSE

Acheson A, Barker PA, Alderson RF, Miller FD, Murphy RA (1991) Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* 7:265-275.

Akasu T (1986) The effects of substance P on neuromuscular transmission in the frog. *Neurosci Res* 3:275-284.

Alderson RF, Curtis R, Alterman AL, Lindsay RM, DiStefano PS (2000) Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. *Brain Res* 871:210-222.

Alloisio S, Cugnoli C, Ferroni S, Nobile M (2004) Differential modulation of ATP-induced calcium signalling by A1 and A2 adenosine receptors in cultured cortical astrocytes. *Br J Pharmacol* 141:935-942.

Alnaes E, Rahamimoff R (1975) On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. *J Physiol* 248:285-306.

Alshuaib WB, Fahim MA (1990) Aging increases calcium influx at motor nerve terminal. *Int J Dev Neurosci* 8:655-666.

Amzica F, Massimini M (2002) Glial and neuronal interactions during slow wave and paroxysmal activities in the neocortex. *Cereb Cortex* 12:1101-1113.

Andreose JS, Fumagalli G, Lomo T (1995) Number of junctional acetylcholine receptors: control by neural and muscular influences in the rat. *J Physiol* 483 (Pt 2):397-406.

Angleon JK, Betz WJ (2001) Intraterminal Ca²⁺ and spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 85:287-294.

Antony MT, Tonge DA (1980) Effects of denervation and botulinum toxin on muscle sensitivity to acetylcholine and acceptance of foreign innervation in the frog. *J Physiol* 303:23-31.

Aoki C, Pickel VM (1992) C-terminal tail of beta-adrenergic receptors: immunocytochemical localization within astrocytes and their relation to catecholaminergic neurons in N. tractus solitarii and area postrema. *Brain Res* 571:35-49.

- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6822-6829.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443-2450.
- Arenander AT, de Vellis J (1982) Glial-released proteins in neural intercellular communication: molecular mapping, modulation, and influence on neuronal differentiation. *Prog Clin Biol Res* 79:243-269.
- Arenson MS (1991) The effects of muscarine and atropine reveal that inhibitory autoreceptors are present on frog motor nerve terminals but are not activated during transmission. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 343:128-133.
- Arkipova OV, Grishin SN, Sitdikova GF, Zefirov AL (2006) The presynaptic effects of arachidonic acid and prostaglandin E₂ at the frog neuromuscular junction. *Neurosci Behav Physiol* 36:307-312.
- Arkipova OV, Grishin SN, Sitdikova GF, Zefirov AL (2006) The presynaptic effects of arachidonic Acid and prostaglandin e₂ at the frog neuromuscular junction. *Neurosci Behav Physiol* 36:307-312.
- Atwood H, Lnenicka GA (1992) Differential effects of calcium entry on phasic and tonic motor axons of crayfish. *Soc Neurosci Abstr* 18.
- Atwood HL (1976) Organization and synaptic physiology of crustacean neuromuscular systems. *Prog Neurobiol* 7:291-391.
- Augustine GJ, Charlton MP (1986) Calcium dependence of presynaptic calcium current and post-synaptic response at the squid giant synapse. *J Physiol* 381:619-640.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.
- Bal A, Bachelot T, Savasta M, Manier M, Verna JM, Benabid AL, Feuerstein C (1994) Evidence for dopamine D₂ receptor mRNA expression by striatal astrocytes in culture: in situ hybridization and polymerase chain reaction studies. *Brain Res Mol Brain Res* 23:204-212.

- Bambrick LL, Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Wright C, Krueger BK, Fiskum G (2006) Cyclosporin A increases mitochondrial calcium uptake capacity in cortical astrocytes but not cerebellar granule neurons. *J Bioenerg Biomembr* 38:43-47.
- Banker BQ, Kelly SS, Robbins N (1983) Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J Physiol* 339:355-377.
- Banker GA (1980) Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* 209:809-810.
- Banner LR, Herrera AA (1986) Differences in synaptic efficacy at neuromuscular junctions in frog twitch muscles. *J Physiol* 379:205-215.
- Barton SB, Cohen IS, van der Kloot W (1983) The calcium dependence of spontaneous and evoked quantal release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 337:735-751.
- Bayer KU, De Koninck P, Schulman H (2002) Alternative splicing modulates the frequency-dependent response of CaMKII to Ca(2+) oscillations. *Embo J* 21:3590-3597.
- Belair EL, Vallee J, Robitaille R (2005) Long-term in vivo modulation of synaptic efficacy at the neuromuscular junction of *Rana pipiens* frogs. *J Physiol* 569:163-178.
- Bennett MR, Lavidis NA, Lavidis-Armson F (1989) The probability of quantal secretion at release sites of different length in toad (*Bufo marinus*) muscle. *J Physiol* 418:235-249.
- Bennett MR, Farnell L, Gibson WG (2004) The facilitated probability of quantal secretion within an array of calcium channels of an active zone at the amphibian neuromuscular junction. *Biophys J* 86:2674-2690.
- Bennett MR, Farnell L, Gibson WG, Dickens P (2007) Mechanisms of calcium sequestration during facilitation at active zones of an amphibian neuromuscular junction. *J Theor Biol* 247:230-241.
- Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-325.
- Betz WJ (1970) Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 206:629-644.

- Betz WJ, Henkel AW (1994) Okadaic acid disrupts clusters of synaptic vesicles in frog motor nerve terminals. *J Cell Biol* 124:843-854.
- Betz WJ, Caldwell JH, Ribchester RR (1980) Sprouting of active nerve terminals in partially inactive muscles of the rat. *J Physiol* 303:281-297.
- Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 512 (Pt 1):197-209.
- Bradacs H, Cooper R, Msghina M, Atwood H (1997) Differential physiology and morphology of phasic and tonic motor axons in a crayfish limb extensor muscle. *J Exp Biol* 200:677-691.
- Brager DH, Cai X, Thompson SM (2003) Activity-dependent activation of presynaptic protein kinase C mediates post-tetanic potentiation. *Nat Neurosci* 6:551-552.
- Brailoiu E, Miyamoto MD, Dun NJ (2002) Calmodulin increases transmitter release by mobilizing quanta at the frog motor nerve terminal. *Br J Pharmacol* 137:719-727.
- Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40:648-677.
- Brown MC, Holland RL, Ironton R (1980) Nodal and terminal sprouting from motor nerves in fast and slow muscles of the mouse. *J Physiol* 306:493-510.
- Bruneau E, Sutter D, Hume RI, Akaaboune M (2005) Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *J Neurosci* 25:9949-9959.
- Bruneau EG, Akaaboune M (2006) The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo. *Development* 133:4485-4493.
- Burgoyne RD, Weiss JL (2001) The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem J* 353:1-12.
- Cangiano A, Lutzemberger L (1980) Normal EDL and diaphragm muscles differ in their sensitivity to tetrodotoxin. *Acta Physiol Scand* 108:205-207.
- Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21:1911-1922.

- Charbonnier F (2007) Exercise-induced neuroprotection in SMA model mice: a means for determining new therapeutic strategies. *Mol Neurobiol* 35:217-223.
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6:983-992.
- Chin ER (2004) The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. *Proc Nutr Soc* 63:279-286.
- Chin ER (2005) Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J Appl Physiol* 99:414-423.
- Chorna NE, Santiago-Perez LI, Erb L, Seye CI, Neary JT, Sun GY, Weisman GA, Gonzalez FA (2004) P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J Neurochem* 91:119-132.
- Cohen MW, Jones OT, Angelides KJ (1991) Distribution of Ca²⁺ channels on frog motor nerve terminals revealed by fluorescent omega-conotoxin. *J Neurosci* 11:1032-1039.
- Constable AL, Armati PJ, Toyka KV, Hartung HP (1994) Production of prostanoids by Lewis rat Schwann cells in vitro. *Brain Res* 635:75-80.
- Cooper RL, Warren WM, Ashby HE (1998) Activity of phasic motor neurons partially transforms the neuronal and muscle phenotype to a tonic-like state. *Muscle Nerve* 21:921-931.
- Cooper RL, Winslow JL, Govind CK, Atwood HL (1996) Synaptic structural complexity as a factor enhancing probability of calcium-mediated transmitter release. *J Neurophysiol* 75:2451-2466.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.
- Corvalan V, Cole R, de Vellis J, Hagiwara S (1990) Neuronal modulation of calcium channel activity in cultured rat astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4345-4348.
- Cull-Candy SG, Lundh H, Thesleff S (1976) Effects of botulinum toxin on neuromuscular transmission in the rat. *J Physiol* 260:177-203.

- D'Alimonte I, Ciccarelli R, Di Iorio P, Nargi E, Buccella S, Giuliani P, Rathbone MP, Jiang S, Caciagli F, Ballerini P (2007) Activation of P2X(7) receptors stimulates the expression of P2Y(2) receptor mRNA in astrocytes cultured from rat brain. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20:301-316.
- D'Alonzo AJ, Grinnell AD (1985) Profiles of evoked release along the length of frog motor nerve terminals. *J Physiol* 359:235-258.
- Danbolt NC (1994) The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog Neurobiol* 44:377-396.
- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429-440.
- David G, Barrett EF (2003) Mitochondrial Ca²⁺ uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol* 548:425-438.
- David G, Barrett JN, Barrett EF (1998) Evidence that mitochondria buffer physiological Ca²⁺ loads in lizard motor nerve terminals. *J Physiol* 509 (Pt 1):59-65.
- De Winter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bar PR, Niclou SP, van Muiswinkel FL, Verhaagen J (2006) The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci* 32:102-117.
- Decher DC, Wilcox BD, Dave V, Rossman PA, Kimelberg HK (1993) Detection of 5-hydroxytryptamine₂ receptors by radioligand binding, northern blot analysis, and Ca²⁺ responses in rat primary astrocyte cultures. *J Neurosci Res* 35:246-256.
- De Koninck P and Schulman H (1998) Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 279: 227-230
- Diaz J, Pecot-Dechavassine M (1989) Terminal nerve sprouting at the frog neuromuscular junction induced by prolonged tetrodotoxin blockade of nerve conduction. *J Neurocytol* 18:39-46.
- Diaz J, Molgo J, Pecot-Dechavassine M (1989) Sprouting of frog motor nerve terminals after long-term paralysis by botulinum type A toxin. *Neurosci Lett* 96:127-132.

- Dobrunz LE, Stevens CF (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18:995-1008.
- Dodge FA, Jr., Rahamimoff R (1967) Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol* 193:419-432.
- Donoghue P, Doran P, Dowling P, Ohlendieck K (2005) Differential expression of the fast skeletal muscle proteome following chronic low-frequency stimulation. *Biochim Biophys Acta* 1752:166-176.
- Dreyer F, Peper K, Akert K, Sandri C, Moor H (1973) Ultrastructure of the "active zone" in the frog neuromuscular junction. *Brain Res* 62:373-380.
- Dupont G, Goldbeter A (1998) CaM kinase II as frequency decoder of Ca²⁺ oscillations. *Bioessays* 20:607-610.
- Everett AW, Ernst EJ (2004) Increased quantal size in transmission at slow but not fast neuromuscular synapses of apolipoprotein E deficient mice. *Exp Neurol* 185:290-296.
- Fdez E, Hilfiker S (2006) Vesicle pools and synapsins: new insights into old enigmas. *Brain Cell Biol* 35:107-115.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729-743.
- Fengler BT, Lnenicka GA (2002) Activity-dependent plasticity of calcium clearance from crayfish motor axons. *J Neurophysiol* 87:1625-1628.
- Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410:41-49.
- Ferroni S, Marchini C, Ogata T, Schubert P (2002) Recovery of deficient cholinergic calcium signaling by adenosine in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurosci Res* 68:615-621.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:722-732.

- Fill M, Copello JA (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82:893-922.
- Flucher BE, Daniels MP (1989) Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron* 3:163-175.
- Fluck M, Waxham MN, Hamilton MT, Booth FW (2000) Skeletal muscle Ca(2+)-independent kinase activity increases during either hypertrophy or running. *J Appl Physiol* 88:352-358.
- Fox LE, Lloyd PE (2001) Evidence that post-tetanic potentiation is mediated by neuropeptide release in Aplysia. *J Neurophysiol* 86:2845-2855.
- Fulgenzi G, Re L, Graciotti L, Cola V (1992) [Presynaptic effects induced by pretreatment with formamide of the neuromuscular junction of the mouse]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 68:403-407.
- Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, Ibanez CF (1995) Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268:1495-1499.
- Gaffield MA, Betz WJ (2007) Synaptic vesicle mobility in mouse motor nerve terminals with and without synapsin. *J Neurosci* 27:13691-13700.
- Gaffield MA, Rizzoli SO, Betz WJ (2006) Mobility of synaptic vesicles in different pools in resting and stimulated frog motor nerve terminals. *Neuron* 51:317-325.
- Galou M, Gao J, Humbert J, Mericskay M, Li Z, Paulin D, Vicart P (1997) The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies. *Biol Cell* 89:85-97.
- Garcia-Chacon LE, Nguyen KT, David G, Barrett EF (2006) Extrusion of Ca²⁺ from mouse motor terminal mitochondria via a Na⁺-Ca²⁺ exchanger increases post-tetanic evoked release. *J Physiol* 574:663-675.
- Gebicke-Haerter PJ, Wurster S, Schobert A, Hertting G (1988) P₂-purinoceptor induced prostaglandin synthesis in primary rat astrocyte cultures. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 338:704-707.

- Genin A, Davis S, Meziane H, Doyere V, Jeromin A, Roder J, Mallet J, Laroche S (2001) Regulated expression of the neuronal calcium sensor-1 gene during long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Neuroscience* 106:571-577.
- Georgiou J, Charlton MP (1999) Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia* 27:101-109.
- Georgiou J, Robitaille R, Charlton MP (1999) Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci* 19:3836-3846.
- Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP (1994) Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12:443-455.
- Gerschenfeld HM, Wald F, Zadunaisky JA, De Robertis ED (1959) Function of astroglia in the water-ion metabolism of the central nervous system: an electron microscope study. *Neurology* 9:412-425.
- Gilman AG, Schrier BK (1972) Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate in fetal rat brain cell cultures. I. Effect of catecholamines. *Mol Pharmacol* 8:410-416.
- Giniatullin AR, Grishin SN, Sharifullina ER, Petrov AM, Zefirov AL, Giniatullin RA (2005) Reactive oxygen species contribute to the presynaptic action of extracellular ATP at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 565:229-242.
- Giniatullin RA, Sokolova EM (1998) ATP and adenosine inhibit transmitter release at the frog neuromuscular junction through distinct presynaptic receptors. *Br J Pharmacol* 124:839-844.
- Glavinovic MI (1995) Decrease of quantal size and quantal content during tetanic stimulation detected by focal recording. *Neuroscience* 69:271-281.
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-5551.
- Grinnell AD, Herrera AA (1980) Physiological regulation of synaptic effectiveness at frog neuromuscular junctions. *J Physiol* 307:301-317.
- Grinnell AD, Trussell LO (1983) Synaptic strength as a function of motor unit size in the normal frog sartorius. *J Physiol* 338:221-241.
- Grishin S, Shakirzyanova A, Giniatullin A, Afzalov R, Giniatullin R (2005) Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 21:1271-1279.

- Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K (2000) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28:285-296.
- Habets RL, Borst JG (2007) Dynamics of the readily releasable pool during post-tetanic potentiation in the rat calyx of Held synapse. *J Physiol* 581:467-478.
- Hagler DJ, Jr., Goda Y (2001) Properties of synchronous and asynchronous release during pulse train depression in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 85:2324-2334.
- Harris JB, Ribchester RR (1979) The relationship between end-plate size and transmitter release in normal and dystrophic muscles of the mouse. *J Physiol* 296:245-265.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009-1031.
- Henn FA, Hamberger A (1971) Glial cell function: uptake of transmitter substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2686-2690.
- Henning RH (1997) Purinoceptors in neuromuscular transmission. *Pharmacol Ther* 74:115-128.
- Herr VD, Sonnenburg DC, Courogen PM, Fiamengo SA, Downes H (1995) Muscle weakness during tricaine anesthesia. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 110:289-296.
- Herrera AA, Grinnell AD, Wolowske B (1985) Ultrastructural correlates of experimentally altered transmitter release efficacy in frog motor nerve terminals. *Neuroscience* 16:491-500.
- Herrera AA, Grinnell AD, Wolowske B (1985) Ultrastructural correlates of naturally occurring differences in transmitter release efficacy in frog motor nerve terminals. *J Neurocytol* 14:193-202.
- Heuser JE, Reese TS, Landis DM (1974) Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze-fracture. *J Neurocytol* 3:109-131.
- Hevron E, David G, Arnon A, Yaari Y (1986) Acetylcholine modulates two types of presynaptic potassium channels in vertebrate motor nerve terminals. *Neurosci Lett* 72:87-92.

- Hinz I, Wernig A (1988) Prolonged nerve stimulation causes changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 401:557-565.
- Hof PR, Pascale E, Magistretti PJ (1988) K^+ at concentrations reached in the extracellular space during neuronal activity promotes a Ca^{2+} -dependent glycogen hydrolysis in mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 8:1922-1928.
- Holland RL, Brown MC (1980) Postsynaptic transmission block can cause terminal sprouting of a motor nerve. *Science* 207:649-651.
- Holtzclaw LA, Pandhit S, Bare DJ, Mignery GA, Russell JT (2002) Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Glia* 39:69-84.
- Hua SY, Teylan MA, Cimenser A (2007) An antibody to synaptotagmin I facilitates synaptic transmission. *Eur J Neurosci* 25:3217-3225.
- Hui E, Bai J, Wang P, Sugimori M, Llinas RR, Chapman ER (2005) Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5210-5214.
- Idestrup CP, Salter MW (1998) P2Y and P2U receptors differentially release intracellular Ca^{2+} via the phospholipase c/inositol 1,4,5-triphosphate pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord. *Neuroscience* 86:913-923.
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069-1077.
- James G, Butt AM (2001) Changes in P2Y and P2X purinoceptors in reactive glia following axonal degeneration in the rat optic nerve. *Neurosci Lett* 312:33-36.
- James G, Butt AM (2002) P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca^{2+} signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 447:247-260.
- Jensen AM, Chiu SY (1991) Differential intracellular calcium responses to glutamate in type 1 and type 2 cultured brain astrocytes. *J Neurosci* 11:1674-1684.
- Jeromin A, Shayan AJ, Msghina M, Roder J, Atwood HL (1999) Crustacean frequenins: molecular cloning and differential localization at neuromuscular junctions. *J Neurobiol* 41:165-175.
- Jessen KR, Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6:671-682.

- Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS (2000) Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 3:323-329.
- Kamiya H, Zucker RS (1994) Residual Ca²⁺ and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371:603-606.
- Karhunen T, Vilim FS, Alexeeva V, Weiss KR, Church PJ (2001) Targeting of peptidergic vesicles in cotransmitting terminals. *J Neurosci* 21:RC127.
- Katz B, Miledi R (1967) The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol* 189:535-544.
- Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481-492.
- Kawada N, Mizoguchi Y, Kobayashi K, Monna T, Morisawa S (1992) Calcium-dependent prostaglandin biosynthesis by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 47:209-214.
- Kerr LM, Yoshikami D (1984) A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature* 308:282-284.
- Keyser DO, Pellmar TC (1994) Synaptic transmission in the hippocampus: critical role for glial cells. *Glia* 10:237-243.
- Kim YI, Lomo T, Lupa MT, Thesleff S (1984) Miniature end-plate potentials in rat skeletal muscle poisoned with botulinum toxin. *J Physiol* 356:587-599.
- King MJ, Atwood HL, Govind CK (1996) Structural features of crayfish phasic and tonic neuromuscular terminals. *J Comp Neurol* 372:618-626.
- Knapp HR, Oelz O, Roberts LJ, Sweetman BJ, Oates JA, Reed PW (1977) Ionophores stimulate prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:4251-4255.
- Ko CP (1984) Regeneration of the active zone at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 98:1685-1695.
- Ko CP (1985) Formation of the active zone at developing neuromuscular junctions in larval and adult bullfrogs. *J Neurocytol* 14:487-512.
- Koirala S, Qiang H, Ko CP (2000) Reciprocal interactions between perisynaptic Schwann cells and regenerating nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *J Neurobiol* 44:343-360.

- Kolikova J, Afzalov R, Giniatullina A, Surin A, Giniatullin R, Khiroug L (2006) Calcium-dependent trapping of mitochondria near plasma membrane in stimulated astrocytes. *Brain Cell Biol* 35:75-86.
- Koltgen D, Ceballos-Baumann AO, Franke C (1994) Botulinum toxin converts muscle acetylcholine receptors from adult to embryonic type. *Muscle Nerve* 17:779-784.
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK (1966) Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:768-787.
- Kuno M, Turkanis SA, Weakly JN (1971) Correlation between nerve terminal size and transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 213:545-556.
- Kuromi H, Kidokoro Y (1999) The optically determined size of exo/endo cycling vesicle pool correlates with the quantal content at the neuromuscular junction of *Drosophila* larvae. *J Neurosci* 19:1557-1565.
- Kuromi H, Kidokoro Y (2000) Tetanic stimulation recruits vesicles from reserve pool via a cAMP-mediated process in *Drosophila* synapses. *Neuron* 27:133-143.
- Kuromi H, Kidokoro Y (2002) Selective replenishment of two vesicle pools depends on the source of Ca²⁺ at the *Drosophila* synapse. *Neuron* 35:333-343.
- Kuromi H, Kidokoro Y (2003) Two synaptic vesicle pools, vesicle recruitment and replenishment of pools at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurocytol* 32:551-565.
- Lin DT, Wu J, Holstein D, Upadhyay G, Rourk W, Muller E, Lechleiter JD (2007) Ca²⁺ signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiol Aging* 28:99-111.
- Lindgren CA, Malik, P., Yu, T.-Y. and Graves, A. (2005) Endocannabinoids mediate muscarine induced synaptic depression at the vertebrate neuromuscular junction. *Society for Neuroscience Abstracts* 31, 729.1.
- Llinas R, Gruner JA, Sugimori M, McGuinness TL, Greengard P (1991) Regulation by synapsin I and Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II of the transmitter release in squid giant synapse. *J Physiol* 436:257-282.

- Lnenicka GA, Atwood HL (1985) Long-term facilitation and long-term adaptation at synapses of a crayfish phasic motoneuron. *J Neurobiol* 16:97-110.
- Lnenicka GA, Zhao YG (1991) Seasonal differences in the physiology and morphology of crayfish motor terminals. *J Neurobiol* 22:561-569.
- Lnenicka GA, Atwood HL, Marin L (1986) Morphological transformation of synaptic terminals of a phasic motoneuron by long-term tonic stimulation. *J Neurosci* 6:2252-2258.
- Lnenicka GA, Hong SJ, Combatti M, LePage S (1991) Activity-dependent development of synaptic varicosities at crayfish motor terminals. *J Neurosci* 11:1040-1048.
- Lohof AM, Ip NY, Poo MM (1993) Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 363:350-353.
- Lomo T, Rosenthal J (1972) Control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat. *J Physiol* 221:493-513.
- Lomo T, Westgaard RH (1975) Further studies on the control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat. *J Physiol* 252:603-626.
- Lopes-Cardozo M, Larsson OM, Schousboe A (1986) Acetoacetate and glucose as lipid precursors and energy substrates in primary cultures of astrocytes and neurons from mouse cerebral cortex. *J Neurochem* 46:773-778.
- Lubischer JL, Bebinger DM (1999) Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:RC46.
- Lupa MT, Krzemien DM, Schaller KL, Caldwell JH (1995) Expression and distribution of sodium channels in short- and long-term denervated rodent skeletal muscles. *J Physiol* 483 (Pt 1):109-118.
- Lupa MT, Tabti N, Thesleff S, Vyskocil F, Yu SP (1986) The nature and origin of calcium-insensitive miniature end-plate potentials at rodent neuromuscular junctions. *J Physiol* 381:607-618.
- Lutz GJ, Bremner SN, Bade MJ, Lieber RL (2001) Identification of myosin light chains in *Rana pipiens* skeletal muscle and their expression patterns along single fibres. *J Exp Biol* 204:4237-4248.

- Mackler JM, Drummond JA, Loewen CA, Robinson IM, Reist NE (2002) The C(2)B Ca(2+)-binding motif of synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. *Nature* 418:340-344.
- Madden KS, van der Kloot W (1982) At the frog neuromuscular junction prostaglandin synthase inhibitors depress and PGE partially restores quantal acetylcholine release. *Brain Res* 234:464-468.
- Magleby KL, Zengel JE (1975) A dual effect of repetitive stimulation on post-tetanic potentiation of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 245:163-182.
- Magleby KL, Zengel JE (1976) Augmentation: A process that acts to increase transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 257:449-470.
- Magleby KL, Pallotta BS (1981) A study of desensitization of acetylcholine receptors using nerve-released transmitter in the frog. *J Physiol* 316:225-250.
- Mantilla CB, Zhan WZ, Sieck GC (2004) Neurotrophins improve neuromuscular transmission in the adult rat diaphragm. *Muscle Nerve* 29:381-386.
- Mantilla CB, Rowley KL, Zhan WZ, Fahim MA, Sieck GC (2007) Synaptic vesicle pools at diaphragm neuromuscular junctions vary with motoneuron soma, not axon terminal, inactivity. *Neuroscience* 146:178-189.
- Marin A, Urena J, Tabares L (1996) Intracellular calcium release mediated by noradrenaline and acetylcholine in mammalian pineal cells. *J Pineal Res* 21:15-28.
- Martin DL (1992) Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5:81-94.
- Martinez-Pena y Valenzuela I, Hume RI, Krejci E, Akaaboune M (2005) In vivo regulation of acetylcholinesterase insertion at the neuromuscular junction. *J Biol Chem* 280:31801-31808.
- Matteoli M, Haimann C, De Camilli P (1990) Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 37:271-275.
- Matteoli M, Haimann C, Torri-Tarelli F, Polak JM, Ceccarelli B, De Camilli P (1988) Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7366-7370.

- Matthews-Bellinger J, Salpeter MM (1978) Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications. *J Physiol* 279:197-213.
- Matveev V, Bertram R, Sherman A (2006) Residual bound Ca^{2+} can account for the effects of Ca^{2+} buffers on synaptic facilitation. *J Neurophysiol* 96:3389-3397.
- McCarthy KD, de Vellis J (1978) Alpha-adrenergic receptor modulation of beta-adrenergic, adenosine and prostaglandin E1 increased adenosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in primary cultures of glia. *J Cyclic Nucleotide Res* 4:15-26.
- McCarthy KD, Salm AK (1991) Pharmacologically-distinct subsets of astroglia can be identified by their calcium response to neuroleptands. *Neuroscience* 41:325-333.
- Mercier AJ, Bradacs H, Atwood HL (1992) Long-term adaptation of crayfish neurons depends on the frequency and number of impulses. *Brain Res* 598:221-224.
- Meriney SD, Grinnell AD (1991) Endogenous adenosine modulates stimulation-induced depression at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 443:441-455.
- Milani D, Facci L, Guidolin D, Leon A, Skaper SD (1989) Activation of polyphosphoinositide metabolism as a signal-transducing system coupled to excitatory amino acid receptors in astroglial cells. *Glia* 2:161-169.
- Millar AG, Bradacs H, Charlton MP, Atwood HL (2002) Inverse relationship between release probability and readily releasable vesicles in depressing and facilitating synapses. *J Neurosci* 22:9661-9667.
- Millar AG, Zucker RS, Ellis-Davies GC, Charlton MP, Atwood HL (2005) Calcium sensitivity of neurotransmitter release differs at phasic and tonic synapses. *J Neurosci* 25:3113-3125.
- Milton RL, Behforouz MA (1995) Na channel density in extrajunctional sarcolemma of fast and slow twitch mouse skeletal muscle fibres: functional implications and plasticity after fast motoneuron transplantation on to a slow muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 16:430-439.
- Misler S, Hurlbut WP (1983) Post-tetanic potentiation of acetylcholine release at the frog neuromuscular junction develops after stimulation in Ca^{2+} -free solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:315-319.

- Misler S, Falke L, Martin S (1987) Cation dependence of posttetanic potentiation of neuromuscular transmission. *Am J Physiol* 252:C55-62.
- Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ (1996) Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17:203-215.
- Mitterauer B (1998) An interdisciplinary approach towards a theory of consciousness. *Biosystems* 45:99-121.
- Msghina M, Govind CK, Atwood HL (1998) Synaptic structure and transmitter release in crustacean phasic and tonic motor neurons. *J Neurosci* 18:1374-1382.
- Msghina M, Millar AG, Charlton MP, Govind CK, Atwood HL (1999) Calcium entry related to active zones and differences in transmitter release at phasic and tonic synapses. *J Neurosci* 19:8419-8434.
- Mulkey RM, Zucker RS (1992) Posttetanic potentiation at the crayfish neuromuscular junction is dependent on both intracellular calcium and sodium ion accumulation. *J Neurosci* 12:4327-4336.
- Mulkey RM, Zucker RS (1993) Calcium released by photolysis of DM-nitrophen triggers transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol* 462:243-260.
- Muller T, Fritschy JM, Grosche J, Pratt GD, Mohler H, Kettenmann H (1994) Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABA_A receptor expression in Bergmann glial cells. *J Neurosci* 14:2503-2514.
- Mulligan SJ, MacVicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199.
- Narita K, Akita T, Osanai M, Shirasaki T, Kijima H, Kuba K (1998) A Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mechanism involved in asynchronous exocytosis at frog motor nerve terminals. *J Gen Physiol* 112:593-609.
- Narumi S, Kimelberg HK, Bourke RS (1978) Effects of norepinephrine on the morphology and some enzyme activities of primary monolayer cultures from rat brain. *J Neurochem* 31:1479-1490.

- Naves LA, Van der Kloot W (2001) Repetitive nerve stimulation decreases the acetylcholine content of quanta at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 532:637-647.
- Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.
- Newburgh RW, Rosenberg RN (1972) Effect of norepinephrine on glucose metabolism in glioblastoma and neuroblastoma cells in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1677-1680.
- Newman EA (2005) Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity. *J Neurosci* 25:5502-5510.
- Nguyen PV, Atwood HL (1990) Expression of long-term adaptation of synaptic transmission requires a critical period of protein synthesis. *J Neurosci* 10:1099-1109.
- Nguyen PV, Atwood HL (1990) Axotomy-induced temporal dissociation of long-term adaptive changes at neuromuscular synapses of a crayfish phasic motoneuron. *Brain Res* 533:107-112.
- Nguyen PV, Atwood HL (1992) Maintenance of long-term adaptation of synaptic transmission requires axonal transport following induction in an identified crayfish motoneuron. *Exp Neurol* 115:414-422.
- Nguyen PV, Atwood HL (1994) Altered impulse activity modifies synaptic physiology and mitochondria in crayfish phasic motor neurons. *J Neurophysiol* 72:2944-2955.
- Nguyen PV, Marin L, Atwood HL (1997) Synaptic physiology and mitochondrial function in crayfish tonic and phasic motor neurons. *J Neurophysiol* 78:281-294.
- Nudell BM, Grinnell AD (1982) Inverse relationship between transmitter release and terminal length in synapses on frog muscle fibers of uniform input resistance. *J Neurosci* 2:216-224.
- O'Malley JP, Waran MT, Balice-Gordon RJ (1999) In vivo observations of terminal Schwann cells at normal, denervated, and reinnervated mouse neuromuscular junctions. *J Neurobiol* 38:270-286.

- Olafsson P, Wang T, Lu B (1995) Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca(2+)-binding protein frequenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8001-8005.
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292:923-926.
- Oliveira L, Timoteo MA, Correia-de-Sa P (2004) Tetanic depression is overcome by tonic adenosine A(2A) receptor facilitation of L-type Ca(2+) influx into rat motor nerve terminals. *J Physiol* 560:157-168.
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:788-806.
- Pang ZP, Melicoff E, Padgett D, Liu Y, Teich AF, Dickey BF, Lin W, Adachi R, Sudhof TC (2006) Synaptotagmin-2 is essential for survival and contributes to Ca²⁺ triggering of neurotransmitter release in central and neuromuscular synapses. *J Neurosci* 26:13493-13504.
- Pappas D, Harzati, LN., Robitaille, R. (1999) Arachidonic acid and PGE₂ as possible glial modulators of synaptic activity at the frog neuromuscular junction. *Society for Neuroscience Abstracts*.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17:7817-7830.
- Patton BL, Chiu AY, Sanes JR (1998) Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft. *Nature* 393:698-701.
- Pawson PA, Grinnell AD (1990) Physiological differences between strong and weak frog neuromuscular junctions: a study involving tetanic and posttetanic potentiation. *J Neurosci* 10:1769-1778.
- Pearce B, Murphy S, Jeremy J, Morrow C, Dandona P (1989) ATP-evoked Ca²⁺ mobilisation and prostanoid release from astrocytes: P₂-purinergic receptors linked to phosphoinositide hydrolysis. *J Neurochem* 52:971-977.

- Peng HB, Xie H, Rossi SG, Rotundo RL (1999) Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J Cell Biol* 145:911-921.
- Peng YY (1998) Effects of mitochondrion on calcium transients at intact presynaptic terminals depend on frequency of nerve firing. *J Neurophysiol* 80:186-195.
- Pette D, Staron RS (2001) Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* 115:359-372.
- Pinard A, Levesque S, Vallee J, Robitaille R (2003) Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *Eur J Neurosci* 18:3241-3250.
- Plomp JJ, Molenaar PC (1996) Involvement of protein kinases in the upregulation of acetylcholine release at endplates of alpha-bungarotoxin-treated rats. *J Physiol* 493 (Pt 1):175-186.
- Plomp JJ, van Kempen GT, Molenaar PC (1992) Adaptation of quantal content to decreased postsynaptic sensitivity at single endplates in alpha-bungarotoxin-treated rats. *J Physiol* 458:487-499.
- Plomp JJ, van Kempen GT, Molenaar PC (1994) The upregulation of acetylcholine release at endplates of alpha-bungarotoxin-treated rats: its dependency on calcium. *J Physiol* 478 (Pt 1):125-136.
- Plomp JJ, Van Kempen GT, De Baets MB, Graus YM, Kuks JB, Molenaar PC (1995) Acetylcholine release in myasthenia gravis: regulation at single end-plate level. *Ann Neurol* 37:627-636.
- Poage RE, Meriney SD (2002) Presynaptic calcium influx, neurotransmitter release, and neuromuscular disease. *Physiol Behav* 77:507-512.
- Poitry-Yamate CL, Poitry S, Tsacopoulos M (1995) Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci* 15:5179-5191.
- Pongs O, Lindemeier J, Zhu XR, Theil T, Engelkamp D, Krah-Jentgens I, Lambrecht HG, Koch KW, Schwemer J, Rivosecchi R (1993) Frequentin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 11:15-28.

- Porter JT, McCarthy KD (1995) GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in $[Ca^{2+}]_i$. *Glia* 13:101-112.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16:5073-5081.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51:439-455.
- Propst JW, Ko CP (1987) Correlations between active zone ultrastructure and synaptic function studied with freeze-fracture of physiologically identified neuromuscular junctions. *J Neurosci* 7:3654-3664.
- Propst JW, Herrera AA, Ko CP (1986) A comparison of active zone structure in frog neuromuscular junctions from two fast muscles with different synaptic efficacy. *J Neurocytol* 15:525-534.
- Pumplin DW, Reese TS, Llinas R (1981) Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7210-7213.
- Quiroz-Rothe E, Rivero JL (2004) Coordinated expression of myosin heavy chains, metabolic enzymes, and morphological features of porcine skeletal muscle fiber types. *Microsc Res Tech* 65:43-61.
- Rakic P (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol* 141:283-312.
- Ransom BR, Goldring S (1973) Slow hyperpolarization in cells presumed to be glia in cerebral cortex of cat. *J Neurophysiol* 36:879-892.
- Ransom BR, Goldring S (1973) Slow depolarization in cells presumed to be glia in cerebral cortex of cat. *J Neurophysiol* 36:869-878.
- Ravin R, Spira ME, Parnas H, Parnas I (1997) Simultaneous measurement of intracellular Ca^{2+} and asynchronous transmitter release from the same crayfish bouton. *J Physiol* 501 (Pt 2):251-262.
- Ravin R, Parnas H, Spira ME, Volfovsky N, Parnas I (1999) Simultaneous measurement of evoked release and $[Ca^{2+}]_i$ in a crayfish release bouton reveals high affinity of release to Ca^{2+} . *J Neurophysiol* 81:634-642.

- Reddy LV, Koirala S, Sugiura Y, Herrera AA, Ko CP (2003) Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron* 40:563-580.
- Redman RS, Silinsky EM (1993) A selective adenosine antagonist (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) eliminates both neuromuscular depression and the action of exogenous adenosine by an effect on A1 receptors. *Mol Pharmacol* 44:835-840.
- Redman RS, Silinsky EM (1994) ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J Physiol* 477 (Pt 1):117-127.
- Reid B, Slater CR, Bewick GS (1999) Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *J Neurosci* 19:2511-2521.
- Reid B, Martinov VN, Nja A, Lomo T, Bewick GS (2003) Activity-dependent plasticity of transmitter release from nerve terminals in rat fast and slow muscles. *J Neurosci* 23:9340-9348.
- Reynolds ML, Woolf CJ (1992) Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *Journal of Neurocytology* 21:50-66.
- Ribchester RR, Thomson D, Haddow LJ, Ushkaryov YA (1998) Enhancement of spontaneous transmitter release at neonatal mouse neuromuscular junctions by the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *J Physiol* 512 (Pt 3):635-641.
- Richards DA, Guatimosim C, Betz WJ (2000) Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron* 27:551-559.
- Richards DA, Guatimosim C, Rizzoli SO, Betz WJ (2003) Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 39:529-541.
- Rizzoli SO, Betz WJ (2004) The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science* 303:2037-2039.
- Rizzuto R (2003) Calcium mobilization from mitochondria in synaptic transmitter release. *J Cell Biol* 163:441-443.
- Rizzuto R, Duchen MR, Pozzan T (2004) Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Sci STKE* 2004:re1.

- Roberts WM, Jacobs RA, Hudspeth AJ (1990) Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J Neurosci* 10:3664-3684.
- Robitaille R (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 15:7121-7131.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847-855.
- Robitaille R, Tremblay JP (1987) Non-uniform release at the frog neuromuscular junction: evidence of morphological and physiological plasticity. *Brain Res* 434:95-116.
- Robitaille R, Charlton MP (1992) Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J Neurosci* 12:297-305.
- Robitaille R, Adler EM, Charlton MP (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5:773-779.
- Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP (1997) Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 504 (Pt 2):337-347.
- Robitaille R, Thomas S, Charlton MP (1999) Effects of adenosine on Ca²⁺ entry in the nerve terminal of the frog neuromuscular junction. *Can J Physiol Pharmacol* 77:707-714.
- Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Charlton MP (1993) Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 11:645-655.
- Rochel S, Robbins N (1987) Acetylcholine receptor availability and transmission efficacy. *Brain Res* 435:41-47.
- Rochon D, Rouse I, Robitaille R (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21:3819-3829.
- Rogozhin AA, Pang KK, Bukharaeva E, Young C, Slater CR (2008) Recovery of mouse neuromuscular junctions from single and repeated injections of botulinum neurotoxin A. *J Physiol*.

- Rose AJ, Frosig C, Kiens B, Wojtaszewski JF, Richter EA (2007) Effect of endurance exercise training on Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II expression and signalling in skeletal muscle of humans. *J Physiol* 583:785-795.
- Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S (1990) slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* 4:2169-2187.
- Ruff RL (1996) Sodium channel slow inactivation and the distribution of sodium channels on skeletal muscle fibres enable the performance properties of different skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol Scand* 156:159-168.
- Santafe MM, Urbano FJ, Lanuza MA, Uchitel OD (2000) Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals. *Neuroscience* 95:227-234.
- Schaad NC, De Castro E, Nef S, Hegi S, Hinrichsen R, Martone ME, Ellisman MH, Sikkink R, Rusnak F, Sygush J, Nef P (1996) Direct modulation of calmodulin targets by the neuronal calcium sensor NCS-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9253-9258.
- Schaller KL, Krzemien DM, McKenna NM, Caldwell JH (1992) Alternatively spliced sodium channel transcripts in brain and muscle. *J Neurosci* 12:1370-1381.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 80:717-766.
- Shahrezaei V, Cao A, Delaney KR (2006) Ca²⁺ from one or two channels controls fusion of a single vesicle at the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 26:13240-13249.
- Shakiryanova D, Tully A, Hewes RS, Deitcher DL, Levitan ES (2005) Activity-dependent liberation of synaptic neuropeptide vesicles. *Nat Neurosci* 8:173-178.
- Shakiryanova D, Klose MK, Zhou Y, Gu T, Deitcher DL, Atwood HL, Hewes RS, Levitan ES (2007) Presynaptic ryanodine receptor-activated calmodulin kinase II increases vesicle mobility and potentiates neuropeptide release. *J Neurosci* 27:7799-7806.

- Shao Y, McCarthy KD (1995) Receptor-mediated calcium signals in astroglia: multiple receptors, common stores and all-or-nothing responses. *Cell Calcium* 17:187-196.
- Shapira R, Silberberg SD, Ginsburg S, Rahamimoff R (1987) Activation of protein kinase C augments evoked transmitter release. *Nature* 325:58-60.
- Sheppard CA, Simpson PB, Sharp AH, Nucifora FC, Ross CA, Lange GD, Russell JT (1997) Comparison of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor distribution and subcellular Ca²⁺ release sites that support Ca²⁺ waves in cultured astrocytes. *J Neurochem* 68:2317-2327.
- Shupliakov O, Atwood HL, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Brodin L (1995) Presynaptic glutamate levels in tonic and phasic motor axons correlate with properties of synaptic release. *J Neurosci* 15:7168-7180.
- Silinsky EM (1975) On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J Physiol* 247:145-162.
- Silinsky EM (2004) Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 558:389-401.
- Silinsky EM, Redman RS (1996) Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog. *J Physiol* 492 (Pt 3):815-822.
- Simpson PB, Mehotra S, Lange GD, Russell JT (1997) High density distribution of endoplasmic reticulum proteins and mitochondria at specialized Ca²⁺ release sites in oligodendrocyte processes. *J Biol Chem* 272:22654-22661.
- Simpson PB, Mehotra S, Langley D, Sheppard CA, Russell JT (1998) Specialized distributions of mitochondria and endoplasmic reticulum proteins define Ca²⁺ wave amplification sites in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 52:672-683.
- Sketelj J, Crne-Finderle N, Brzin M (1992) Influence of denervation on the molecular forms of junctional and extrajunctional acetylcholinesterase in fast and slow muscles of the rat. *Neurochem Int* 21:415-421.

- Sketelj J, Leisner E, Gohlsch B, Skorjanc D, Pette D (1997) Specific impulse patterns regulate acetylcholinesterase activity in skeletal muscles of rats and rabbits. *J Neurosci Res* 47:49-57.
- Snider WD, Harris GL (1979) A physiological correlate of disuse-induced sprouting at the neuromuscular junction. *Nature* 281:69-71.
- Sokolova E, Grishin S, Shakirzyanova A, Talantova M, Giniatullin R (2003) Distinct receptors and different transduction mechanisms for ATP and adenosine at the frog motor nerve endings. *Eur J Neurosci* 18:1254-1264.
- Somasekhar T, Nordlander RH, Reiser PJ (1996) Alterations in neuromuscular junction morphology during fast-to-slow transformation of rabbit skeletal muscles. *J Neurocytol* 25:315-331.
- Son Y-J, Thompson WS (1995) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14:133-141.
- Son Y-J, Trachtenberg JT, Thompson WJ (1996) Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *TINS* 19:280-285.
- Sontheimer H, Minturn JE, Black JA, Ransom BR, Waxman SG (1991) Two types of Na⁽⁺⁾-currents in cultured rat optic nerve astrocytes: changes with time in culture and with age of culture derivation. *J Neurosci Res* 30:275-287.
- Sorg O, Magistretti PJ (1991) Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain Res* 563:227-233.
- Stevens B, Ishibashi T, Chen JF, Fields RD (2004) Adenosine: an activity-dependent axonal signal regulating MAP kinase and proliferation in developing Schwann cells. *Neuron Glia Biol* 1:23-34.
- Suh HW, Lee HK, Seo YJ, Kwon MS, Shim EJ, Lee JY, Choi SS, Lee JH (2005) Kainic acid (KA)-induced Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) expression in the neurons, astrocytes and microglia of the mouse hippocampal CA3 region, and the phosphorylated CaMK II only in the hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 381:223-227.

- Suzuki S, Osanai M, Mitsumoto N, Akita T, Narita K, Kijima H, Kuba K (2002) Ca²⁺-dependent Ca²⁺ clearance via mitochondrial uptake and plasmalemmal extrusion in frog motor nerve terminals. *J Neurophysiol* 87:1816-1823.
- Suzuki S, Osanai M, Murase M, Suzuki N, Ito K, Shirasaki T, Narita K, Ohnuma K, Kuba K, Kijima H (2000) Ca²⁺ dynamics at the frog motor nerve terminal. *Pflugers Arch* 440:351-365.
- Talbot JD, David G, Barrett EF (2003) Inhibition of mitochondrial Ca²⁺ uptake affects phasic release from motor terminals differently depending on external [Ca²⁺]. *J Neurophysiol* 90:491-502.
- Tanabe N, Kijima H (1989) Both augmentation and potentiation occur independently of internal Ca²⁺ at the frog neuromuscular junction. *Neurosci Lett* 99:147-152.
- Tang Y, Zucker RS (1997) Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron* 18:483-491.
- Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH (2008) Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* 88:983-1008.
- Thesleff S, Molgo J, Lundh H (1983) Botulinum toxin and 4-aminoquinoline induce a similar abnormal type of spontaneous quantal transmitter release at the rat neuromuscular junction. *Brain Res* 264:89-97.
- Thiagarajan TC, Piedras-Renteria ES, Tsien RW (2002) alpha- and betaCaMKII. Inverse regulation by neuronal activity and opposing effects on synaptic strength. *Neuron* 36:1103-1114.
- Thomas S, Robitaille R (2001) Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21:1087-1095.
- Todd KJ, Robitaille R (2007) The outcome of synaptic plasticity is determined by pattern-dependent endogenous glial activity. *Society for Neuroscience Abstracts* 252.7/K23.
- Todd KJ, Auld DS, Robitaille R (2007) Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci* 25:1287-1296.
- Todd KJ, Serrano A, Lacaille JC, Robitaille R (2006) Glial cells in synaptic plasticity. *J Physiol Paris* 99:75-83.

- Tong JJ (2007) Mitochondrial delivery is essential for synaptic potentiation. *Biol Bull* 212:169-175.
- Tonge DA (1974) Chronic effects of botulinum toxin on neuromuscular transmission and sensitivity to acetylcholine in slow and fast skeletal muscle of the mouse. *J Physiol* 241:127-139.
- Trussell LO, Grinnell AD (1985) The regulation of synaptic strength within motor units of the frog cutaneous pectoris muscle. *J Neurosci* 5:243-254.
- Tsacopoulos M, Veuthey AL, Saravelos SG, Perrottet P, Tsoupras G (1994) Glial cells transform glucose to alanine, which fuels the neurons in the honeybee retina. *J Neurosci* 14:1339-1351.
- Tsujimoto T, Kuno M (1988) Calcitonin gene-related peptide prevents disuse-induced sprouting of rat motor nerve terminals. *J Neurosci* 8:3951-3957.
- Tsujimoto T, Umemiya M, Kuno M (1990) Terminal sprouting is not responsible for enhanced transmitter release at disused neuromuscular junctions of the rat. *J Neurosci* 10:2059-2065.
- Ulenkate HJ, Gispen WH, Jennekens FG (1996) Effects of ciliary neurotrophic factor on retrograde cell reaction after facial nerve crush in young adult rats. *Brain Res* 717:29-37.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661.
- van Calker D, Muller M, Hamprecht B (1980) Regulation by secretin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin of cyclic AMP accumulation in cultured brain cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6907-6911.
- Van der Kloot W (1993) Nicotinic agonists antagonize quantal size increases and evoked release at frog neuromuscular junction. *J Physiol* 468:567-589.
- Van der Kloot W (1994) Facilitation of transmission at the frog neuromuscular junction at 0 degrees C is not maximal at time zero. *J Neurosci* 14:5722-5724.
- Van der Kloot W, Molgo J (1993) Facilitation and delayed release at about 0 degree C at the frog neuromuscular junction: effects of calcium chelators, calcium transport inhibitors, and okadaic acid. *J Neurophysiol* 69:717-729.

- Van der Kloot W, Molgo J (1994) Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev* 74:899-991.
- Van der Kloot W, Molgo J, Naves LA (1997) Cholinergic agonists decrease quantal output at the frog neuromuscular junction by targeting a calcium channel blocked by omega-conotoxin. *Pflugers Arch* 434:735-741.
- Van der Kloot W, Benjamin WB, Balezina OP (1998) Calcitonin gene-related peptide acts presynaptically to increase quantal size and output at frog neuromuscular junctions. *J Physiol* 507 (Pt 3):689-695.
- Van Der Zee EA, De Jong GI, Strosberg AD, Luiten PG (1993) Muscarinic acetylcholine receptor-expression in astrocytes in the cortex of young and aged rats. *Glia* 8:42-50.
- Van Kempen GT, Trip SA, Molenaar PC (1999) Acetylcholinesterase activity of skeletal muscle in a non-immunogenic model for myasthenia gravis in rats. *J Neural Transm* 106:423-431.
- van Koppen CJ, Kaiser B (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* 98:197-220.
- VanSaun M, Humburg BC, Arnett MG, Pence M, Werle MJ (2007) Activation of Matrix Metalloproteinase-3 is altered at the frog neuromuscular junction following changes in synaptic activity. *Dev Neurobiol* 67:1488-1497.
- Verderio C, Bianco F, Blanchard MP, Bergami M, Canossa M, Scarfone E, Matteoli M (2006) Cross talk between vestibular neurons and Schwann cells mediates BDNF release and neuronal regeneration. *Brain Cell Biol* 35:187-201.
- Verkhatsky A, Steinhauser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32:380-412.
- Verma V, Reese TS (1984) Structure and distribution of neuromuscular junctions on slow muscle fibers in the frog. *Neuroscience* 12:647-662.
- Verstreken P, Ly CV, Venken KJ, Koh TW, Zhou Y, Bellen HJ (2005) Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47:365-378.

- Wachman ES, Poage RE, Stiles JR, Farkas DL, Meriney SD (2004) Spatial Distribution of Calcium Entry Evoked by Single Action Potentials within the Presynaptic Active Zone. *J Neurosci* 24:2877-2885.
- Walrond JP, Reese TS (1985) Structure of axon terminals and active zones at synapses on lizard twitch and tonic muscle fibers. *J Neurosci* 5:1118-1131.
- Walz W (2000) Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia* 31:95-103.
- Wang CY, Yang F, He X, Chow A, Du J, Russell JT, Lu B (2001) Ca(2+) binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca(2+) channels and transmitter release. *Neuron* 32:99-112.
- Wang CY, Yang F, He XP, Je HS, Zhou JZ, Eckermann K, Kawamura D, Feng L, Shen L, Lu B (2002) Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. *J Biol Chem* 277:10614-10625.
- Wang X, Berninger B, Poo M (1998) Localized synaptic actions of neurotrophin-4. *J Neurosci* 18:4985-4992.
- Wang X, Engisch KL, Li Y, Pinter MJ, Cope TC, Rich MM (2004) Decreased synaptic activity shifts the calcium dependence of release at the mammalian neuromuscular junction in vivo. *J Neurosci* 24:10687-10692.
- Wang X, Engisch KL, Teichert RW, Olivera BM, Pinter MJ, Rich MM (2006) Prolongation of evoked and spontaneous synaptic currents at the neuromuscular junction after activity blockade is caused by the upregulation of fetal acetylcholine receptors. *J Neurosci* 26:8983-8987.
- Wehrwein EA, Roskelley EM, Spitsbergen JM (2002) GDNF is regulated in an activity-dependent manner in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 26:206-211.
- Wells DG, McKechnie BA, Kelkar S, Fallon JR (1999) Neurotrophins regulate agrin-induced postsynaptic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1112-1117.
- Wernig A, Pecot-Dechavassine M, Stover H (1980) Sprouting and regression of the nerve at the frog neuromuscular junction in normal conditions and after prolonged paralysis with curare. *J Neurocytol* 9:278-303.

- Wernig A, Dorlochter M, Palazis P (1996) Differential sensitivity to Mg(2+)-and tubocurarine-block of frog neuromuscular junctions in summer and winter. *Neurosci Lett* 207:41-44.
- Whitaker-Azmitia PM, Clarke C, Azmitia EC (1993) Localization of 5-HT_{1A} receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action. *Synapse* 14:201-205.
- Windisch A, Gundersen K, Szabolcs MJ, Gruber H, Lomo T (1998) Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. *J Physiol* 510 (Pt 2):623-632.
- Wines MM, Letinsky MS (1988) Motor nerve terminal sprouting in formamide-treated inactive amphibian skeletal muscle. *J Neurosci* 8:3909-3919.
- Wines MM, Letinsky MS (1991) Inactivity-induced motor nerve terminal sprouting in amphibian skeletal muscles chronically blocked by alpha-bungarotoxin. *Exp Neurol* 111:115-122.
- Wojtowicz JM, Marin L, Atwood HL (1994) Activity-induced changes in synaptic release sites at the crayfish neuromuscular junction. *J Neurosci* 14:3688-3703.
- Wood SJ, Slater CR (2001) Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol* 64:393-429.
- Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R, Williams RS (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296:349-352.
- Wu LG, Betz WJ (1999) Spatial variability in release at the frog neuromuscular junction measured with FM1-43. *Can J Physiol Pharmacol* 77:672-678.
- Xie K, Wang T, Olafsson P, Mizuno K, Lu B (1997) Activity-dependent expression of NT-3 in muscle cells in culture: implications in the development of neuromuscular junctions. *J Neurosci* 17:2947-2958.
- Xu QG, Midha R, Martinez JA, Guo GF, Zochodne DW (2008) Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. *Neuroscience* 152:877-887.
- Yamamoto-Hino M, Miyawaki A, Kawano H, Sugiyama T, Furuichi T, Hasegawa M, Mikoshiba K (1995) Immunohistochemical study of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 in rat central nervous system. *Neuroreport* 6:273-276.

- Yamamoto M, Sobue G, Li M, Arakawa Y, Mitsuma T, Kimata K (1993) Nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) mRNA levels in cultured rat Schwann cells; differential time- and dose-dependent regulation by cAMP. *Neurosci Lett* 152:37-40.
- Yang F, He XP, Russell J, Lu B (2003) Ca²⁺ influx-independent synaptic potentiation mediated by mitochondrial Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger and protein kinase C. *J Cell Biol* 163:511-523.
- Yang JS, Sladky JT, Kallen RG, Barchi RL (1991) TTX-sensitive and TTX-insensitive sodium channel mRNA transcripts are independently regulated in adult skeletal muscle after denervation. *Neuron* 7:421-427.
- Yao YM, Weakly JN (1986) Differences in transmitter release and number of nerve terminals per motoneuron between two frog muscles. *J Neurosci* 6:498-506.
- Yoshikami D, Bagabaldo Z, Olivera BM (1989) The inhibitory effects of omega-conotoxins on Ca channels and synapses. *Ann N Y Acad Sci* 560:230-248.
- Zengel JE, Magleby KL (1982) Augmentation and facilitation of transmitter release. A quantitative description at the frog neuromuscular junction. *J Gen Physiol* 80:583-611.
- Zengel JE, Sosa MA (1994) Changes in MEPP frequency during depression of evoked release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 477 (Pt 2):267-277.
- Zengel JE, Lee DT, Sosa MA, Mosier DR (1993) Effects of calcium channel blockers on stimulation-induced changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Synapse* 15:251-262.
- Zengel JE, Sosa MA, Poage RE, Mosier DR (1994) Role of intracellular Ca²⁺ in stimulation-induced increases in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Gen Physiol* 104:337-355.
- Zhan WZ, Mantilla CB, Sieck GC (2003) Regulation of neuromuscular transmission by neurotrophins. *Sheng Li Xue Bao* 55:617-624.
- Zhang Q, Haydon PG (2005) Roles for gliotransmission in the nervous system. *J Neural Transm* 112:121-125.

- Zhao Y, Klein M (2004) Changes in the readily releasable pool of transmitter and in efficacy of release induced by high-frequency firing at *Aplysia* sensorimotor synapses in culture. *J Neurophysiol* 91:1500-1509.
- Zhong N, Beaumont V, Zucker RS (2001) Roles for mitochondrial and reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and the plasmalemma Ca^{2+} ATPase in post-tetanic potentiation at crayfish neuromuscular junctions. *J Neurosci* 21:9598-9607.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.
- Zucker RS (1996) Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17:1049-1055.
- Zucker RS (2003) NCS-1 stirs somnolent synapses. *Nat Neurosci* 6:1006-1008.
- Zucker RS, Lara-Estrella LO (1983) Post-tetanic decay of evoked and spontaneous transmitter release and a residual-calcium model of synaptic facilitation at crayfish neuromuscular junctions. *J Gen Physiol* 81:355-372.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.
- Zuo Y, Lubischer JL, Kang H, Tian L, Mikesch M, Marks A, Scofield VL, Maika S, Newman C, Krieg P, Thompson WJ (2004) Fluorescent proteins expressed in mouse transgenic lines mark subsets of glia, neurons, macrophages, and dendritic cells for vital examination. *J Neurosci* 24:10999-11009.