

Université de Montréal

**L'altération des interactions neurone-glie à la jonction neuromusculaire de souris
âgées**

par
Noam KRIEF

Département de Neurosciences
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maitrise
en Sciences Neurologiques
2-530-1-0

décembre 2014

© Noam KRIEF, 2014

Résumé :

Durant le vieillissement, l'ensemble des fonctions de l'organisme se détériore, que ce soit aussi bien au niveau moteur que cognitif. Le vieillissement s'accompagne d'une diminution de la force, ainsi que de la masse musculaire. Des études récentes tendent à montrer que cette perte de masse musculaire que l'on appelle sarcopénie aurait pour origine un dérèglement de la jonction neuromusculaire. Les changements au niveau du présynaptique et du post synaptiques lors du vieillissement normal font l'objet de plusieurs études, mais les changements relatifs aux cellules de Schwann pérисynaptique sont très peu connus. Le but de cette étude est donc d'analyser les modifications des interactions neurone-glie à la jonction neuromusculaire.

Dans cette étude, nous montrons que certaines fonctions des cellules gliales de la synapse âgée sont dérégées, en particulier, le type de récepteurs activés par une stimulation nerveuse à haute fréquence. D'autre part, nos résultats montrent que les mécanismes responsables de l'augmentation de la transmission synaptique suite à cette stimulation nerveuse à haute fréquence sont altérés à la synapse âgée. Enfin, outre les modifications de la terminaison axonale et de la fibre musculaire, les cellules gliales montrent des signes de réorganisation structurelle propre à une synapse en réparation.

Ces résultats montrent que le fonctionnement de la jonction neuromusculaire et *a fortiori* les interactions neurones-glie sont altérées lors du vieillissement normal.

Mots-clés : Vieillissement, jonction neuromusculaire, glie, cellules de schwann perisynaptique, synapse tripartite, plasticité synaptique, récepteurs muscariniques.

Abstract

Aging comes with an alteration and organism functions including cognitive and motor functions. Major weakening of the neuromuscular system occurs which includes muscle weight loss, difficulties in initiating voluntary movement and reduced muscle strength. The possible role of the alteration of the neuromuscular junction has been examined but always only considering the pre- and postsynaptic elements. However, perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the neuromuscular junction (NMJ), play fundamental roles in the regulation of the synaptic efficacy of the NMJ as well as in its maintenance and stability. Hence, we analysed NMJ properties and their glial cells in aging.

This study shows that PSCs function at the old NMJ are dysregulated. Indeed, PSCs ability to detect synaptic transmission, determined using imaging of intracellular Ca^{2+} , was maintained in PSCs at NMJs from old mice, but the contribution of the muscarinic component was greatly reduced. On the other hand, our results using synaptic recordings are showing that a number of synaptic plasticity events known to be regulated by PSCs are reduced at NMJs of old mice. Finally, morphological NMJ reorganisation and sprouting of PSCs were also observed.

These data suggest that PSC properties are consistent with the repair of the NMJ that may also result in their reduced ability in regulating synaptic efficacy.

Keywords : aging, neuromuscular junction, glia, perisynaptic Schwann cells, synaptic plasticity, muscarinic receptors, tripartite synapse.

Table des matières

Résumé :	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	vi
Liste des abréviations	vii
Remerciements	ix
Introduction	1
I Vieillessement du système nerveux	1
1.1 Altération des fonctions cognitives avec le vieillissement normal.....	1
1.2 Modifications neuronales du système nerveux central lors du vieillissement normal.....	2
1.3 Le vieillissement normal s'accompagne aussi de modifications au niveau musculaire et moteur.	4
II- La Jonction neuromusculaire	5
2.1- Le neurone moteur et la terminaison axonale.....	7
2.1.1-Les différentes unités motrices et leurs propriétés fonctionnelles.....	8
2.1.2 L'élément présynaptique et les zones actives du neurone moteur.....	10
2.2 La fente synaptique.....	12
2.3 L'élément post-synaptique à la jonction neuromusculaire	12
2.4- L'élément glial à la jonction neuromusculaire : les cellules de Schwann périssynaptiques.	13
2.5- La plasticité synaptique à la jonction neuromusculaire.....	15
2.5.1. La dépression	15
2.5.2. L'augmentation et la potentialisation.....	16
2.6. Les cellules gliales dans la plasticité synaptique.....	18
2.6.1. Les récepteurs gliaux lors la transmission synaptique.....	18
2.6.2- Les cellules gliales périssynaptiques répondent à l'activité synaptique.	20
2.6.3- Les CSP sont capables de moduler l'activité synaptique à la jonction neuromusculaire.....	22

2.6.4 Les CSP sont importantes pour la formation, le maintien et la régénération de la jonction neuromusculaire.....	24
III-Vieillessement de la jonction neuromusculaire.....	26
3.1- Les changements morphologiques et fonctionnels de l'unité motrice.	27
3.1.1- La perte de masse musculaire et la perte des unités motrices de type 2.....	27
3.1.2 L'accumulation de radicaux libres lors du vieillissement normal.	29
3.1.3- Le vieillissement du neurone moteur et sa dégénérescence contribuent à la perte de l'unité motrice.....	29
3.1.4- Les différents muscles du corps ne sont pas affectés de la même façon par le vieillissement normal.....	31
3.2-Les changements morphologiques et fonctionnels de la jonction neuromusculaire lors du vieillissement.	32
3.2.1-Changements morphologiques et fonctionnels de l'élément présynaptique.	32
3.2.2-Les changements post-synaptiques liés au vieillissement.	35
IV-Hypothèse	36
Contribution des auteurs:	39
Article:	40
Abstract.....	41
2. Materials and methods.....	44
3. Results.....	49
4. Discussion:.....	56
Acknowledgements:.....	61
References:.....	62
Figure legends:	69
Discussion :.....	76
I- Certains mécanismes de la plasticité synaptique sont altérés à la jonction neuromusculaire de souris âgées.	76
1.1 Mécanisme de plasticité synaptique à court terme.	77
1.1.1- La dépression.....	77
1.1.2. L'augmentation et la potentialisation.....	79
1. 2. La plasticité à long terme.....	81

II. Le fonctionnement des cellules gliales pérисynaptique est modifié à la jonction neuromusculaire âgée.....	83
III. Mécanisme de maintien de l'intégrité synaptique lors du vieillissement : rôle des facteurs trophiques.....	87
Conclusion.....	90
Bibliographie.....	i

Liste des figures

Figure 1 : Localisation et présentation d'une jonction neuromusculaire de souris.....	6
Figure 2 : Représentation schématique de l'unité motrice.	9
Figure 3 : Représentation schématique des prolongements des CSP permettant la réinnervation de la jonction neuromusculaire en cas de réinnervation.....	25
Figure 4 : Atrophie des fibres musculaires et modifications des unités motrices au cours du vieillissement normal.....	28
Figure 5 : Modifications morphologiques de la jonction neuromusculaire au cours du vieillissement normal.	34
<i>Figure 1: Reduced synaptic plasticity at aged NMJs.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 3: Reduced muscarinic excitability of PSCs in aging.....</i>	<i>70</i>
<i>Figure 4: Altered NMJ structure and reorganisation of the glial coverage at NMJs in aging.</i>	<i>70</i>
Figure 10 : Mécanismes d'activation gliale à la NMJ adulte et à la NMJ âgée.....	85

Liste des abréviations

AChR : Acetylcholine Receptor

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

Ca²⁺: ions calcium

CNTF : Ciliary Neurotrophic Factor

CSP : Cellule de Schwann Périssynaptique

EDL : Extensor digitorum longus

FGF : Fibroblast Growth Factor

GDNF : Glial cell-Derived Neurotrophic Factor

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

IGF I et IGF II : Insulin-like Growth Factor

LAL : *Levator Auris Longus*

LRP4 : Low density lipoprotein Receptor-related Protein 4

MHC : Myosin Heavy Chain

MUSK : Muscle Specific Kinase

NMJ : Neuromuscular Junction

NRG1 : Neuroregulin 1

NT-3 / NT-4 : Neurotrophin 3 et Neurotrophin 4

PSC : Perisynaptic Schwann Cell

ROS : Reactive Oxygen Species

SNAP-25 : Synaptosomal-associated Protein 25

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

*Je dédicace ce mémoire aux personnes pour qui,
un jour peut-être, mes recherches seront utiles,
ainsi qu'à ma famille qui m'a soutenu
dans cette aventure que j'entreprenais.*

Remerciements

Je tiens à remercier Éric, Danielle, Elsa, Anna, Julie et les autres membres du laboratoire du professeur Robitaille sans qui je n'aurais pas autant aimé réaliser cette maîtrise. Un remerciement particulier à Houssam Darabid, qui m'a appris à apprécier la belle science et avec qui j'ai formé des liens d'amitié au cours de ces deux dernières années. Je remercie aussi Joanne Vallée pour sa pédagogie et pour le temps qu'elle a passé à me former sans jamais perdre patience. Enfin, je remercie le professeur Richard Robitaille pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche en me donnant l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire.

Introduction

I Vieillessement du système nerveux

Le vieillissement se caractérise par une détérioration progressive et globale du fonctionnement des organes et de leur efficacité. Cette détérioration se poursuit jusqu'à l'arrêt complet de leur fonctionnement menant à la mort de l'organisme. À titre d'exemple, les êtres humains vieillissants sont plus susceptibles de présenter des anomalies cardiaques menant à des maladies cardio-vasculaires, du diabète ou d'autres maladies dégénératives. Ceci est aussi vrai pour le système nerveux dans lequel le vieillissement s'accompagne de perte de mémoire, d'apprentissage et de motricité.

1.1 Altération des fonctions cognitives avec le vieillissement

normal

Le vieillissement normal s'accompagne d'une altération des fonctions liées au système nerveux. Par exemple, on observe une difficulté d'apprentissage, d'assimilation de nouvelles connaissances et plus globalement des problèmes de mémoire. Il faut savoir qu'il existe plusieurs types de mémoire, la mémoire déclarative et la mémoire non déclarative et les deux ne sont pas affectées de la même manière par le vieillissement normal. La mémoire déclarative, aussi appelée parfois mémoire explicite, concerne le stockage et la récupération de données qu'un individu peut exprimer par le langage. Elle est complémentaire de la mémoire non déclarative qui permet l'acquisition et l'utilisation de compétences motrices, telles que

faire du vélo ou pratiquer un sport. La mémoire déclarative est davantage touchée par le vieillissement comparativement à la mémoire non déclarative, qui ne subit qu'un léger déclin au cours de la vie (Woodruff and Finkbiner, 1990).

1.2 Modifications neuronales du système nerveux central lors du vieillissement normal

Du point de vue anatomique, le vieillissement normal du système nerveux central se caractérise par une diminution de la masse de l'ensemble de l'encéphale. Ces observations ont été faites depuis déjà de nombreuses années sur des échantillons *post-mortem* dans lesquels il a été noté une perte de la masse du cerveau accompagné d'une augmentation de la taille des ventricules chez les personnes âgées (Alvarez-Royo et al., 1992). La perte de volume n'est pas homogène entre l'ensemble des régions du cerveau. Le cervelet ainsi que les lobes temporaux sont les régions les plus touchées par cette perte de volume. De façon générale, la perte de volume de la matière blanche serait de 23% entre l'âge de 20 ans et l'âge de 90 ans tandis que la perte de matière grise serait de 12% (Allen et al., 2005).

Il a longtemps été cru que l'altération des fonctions cognitives avec le vieillissement était le résultat de la perte du nombre de neurones dans le cerveau. Effectivement, les neurones sont les cellules à la base de la communication nerveuse. Cette communication entre deux cellules est possible grâce à la synapse. La perte de volume du cerveau que l'on observe par imagerie par résonance magnétique concorde avec une perte du nombre de neurones au cours du vieillissement normal évalué grâce à des méthodes stéréologiques. Mais cette perte du

nombre de neurones ne permet pas d'expliquer l'ensemble des changements cognitifs. Le nombre de neurones perdu entre l'âge de 20 et 90 ans est évalué à 10%. Tout comme pour la perte de volume, la perte du nombre de neurones dans le cerveau encore une fois n'est pas homogène et est plus importante dans certaines régions tel que dans l'aire 8A du cortex préfrontal et les lobes temporaux (Pakkenberg and Gundersen, 1997).

Les changements de comportement que l'on observe lors du vieillissement sont le résultat d'une multitude de facteurs affectant le fonctionnement du neurone et de la synapse. L'ensemble des modifications neuronales au cours du vieillissement normal ne fait pas l'objet de cette thèse, mais l'on notera des changements d'excitabilité, une perte du nombre de synapses et le dérèglement de l'expression de certains gènes (par exemple l'expression de *Arc* et *Narp* deux gènes impliqués dans la potentialisation à long terme dans l'hippocampe, est diminuée). Des études morphologiques à l'aide de microscopie électronique ont montré une diminution de 27% du nombre de synapses dans le gyrus dentelé de rats âgés (Geinisman et al., 1986). Ces observations morphologiques sont confirmées par des études fonctionnelles dans lesquelles il a été montré une altération de la plasticité synaptique à long terme (Moore et al., 1993, Norris et al., 1996). La plasticité synaptique est un phénomène important dans l'adaptation et la stabilisation des connexions synaptiques et de la mémoire. Elle se caractérise par une modification de la transmission synaptique au cours du temps. Deux phases sont importantes pour l'induction de plasticités synaptiques : l'induction et la maintenance de cette plasticité. Ces deux phases sont altérées lors du vieillissement normal (Barnes, 1979, Deupree et al., 1993). Encore une fois, ces altérations sont spécifiques à certaines régions précises du cerveau et à la synapse en question. De par leur importance dans la transmission de

l'information nerveuse et de la mémoire les dérèglements synaptiques sont donc de cruciaux quand il s'agit des changements cognitifs liés au vieillissement.

1.3 Le vieillissement normal s'accompagne aussi de modifications au niveau musculaire et moteur

Les fonctions cognitives ne sont pas les seules fonctions neuronales à être affectées par le vieillissement du système nerveux. En effet, le vieillissement normal s'accompagne d'une difficulté à effectuer les mouvements volontaires ainsi qu'une augmentation du nombre de chutes et d'une perte de l'équilibre. Le vieillissement normal s'accompagne aussi d'une diminution de la masse musculaire et de la force musculaire. Au niveau périphérique, le vieillissement s'accompagne d'une perte de 30% de la masse musculaire entre l'âge de 60 ans et 85 ans. Cette perte de masse musculaire que l'on appelle sarcopénie se manifeste notamment par une faiblesse accrue et une moindre résistance à l'exercice. Une diminution de la force dans les ligaments et les tendons de même que des changements dans la stature et une diminution de taille sont aussi associés au phénomène. Il est estimé que 45% des Américains de plus de 60 ans sont sarcopénique (Janssen et al., 2004a). Cette perte de masse musculaire entraîne des chutes, des fractures et une perte d'indépendance entraînant un cout de 18.5 milliards de dollars aux États-Unis en l'an 2000 (Janssen et al., 2004b). De par l'augmentation de l'âge moyen dans la société, il est essentiel d'accorder une importance croissante à la compréhension de ce phénomène. Il a longtemps été cru que la perte de masse musculaire n'avait pour origine que le dysfonctionnement de la machinerie musculaire et des fibres qui

composent le muscle. Cependant, tout comme pour les déficits comportementaux observés dans le système nerveux central, de nombreuses études ont montré l'importance des dérèglements synaptique du système nerveux périphérique comme cause des changements moteurs lié au vieillissement normal. Ces études semblent montrer que le maintien du bon fonctionnement de la synapse entre l'élément musculaire et le neurone moteur, la jonction neuromusculaire, est essentiel à la prévention de la perte de masse musculaire lors du vieillissement normal (Valdez et al., 2010, Chai et al., 2011).

II- La Jonction neuromusculaire

La jonction neuromusculaire est une synapse chimique du système nerveux périphérique permettant l'accomplissement du mouvement volontaire. Historiquement, la jonction neuromusculaire a servi d'excellent modèle pour la compréhension de la synapse chimique. Mon projet de maitrise porte sur le vieillissement de la jonction neuromusculaire.

La synapse est la zone de contact permettant aux neurones de communiquer avec leur cible. Elle fut mise en évidence par le docteur Charles Sherrington au début du 20^e siècle. Il existe deux sortes de synapses dans le système nerveux, la synapse électrique et la synapse chimique. Les deux possèdent une structure et des mécanismes de fonctionnement différents. La synapse chimique est composée de l'élément présynaptique séparé de l'élément post-synaptique par la fente synaptique, l'ensemble est recouvert par les prolongements des cellules gliales pérисynaptiques. La jonction neuromusculaire est une synapse chimique ayant la particularité d'avoir comme élément présynaptique le neurone moteur et comme élément post-synaptique la fibre musculaire. Lorsque l'élément présynaptique est activé par un potentiel

d'action, il libère des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs se lient à des récepteurs sur l'élément post-synaptique permettant la propagation du message nerveux.

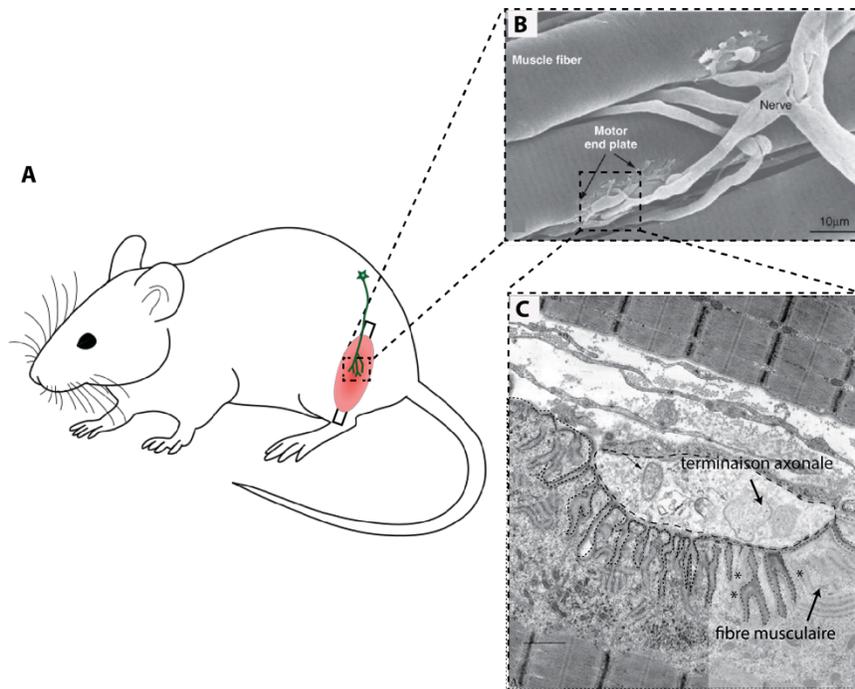


Figure 1 : Localisation et présentation d'une jonction neuromusculaire de souris.

Le corps cellulaire du neurone moteur situé dans la moelle épinière envoie un axone vers le muscle situé en périphérie (A). L'axone du neurone moteur se ramifie en plusieurs terminaisons axonales. Ces dernières entrent en contact avec la fibre musculaire au niveau de la plaque motrice (*motor end plate*) pour former la jonction neuromusculaire (B). Cette dernière est composée de la terminaison présynaptique apposée au-dessus de la plaque motrice. La plaque motrice présente de nombreux replis post-synaptiques (*) au sommet desquels on retrouve les récepteurs nicotiques (C). L'élément glial (non représenté dans cette figure) recouvre l'ensemble de la jonction neuromusculaire.

Pendant longtemps, on a considéré que la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire reposait uniquement sur la contribution de l'élément présynaptique, le neurone moteur, et de l'élément post-synaptique, la fibre musculaire. Au cours des quinze dernières années, des études ont démontré le rôle important de la glie comme modulateur de l'activité synaptique. La jonction neuromusculaire est donc tripartite, c'est-à-dire que son fonctionnement repose sur l'interaction des trois éléments, la glie, le neurone, et la fibre musculaire (Araque et al., 1999, Auld and Robitaille, 2003). Dans la section suivante, je vais faire une description des trois éléments composants la synapse neurone-muscle. Je commencerai par une description de la terminaison axonale du neurone moteur, puis de la région spécialisée du muscle à la jonction neuromusculaire, la plaque motrice, enfin, je ferai une revue de la contribution gliale lors de l'activité synaptique.

2.1- Le neurone moteur et la terminaison axonale

Lors d'un mouvement volontaire, la commande nerveuse initiée dans le cortex moteur arrive dans la moelle épinière et active le neurone moteur. Le neurone moteur peut être séparé en quatre parties fonctionnelles : les dendrites, le corps cellulaire, l'axone et la terminaison axonale. Les dendrites et les corps cellulaires de ces neurones moteurs sont situés dans le noyau moteur dans la corne ventrale de la moelle épinière. Les axones de ces neurones sortent de la moelle épinière par les racines ventrales pour se rendre jusqu'aux muscles. Un neurone moteur n'innervé qu'un muscle, mais au sein de ce muscle plusieurs fibres musculaires. Un motoneurone unique ainsi que l'ensemble des fibres qu'il innervé est appelé unité motrice dont les propriétés sont discutées dans la section suivante.

2.1.1-Les différentes unités motrices et leurs propriétés fonctionnelles

L'ensemble des fibres musculaires innervées par un seul neurone moteur s'appelle l'unité motrice. La taille de l'unité motrice est proportionnelle à la taille du neurone moteur. La force contractile du muscle ne dépend pas seulement du nombre d'unités motrices qui sont activées lors d'une contraction, mais des propriétés de celles-ci. Ces propriétés sont : la vitesse de contraction, la force maximale développée et la résistance à la fatigue. Il existe trois catégories d'unité motrice, les unités motrices à contraction rapide et forte, mais facilement fatigables, et des unités motrices à contraction lente, à moindre force, mais plus résistantes à la fatigue et les unités motrices intermédiaires. Il est possible de distinguer les différents types d'unités motrices par les propriétés biochimiques des fibres musculaires innervées, et en particulier à l'aide de leur composition en chaînes de myosine lourdes (MHC) (*myosin heavy chain*) (Huxley, 2000). Les fibres musculaires composées de MHC de type I sont associées à des unités motrices lentes et résistantes à la fatigue. Elles possèdent un seuil de contraction plus bas et sont capables de développer une force de contraction constante de faible intensité pour une longue durée. Les fibres musculaires composées de MHC de type II sont associées à des unités motrices à contraction rapide et fatigable. L'activation des unités motrices à contraction rapide provoque une contraction dont la force est plus importante pour chaque potentiel d'action, mais le seuil requis pour l'activation de ces unités motrice est plus élevé. Les différents types d'unités motrices possèdent aussi leurs spécificités structurelles étant adaptées à leur fonctionnement. Les unités motrices résistantes à la fatigue sont par exemple plus riche en myoglobine ce qui leur permet un meilleur approvisionnement en métabolites

lors d'effort de longue durée. Les fibres musculaires des unités motrices de type II ont un plus large diamètre et une force de contraction plus intense. Ces fibres sont de couleur pâle et moins riches en mitochondries ce qui les rend moins résistantes à la fatigue.

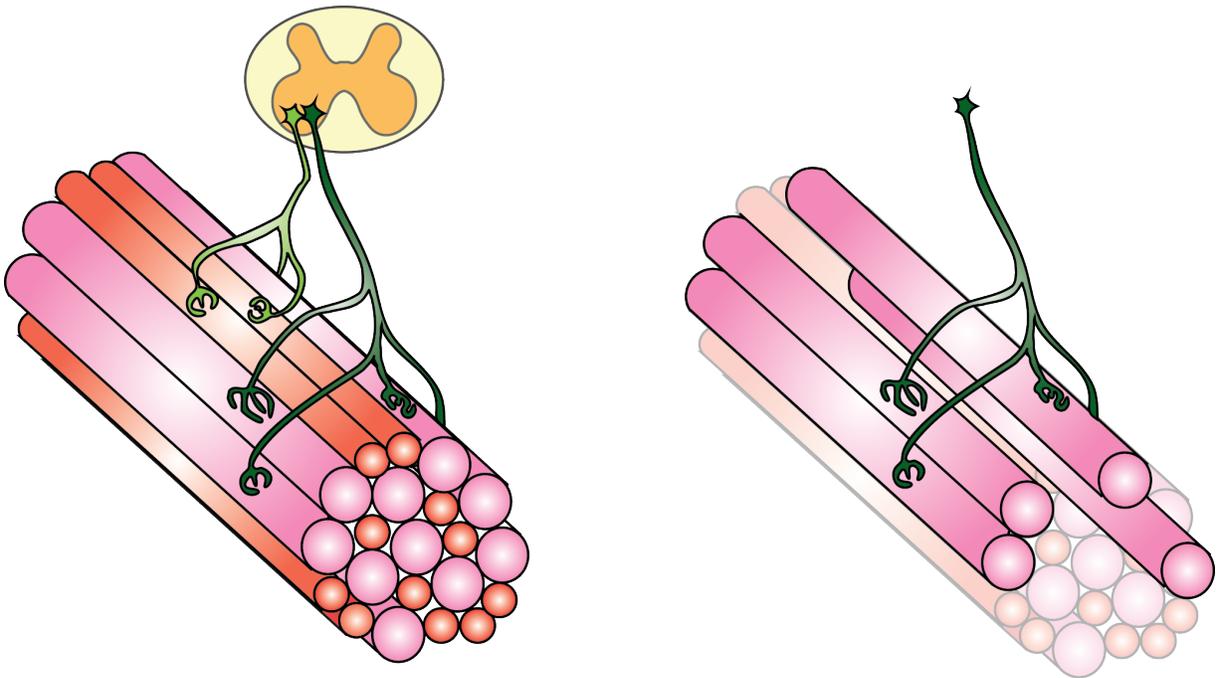


Figure 2 : Représentation schématique de l'unité motrice.

À gauche, deux neurones moteurs dont les corps cellulaires sont situés dans la corne ventrale de la moelle épinière viennent innover plusieurs fibres musculaires d'un muscle. Les fibres musculaires de type II sont d'un plus grand diamètre et sont facilement fatigables, alors que les fibres musculaires de type I sont de plus faible diamètre et plus résistant à la fatigue. À droite, représentation schématique d'une unité motrice. Elle est composée du neurone moteur (vert foncé) ainsi que de l'ensemble des fibres musculaire qu'il innerve. Notez que chaque neurone moteur n'innerve normalement qu'un seul type de fibre musculaire.

Chaque muscle est composé de chacun des quatre types d'unités motrices (type I, IIa, IIb, IIx). La présence majoritaire de l'un des deux types donne les propriétés générales du

muscle. Par exemple, les muscles de la posture sont composés majoritairement d'unités motrices de type résistantes à la fatigue, alors que les muscles nécessaires à la pratique de sport tel que le sprint sont composés d'unités motrices à contraction forte et rapide, mais fatigable (Huxley, 2000).

Une unité motrice est donc l'ensemble des fibres musculaires qu'un neurone moteur innerve. Il existe autant de jonction neuromusculaire par unité motrice qu'il y a fibres musculaires.

2.1.2 L'élément présynaptique et les zones actives du neurone moteur

La terminaison axonale est la partie la plus distale du neurone et se situe à la zone de contact entre le neurone et la fibre musculaire. C'est elle qui est responsable de la transformation du signal électrique en signal chimique. La microscopie électronique révèle que la terminaison axonale peut être séparée en deux zones de spécialisations structurelles et fonctionnelles distinctes (Siksou et al., 2009). La première se situe plutôt en retrait dans la terminaison, loin des sites de libérations et contient une forte concentration de mitochondries ainsi qu'un réticulum endoplasmique très développé. Ceux-ci sont chargés de fournir l'apport énergétique nécessaire à la transmission synaptique. La synthèse et la libération des neurotransmetteurs sont des processus très énergivores nécessitant une machinerie métabolique capable de produire de grande quantité d'ATP en peu de temps. Le second site spécialisé est la zone active.

Les zones actives sont les sites de libérations des neurotransmetteurs, elles concentrent leurs efforts sur l'exocytose des vésicules synaptiques. Au microscope électronique, chaque

zone active apparaît comme une zone opaque aux électrons le long de la membrane plasmique due à sa densité importante en protéines. La zone active est constituée de toute la machinerie nécessaire au stockage et à la libération de vésicules chargées en neurotransmetteurs. La libération de ces vésicules repose sur un mécanisme dépendant des ions calciums. La zone active possède donc des canaux calciques dépendant du voltage (de type P/Q chez la souris adulte) qui permettent l'entrée des ions calciums lors de l'arrivée d'un potentiel d'action (Nishimune et al., 2004). Les protéines constituant la zone active sont appelées la matrice du cytosquelette de la zone active (de l'anglais *cytoskeletal matrix at the active zone*) et comprends des protéines telles que Bassoon, Piccolo, ELK et d'autres (Billings et al., 2012, Wang et al., 2009). Ces protéines sont des protéines nécessaires à l'échafaudage de la zone active et à son alignement avec la plaque motrice situées sur la fibre musculaire. Par exemple, Bassoon interagit avec la β 2-laminine de la matrice extracellulaire située dans la fente synaptique (Nishimune et al., 2004). En l'absence de cette dernière, l'organisation de la synapse est altérée.

En intime coordination avec ces protéines d'échafaudage, la zone active comprend aussi la machinerie nécessaire à l'exocytose et à la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. Le complexe protéique chargé de cette fonction est le complexe SNARE. Il comprend les protéines SNAP-25, synaptobrevine et syntaxyne. Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, les ions calciums entrants se lient à la synaptotagmine, protéine membranaire située sur les vésicules synaptiques. Ceci induit un changement de conformation de la protéine qui lui permet de se lier au complexe SNARE et de rapprocher la vésicule synaptique de la membrane plasmique jusqu'à ce que les deux fusionnent (Trimble et al., 1991).

La jonction neuromusculaire est avant tout une synapse cholinergique dont le principal neurotransmetteur est l'acétylcholine. Néanmoins, il est connu que les vésicules synaptiques sont chargées de deux types de neurotransmetteurs, l'acétylcholine et l'ATP. Lors de l'activation du neurone moteur par un potentiel d'action, l'ATP et l'acétylcholine sont libérées dans la fente synaptique par la terminaison axonale (Redman and Silinsky, 1994).

2.2 La fente synaptique

La fente synaptique est l'espace d'environ 50 nanomètres séparant le neurone moteur, de la fibre musculaire. Elle contient la lame basale composée de protéines du cytosquelette, des enzymes de dégradation des neurotransmetteurs ainsi que du collagène. Une fois dans la fente synaptique, les neurotransmetteurs diffusent au travers de la matrice jusqu'à éventuellement atteindre un récepteur, que ce soit sur les cellules gliales, ou sur la fibre musculaire. Les neurotransmetteurs sont ensuite dégradés par des enzymes spécialisées (par l'acétylcholine estérase pour l'acétylcholine), recaptés, ou transformés (l'ATP peut être transformée en adénosine) (James and Richardson, 1993).

2.3 L'élément post-synaptique à la jonction neuromusculaire

La partie post-synaptique de la jonction formée par la fibre musculaire possède aussi sa particularité structurelle. À la jonction neuromusculaire, la membrane de la fibre musculaire forme des replis post-synaptiques. Au sommet de celles-ci, nous retrouvons une grande densité de récepteurs nicotiques à l'acétylcholine. La haute densité de récepteurs à l'acétylcholine

au niveau de la plaque motrice est possible grâce des protéines telles que Agrin, MuSK et Rapsyne, qui se rattachent au cytosquelette (DeChiara et al., 1996, Gautam et al., 1996, Gautam et al., 1995). Ces récepteurs à l'acétylcholine sont des canaux cationiques non sélectifs. Lors de la liaison de l'acétylcholine, les canaux s'ouvrent permettant l'entrée d'ions positifs dans la cellule. Ceci provoque l'ouverture des canaux sodiques dépendant du voltage situés au fond des replis et la dépolarisation de la fibre musculaire. L'entrée de calcium dans la cellule musculaire active les récepteurs à la ryanodine situés sur le réticulum sarcoplasmique. Le réticulum sarcoplasmique est une réserve interne d'ions calcium qui libère son contenu lors de la dépolarisation de la fibre musculaire. La libération d'ions calcium dans le cytoplasme permet la contraction du sarcomère et ainsi la contraction musculaire (Sine, 2012).

Plusieurs études dans les vingt dernières années ont montré que la jonction neuromusculaire ne relève pas seulement de l'implication de l'élément présynaptique et post-synaptique, mais aussi d'un troisième élément : les cellules de Schwann pérисynaptique.

2.4- L'élément glial à la jonction neuromusculaire : les cellules de Schwann pérисynaptiques

Les éléments gliaux principaux du SNP sont, les cellules de Schwann axonales et les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSP). Tout comme les neurones, les cellules gliales ont comme origine embryologique l'ectoderme. On distingue deux types de cellules de Schwann axonales, les cellules myélinisantes et non myélinisantes. Les cellules myélinisantes sont situées en dehors du SNC et s'enroulent en plusieurs couches autour de l'axone des neurones.

Les cellules myélinisantes produisent la myéline, un isolant qui entrave le flux d'ions à travers la membrane cellulaire permettant une conduction du signal nerveux plus rapide.

L'autre type de cellules gliales présentes au niveau périphérique sont les CSP, celles-ci diffèrent des cellules de Schwann axonales par plusieurs aspects. Tout d'abord par leur localisation : la CPS ne se situe pas le long de l'axone, mais à la jonction neuromusculaire, le lieu de contact entre la terminaison axonale et la fibre musculaire. D'autre part, les cellules gliales pérисynaptiques ne sont pas productrices de myéline et ne forment pas de « gaine » isolante autour du bouton axonal. Chez l'adulte, on trouve 3 à 5 cellules gliales par jonctions et celles-ci recouvrent les terminaisons axonales. À la jonction neuromusculaire de grenouille par exemple, les CSP envoient des prolongements dans la fente synaptique très proche du site de libération des neurotransmetteurs (Couteaux and Pecot-Dechavassine, 1974). Chez les mammifères, les CSP ne s'introduisent pas dans la fente synaptique, mais restent très proches du site de libération des neurotransmetteurs (Salpeter, 1987).

Les trois éléments synaptiques sont d'une importance cruciale pour la machinerie neuromusculaire. Ils interagissent entre eux pour moduler la transmission du signal nerveux et pour adapter la réponse synaptique en fonction à l'activité antérieure. On appelle cette modulation synaptique au cours du temps la « plasticité synaptique ». Cette plasticité peut être aussi bien morphologique que fonctionnelle et ses mécanismes varient dépendamment de l'échelle temporelle. Je décrirai dans la prochaine section les bases physiologiques sur lesquelles elles reposent et pourquoi les cellules gliales sont importantes dans la modulation de la plasticité synaptique.

2.5- La plasticité synaptique à la jonction neuromusculaire

La plasticité de la transmission synaptique permet aux synapses de s'adapter à l'activité de la synapse et dépend de plusieurs facteurs. On sépare ces plasticités en deux catégories : la plasticité à court terme et la plasticité à long terme. Au sein de la plasticité à court terme, on distingue en général quatre formes de plasticités : la facilitation, l'augmentation, la potentialisation, et la dépression. La distinction entre ces différentes plasticités se trouve dans le décours temporel auquel elles sont associées. L'augmentation et la potentialisation, comme leur nom l'indique, sont des phénomènes qui accroissent la transmission synaptique. On les retrouve à la suite d'une stimulation à haute intensité. Le protocole de stimulation à haute intensité conditionne la plasticité qui en découle (Todd et al., 2010). Ces deux phénomènes se manifestent à l'échelle de la seconde voir minutes suivant la stimulation tétranique.

La plasticité à long terme est une modification persistante au cours du temps de l'amplitude de la transmission synaptique suite à une stimulation à haute fréquence de la terminaison présynaptique. Ce changement dans l'amplitude de la réponse synaptique peut durer plusieurs minutes voir plusieurs heures après la stimulation à haute fréquence.

2.5.1. La dépression

Les mécanismes derrière la plasticité synaptique à court terme sont multiples. En ce qui concerne la dépression, les mécanismes sont en grande partie reliés à la déplétion du nombre de vésicules prêtes à être relâchées. En théorie, le bouton présynaptique contient un montant V de vésicules. Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, parmi ce stock V , une fraction V_f va

être libérée par le premier potentiel d'action. Le montant de vésicule alors disponible pour le deuxième potentiel d'action est donc $(V-V_f)$, ce qui est inférieur au stock d'origine. Lors d'un train de stimulation, le stock de vésicules se réduit au fur et à mesure que chaque stimulation libère une partie du stock d'origine. Cette théorie de la déplétion du nombre de vésicules exclut certains facteurs. Par exemple, en microscopie électronique, il a été montré que la terminaison synaptique possède plusieurs stocks de vésicules synaptiques ayant des fonctionnalités distinctes (Rowley et al., 2007). Une partie du stock de vésicules est prête à être utilisée et se trouve à proximité du site de relâche, ce stock se vide dans les premières secondes de la stimulation. Une autre partie de l'ensemble des vésicules se trouve légèrement en retrait de la zone active et sert de réserve. Ce deuxième stock permet de maintenir constant le nombre de vésicules dans le stock de libération. Mathématiquement, la dépression est exponentielle dans les premières secondes le temps de vider le stock de vésicules prêtes à être libéré, puis atteint un plateau correspondant au remplacement des vésicules libérées par le stock de réserve. La relâche de vésicule est alors égale au nombre de vésicules recyclées. La durée de chacun des deux types de dépressions dépend de la fréquence de stimulation. La dépression que l'on observe durant la stimulation à haute fréquence permet donc d'évaluer indirectement le nombre de vésicules présent dans la terminaison axonale (Zucker and Regehr, 2002).

2.5.2. L'augmentation et la potentialisation

Une théorie expliquant l'augmentation de la transmission synaptique lors de la potentialisation à court terme semble provenir de la présence d'ions calciums résiduels dans la

terminaison synaptique suite à une activité antérieure intense. En effet, l'arrivée d'un potentiel d'action provoque l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage de type P/Q permettant l'entrée d'une quantité de calcium dans la terminaison présynaptique. Une grande majorité des ions calciums sont nettoyés rapidement, mais une partie de ces ions s'accumule dans la terminaison synaptique et s'additionne aux ions calciums des stimulations subséquentes ce qui provoque une augmentation de la quantité de vésicules libérées (Delaney et al., 1989, Katz and Miledi, 1968). L'amplitude de l'augmentation synaptique suite à un train de stimulation dépendait du nombre d'ions calciums dans la cellule (Mulkey and Zucker, 1992, Parnas et al., 1982). Cette théorie laisse à penser qu'un nettoyage moins efficace des ions calciums résiduel est synonyme d'une plus importante transmission synaptique. Les mitochondries sont une figure importante de la régulation du calcium intracellulaire lors de la stimulation à haute fréquence, elles agissent comme tampon de ces ions et influencent la modulation de la transmission synaptique (Garcia-Chacon et al., 2006). Elles sont présentes en abondance dans le bouton présynaptique et leur dysfonctionnement peut apporter des modifications majeures à la libération des neurotransmetteurs. Certaines protéines telles que les calmodulines et CaMKII jouent aussi un rôle dans la gestion de la concentration intracellulaire du calcium.

Les différents mécanismes cités ne sont pas suffisants pour expliquer l'ensemble des phénomènes de plasticité que l'on observe à la jonction neuromusculaire. Comme nous l'avons mentionné, la jonction neuromusculaire est une jonction tripartite. Le troisième élément de la synapse, les CSP, joue un rôle fondamental à la modulation de la transmission

synaptique et au maintien de cette synapse. Dans la prochaine partie, nous verrons en quoi ces cellules sont capables de moduler la transmission synaptique.

2.6. Les cellules gliales dans la plasticité synaptique

2.6.1. Les récepteurs gliaux lors la transmission synaptique

2.6.1.1 Les cellules gliales pérисynaptiques possèdent des récepteurs aux neurotransmetteurs

Les CSP sont des cellules excitables mais ne le sont pas électriquement comme le sont les neurones. Leur excitabilité repose sur une augmentation de la concentration d'ions calciums intracellulaire. Cette augmentation intracellulaire en ions calciums nécessite l'activation des récepteurs couplés à une protéine G situé à la membrane plasmique. Afin de pouvoir intervenir dans la fonction de la jonction neuromusculaire, les cellules gliales pérисynaptiques doivent détecter correctement le signal nerveux. Comme mentionné précédemment, la libération d'ATP et d'acétylcholine dans la fente synaptique lors d'un potentiel d'action peut activer les récepteurs gliaux. Que ce soit pour l'ATP ou l'acétylcholine, les récepteurs gliaux activés sont des récepteurs liés à des protéines G. Cela fut démontré par le fait que le blocage des récepteurs nicotiniqes par l' α -bungarotoxine ne bloque pas la réponse calcique gliale, tandis que l'application locale de muscarine induit une réponse calcique gliale (Jahromi et al., 1992, Rochon et al., 2001, Robitaille et al., 1997). Les récepteurs présents sur la glie sont des récepteurs muscariniques pour l'acétylcholine et des récepteurs purinergiques pour l'ATP. Il a aussi été rapporté la présence de canaux ioniques

tels que des canaux calciques de type L, des récepteurs purinergiques de type P2X ou encore des récepteurs à la substance P (Robitaille et al., 1996, Bourque and Robitaille, 1998, Robitaille, 1995).

2.6.1.2- Les récepteurs muscariniques et purinergiques des cellules de Schwann périssynaptiques

Les deux récepteurs auxquels nous avons porté une attention particulière sont les récepteurs muscariniques et purinergiques. En effet, l'application locale de muscarine et d'ATP, les agonistes respectifs de ces récepteurs, déclenche une réponse calcique des CSP. Comme mentionné précédemment, les récepteurs muscariniques et purinergiques sont des récepteurs liés à des protéines G, c'est-à-dire que l'activation de ces récepteurs déclenche une cascade d'activation mettant en jeu un second messenger. Il existe plusieurs types de récepteurs muscariniques : m1, m2, m3, m4 et m5. Les récepteurs m1, m3 et m5 sont ceux que l'on retrouve sur les cellules gliales, ils sont en général couplés à une protéine Gq activatrice de l'hydrolyse de l'inositol triphosphate (IP3), mais l'on retrouve certains récepteurs m1 couplés à des sous-types Gi et Gs (Berstein et al., 1992). L'activation des récepteurs Gq provoque la libération de l'IP3 dans le cytoplasme qui peut se lier aux récepteurs à l'IP3 situés sur le réticulum endoplasmique. Ces récepteurs sont des canaux calciques dont l'ouverture provoquée par la liaison de l'IP3 permet l'augmentation des ions calciums intracellulaires. Ces ions calciums agissent comme second messenger ubiquitaire régulant un nombre important de mécanismes cellulaires. Les sous-types m2 et m4 sont davantage retrouvés sur le neurone

moteur et sont liés à des protéines Gi, dont l'activation inhibe l'adénylate cyclase et donc la libération d'ions calciums intracellulaires (Berstein et al., 1992) (Wright et al., 2009).

2.6.2- Les cellules gliales périssynaptiques répondent à l'activité synaptique

2.6.2.1- L'activation des récepteurs gliaux provoque l'augmentation du calcium

intracellulaire

Comme mentionné dans la section précédente, l'excitabilité des cellules gliales repose sur une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium. Par des méthodes d'imagerie calcique sur des préparations *in situ*, laissant intacte l'organisation de la jonction neuromusculaire, il a été possible de montrer que les CSP sont capables de détecter et de répondre à l'activité synaptique. Cette augmentation de la concentration en ions calcique est observable lors de la stimulation à haute fréquence du nerf moteur. Le blocage de la libération de neurotransmetteur provoque l'absence d'activité calcique gliale, démontrant ainsi que cette activation nécessite la présence de neurotransmetteurs. Il est aussi intéressant de noter que l'activité calcique des CSP n'est pas bloquée lorsque les ions calciums sont absents du milieu extracellulaire, suggérant que la provenance des ions calcique a pour origine les stocks internes tels que le réticulum endoplasmique lisse (Jahromi et al., 1992). On notera que cette dernière observation est en accord avec le fait que l'excitabilité calcique gliale repose sur l'activation des récepteurs couplés aux protéines G. Enfin l'activité calcique des CSP est préservée à la jonction neuromusculaire de mammifère, ce qui montre que l'interaction neurone-glie est un principe fondamental, conservé au cours de l'évolution. De façon plus spécifique, les CSP présentent une augmentation de leur activité calcique lorsque l'on

applique localement de l'ATP et de l'acétylcholine, deux neurotransmetteurs libérés à la jonction neuromusculaire (Jahromi et al., 1992).

2.6.2.2- Les propriétés intrinsèques des cellules gliales

Chez le mammifère, il est intéressant de noter que les CSP possèdent des propriétés qui leur sont propres. Il a été montré que l'activité calcique des CSP diffère suivant l'âge, les muscles et les jonctions neuromusculaires auxquels elles se trouvent. Rousse et ses collègues montrèrent que malgré une stimulation électrique à la même fréquence du neurone moteur, les réponses calciques des CSP du *Levator Auris Longus* (LAL) et du soléus sont différentes (Rousse et al., 2010). L'étude montra que la réponse calcique des cellules gliales du LAL est plus élevée que la réponse calcique des cellules gliales du soléus. Les deux muscles possèdent une composition en type de fibre musculaire différente. Le LAL est un muscle à contraction rapide facilement fatigable, composé des fibres musculaires de type 2a et 2b. Le soléus quant à lui est un muscle endurant, composé de fibres musculaires de type 1 et de 2a.

Lors de la compétition synaptique, plusieurs terminaisons axonales luttent afin d'occuper la même plaque motrice. Les CSP sont capables de distinguer et de répondre de façon différente à la plus forte des deux terminaisons (Darabid et al., 2013). Les propriétés des cellules gliales s'adaptent en fonction de l'âge et du muscle étudié. Ces observations montrent bien que les cellules gliales sont capables de s'adapter à l'environnement dans lequel elles se trouvent et que des propriétés intrinsèques à ces cellules influencent l'amplitude de leur réponse à une stimulation donnée.

2.6.3- Les CSP sont capables de moduler l'activité synaptique à la jonction neuromusculaire

En tant qu'élément actif de la synapse, les cellules gliales doivent non seulement détecter et répondre, mais aussi intervenir et moduler l'activité synaptique. La libération de neurotransmetteurs lors de stimulation à haute fréquence permet l'activation calcique des CSP qui en retour influence la libération de neurotransmetteurs. Plusieurs évidences montrent en effet qu'un mécanisme lié à l'activation des récepteurs couplés à des protéines G des CSP influence l'activité synaptique. Dans son étude de 1998, le professeur R. Robitaille a montré qu'en intervenant seulement sur les cellules gliales à la jonction, et en ne perturbant ni l'activité de la terminaison axonale ni de la fibre musculaire, il est possible de moduler l'activité synaptique. L'étude montre qu'en injectant spécifiquement dans la cellule gliale une molécule impliquée dans la cascade d'activation des protéines G, le GTP γ S, une forme non hydrolysable du GTP, celles-ci diminuent la probabilité de relâche de vésicules par le neurone moteur (Robitaille, 1998, Castonguay and Robitaille, 2001). Cette expérience fut la première à montrer directement l'impact des cellules gliales et de leur activation dans la modulation de l'activité synaptique *in situ*.

Todd et al, en 2010 montra que les CSP à la jonction neuromusculaire adulte de mammifère sont capables de distinguer les différents patrons d'activation nerveux. Suivant le patron d'activation, qu'il soit continu ou en rafale, les CSP répondent de façon distincte et induisent une augmentation ou diminution de l'activité synaptique. La stimulation continue du nerf moteur induit une forte augmentation des ions calciums intracellulaires dans les CSP ainsi

qu'une potentialisation de l'activité synaptique alors que l'activité en rafale induisait une activité calcique plus réduite et une dépression de l'activité synaptique (Todd et al., 2010).

Le point fort de cette étude réside dans le fait que l'activité calcique gliale est nécessaire et suffisante dans la modulation de l'activité synaptique. Ceci fut montré à l'aide de chélateurs calciques photo-activables avec lesquelles il fut possible de mimer la réponse calcique gliale et moduler la transmission synaptique (Todd et al., 2010). Le mécanisme sous-jacent cette observation serait lié à la libération d'ATP de la part des cellules gliales, qui serait dégradé en adénosine. L'adénosine activerait les récepteurs A1 ou A2 sur le bouton présynaptique, dont l'affinité pour la molécule est différente. L'activation des récepteurs A1 ou A2 induirait respectivement soit une dépression soit une potentialisations.

Dans une étude *in vivo* en 2010, Belair a montré que les CSP à la jonction neuromusculaire sont capables de s'adapter à l'activité de la synapse à laquelle elles se trouvent. La stimulation ou le blocage chronique de la jonction induisent une modification de la sensibilité des CSP à l'ATP et à l'acétylcholine. Tout comme les neurones, les cellules gliales présentent un certain degré de plasticité qui leur permet de s'adapter au fonctionnement de la synapse (Belair et al., 2010).

Les cellules gliales pérисynaptiques sont donc importantes à la modulation de l'activité synaptique. Elles permettent une adaptation du signal neuronale en fonction de l'activité antérieure afin de mieux répondre aux exigences physiologiques. Leur activité diffère avec l'âge de l'individu ainsi qu'avec l'état de la synapse en tant que telle.

2.6.4 Les CSP sont importantes pour la formation, le maintien et la régénération de la jonction neuromusculaire

Lors du développement, les cellules gliales ne sont pas nécessaires à l'établissement du premier contact entre le neurone moteur et la fibre musculaire. Le neurone moteur est capable d'atteindre la fibre musculaire cible sans l'intervention de la glie. Néanmoins l'absence de cellule gliale induit la rétraction de la terminaison axonale plus tard dans la maturation de la synapse (Lin et al., 2000). Les PSC sont aussi capables de distinguer les terminaisons fortes des terminaisons faibles lors de la compétition synaptique et sont chargées d'éliminer les terminaisons non désirées (Darabid et al., 2014). Elles possèdent donc un rôle prépondérant dans l'établissement d'une synapse fonctionnel.

Chez l'adulte, l'ablation des cellules gliales pérисynaptique provoque la diminution de la libération de neurotransmetteurs ne serait-ce qu'une semaine après la disparition des cellules gliales. Au niveau morphologique, l'ablation des CSP provoque une rétraction totale ou partielle de la terminaison axonale. Il semble que le maintien de l'intégrité de la synapse se fasse par la libération de facteurs trophiques de la part des cellules gliales (Reddy et al., 2003). Ce qui montre bien le rôle important des cellules gliales pour le maintien d'une jonction neuromusculaire fonctionnelle.

D'autre part, les CSP sont un élément essentiel lors de la régénération des terminaisons axonales après une blessure ou dénervation. Chez la souris, les cellules gliales de la synapse dénervée envoient des prolongements vers une synapse en santé. La formation de ce « pont » gliale guide la terminaison axonale de la synapse fonctionnelle vers la plaque motrice à réinnover (Son and Thompson, 1995, Kang et al., 2014). Les mécanismes sous-jacents la formation de ces ponts gliaux ne sont pas claires. Il semble que ces changements

morphologiques gliaux soient dépendant de l'activité synaptique (Georgiou et al., 1994). Lorsqu'aucun signal nerveux n'est détecté, les CSP augmentent l'expression de certaines protéines telles que le GFAP ou NRG1 (Carroll et al., 1997). Par exemple, l'expression du GFAP, une protéine cytosquelettique importante lors de la réinnervation, est intimement liée à l'activation des récepteurs muscariniques gliaux (Triolo et al., 2006, Georgiou et al., 1999).

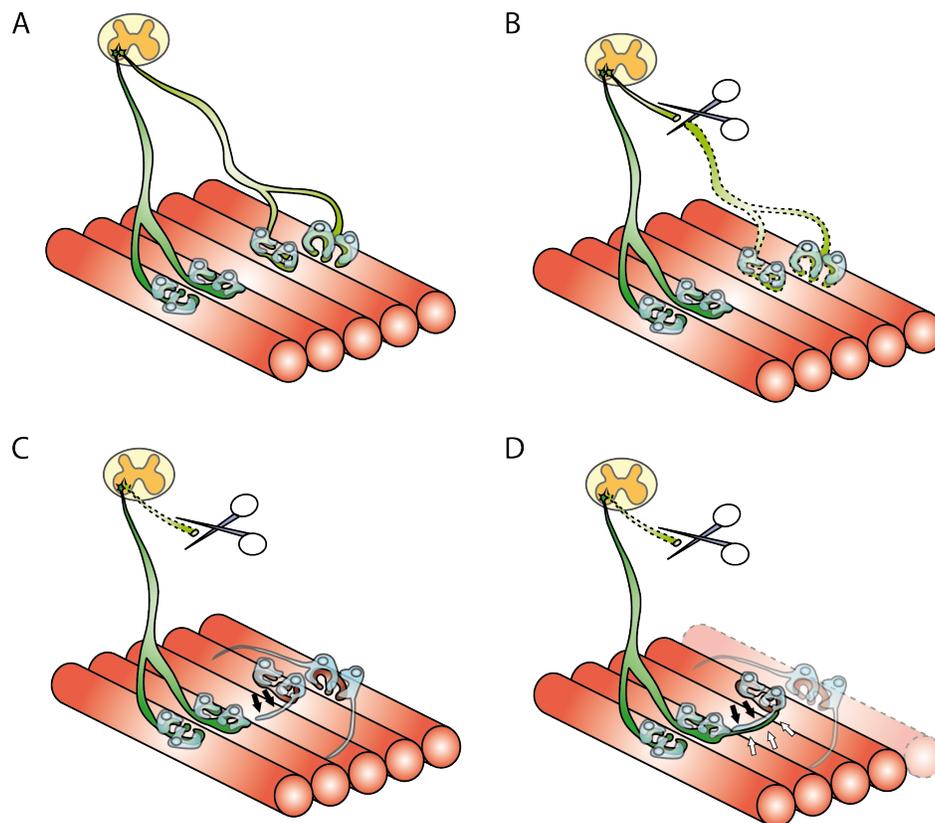


Figure 3 : Représentation schématique des prolongements des CSP permettant la réinnervation de la jonction neuromusculaire en cas de réinnervation.

En cas de dénervation de la jonction neuromusculaire par sa terminaison axonale (B), les cellules gliales pérисynaptiques des synapses dénervées envoient des prolongements vers les jonctions avoisinantes (flèches noires) (C). Une fois le contact établi, le “pont glial” formé entre les deux synapses sert de guide qui permet à la terminaison axonale de la jonction

innervé d'envoyer un prolongement vers la jonction dénervée (flèches blanches) (D). Ces prolongements gliaux sont aussi observables lors du blocage de la transmission synaptique. Les jonctions ainsi que les fibres musculaires n'étant pas réinnervées par les jonctions avoisinantes dégénèrent.

La jonction neuromusculaire est une synapse composée de trois éléments interagissant ensemble et ayant chacun une spécificité propre. Cette synapse est capable de montrer des signes de plasticité synaptique afin de s'adapter à une situation donnée. L'étude des cellules gliales à la jonction neuromusculaire montre qu'elles ont possèdent un rôle à part entière dans le développement, le maintien et la modulation de la transmission synaptique. Tout au long de la vie d'un individu, la jonction neuromusculaire va subir du stress, des traumatismes, des restructurations qui modifieront la morphologie et le fonctionnement de la synapse.

III-Vieillessement de la jonction neuromusculaire

Tout comme le reste de l'organisme, le vieillissement s'accompagne de nombreuses modifications de l'organisation de la jonction neuromusculaire. Ces modifications touchent aussi bien l'élément présynaptique que l'élément post-synaptique. Bien que de nombreuses études s'intéressent au vieillissement du neurone moteur et du muscle, nos connaissances concernant les modifications gliales à la jonction sont très limitées. Dans la section suivante, je ferai une revue de la littérature concernant le vieillissement normal de la jonction neuromusculaire.

3.1- Les changements morphologiques et fonctionnels de l'unité motrice

3.1.1- La perte de masse musculaire et la perte des unités motrices de type 2

Lors du vieillissement, nous observons une diminution de la taille et de la masse musculaire. La perte de la masse musculaire est régulière et est évaluée à environ 1% de la masse musculaire à l'âge adulte par an. Ce phénomène appelé sarcopénie se traduit par une perte de masse musculaire d'environ 30% entre l'âge de 50 et 80 ans, réduisant la force musculaire et la résistance à l'effort. Elle mène à une perte d'autonomie et de motricité. Chez le rongeur cette diminution de la masse musculaire semble provenir de la perte du nombre de fibres musculaires spécifiquement de type II. Chez l'humain, le nombre de fibres musculaires de type II ne diminue pas, mais en revanche, une analyse de tissus musculaire par le Professeur Lexell a montré que celles-ci étaient sujettes à une atrophie plus sévère. La proportion de la masse musculaire composée de fibres musculaires de type II est donc réduite par rapport à la masse totale du muscle chez les personnes âgées (Lexell, 1995, Valdez et al., 2012).

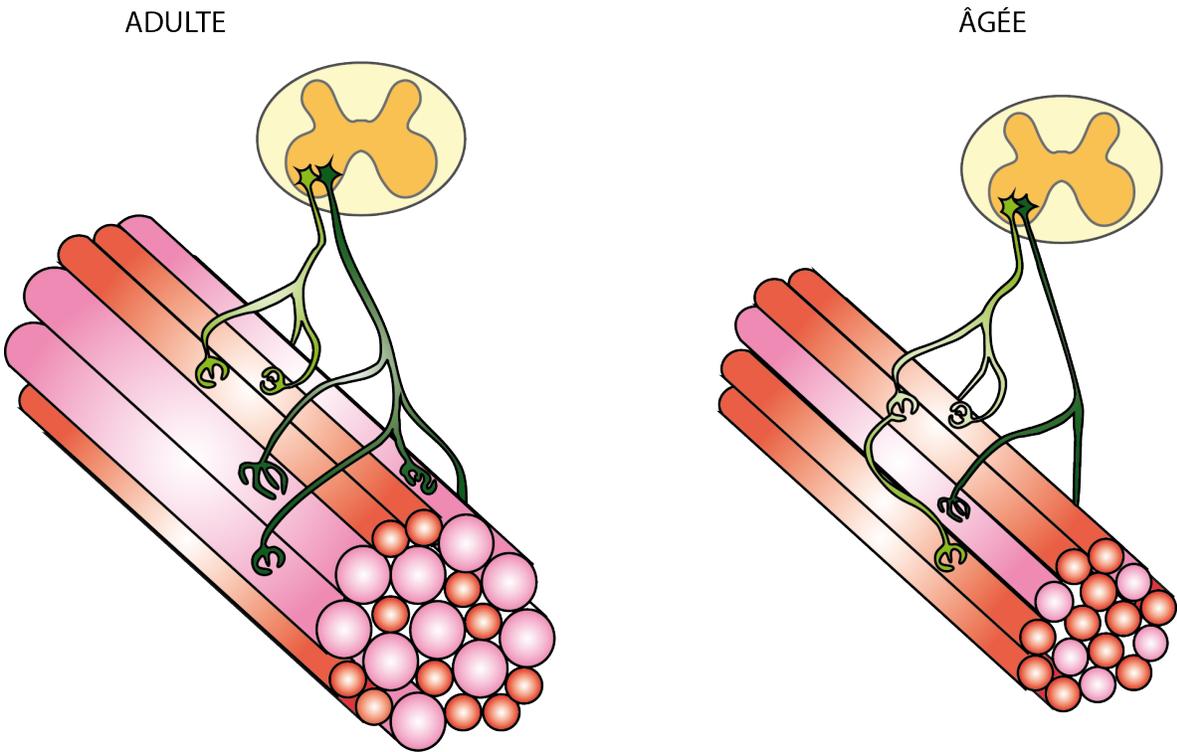


Figure 4 : Atrophie des fibres musculaires et modifications des unités motrices au cours du vieillissement normal.

Le vieillissement s'accompagne d'une perte de masse musculaire due à une atrophie et à une perte du nombre de fibres musculaires facilement fatigables (type II) (rose) tandis que le nombre de fibres musculaires résistantes à la fatigue (type I) (rouge) ne diminue pas significativement. Une partie des jonctions neuromusculaires associées à ces fibres musculaires de type II dégénère ce qui induit une diminution de la taille de leurs unités motrices associées (vert foncé). Les sites de jonctions laissés vacants peuvent être réinnervés par des unités motrices de type résistant à la fatigue RF (vert clair).

3.1.2 L'accumulation de radicaux libres lors du vieillissement normal

Les neurones moteurs montrent des signes liés au vieillissement et accumulent des anomalies au cours du temps. Contrairement à ce que l'on retrouve dans le SNC, les axones ainsi que les terminaisons axonales ne sont pas protégés par une barrière hémato encéphalique. Avec le vieillissement, on note une augmentation du nombre de radicaux libres (*reactive oxygen species* ROS) et d'inflammation chronique dans l'ensemble de l'organisme (Mattson and Magnus, 2006). Alors que les cellules adultes sont capables d'éliminer les ROS, ces derniers sont beaucoup moins bien régulés dans le milieu extracellulaire des individus âgés. Avec le vieillissement, l'accumulation de ROS dans la circulation endommage l'intégrité des membranes lipidiques, altère le fonctionnement enzymatique cellulaire, compromet l'équilibre énergétique ainsi que l'expression des protéines. Toutes ces lésions mènent à la mort des cellules. De par leur composition riche en acide gras, il semble que les cellules gliales myelinisantes soient particulièrement vulnérables au ROS (Opalach et al., 2010).

3.1.3- Le vieillissement du neurone moteur et sa dégénérescence contribuent à la perte de l'unité motrice

Parmi l'ensemble des explications relatives à la perte de masse musculaire et de fibres musculaires, la dégénérescence du neurone moteur et de la jonction neuromusculaire reste la plus plausible. Le vieillissement s'accompagne d'une perte du nombre de neurones moteurs dans la moelle épinière. Chez les personnes âgées de plus 60 ans, on observe une perte d'au moins 25% du nombre de neurones moteurs dans la moelle épinière par rapport aux individus

plus jeunes (Gawel and Kostera-Pruszczyk, 2014)(Tomlinson BE 1977). Cette perte de neurones moteurs mène à la dénervation de certaines fibres musculaires qui se retrouvent sans interaction nerveuse. Les neurones moteurs adjacents qui sont en bonne santé peuvent envoyer des prolongements vers les fibres musculaires dénervées (Kang et al., 2014). Dans ce cas, la fibre réinnervée survit (Kang and Lichtman, 2013). Mais la fibre musculaire peut rester dénervée et dans ce cas là, cette dernière dégénère. Il n'est pas clair si la dénervation commence à la jonction ou dans la moelle, mais certaines évidences récentes montrent que certains changements sont préalablement observés à la jonction neuromusculaire avant qu'aucun ne soit observable dans la moelle (Chai et al., 2011).

Le vieillissement s'accompagne d'une baisse d'efficacité de la part des neurones moteurs à envoyer des prolongements. Cette perte d'efficacité peut être expliquée par l'accumulation de déchets dans la matrice extracellulaire empêchant l'axone d'atteindre la fibre musculaire dénervée (Kang, Lichtman 2013). Ce processus de dénervation et de réinnervation mène à la formation d'unités motrices hybrides, composées de fibres musculaires de types différents. Les fibres musculaires de type II, plus susceptibles à la dénervation, vont être réinnervées par des neurones moteurs de type I dont les propriétés physiologiques sont différentes.

L'ensemble de ces lésions de l'unité motrice mène à des modifications de leur l'activité fonctionnelle. Les personnes âgées sont par exemple plus susceptibles de posséder une force de contraction diminuée (Deschenes 2004, Young A 1984, Larsson 1986, Lanza IR 2004).

3.1.4- Les différents muscles du corps ne sont pas affectés de la même façon par le vieillissement normal

Dépendamment du muscle au sein d'une même espèce, on note une différence quant à l'effet de l'âge sur la jonction neuromusculaire. Comme le montre l'étude effectuée par Valdez et Sanes en 2012 sur 16 muscles différents de la souris, tous ne sont pas touchés de la même façon (Valdez et al., 2012). Certains muscles tels que les muscles extra oculaires sont complètement préservés de l'effet de l'âge sur leur fonctionnement et leur morphologie. À l'opposé, les muscles des membres inférieurs, du dos et du cou présentent plusieurs symptômes liés au vieillissement. Les muscles innervés par les nerfs crâniens, sont touchés, mais plus tardivement et de façon moins sévère. Les raisons de cette disparité au sein des muscles du corps ne sont pas clairement établies et le changement du type de fibre n'explique pas certaines observations. Par exemple, bien que composé entièrement de fibres musculaires de type rapide et fatigable, le LAL, ne voit pas la taille de ses unités motrices diminuer. De plus, au niveau du soleus, un muscle de soutien résistant à la fatigue, les jonctions neuromusculaires sur les fibres musculaires de type I présentent plus de signes liés au vieillissement que les jonctions neuromusculaires situées sur les fibres musculaires de type II. Dans le EDL, les jonctions neuromusculaires situées sur les fibres de type I et II présentent un même degré d'altération lié au vieillissement (Valdez et al., 2012).

3.2-Les changements morphologiques et fonctionnels de la jonction neuromusculaire lors du vieillissement

Dans les dernières années, plusieurs évidences ont montré que les modifications qui accompagnent l'unité motrice ainsi que l'ensemble du muscle durant le vieillissement semblent avoir comme origine la jonction neuromusculaire (Deschenes et al., 2010, Chai et al., 2011). En effet, les modifications morphologiques et fonctionnelles de la synapse sont observables avant les modifications des fibres musculaires et de l'axone du neurone moteur. Chez les rongeurs, le nombre de neurones moteurs dans la corne ventrale de la moelle épinière reste constant malgré des changements structurels au niveau de la jonction neuromusculaire. Cela montre une dégénérescence rétrograde du neurone moteur ayant comme origine la synapse neurone-muscle puis se propageant vers le corps cellulaire. On observe des changements aussi bien au niveau de l'élément présynaptique, que post-synaptique. Néanmoins, ces changements associés au vieillissement de la jonction neuromusculaire restent peu connus et nécessitent une étude approfondie.

3.2.1-Changements morphologiques et fonctionnels de l'élément présynaptique

Au niveau présynaptique, le vieillissement s'accompagne de plusieurs changements morphologiques et fonctionnels. On observe une augmentation de la taille des prolongements au niveau de la terminaison axonale. Cette augmentation en taille de l'élément présynaptique est synonyme d'une dispersion des sites de libération de neurotransmetteurs. Le nombre de

vésicules synaptique contenant les neurotransmetteurs est diminué ainsi que le nombre de zones actives. On note aussi une baisse du nombre de mitochondries dans la terminaison ce qui se traduit par une baisse de la production d'ATP (Fahim and Robbins 1982). On notera aussi que la gestion du calcium intracellulaire au niveau de la terminaison axonale est altérée à la synapse âgée du EDL, un muscle composé majoritairement d'unité motrice de type 2 (Smith, 1988).

Plusieurs mécanismes compensatoires sont mis en place afin de remédier à ces changements de morphologie et de fonctionnement de l'élément présynaptique. Il a été montré que le contenu quantique des vésicules synaptiques augmente ainsi que le nombre de vésicules recyclées lors de la stimulation du neurone moteur. Au niveau du EDL, chez les vieilles souris, la fréquence de libération spontanée que l'on mesure par la fréquence des potentiels de plaque motrice miniature (mPPM) augmente (Kelly and Robbins, 1986, Smith, 1988).

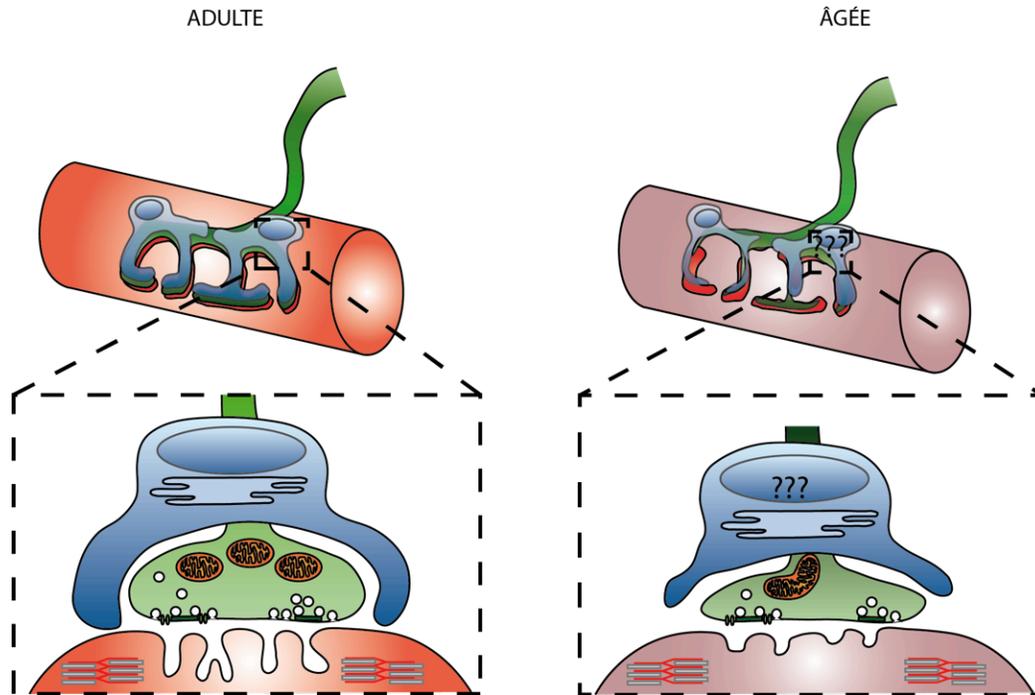


Figure 5 : Modifications morphologiques de la jonction neuromusculaire au cours du vieillissement normal.

Le vieillissement de la jonction neuromusculaire s'accompagne au niveau post-synaptique (rose) : d'une fragmentation de la plaque motrice ainsi que de la formation d'ilots de récepteurs cholinergiques. Il y a une diminution du nombre de replis post-synaptique au niveau de la plaque motrice. Au niveau présynaptique (vert), le vieillissement s'accompagne d'un nombre important de synapses présentant des signes de dénervation partielle se traduisant par des régions de la plaque motrice non recouverte par la terminaison axonale. Le nombre de mitochondries diminue et celles-ci ont une organisation chaotique ont l'origine pourrait provenir de la fusion de plusieurs mitochondries. Les zones actives sont moins nombreuses. Les modifications des cellules gliales (bleu) à la jonction neuromusculaire lors du vieillissement sont inconnues et font l'objet de ce mémoire.

3.2.2-Les changements post-synaptiques liés au vieillissement

Au niveau post-synaptique, le vieillissement de la jonction neuromusculaire s'accompagne aussi de modifications morphologiques et fonctionnelles. De nombreuses études ont montré que le vieillissement s'accompagnait d'une fragmentation des récepteurs post-synaptiques, d'une diminution du nombre de replis et d'une dispersion des récepteurs à l'acétylcholine (Rosenheimer and Smith, 1985). Plusieurs études ont souligné un agrandissement de la surface de la plaque motrice, mais cela reste controversé (Deschenes et al., 2013). Cette augmentation de la taille aurait lieu durant les premiers stades du vieillissement, mais arrivé au point limite, la jonction neuromusculaire perd son innervation et sa taille diminue peu à peu.

Une étude très intéressante de Li et Thompson en 2011 a montré à l'aide du marquage de la jonction *in vivo* que les changements ayant lieu à la jonction neuromusculaire se font brusquement. En effet, durant la majorité de la vie, la jonction neuromusculaire est une structure très stable ne changeant quasiment pas ni de forme ni de taille tout au long de la vie de l'individu. Les récepteurs à l'acétylcholine se retrouvent au sommet des replis post-synaptiques et forment une structure particulière souvent comparée à la forme d'un « bretzel ». Durant le vieillissement, l'incapacité à maintenir l'intégrité de la synapse mène à la dénervation de la synapse ainsi qu'à des changements drastiques de la plaque motrice. Les récepteurs à l'acétylcholine déjà présents sont éliminés puis remplacés par de nouveaux récepteurs à l'acétylcholine. L'organisation de ces nouveaux récepteurs est évasive et fragmentée. La fibre musculaire sous la jonction neuromusculaire en question présente des signes d'une fibre musculaire nécrosée ayant rapidement régénérée (Li et al., 2011). Une nouvelle synapse est reformée à la même location que la synapse qui a dégénéré, mais l'organisation de cette dernière présente le phénotype d'une jonction âgée abimée.

Ces changements morphologiques et organisationnels de la jonction neuromusculaire, aussi bien au niveau de l'élément présynaptique que post-synaptique sont réversibles par la pratique de l'exercice physique et la restriction calorique (Valdez et al., 2010).

IV-Problématique

Comme exposé ci-dessus, les changements morphologiques et fonctionnels de la jonction neuromusculaire lors du vieillissement ont en grande partie été décrits au niveau de l'élément présynaptique et post-synaptique. Au niveau de l'élément glial, nos connaissances restent minimales.

Nous avons vu aussi qu'au cours du vieillissement, les jonctions neuromusculaires sont sujettes à être dénervées puis réinnervées par les neurones moteurs environnants. Or, les CSP jouent un rôle important lors du développement de la synapse ainsi que lors de la réinnervation de la synapse après une blessure (Reynolds and Wolf 1992). Elles envoient des prolongements grâce auxquels les neurones moteurs peuvent atteindre la synapse et libèrent des facteurs trophiques dans le milieu extracellulaire (Frostik et al 1998).

La fonction des cellules gliales dans une situation spécifique est régulée par sa capacité à interagir avec la synapse. Chez l'adulte, la synapse est fonctionnelle et les cellules gliales jouent un rôle modulateur. Lors de blessures, les CSP détectent un signal nerveux perturbé et agissent en tant que réparateurs afin de réinnover la synapse dénervée. Dans notre étude, nous sommes intéressés à l'interaction neurone-glie à la jonction neuromusculaire lors du vieillissement. Puisque les cellules gliales sont essentielles à la maintenance de la synapse et

que cette maintenance passe par l'activation de certains récepteurs gliaux notre problématique fut la suivante :

**L'interaction neurone-glie à la jonction neuromusculaire est-elle altérée
lors du vieillissement normal ?**

Nous avons donc comparé l'activité synaptique et l'activité gliales à la jonction neuromusculaire adulte (3 mois) et à la jonction neuromusculaire âgée (20-24 mois). Le muscle que nous avons utilisé est le LAL de souris CD-1.

1- Nous avons mesuré l'activité synaptique et l'effet d'une stimulation synaptique à haute fréquence sur la plasticité synaptique à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques. Les résultats obtenus montrent que l'activité synaptique de la jonction neuromusculaire de souris âgée est altérée et que la transmission tend à déprimer à long terme.

2- Nous nous sommes donc tournés vers les cellules gliales afin de déterminer si ces dernières sont capables de détecter correctement l'activité synaptique à la synapse âgée. Nous avons donc mesuré l'activité calcique intracellulaire des cellules gliales à la jonction neuromusculaire grâce à des méthodes d'imagerie calcique. Nos résultats montrent que les cellules gliales à la jonction neuromusculaire âgée sont encore capables de détecter l'activité synaptique, mais que la contribution des récepteurs muscariniques des CSP âgées est largement diminuée.

3) Au niveau morphologique, les résultats obtenus lors du marquage des trois éléments de la jonction neuromusculaire montrent que l'organisation de la synapse est complètement dénaturée. La morphologie des cellules gliales est modifiée puisque des changements caractéristiques d'une jonction neuromusculaire en détresse sont observables lors de la comparaison des CSP de souris âgées avec les CSP de souris adultes.

Contribution des auteurs:

Ci-après est joint l'article faisant l'objet de l'étude. Celui-ci n'est pas encore soumis et est en préparation pour sa soumission. Plusieurs auteurs ont participé à l'élaboration de l'article, voici leur contribution respective.

Noam Krief : A effectué la grande majorité des expériences de l'ensemble de l'étude, de l'analyse des résultats et de la rédaction de l'article. Fut le principal gestionnaire du projet d'étude sur le vieillissement.

Alexandre Saint-Amour : A commencé le projet. A mis au point certaines techniques expérimentales, telles que le protocole d'imagerie calcique et la dissection de la préparation.

Joanne Vallée : A participé à la mise au point du protocole d'immunohistochimie pour le quadruple marquage ainsi qu'à l'imagerie de lames.

Richard Robitaille : A mis en place le projet et l'hypothèse de l'étude. A été à l'origine de l'élaboration des expériences. A participé à la correction de l'article.

Article:

ALTERATION OF NEURON-GLIA INTERACTIONS AT THE NEUROMUSCULAR JUNCTION OF OLD MICE

Noam Krief^{1,2}, Alexandre St-Amour^{1,2}, Joanne Vallée^{1,2}, Richard Robitaille^{1,2*}

¹ : Département de neurosciences, Université de Montréal

² : Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal, PO box 6128,
Station centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

* To whom correspondence should be addressed:

Richard Robitaille
Département de neurosciences
Université de Montréal

Abstract

Major weakening of the neuromuscular system occurs during aging that include muscle weight loss, difficulties in initiating voluntary movement and reduced muscle strength. The possible role of the alteration of the neuromuscular junction has been examined but always only considering the pre- and postsynaptic elements. However, perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the neuromuscular junction (NMJ), play fundamental roles in the regulation of the synaptic efficacy of the NMJ as well as in its maintenance and stability. Hence, we analysed NMJ properties and their glial cells in aging. Using synaptic recordings, we found that a number of synaptic plasticity events known to be regulated by PSCs are reduced at NMJs of old mice. PSCs ability to detect synaptic transmission, determined using imaging of intracellular Ca^{2+} , was maintained in PSCs at NMJs from old mice, but the contribution of the muscarinic component was greatly reduced. Finally, NMJ reorganisation and sprouting of PSCs were also observed. These data suggest that PSC properties are consistent with the repair of the NMJ that may also result in their reduced ability in regulating synaptic efficacy.

Key words (6): Perisynaptic Schwann cells; synaptic plasticity; neuron-glia interactions; neuromuscular junction organisation; aging; muscarinic receptors

1. Introduction

Aging is characterized by an alteration of the nervous system functions such as age-related memory loss, learning difficulties and lack of attention (Herrup, 2010, Serper et al., 2014). In the peripheral nervous system, several changes such as muscle weight loss, difficulties in initiating voluntary movement and reduced muscle strength (Morley, 2012, Deschenes, 2011) are amongst the most important and striking changes observed. Ultimately, these events lead to a significant loss of muscle mass and sarcopenia (Cederholm and Morley, 2015). Interestingly, recent evidence has highlighted the possible roles of neuromuscular junction (NMJ) denervation in sarcopenia (Chai, Vukovic et al. 2011; Rowan et al., 2012), although whether changes in NMJ denervation or sarcopenia is the preceding event remains unclear (Gonzalez-Freire et al., 2014).

The vertebrate NMJ is composed of three active elements, the presynaptic nerve terminal, the muscle fibre and its specialised endplate area and the perisynaptic Schwann cell (PSCs) (Jahromi et al., 1992, Auld and Robitaille, 2003). Interestingly, studies of the changes and properties of NMJ during aging have systematically focussed on the pre- and postsynaptic elements, leaving the study of the glial compartment understudied. However, since PSCs at the NMJ play several key roles in the regulation of NMJ functions it is important to investigate some of the changes that occur during aging and help elucidate whether old NMJ properties are causally link to the sarcopenia.

For instance, glial cells are sensitive to synaptic activity and, in turn, modulate synaptic transmission and plasticity (Rochon et al., 2001, Robitaille, 1998, Todd et al., 2010). Furthermore, they are essential for the maintenance and repair of the NMJ following injury (Ko and Robitaille, 2014). This glial modulation of synaptic efficacy and stability depends on

proper detection of neurotransmitters through receptors for neurotransmitter (mainly metabotropic receptors), in particular, purinergic and muscarinic receptors (Ko and Robitaille, 2014). The balance of activation of these receptors will sculpt the PSCs activity, adapted to the need of the NMJ in a given situation such as synaptic competition, according to the state of the NMJ or in disease (Rousse et al., 2010, Wright et al., 2009, Darabid et al., 2013, Arbour, 2015). In particular, the contribution of the muscarinic receptors in PSCs activation determines their phenotype to be consistent with the stability of the NMJ or its repair (Ko and Robitaille, 2014).

Hence, the goal of this work was to study the functional properties of PSCs at NMJs during aging and characterise the properties of the NMJ known to be regulated by PSCs, that is, the efficacy of the synapse (synaptic transmission and plasticity) and NMJ maintenance and repair. Using Ca^{2+} imaging of PSCs and synaptic recording of innervated NMJ, we found that although PSCs of older mice detected synaptic transmission, this detection was based on a reduced contribution of muscarinic receptors. Also, various forms of synaptic plasticity were altered, leading to a reduced strength of the synapse. These data suggest that PSC properties are consistent with the repair of the NMJ that may also result in their reduced ability in regulating synaptic efficacy.

2. Materials and methods

2.1 Animals and Nerve muscle experiment:

All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and the “Comité de déontologie animale of Université de Montréal”. Male CD-1 mice were used at P90-100 for the adult group and at P620-700 for the old group. Mice were purchased at P90 from Charles River, Montreal and maintained in our animal facility until the age of interest was reached. Each mouse was weighted weekly and all cages were given a training wheel that the animals used at will. An autopsy was performed at the day of the experiment, searching for the presence of abnormalities such as tumours or organ necrosis.

Mice were anaesthetised by inhalation of Isoflurane. Experiments were performed on the Levator Auris Longus (LAL) muscle to avoid possible direct influence of exercise. Muscles and their innervation were dissected and pinned into a silgard coated chamber filled with oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Rees' Ringer's solution (in mM): 110 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 11 glucose, 0.3 glutamate, 0.4 glutamine, 5 BES, 4.34×10^{-7} cocarboxylase and 0.036 choline chloride.

2.2 Electrophysiological recording of synaptic transmission:

All experiments were performed with continuous perfusion of normal Ringer solution heated to 30 °C. Intracellular synaptic recordings were performed using glass microelectrodes (40-70 M Ω, filled with 3 M KCl) in oxygenated Ringer at 28-30°C. Synaptic responses were recorded using a Neuroprobe model 1600 amplifier (A-M Systems Inc.) and further amplified (100x) and filtered (2kHz) by Warner Instruments DC amplifier. EPPs were recorded with

WinWCP software (John Dempster, University of Strathclyde, Strathclyde, United Kingdom). The cut end of the nerve was stimulated with a suction electrode at twice the threshold level for muscle contraction (Grass medical instrument; Quincy, MA, USA). EPPs were recorded at 0.2 Hz for 15 min to establish the basal level of synaptic transmission. Muscle contractions were prevented using d-tubocurarine chloride (2,0 µg/ml in the perfusion, Sigma-Aldrich).

Synaptic plasticity was studied using three rounds of motor nerve stimulation at 100Hz for 5 s, 90 s interval between bouts. This pattern mimics the activity observed *in vivo* for the LAL. Synaptic plasticity was studied as follow and is illustrated in Figure 1: after recording the basal level of synaptic transmission for 15 to 20 minutes, high frequency stimulation at 100 Hz three times as described earlier was induced. Synaptic depression following high frequency stimulation was defined by the reduction in amplitude measured for the last fifty EPPs of the train of stimuli and expressed as percentage of the averaged amplitude of the EPPs during the control period. Post-tetanic potentiation was determined by measuring the relative amplitude over control of the first 15 EPPs immediately following high frequency stimulation. Finally, long term Plasticity (LTP) was determined by measuring the amplitude of 15 EPPs 30 minutes after high frequency stimulation.

2.3 Calcium imaging:

Muscles were incubated in a pre-oxygenated physiological solution containing 15µM fluo-4 AM (Molecular Probes, Invitrogen) 0.02% pluronic acid (Molecular Probes), and 0.5% dimethylsulfoxide (Sigma-Adlrich) for 90 min. Preparations were transferred in a fresh loading solution after 45 min. The preparations were then transferred under the microscope and the threshold for motor nerve stimulation to evoke muscle contractions was determined

before applying d-tubocurarine chloride (2,0 µg/ml in the perfusion bath). Images were acquired on a Nikon E600N upright microscope fitted with a Princeton Instruments CCD-1300 camera. Digital acquisition was performed using MetaFluor software (Molecular Devices) driving a Lambda 10-2 shutter wheel (Sutter Instruments). Images were acquired at a rate of one image per second with an integration time of 500 ms. Relative changes in fluorescence was calculated as $\Delta F/F_0 = (F - F_0/F_0)*100$. Experiments were discarded when bleaching or focus drift occurred.

Ca²⁺ responses were elicited in PSCs by endogenous release of neurotransmitters evoked by motor nerve stimulation with one of the stimulation protocol described above at twice the threshold level for muscle contraction. Ca²⁺ responses in PSCs were also induced by local applications of agonists. ATP (10µM) and muscarine (50µ) were dissolved in the perfusing physiological solution and locally applied on PSCs using small micropressure pulses (20 psi) for 150 milliseconds using a Picospritzer II (General Valve).

In some experiments, antagonist was bath applied for at least 45 min before the start of experiments. Muscarinic AChRs (atropine, 5–20 µM, Sigma) antagonist was diluted in oxygenated Rees' Ringer's solution.

2.4 Immunohistochemistry:

The morphology of the NMJ was characterised by staining all three elements at this synapse using immunohistochemistry. Muscles were fixed in a solution of 4% formaldehyde for 10 minutes and rinsed three times in PBS. Preparations were permeabilized in 100% methanol for 6 min at -20°C. Blockade of non-specific labelling was performed by a 20 min incubation with normal donkey serum 10%. Preparations were then incubated for 16 hours at

4°C with a rabbit primary antibody (1:250, Dako) targeting S100 β . After rinsing, muscles were incubated 90 min at room temperature with IgG anti NF-M (1:250, Rockland Immunochemicals Inc) then rinsed. Secondary antibodies were coupled to Alexa Fluor 488 (1:500, Molecular Probes) for S-100 β and Alexa Fluor anti-goat 405 (1 :500, Molecular Probes) for NF-M. Incubation of secondary antibodies was performed simultaneously at room temperature for 60 min. Different concentration of antibodies were tested in order to get optimal staining for each element of the synapse. To test the specificity of our antibodies, this protocol was performed without either the primary or secondary antibodies. As a result, no specific staining was obtained in absence of neither primary nor secondary antibodies. Nicotinic receptors were labelled using α -bungarotoxin coupled to an Alexa 594 (1:750, Molecular Probes) for 30 min at room temperature. Muscles were then mounted with Prolong Gold antifade reagent containing DAPI (Invitrogen) to visualize nuclear material. All labels were observed simultaneously using the spectral detection feature of an Olympus FV1000 confocal microscope. Pinholes were set to obtain an airy disk value of 1. No further manipulations of images were performed after the acquisition.

2.5 Criteria concerning morphology of NMJ:

The following analysis of the pre- postsynaptic and glial elements was performed to establish the state of NMJs of adult and aged mice.

The endplate area was determined as the area delineated by the postsynaptic receptor labelling state of the undergoing alteration of the NMJ. The following scale was used: 1 = 1 or 2 fragments; 2 = 2 to 5 fragments; 3 = 6 to 8 fragments; 4 = more than 9 fragments.

Endplates lacking presynaptic axonal terminal were considered as denervated NMJ and those with axonal terminal innervating only a part of the area were qualified as partially denervated.

The glial structural morphology was analysed in relation with the pre- and postsynaptic elements by evaluating the coverage of the endplate, the number of PSCs expressing S-100 at adult and old NMJs and the number of glial cells extending processes to nearby synapses.

2.6 Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. N represents the number of animals and n refers to the numbers of NMJs or PSCs. *Paired t tests* were performed when comparing synaptic responses induced by the motor nerve stimulation during the same experiment. *Unpaired t tests* were performed to compare two different conditions from different experiments. All tests were used at a confidence level of 95% ($\alpha = 0.05$).

3. Results

A growing body of evidence shows that PSCs contribute to NMJ formation and maintenance and the regulation of its efficacy during synapse formation and at mature NMJs (Rochon et al., 2001, Reddy et al., 2003, Darabid et al., 2013, Darabid et al., 2014, Ko, 2014), but very little is known about their activity during late stage of life.

3.1 Synapse Activity is altered at the old NMJ

In order to investigate glial-related changes in NMJ functions with age, we recorded short and long term synaptic plasticity following stimulation of the nerve by an electrical stimulation in adult and old animals. These forms of synaptic plasticity are known to be regulated by PSCs at the NMJ (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001; Todd et al., 2010)

We recorded short and long-term synaptic plasticity of adult and old mice NMJs induced by high frequency stimulation (HFS) at the LAL. The motor nerve was stimulated with a pattern of stimulation that mimicked endogenous activity of the LAL muscle (3 times 100Hz, for 5 s at 90 s intervals).

We first examined the alteration of synaptic depression induced by motor nerve stimulation. As shown in figure 1(A,C and I), at the adult NMJ (N=9 adult mice, n=9 adult NMJ), mean EPP amplitude during HFS was of $31\pm 2,4\%$, $27\pm 2,4\%$, and $27\pm 2,4\%$ of control for the first, second and third depression respectively. At the old NMJ (Figure 1 D, F and I), EPP amplitude was $27\pm 2,5\%$, $22\pm 2,1\%$ and $22\pm 2,7\%$ of control for the first, second and third depression respectively (Figure 1I; N=6 old mice, n=6 old NMJ; unpaired t-test, $p > 0.05$). Depression was not significantly different between the old and adult NMJ.

However, a major difference in the post-tetanic potentiation was observed between NMJs from adult and old mice. Indeed, NMJs from adult mice showed a larger potentiation as the EPP amplitude from NMJs of adult mice was $156\pm 9,1\%$, $165\pm 14,8\%$ and $153\pm 15,3$ of control for the first, second and third train of stimuli. At the old NMJ, HFS induced a potentiation of $121\pm 5,8\%$, $117\pm 8,0\%$ and $122,3\pm 4,3\%$ of control for the first, second and third HFS (Figure 1B, E, J; unpaired t-test, $p < 0.05$).

Similarly, we also observed differences in long-term plasticity between NMJs from adult and old mice (Figure 1A, D, K). Indeed, our results show that EPP amplitude at NMJs of old mice 30 minutes after HFS was $79\pm 6,0\%$ of control whereas EPP amplitude at NMJs from adult mice was of $94\pm 3,4\%$ of control (N=6 adult mice n=6 adult NMJ; N=4 old mice, n=4 old NMJ). These results are significantly different (unpaired t-test, $P < 0.05$).

As a whole, these data indicate that the mechanisms of synaptic depression appear unaltered in aging while the ability to potentiate synaptic efficacy appears altered. Since these synaptic plasticity events are known to be regulated by PSCs (Todd et al., 2010; Ko and Robitaille, 2014), we next focused our attention on the glial element at the NMJ.

3.2 Glial cell are able to detect properly synaptic activity at the old NMJ

Glial cells regulation of synaptic properties relies on their ability to detect and decode the level and pattern of synaptic activity (Robitaille, 1998; Todd et al., 2010) at the adult NMJ. Since then, they are able to modulate synaptic transmission. We compared intracellular Ca^{2+} changes in PSCs at NMJs of adult and old mice induced endogenous release of neurotransmitters since PSCs ability to detect and respond to synaptic activity is reflected by their calcium response (Rochon et al., 2001; Rousse et al., 2010; Darabid et al., 2013). As

shown in figure 2 (A, E) and consistent with the literature, each train of stimuli elicited a rise of intracellular Ca^{2+} in PSCs at NMJs of adult mice (N=17; PSCs n=33) with a mean amplitude of $7,8 \pm 1,3\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the first train, $3,4 \pm 0,6\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the second and $3,25 \pm 0,4\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the third one.

Knowing that quantal content of transmitter release is increased at NMJs of old rodents (Fahim, 1997) and that PSCs Ca^{2+} responses are dependent of the release of neurotransmitter (Rousse et al., 2010), one could predict that the Ca^{2+} responses elicited in PSCs by endogenous synaptic activity would be larger. On the other hand, since we observed an overall reduced synaptic plasticity, we could also expect PSCs to have smaller responses, since Bélair and colleagues (2010) showed that a lower synaptic efficacy induced smaller response from PSCs at the frog NMJ. However, the mean amplitude of Ca^{2+} responses in PSCs of NMJs from old mice (N=15; n=32) was $7,4 \pm 1,6\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the first train of stimuli, $3,7 \pm 0,5\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the second and $2,8 \pm 0,4\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the third one. Which are not significantly different responses from adult PSCs (Figure 2B, E; unpaired t-test $P > 0.05$).

We further analysed the kinetics of the Ca^{2+} responses since it is part of the decoding of synaptic transmission by PSCs and that it determines the modulation of synaptic transmission by PSCs (Todd et al., 2010; Ko and Robitaille, 2014). As for the amplitude of response, the duration of calcium increase between adult and old PSCs did not significantly differ (Figure 2E et 2F; unpaired t-test $P > 0.05$). The mean duration of the Ca^{2+} response in adult glial cells was $41,3 \pm 3,8\text{s}$ and $39,4 \pm 3,5\text{s}$ in old cells for the response of the first train of stimuli, $34,7 \pm 3,2\text{s}$ versus $36,2 \pm 3,0\text{s}$ for the train and $31,3 \pm 2,7\text{s}$ versus $29,7 \pm 1,8\text{s}$ for the third one (Figure 2F).

As a whole, these data indicate that PSCs maintained their ability to detect synaptic transmission during aging and that their properties appear unaltered.

3.3 Muscarinic contribution to PSCs activity is reduced at the old NMJ

We next tested the contribution of muscarinic receptors at PSCs of old NMJs owing to the cholinergic nature of synaptic transmission of the mouse NMJ and that PSCs respond to muscarinic agonists (Jahromi et al., 1992). Importantly, mAChR are known to maintain NMJ morphological integrity (Georgiou et al., 1999, Wright et al., 2009) and their contribution in PSCs activation differs at the young NMJ (Darabid et al., 2013) and in a mouse model of ALS (Arbour et al., 2015).

First, we applied the mAChRs agonist, muscarine to test for the presence of functional mAChRs on PSCs of adult and old mice. As shown in figure 3 (A, B, E and F), we found, that local application of muscarine induced a mean intracellular rise of Ca^{2+} in adult PSCs of $19 \pm 5,4\% \Delta\text{F}/\text{F}$ (N=5; n=13) and of $15 \pm 4,2\% \Delta\text{F}/\text{F}$ (N=6; n=15) in PSCs of NMJs of old mice. These responses were not statistically different from one another (unpaired t test $P > 0,5$), which indicate that muscarinic receptors are present and functional in PSCs in aged animals. We further confirmed the muscarinic nature of the effects by testing whether atropine ($5 \mu\text{M}$), a wide spectrum muscarinic antagonist, could block the muscarine-induced responses. As shown in figure 3 (C, D, E, F), local application of the muscarinic agonist did not induce any Ca^{2+} response from neither adult nor old PSCs, confirming the muscarinic nature of the responses. However, the presence of atropine did not alter the ability of ATP to activate the purinergic receptors as local application of ATP ($20 \mu\text{M}$) still induced Ca^{2+} responses in PSCs at NMJs of adult and old mice (figure 3C, D, E, F, $29,8 \pm 5,0\% \Delta\text{F}/\text{F}$ in adult and $23,83\% \Delta\text{F}/\text{F}$ in old mice)

We next tested the contribution of mAChRs to the PSCs activity induced by the release of endogenous neurotransmitters. We used atropine, which is known to block nerve-evoked Ca^{2+} responses of PSCs of mouse and frog NMJs (Jahromi et al., 1992; Rochon et al., 2001). We monitored Ca^{2+} responses elicited in PSCs of adult and old mice by motor nerve stimulation in presence of atropine (5 μM) bath applied for 40 minutes prior to the stimulation. As shown in figure 3E, the mean amplitude of adult PSCs response in presence of atropine was $2,5 \pm 0,3\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the train of stimulation, $2,2 \pm 0,3\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ and $1,6 \pm 0,2\%$ of $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the second and third respectively (N=10, n=23). These responses were significantly lower than those obtained in absence of atropine (Figure 3E; unpaired t-test $P > 0.05$). This results indicate that mAChR contribute to 68,1% of PSCs global activity at the adult NMJ and are in accordance with what shown in a previous study (Rochon et al., 2001).

The same approach was then performed on PSCs of NMJs from old mice. The mean amplitude of Ca^{2+} response of PSCs at old NMJs was $6,5 \pm 1,4\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the first train of stimulation, $2,8 \pm 0,6\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the second and $2,7 \pm 0,7\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for the third one (Figure 3D; N=8, n=16). These responses were not significantly different from the ones from control conditions (Figure 3F; unpaired t-test $P > 0.05$). These results indicate that mAChRs contribution in is limited in PSCs of NMJs of old mice.

These data indicate that PSCs ability to detect and respond to synaptic activity at NMJs of old mice primarily relies most likely on purinergic receptors rather than a balance between muscarinic and purinergic signaling in the adult.

3.4 NMJ morphology at the old LAL muscle is erratic and indicates a functional disorder

Since PSCs are involved in the stability of the NMJ structure and its repair, particularly via muscarinic receptor activation (Ko and Robitaille, 2014), we next analysed NMJ morphological organisation, considering all three components of the synapse. Indeed, although number of thorough studies have already characterized the presynaptic and postsynaptic organisation of NMJs of old mice (Valdez et al., 2010), PSCs morphology and organisation remain ill defined. In particular, PSCs are known to extend sprouting extension that serve as bridges to guide nerve terminal processes towards denervated endplates (Ko and Robitaille, 2014). This phenotype has been well characterized at the adult NMJ during Wallerian degeneration (Kang and Lichtman, 2013, Magill et al., 2007).

At the adult NMJ (3 months old; N=4 n=37), less than 7% of junctions showed an impaired concordance of the presynaptic terminal axon with the AChR on the postsynaptic side. As shown in Figure 4, the percentage of junction with fragmented islands of AChR, a sign of partial denervation was 18,7 %. Finally, the number of PSCs per NMJ was determined by counting the number of DAPI profiles of S100-positive cells. We found that there was a mean number of PSCs per adult NMJ of 3.0 ± 0.2 .

As expected, old NMJs (20-24 months old; N=7 n=79) showed numerous signs of deterioration. Signs of partial denervation defined as synaptic endplate with portion of postsynaptic AChR not covered with terminal axon was observed in $76 \pm 6,9\%$ of NMJs (Figure 4). Surprisingly, no NMJ at the old LAL muscle were found totally denervated. In old mice, 86% of NMJs showed signs of fragmented postsynaptic AChR at the endplate. The number of PSCs at old NMJ was no different from adult NMJ, i.e. $3,0 \pm 0,3$ cells per synapse. Glial coverage of the NMJ through PSC processes remained the same between adult and old mice. However, the

number of glial bridges at the old muscle was enhanced. Indeed, $37\pm 5\%$ of NMJs extended processes at the old LAL whereas only $18\pm 6\%$ are doing so in adult mice. These morphological results tend to show that NMJs at the old LAL muscle are not healthy which once again is in accordance with our functional findings.

4. Discussion:

We showed that synaptic functions at the NMJ, including glial cell properties, undergo modifications during aging. Although alteration of the NMJ has been characterized in a number of studies focusing on the pre- and postsynaptic elements. This study is the first showing an alteration of the glial member of the old neuromuscular synapse, the PSCs. Here we show that PSCs maintain their ability to detect synaptic activity albeit through a different balance of receptor activation that could have fundamental implications for the NMJ functions in aging.

4.1 Mechanisms responsible for the increase of synaptic transmission are altered at the aged synapse

Although synaptic properties of aged NMJs have been studied (Fahim, 1997), no clear observations had been made on the different forms of plasticity at the NMJ. Here we show that synaptic function and in particular synaptic plasticity is altered at the aged synapse whereby all potentiating forms of plasticity are reduced or absent at aged mice. The mechanisms underlying this plasticity are still unclear but several studies have pointed to a possible Ca^{2+} -dependant increase in the number of vesicles released. When presynaptic activity persists at high levels for several seconds, it induces a prolonged augmentation in intracellular Ca^{2+} concentration (Delaney et al., 1989). This residual Ca^{2+} causes a higher number of quanta being released for each action potential following the train of stimulation. This accumulation of Ca^{2+} could arise from mitochondria and endoplasmic reticulum previously loaded by the conditioning activity (Tang and Zucker, 1997, Narita et al., 2000). At the old presynaptic terminal, several studies report an alteration of mitochondrial functions and their altered Ca^{2+}

buffering (Lin and Beal, 2006, Reddy, 2008, Satrustegui et al., 1996). Another possibility that could explain this altered enhancement of synaptic transmission could be an impairment of the active zone during aging. It has been shown that the density of active zone at the aged is reduced and that the structure of active zones is altered (Chen et al., 2012, Nishimune et al., 2012). Indeed, the proper function of P/Q type Ca^{2+} channels requires the interaction of the β -subunit of the channel with Bassoon protein at the active zone. Yet, Bassoon expression is attenuated at the aged NMJ (Nishimune et al., 2012). Furthermore, presynaptic terminals show other signs of age-related abnormalities such as reduced number of vesicles, swelling and accumulation of reactive oxygen species, which could all modify synaptic transmission.

Our work raises another possible mechanism by which synaptic efficacy of NMJs in aging may be altered: the contribution of glial cells as a modulator of synaptic transmission. The proximity of the processes of these cells with the synapse makes them a good candidate for synapse regulation.

4.2 Glial cells activation changes with aging

It is now established that modulation of synaptic transmission at the adult synapse involves the activation of several glial receptors (Araque et al., 2014, Araque et al., 1999, Bezzi et al., 1999, Darabid et al., 2013, Robitaille, 1998, Todd et al., 2010). This modulation often occurs in a Ca^{2+} -dependent manner that triggers a glial mechanisms leading to the neuronal modulation. Here we show that the excitability of PSCs of aged mice appears unaltered as indicated by the same characteristics of the overall Ca^{2+} changes in adults and aged NMJs.

However, the muscarinic contribution to glial activation is down regulated at old NMJs. This observation may have an important implication for the NMJ integrity during aging. Indeed, it is known that PSCs play a major role in the re-innervation of the NMJ after injury (Son and Thompson, 1995) and that many properties required for PSCs involved are under the control of the muscarinic receptor cascades of events (Georgiou et al., 1999, Triolo et al., 2006, Wright et al., 2009, Ko, 2014). In particular, PSCs at a denervated endplate elaborate processes toward an innervated NMJ from which the presynaptic terminal will follow back the glial process towards the denervated endplate. Interestingly and consistent with the role of muscarinic receptor control of PSCs sprouting (Wright et al., 2009), we observed that a larger propensity of PSCs elaborates bridges in old than in adult mice. This strongly suggests that PSCs have entered in a repair mode to facilitate NMJ repair of alterations that occur during aging (Ko and Robitaille, 2014). This is further supported by the observation that muscarinic receptors are not involved in regulation of PSCs activity during the final stage of synaptic competition (Darabid et al., 2013). Interestingly, this is the exact opposite scenario to the one observed in an ALS model, whereby the muscarinic contribution to PSCs excitability is enhanced in the disease and where the propensity for PSCs to facilitate NMJ re-innervation is faulted (Arbour et al., 2015).

4.3 Possible glial mechanisms underlying the altered NMJ functions in aging

There are a number of alternative glial-dependent mechanisms that can explain the properties of NMJs of old mice. First, considering the state of PSCs, our data suggest that they are in a mode consistent with structural plasticity and repair owing to the reduced muscarinic contribution (Darabid et al., 2013; Ko and Robitaille, 2014). This is known to have direct

effect on their ability to regulate synaptic transmission at the NMJ and, as such could be a first direct contribution to the altered synaptic properties observed in our study. Since we know that PSCs' functions are closely related to synaptic transmission (Georgiou, Robitaille et al. 1994; Rousse et al., 2010) a number of glial factors might be involved. For instance, previous studies at the NMJ and in the CNS have shown that the glial-mediated modulation of synaptic transmission occurred preferentially through the activation of purinergic receptors (Todd, Darabid et al. 2010, Panatier, Vallee et al. 2011). At the NMJ, ATP released by the surrounding PSC is degraded into adenosine, which in turn activates A1 or A2 receptors. What is the contribution of purinergic receptors and at what point they can modulate synaptic transmission at the old NMJ is an important avenue to follow.

Another potential candidate are the neurotrophins. Indeed, the Interactions among presynaptic motor neuron, postsynaptic muscle, and PSCs play critical role in growth, maintenance, and survival of synapses. The exchange of trophic factors has been implicated in pre- and postsynaptic development as well as preserving neuronal and synaptic plasticity at the NMJ and Neurotrophins are known to participate in activity-induced modification of synaptic transmission (Schinder et al., 2000, Schinder and Poo, 2000). Recent studies indicate that a variety of trophic factors such as brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4 (NT-4), cytokines such as glial-derived neurotrophic factor (GDNF) and ciliary neurotrophin factor (CNTF), and other growth factors such as insulin-like growth factor (IGF-1 and IGF-II) and fibroblast growth factors (FGF) all play a modulatory role in neuromuscular system to a different extent during aging (Belluardo et al., 2001, Gonzalez et al., 1999, Guma et al., 2010, Huang and Reichardt, 2001, Loeb et al., 2002, Payne et al., 2007, Payne et al., 2006).

In conclusion, the data presented in this work unravel the changes that occur in glial cells at the NMJ and raise a number of important issues that could be important to understand the changes in NMJ functions during aging. This could even provide additional therapeutic targets to delay the occurrence of gradual muscle denervation during aging and perhaps also have a positive impact in the development of sarcopenia.

Acknowledgements:

This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health research to RR (MOP-14137 and MOP-111070), a Leader Opportunity Fund from the Canadian Foundation of Innovation and an infrastructure grant from Fonds Recherche Quebec-Santé (FRQ-S) to the Groupe de recherche sur le Système Nerveux Central. The authors declare no competing financial interests.

References:

Araque, A., G. Carmignoto, P. G. Haydon, S. H. Oliet, R. Robitaille and A. Volterra (2014). "Gliotransmitters travel in time and space." Neuron **81**(4): 728-739.

Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri and P. G. Haydon (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." Trends Neurosci **22**(5): 208-215.

Arbour, A., Tremblay, E., Martineau, E., Julien, J.P. and Robitaille, R. (2015) Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS mouse model. Journal of Neuroscience, 35(2):688 –706.

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

Belair, E. L., J. Vallee and R. Robitaille (2010). "In vivo long-term synaptic plasticity of glial cells." J Physiol **588**(Pt 7): 1039-1056.

Belluardo, N., H. Westerblad, G. Mudo, A. Casabona, J. Bruton, G. Caniglia, O. Pastoris, F. Grassi and C. F. Ibanez (2001). "Neuromuscular junction disassembly and muscle fatigue in mice lacking neurotrophin-4." Mol Cell Neurosci **18**(1): 56-67.

Bezzi, P., S. Vesce, P. Panzarasa and A. Volterra (1999). "Astrocytes as active participants of glutamatergic function and regulators of its homeostasis." Adv Exp Med Biol **468**: 69-80.

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

Cederholm T and Morley JE (2015) Sarcopenia: the new definitions. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 18(1):1-4.

Chen, J., T. Mizushige and H. Nishimune (2012). "Active zone density is conserved during synaptic growth but impaired in aged mice." J Comp Neurol **520**(2): 434-452.

Darabid, H., D. Arbour and R. Robitaille (2013). "Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction." J Neurosci **33**(4): 1297-1313.

Darabid, H., Perez, A. and Robitaille, R. (2014) Neuromuscular synaptogenesis: Coordinating several partners with multiple functions. *Nature Reviews Neuroscience*, 15, 703 – 718.

Delaney, K. R., R. S. Zucker and D. W. Tank (1989). "Calcium in motor nerve terminals associated with posttetanic potentiation." J Neurosci **9**(10): 3558-3567.

Erzen, I., E. Cvetko, S. Obreza and D. Angaut-Petit (2000). "Fiber types in the mouse levator auris longus muscle: a convenient preparation to study muscle and nerve plasticity." J Neurosci Res **59**(5): 692-697.

Fahim, M. A. (1997). "Endurance exercise modulates neuromuscular junction of C57BL/6NNia aging mice." J Appl Physiol (1985) **83**(1): 59-66.

Georgiou, J., R. Robitaille and M. P. Charlton (1999). "Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia." J Neurosci **19**(10): 3836-3846.

Georgiou, J., R. Robitaille, W. S. Trimble and M. P. Charlton (1994). "Synaptic regulation of glial protein expression in vivo." Neuron **12**(2): 443-455.

Gonzalez, M., F. P. Ruggiero, Q. Chang, Y. J. Shi, M. M. Rich, S. Kraner and R. J. Balice-Gordon (1999). "Disruption of Trkb-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions." Neuron **24**(3): 567-583.

Gonzalez-Freire M, de Cabo R, Studenski SA, Ferrucci L (2014) The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle. *Front Aging Neurosci*. 2014 Aug 11;6:208. doi: 10.3389/fnagi.2014.00208. eCollection 2014.

Guma, A., V. Martinez-Redondo, I. Lopez-Soldado, C. Canto and A. Zorzano (2010). "Emerging role of neuregulin as a modulator of muscle metabolism." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**(4): E742-750.

Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." *Annu Rev Neurosci* **24**: 677-736.

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

Kang, H. and J. W. Lichtman (2013). "Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young adult and aged animals." *J Neurosci* **33**(50): 19480-19491.

Kang, H., L. Tian, M. Mikesch, J. W. Lichtman and W. J. Thompson (2014). "Terminal Schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury." *J Neurosci* **34**(18): 6323-6333.

Ko, C.-P., Robitaille, R (2014) Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular synapse: adaptable, multitasking glial cells. *Cold Spring Harbor Perspectives, Barres, Freeman & Stevens editors*.

Larsson, L., G. Grimby and J. Karlsson (1979). "Muscle strength and speed of movement in relation to age and muscle morphology." *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **46**(3): 451-456.

Li Y, Lee Yi and Thompson WJ (2011). Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse. *J Neurosci*. 2011 Oct 19;31(42):14910-9.

Li Y and Thompson WJ (2011). Nerve terminal growth remodels neuromuscular synapses in mice following regeneration of the postsynaptic muscle fiber. *J Neurosci*. 31(37):13191-203.

Lin, M. T. and M. F. Beal (2006). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Nature* **443**(7113): 787-795.

Loeb, J. A., A. Hmadcha, G. D. Fischbach, S. J. Land and V. L. Zakarian (2002). "Neuregulin expression at neuromuscular synapses is modulated by synaptic activity and neurotrophic factors." *J Neurosci* **22**(6): 2206-2214.

Narita, K., T. Akita, J. Hachisuka, S. Huang, K. Ochi and K. Kuba (2000). "Functional coupling of Ca(2+) channels to ryanodine receptors at presynaptic terminals. Amplification of exocytosis and plasticity." *J Gen Physiol* **115**(4): 519-532.

Nishimune, H., T. Numata, J. Chen, Y. Aoki, Y. Wang, M. P. Starr, Y. Mori and J. A. Stanford (2012). "Active zone protein Bassoon co-localizes with presynaptic calcium channel, modifies channel function, and recovers from aging related loss by exercise." *PLoS One* **7**(6): e38029.

Panatier, A., J. Vallee, M. Haber, K. K. Murai, J. C. Lacaille and R. Robitaille (2011). "Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses." *Cell* **146**(5): 785-798.

Payne, A. M., M. L. Messi, Z. Zheng and O. Delbono (2007). "Motor neuron targeting of IGF-1 attenuates age-related external Ca²⁺-dependent skeletal muscle contraction in senescent mice." *Exp Gerontol* **42**(4): 309-319.

Payne, A. M., Z. Zheng, M. L. Messi, C. E. Milligan, E. Gonzalez and O. Delbono (2006). "Motor neurone targeting of IGF-1 prevents specific force decline in ageing mouse muscle." J Physiol **570**(Pt 2): 283-294.

Pinard, A. and R. Robitaille (2008). "Nitric oxide dependence of glutamate-mediated modulation at a vertebrate neuromuscular junction." Eur J Neurosci **28**(3): 577-587.

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

Reddy, P. H. (2008). "Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases." Neuromolecular Med **10**(4): 291-315.

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

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

Rochon, D., I. Rouse and R. Robitaille (2001). "Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction." J Neurosci **21**(11): 3819-3829.

Rouse, I., A. St-Amour, H. Darabid and R. Robitaille (2010). "Synapse-glia interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties." Neuroscience **167**(3): 621-632.

Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, Solbak NM, Turnbull DM and Hepple RT (2012) Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. PLoS One. e29082. doi: 10.1371/journal.pone.0029082

Satrustegui, J., M. Villalba, R. Pereira, E. Bogonez and A. Martinez-Serrano (1996). "Cytosolic and mitochondrial calcium in synaptosomes during aging." Life Sci **59**(5-6): 429-434.

Schinder, A. F., B. Berninger and M. Poo (2000). "Postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation." Neuron **25**(1): 151-163.

Schinder, A. F. and M. Poo (2000). "The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity." Trends Neurosci **23**(12): 639-645.

Son, Y. J. and W. J. Thompson (1995). "Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons." Neuron **14**(1): 125-132.

Tang, Y. and R. S. Zucker (1997). "Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission." Neuron **18**(3): 483-491.

Todd, K. J., H. Darabid and R. Robitaille (2010). "Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction." J Neurosci **30**(35): 11870-11882.

Triolo, D., G. Dina, I. Lorenzetti, M. Malaguti, P. Morana, U. Del Carro, G. Comi, A. Messing, A. Quattrini and S. C. Previtali (2006). "Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage." J Cell Sci **119**(Pt 19): 3981-3993.

Valdez G1, Tapia JC, Kang H, Clemenson GD Jr, Gage FH, Lichtman JW and Sanes JR (2010) Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(33):14863-8.

Valdez G1, Tapia JC, Lichtman JW, Fox MA and Sanes JR (2012) Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. PLoS One 7(4):e34640. doi: 10.1371/journal.pone.0034640

Wright, M. C., S. Potluri, X. Wang, E. Dentcheva, D. Gautam, A. Tessler, J. Wess, M. M. Rich and Y. J. Son (2009). "Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses." J Neurosci **29**(47): 14942-14955.

Figure legends:

Figure 1: *Reduced synaptic plasticity at aged NMJs.*

Different forms of synaptic plasticity at adult (left) and aged NMJs (right). Recordings from adult NMJs illustrating: A) Relative changes of EPP amplitude before, during and after the three trains of stimuli. B) Relative changes of EPP amplitude during the post-tetanic potentiation, C) during the synaptic depression. G) Representative EPPs illustrating each time period of the recording sequence. Recordings from aged NMJs illustrating: D) Relative changes of EPP amplitude before, during and after the three trains of stimuli. E) Relative changes of EPP amplitude during the post-tetanic potentiation, F) during the synaptic depression. H) Representative EPPs illustrating each time period of the recording sequence. I) Histogram comparing the level of post-tetanic potentiation in adult and old NMJs. Note the significant differences for the first two trains of stimulation. J) Histogram comparing the level of synaptic depression in adult and old NMJs. No difference was observed between adult and old NMJs. K) Histogram comparing the level of long-term plasticity in adult and old NMJs which was significantly smaller at the NMJs from old mice.

Figure 2: *PSCs' ability to detect synaptic transmission remains at aged NMJs.*

Representative Ca^{2+} responses elicited by the first (1), second (2) and third train of stimulation of a PSC at an adult NMJ (A) and an old NMJ (B). False colour confocal images of the same cell as in A represented before (base) at the peak of the response elicited by each train of stimulation and after recovery for the same adult (C) and old NMJ (D) as in A and C respectively. E) Histogram comparing the amplitude of PSCs Ca^{2+} responses elicited by the

three trains of stimulation. F) Histogram comparing the duration of PSCs Ca^{2+} responses elicited by the three trains of stimulation.

Figure 3: *Reduced muscarinic excitability of PSCs in aging.*

Average (solid line) and SEM (dotted lines) of PSCs Ca^{2+} responses elicited by the three train of stimulation (endogenous induced calcium) and by local application of agonists (muscarine or ATP) for NMJs of adult (A) and aged (B) mice. C – D) Similar representation but in the presence of the muscarinic receptor antagonist atropine. Histograms depicting the amplitude of Ca^{2+} response in control and in the presence of the muscarinic receptor antagonist for NMJs from adult (E) and aged mice (F).

Figure 4: *Altered NMJ structure and reorganisation of the glial coverage at NMJs in aging.*

Top: Confocal images of two different NMJs from two different adult mice. Three months old LAL NMJs were labeled for the nerve terminals (NT) (SV2 and NF-M, green), PSC (S100b, cyan), postsynaptic nAChRs (a-bungarotoxin, red) and nuclei with DAPI (purple). Note the similar staining patterns between each animal group. Middle: Confocal images of two different NMJs from two different old mice. Twenty four months old LAL NMJs were labeled for the nerve terminals (NT) (SV2 and NF-M, green), PSC (S100b, cyan), postsynaptic nAChRs (a-bungarotoxin, red) and nuclei with DAPI (purple). Note the presence of nAChRs islands (arrow heads), glial sprouting (arrow) and partial denervation (asterisk). Bottom: Histograms illustrating the ratio of NMJ sprouting, number of S100-positive cells, the fragmentation of AChR clustering and the level of partial denervation. Scale bar 10 mm.

Figure 1

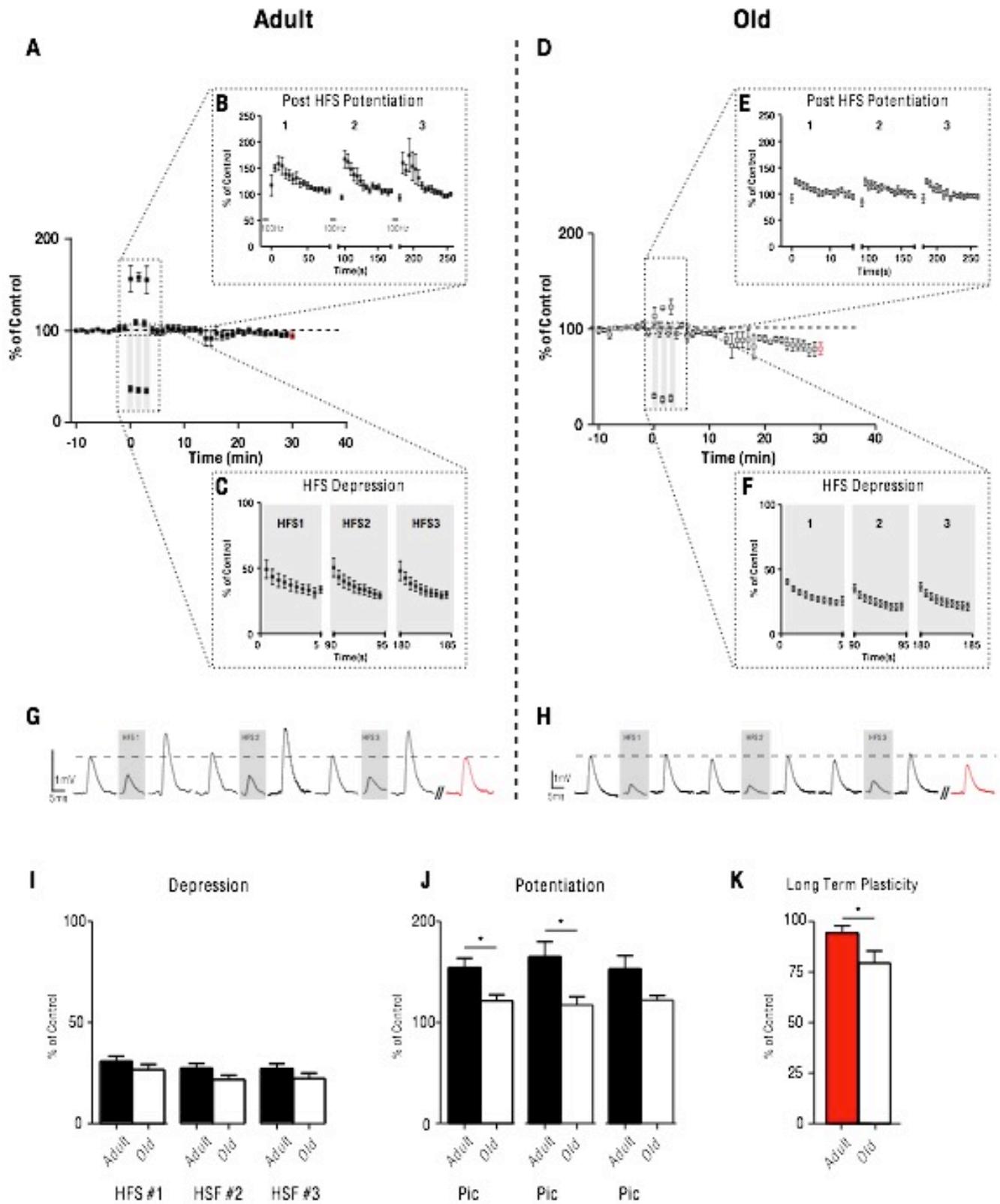


Figure 2

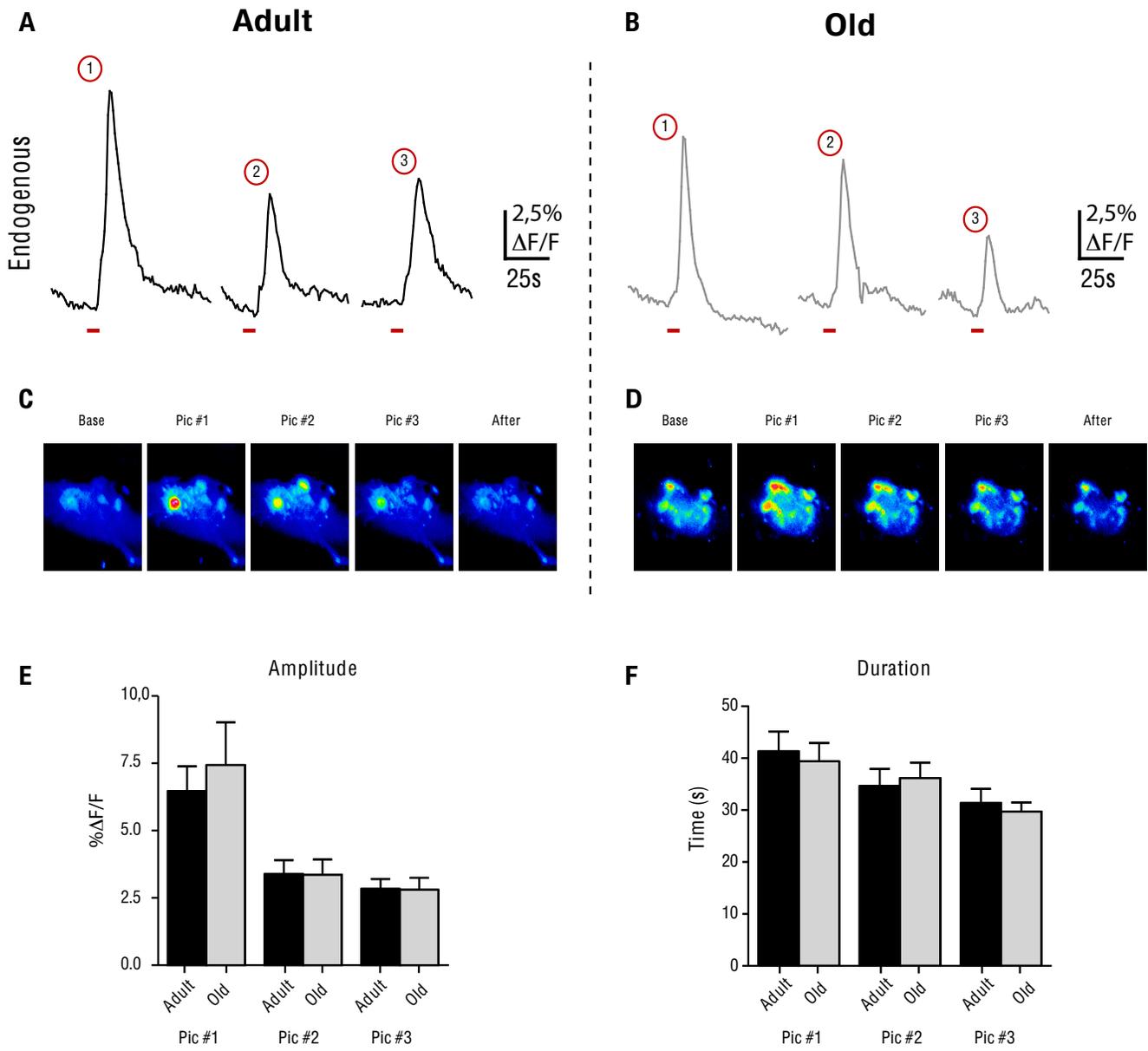


Figure 3

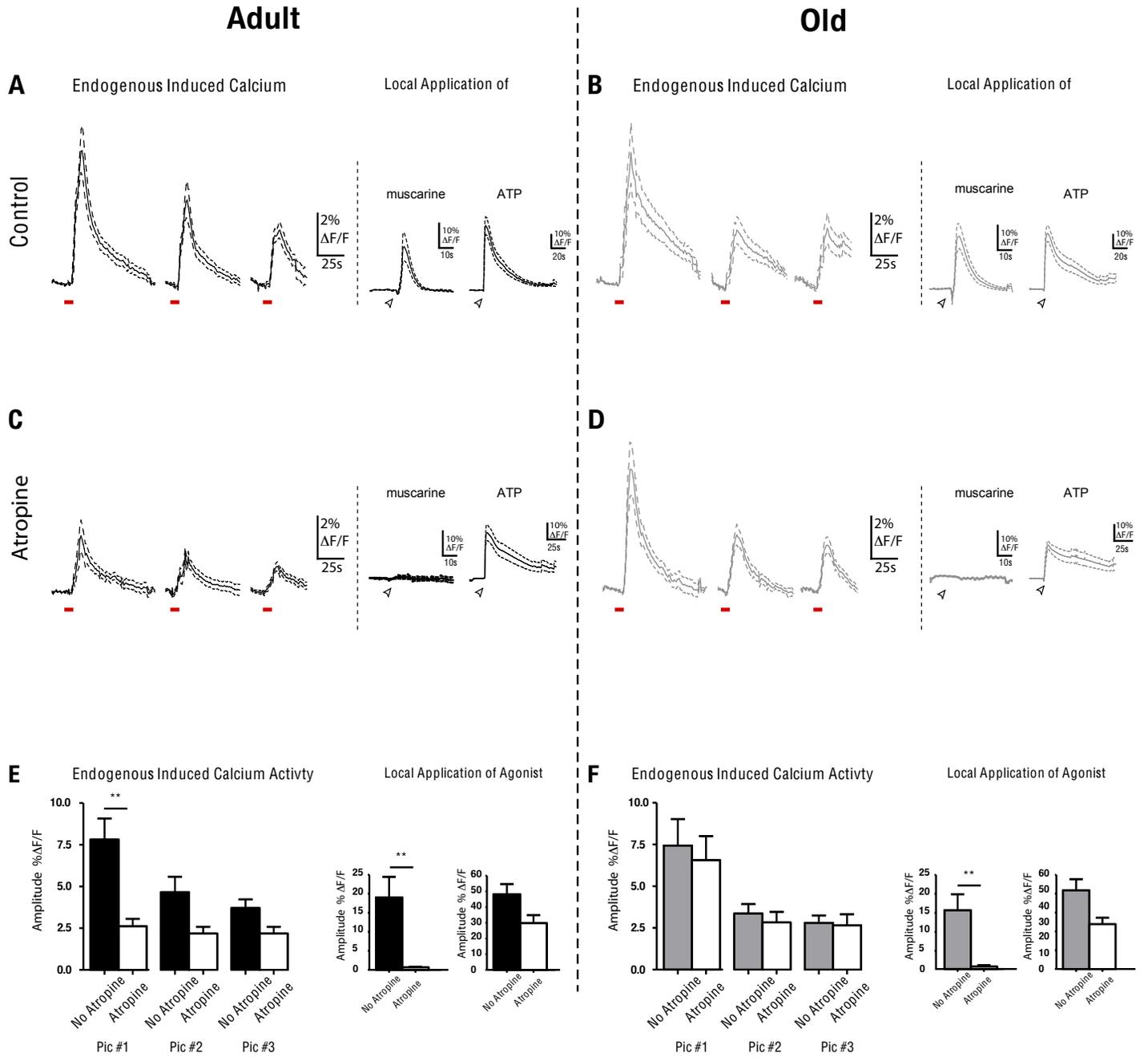
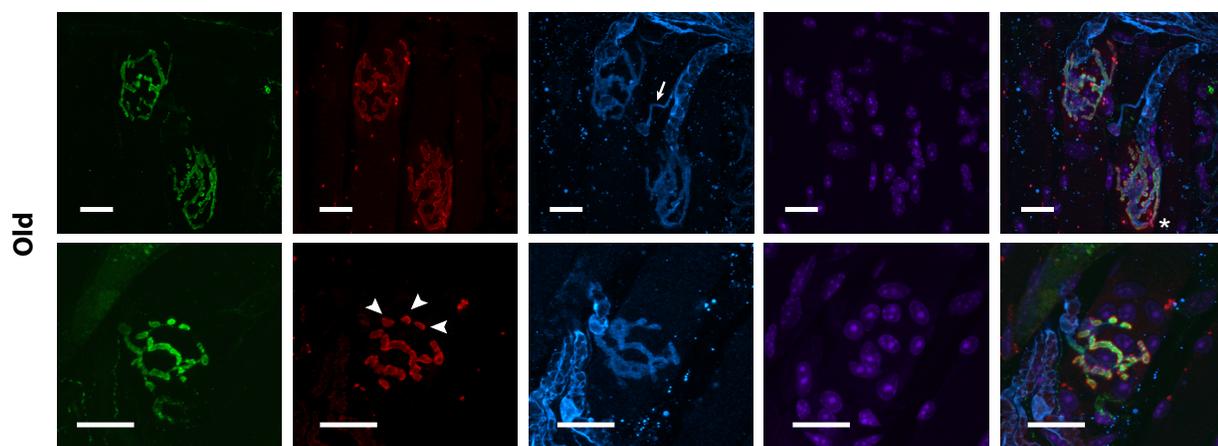
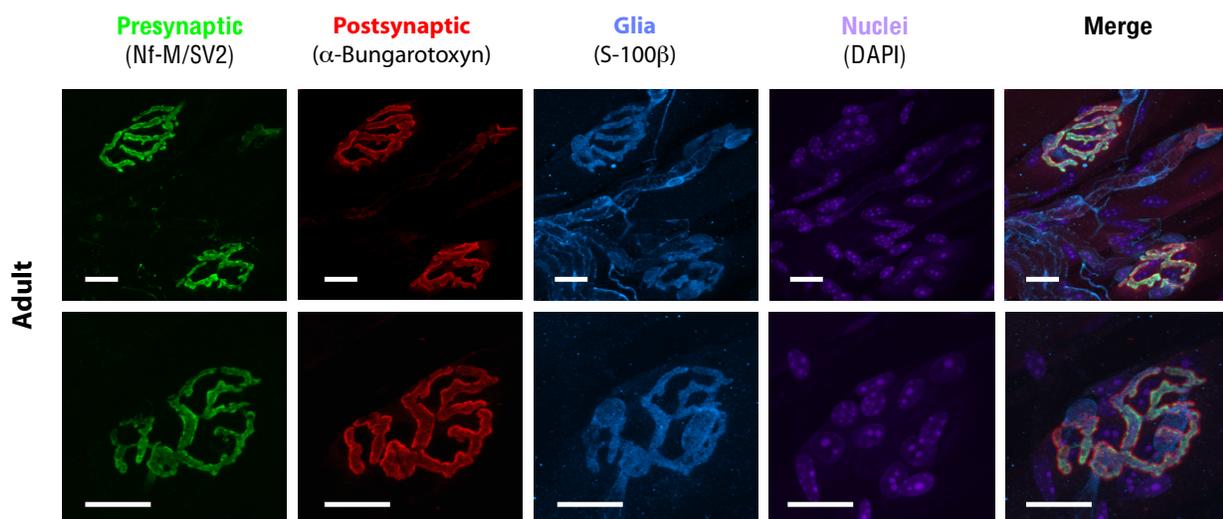
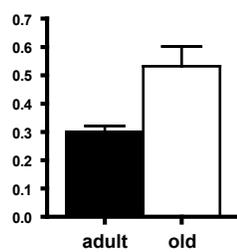


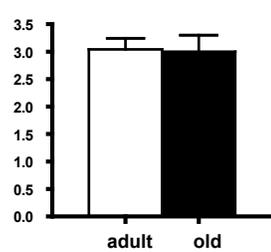
Figure 4



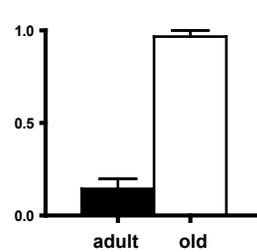
ratio of NMJ with S-100 sprouting



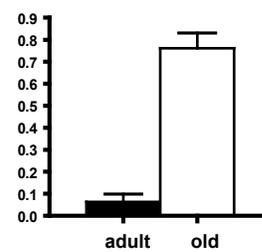
nbr of cells expressing S-100



Fragmentation of AchR



Partial Denervation



Discussion :

Dans cette étude, nous avons montré que la jonction neuromusculaire de souris âgées est sujette à des modifications fonctionnelles aussi bien au niveau de la transmission synaptique que des cellules gliales. Nous avons en effet montré que la plasticité synaptique potentialisatrice était réduite à la jonction neuromusculaire âgée. Nous avons aussi montré que la contribution des récepteurs muscariniques à la réponse calcique des cellules gliales diminue aux synapses âgées. D'autre part, les changements morphologiques et structurels concordent avec les changements fonctionnels synaptiques. La jonction neuromusculaire étant une synapse tripartite, les changements survenant à l'un des éléments de la synapse sont susceptibles de modifier le fonctionnement de l'ensemble de la synapse, il est donc important d'étudier les changements liés au vieillissement dans son ensemble. Dans cette dernière partie, nous discuterons des mécanismes ayant une potentielle contribution aux changements observés dans cette étude et en particulier du rôle que pourraient avoir les cellules gliales lors du vieillissement normal de la jonction neuromusculaire.

I- Certains mécanismes de la plasticité synaptique sont altérés à la jonction neuromusculaire de souris âgées

Comme nous le savons, la plasticité de la transmission synaptique permet à la jonction neuromusculaire de s'adapter à l'activité de la synapse et dépend de plusieurs facteurs. On peut distinguer plusieurs formes de plasticité synaptique que l'on sépare en deux catégories : la plasticité à court terme et la plasticité à long terme. Dans le cas de notre étude, on observe trois types de plasticités. La première est une plasticité à court terme se manifestant par une

dépression de la réponse synaptique lors de la stimulation à haute fréquence. La deuxième, que l'on nomme dans la littérature « augmentation », est comme son nom l'indique, une augmentation de l'amplitude des potentiels de plaque motrice dans les secondes suivant la stimulation. La dernière est une plasticité à long terme se manifestant par une dépression de la transmission synaptique.

1.1 Mécanisme de plasticité synaptique à court terme

1.1.1- La dépression

La dépression à court terme se caractérise par une diminution de l'amplitude du potentiel de plaque motrice durant la stimulation à haute fréquence. Comme nous l'avons vu, elle est en partie due à une déplétion du nombre de vésicules synaptiques présente dans la terminaison axonale.

Dans notre étude, on remarque que la dépression durant la stimulation à haute fréquence atteint un plateau. Comme nous pouvons aussi le remarquer, nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence entre la dépression de la synapse adulte et de la synapse âgée. Dans l'étude du professeur Robitaille de 1998, il fut montré que la dépression que l'on observe lors de la stimulation téτανique était en grande partie due à l'activation des protéines G gliales, mais qu'une partie de cette dépression pouvait provenir du neurone moteur. Ces résultats furent montrés à la NMJ de grenouille par le fait que la dépression était fortement réduite lors du blocage spécifique des protéines G gliales par un antagoniste (GDPβS) (Robitaille, 1998). Nos résultats montrent que l'activité calcique des CSP lors de l'application locale d'agoniste témoigne du bon fonctionnement des protéines G gliales aussi bien à la synapse adulte qu'à la

synapse âgée. En effet, nous n'observons pas de différence dans la durée ainsi que dans l'amplitude des réponses calciques des CSP âgées, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence entre nos deux groupes. Afin de s'assurer que cette absence de différence est bien d'origine gliale, il pourrait être intéressant d'étudier l'étendue de l'implication des CSP lors de la plasticité à court terme en bloquant spécifiquement leur fonctionnement à l'aide de technique telle que l'électroporation en cellule unique. Il serait ainsi possible de déterminer la contribution des CSP à la synapse d'un mammifère lors du vieillissement en introduisant spécifiquement un chélateur calcique ou un antagoniste des protéines G analogue à GDPβS.

Une partie de la dépression lors d'un train de stimulation provient de la déplétion du stock de vésicules présent dans la terminaison axonale. L'absence de différence entre la souris adulte et la souris âgée porterait à croire qu'il n'y aurait pas de différence entre le nombre de vésicules à la synapse adulte et la synapse âgée. Pourtant plusieurs études à la jonction neuromusculaire de souris ont montré que le nombre de vésicules par terminaisons nerveuses (Wang et al., 2011, Banker et al., 1983) ainsi que la densité de zones actives auxquels peuvent être encrées des vésicules diminuaient avec l'âge (Chen et al., 2012). Ces observations devraient mener à une dépression plus importante à la synapse âgée. Une explication à cette absence de différence que l'on observe dans notre étude pourrait venir du fait que le type de fibres musculaires influence la sévérité de la dépression. Afin de pourvoir le nombre de vésicules nécessaire à une activité prolongée, il a été rapporté que le recyclage des vésicules synaptiques dans les unités motrices de type I et IIa est plus efficace que dans les unités motrices de type IIb (Mantilla et al., 2004, Rowley et al., 2007). Sachant que les muscles âgés sont composés majoritairement de fibres IIa contrairement aux muscles adultes composés de fibre IIb, cela pourrait expliquer l'absence de différences dans la dépression que l'on observe

durant la stimulation à haute fréquence (Valdez et al., 2012). Le changement de type de fibres vers une machinerie plus efficace au recyclage des vésicules synaptiques pourrait compenser la perte du nombre de vésicule et de zones actives. Néanmoins, les raisons de cette absence de différences entre les dépressions adultes et âgées ne sont pas claires et il serait intéressant d'investiguer de manière plus approfondie l'effet de l'âge sur la vitesse de recyclage des vésicules synaptiques. Certaines protéines telles que Munc-13 et RIM sont directement impliquées dans le recyclage de vésicules lors de la stimulation tétranique. Il pourrait être intéressant de vérifier le fonctionnement ou de quantifier ces protéines lors du vieillissement.

1.1.2. L'augmentation et la potentialisation

Les stimulations répétées pendant la stimulation à haute fréquence ouvrent de façon prolongée les canaux ioniques dépendant du voltage situés au niveau de la terminaison synaptique. Une théorie expliquant l'augmentation de la transmission synaptique lors de la potentialisation à court terme semble provenir de la présence d'ions calciums résiduels dans la terminaison synaptique suite à une activité antérieure intense. La régulation de ces ions calcium intracellulaire est en grande partie effectuée par les mitochondries présentes en abondance dans le bouton présynaptique ainsi que de complexes protéiques tels que la calmoduline et CaMK II (Zucker and Regehr, 2002).

Dans notre étude, nous remarquons que la potentialisation de la transmission synaptique à la synapse âgée est moins importante que la potentialisation observée à la synapse adulte. Si l'on se base sur la théorie du calcium résiduel, cela veut dire que la présence de calcium dans la synapse adulte est plus importante qu'à la synapse âgée. Cela est

contradictoire avec le fait que les mitochondries de la jonction neuromusculaire adulte contrôlent de façon plus efficace les ions calciums intracellulaires. À la jonction neuromusculaire, il a été montré que la terminaison présynaptique de rat âgé est moins efficace dans le nettoyage des ions calciums suite à une dépolarisation (Smith, 1988). Il a aussi été rapporté un dysfonctionnement de l'activité mitochondriale à la jonction neuromusculaire âgée. Ces changements mitochondriaux pourraient être à la base du dérèglement de l'activité calcique et sont une raison majeure de l'augmentation de la production de radicaux libres lors du vieillissement (Garcia et al., 2013). Une cible potentielle du dysfonctionnement de la régulation des ions calciums pourrait être due à la pompe Ca^{2+} -ATPase située sur la membrane mitochondriale. Cette pompe est responsable du gradient chimique permettant le fonctionnement des mitochondries et est importante pour l'induction de la plasticité synaptique chez l'adulte (Giorgi et al., 2012). Son fonctionnement lors du vieillissement n'est pas connue, mais mérite que l'on y porte plus d'attention. Dans l'hippocampe, ces changements dans la concentration intracellulaire des ions calciums mènent à des modifications de la plasticité synaptique chez les souris âgées (Thibault et al., 2001).

Le vieillissement s'accompagne d'une augmentation du stress oxydatif. L'exposition de la jonction neuromusculaire de grenouille à certains dérivés oxydatifs tels que le peroxyde d'oxygène et F^{2+} prévient la relâche de neurotransmetteurs spontanée et évoquée. Des trois protéines du complexe SNARE, synaptobrevine, syntaxyne et SNAP-25, la dernière est la plus sensible à la présence de radicaux libres. L'exposition au peroxyde d'oxygène empêche la formation du complexe nécessaire à la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique (Giniatullin et al., 2006). Toutes ces raisons font qu'il est possible que les mécanismes de libération de vésicules synaptiques soient altérés à la synapse âgée.

Enfin, nous pouvons souligner que le contenu quantique de la synapse âgée est plus important (Kelly and Robbins, 1986). En effet, l'amplitude des potentiels de plaques motrices mesurée dans le EDL, un autre muscle à contraction rapide, est plus élevée à la synapse âgée qu'à la synapse adulte. Plus une synapse est déjà forte (contenu quantique important), plus il est difficile d'augmenter davantage son efficacité synaptique. Les raisons de cette augmentation du contenu quantique à la jonction neuromusculaire âgée sont peu connues, mais il s'agirait d'un mécanisme compensatoire à la perte de vésicules synaptiques. On observe par exemple une augmentation de l'expression de l'acétylcholine transférase à la synapse de souris âgées (Washio et al., 1987). La protéine d'échafaudage, Bassoon, importante pour son interaction avec les canaux calciques dépendant du voltage, est d'ailleurs moins exprimée aux synapses de souris âgées (Nishimune et al., 2012). Toutes ces observations sont en faveur d'une détérioration du mécanisme de relâche de vésicules synaptiques.

1. 2. La plasticité à long terme

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que l'efficacité de la transmission synaptique à long terme est aussi en déclin chez la souris âgée. Peu de mécanismes ont été décrits afin d'expliquer la plasticité synaptique à long terme à la jonction neuromusculaire, et ceux mentionnés dans la littérature impliquent les cellules gliales comme des membres actifs de la modulation de la transmission synaptique. Comme nous l'avons mentionné, la jonction neuromusculaire est une synapse tripartite ce qui implique que la transmission synaptique ne dépend donc pas seulement de l'activité de l'élément présynaptique. Elle nécessite aussi le bon

fonctionnement de l'élément glial et musculaire (Pinard et al., 2003, Pinard and Robitaille, 2008, Todd et al., 2010).

Un premier mécanisme qui pourrait être responsable de la dépression à long terme de la transmission synaptique impliquerait la libération d'ATP de la part des CSP suite à une stimulation en rafale du nerf moteur (Todd et al., 2010). Cette étude effectuée chez la souris adulte montre que les cellules gliales sont capables de moduler l'activité synaptique à long terme. La stimulation à haute fréquence du neurone moteur induit une réponse calcique des cellules gliales. Nos résultats ainsi que plusieurs études dans la littérature montrent que cette activité calcique chez l'adulte dépend de l'activation équilibrée de plusieurs types de récepteurs. Chez l'adulte, il semble que les deux types de récepteurs contribuant majoritairement à la réponse calcique gliale soient les récepteurs muscariniques et purinergiques (Rousse et al., 2010, Jahromi et al., 1992). Du fait que la contribution des récepteurs muscariniques est réduite lors à la synapse âgée, cela pourrait induire un phénomène de plasticité différent qu'à la synapse adulte.

Un deuxième mécanisme pouvant expliquer la plasticité synaptique à long terme viendrait de l'activité glutamatergique des CSP. Deux études effectuées à la jonction neuromusculaire de grenouilles ont montré que la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire pouvait être modulée par la libération de glutamate. Lors d'un train de stimulation à haute fréquence, une partie de l'acétyl choline libérée par le neurone moteur se lie aux récepteurs nicotiniques de la plaque motrice. Une autre partie de cet acétyl choline libérée va activer les récepteurs métabotropes des cellules gliales. L'activation de ces récepteurs provoque entre autres la relâche de glutamate de la part des cellules gliales. Chez la grenouille, Il a été montré que les cellules gliales possèdent des réserves de glutamates

(Waerhaug and Ottersen, 1993) qui peuvent être libérées et activer des récepteurs métabotropes sur la membrane de la fibre musculaire. L'activation des récepteurs métabotropes permet une élévation locale des ions calciums intracellulaires qui activent à leur tour du monoxyde d'azote synthétase afin de produire du monoxyde d'azote (NO). Le NO étant lipophile, il peut ensuite diffuser jusqu'à la terminaison présynaptique. Il induit une diminution de la libération de neurotransmetteurs par différents mécanismes dépendant de la fréquence de stimulation (Thomas and Robitaille, 2001, Etherington and Everett, 2004).

Le vieillissement s'accompagne d'une augmentation de la quantité de radicaux libres. Or, NO est capable d'agir comme antioxydant, mais est aussi un contributeur majeur de la formation de radicaux libres dans les muscles adultes (Kanner et al., 1991, Jackson, 2005). Le vieillissement est donc susceptible de s'accompagner d'une présence importante de NO qui pourrait mener à une dépression de l'activité synaptique (Vasilaki and Jackson, 2013). Cette théorie peut être facilement vérifiable par l'ajout d'un antagoniste du monoxyde d'azote synthétase tel que le *3-bromo-7-nitroindazole sodium salt*.

II. Le fonctionnement des cellules gliales pérисynaptique est modifié à la jonction neuromusculaire âgée

Les cellules gliales sont des contributeurs importants de la régulation de la transmission synaptique. Toutefois, nos résultats montrent que leur fonctionnement est perturbé en vieillissant ce qui pourrait altérer leurs fonctions modulatrices.

Comme le montrent plusieurs études effectuées aussi bien dans le SNC que dans le SNP, la modulation de la transmission synaptique par les cellules gliales se fait préférentiellement par l'intermédiaire des récepteurs purinergiques (Darabid et al., 2013,

Panatier et al., 2011, Todd et al., 2010, Di Castro et al., 2011). Le maintien de l'intégrité de la synapse semble davantage lié à l'activité des récepteurs muscariniques (Georgiou et al., 1999, Georgiou et al., 1994, Wright et al., 2009). Comme mentionné dans l'introduction, les CSP sont essentielles au maintien de l'intégrité de la synapse et ce maintien passe par l'interaction de la glie avec les autres éléments de la synapse. Il a été montré que l'absence de détection de neurotransmetteurs par les cellules gliales aussi bien par l'action de drogue (TTX) que par la dégénération du neurone moteur provoque l'expression de protéines du cytosquelette (Georgiou et al., 1994). Plus spécifiquement, une diminution de l'activation des récepteurs muscariniques provoque une augmentation de l'expression de GFAP (Georgiou et al., 1999). Dans notre étude, nous remarquons que bien que la transmission synaptique soit affaiblie, elle est encore présente à la synapse âgée. Néanmoins, la contribution des récepteurs muscariniques à l'activité calcique gliale lors de la libération endogène de neurotransmetteurs est diminuée. Les récepteurs muscariniques sont encore présents sur les CSP de souris âgées puisque l'application locale de muscarine induit une réponse calcique gliale chez les vieilles CSP n'étant pas significativement différente de la réponse calcique des CSP adultes. Ce même cas de figure est observable à la jonction neuromusculaire en développement à laquelle les récepteurs muscariniques sont présents sur les CSP, mais ne contribuent pas à la réponse calcique lors de la libération endogène de neurotransmetteurs. Lors du développement ces récepteurs ne sont pas présents aux abords des zones actives et ne contribuent donc pas à la réponse calcique gliale lors de l'activation du neurone moteur (Darabid et al., 2013).

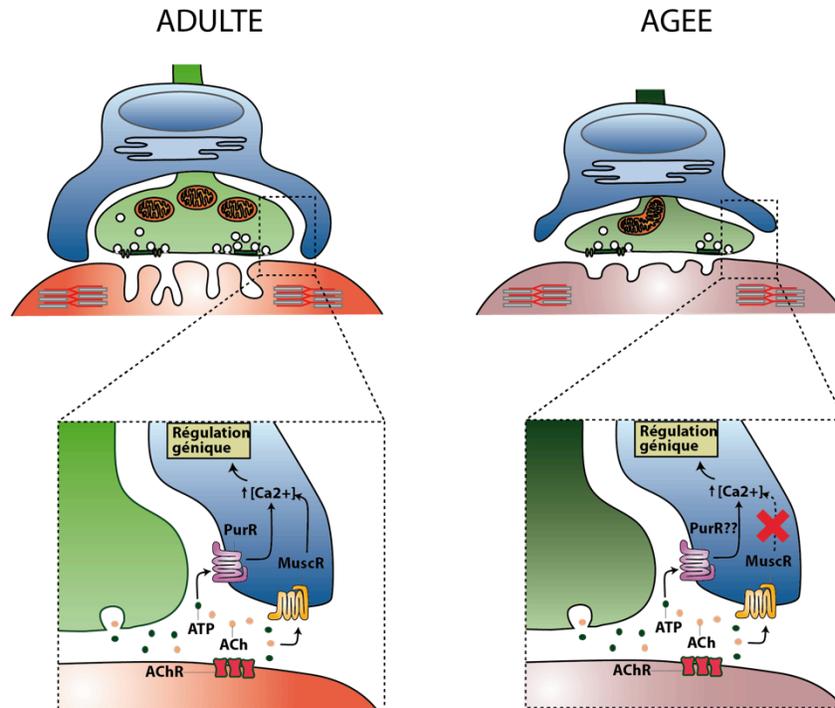


Figure 10 : Mécanismes d'activation gliale à la NMJ adulte et à la NMJ âgée.

L'activation des CSP à la NMJ adulte lors d'une stimulation à haute fréquence repose sur l'activation des récepteurs purinergiques et muscariniques. À la jonction neuromusculaire âgée ainsi qu'au développement, la contribution des récepteurs muscariniques est réduite comme nous le montrent les résultats obtenus lors de la stimulation à haute fréquence en présence d'atropine ainsi que l'étude effectuée par Darabid et al., 2013.

Nous pouvons faire un rapprochement ici entre les quatre situations que sont : le vieillissement, le développement, la régénération après une blessure et aussi la sclérose latérale amyotrophique. Dans ces trois premiers événements, la jonction neuromusculaire est sujette à des modifications et à des remaniements morphologiques afin de s'adapter à des situations critiques. Les cellules gliales sont connues pour jouer un rôle important en matière de plasticité et de guidance lorsque la jonction neuromusculaire est altérée ou en

développement (Deschenes, 2011, Kang et al., 2014, Kawabuchi et al., 2011, Son and Thompson, 1995, Triolo et al., 2006). Lors du développement et du vieillissement, l'activation gliale par les récepteurs muscariniques est diminuée ce qui permettrait la production de protéines cytosquelettiques essentielles à la réinnervation. Dans notre étude, nous pouvons d'ailleurs remarquer une augmentation du nombre de ponts gliaux dans les muscles âgés similaire à ce qui est observé lors de la réinnervation. Certaines données préliminaires obtenues dans le laboratoire indiquent d'ailleurs une diminution de la réponse des récepteurs muscariniques des cellules gliales lors de la réinnervation. Dans la maladie de la sclérose latérale amyotrophique, une maladie neurodégénérative dont certains symptômes sont observables de façon préliminaire à la jonction neuromusculaire, la contribution des récepteurs muscariniques augmente, ce qui est l'inverse de ce que nous observons lors du vieillissement normal. L'activité calcique des cellules gliales est perturbée avant même que la souche exprimant la protéine mutante ne montre de signes symptomatiques (Arbour et al., 2015). Sachant que par la suite, cette maladie se traduit par une dégénérescence du système nerveux périphérique, ces résultats montrent bien que les changements au niveau de ces récepteurs gliaux sont importants aussi bien pour la stabilité de la synapse que pour la transmission synaptique.

Les mécanismes contribuant à la diminution de la composante muscarinique lors du vieillissement normal ne sont pas connus. Ces changements gliaux que l'on observe au cours du vieillissement sont similaires aux changements que l'on observe lors de la dénervation, portant à croire que la synapse âgée est endommagée. Néanmoins, les CSP à la synapse âgée sont moins efficaces à la réparation de la jonction neuromusculaire qu'à la synapse adulte (Kang and Lichtman, 2013). Les facteurs trophiques sont des éléments essentiels au maintien

de l'intégrité de la synapse et à son bon fonctionnement. Dans la dernière section de ce mémoire, nous discuterons des principaux facteurs trophiques importants ayant un lien avec les modifications du fonctionnement synaptique que l'on observe lors du vieillissement.

III. Mécanisme de maintien de l'intégrité synaptique lors du vieillissement : rôle des facteurs trophiques

Comme nous l'indiquent nos résultats obtenus par immunohistochimie, la morphologie de la synapse et son organisation sont altérées. Les récepteurs nicotiniens situés sur la fibre musculaire sont fragmentés, les jonctions neuromusculaires sont partiellement dénervées et les cellules gliales envoient des prolongements vers les jonctions avoisinantes. Ces modifications morphologiques sont en accord avec les dysfonctionnements que l'on observe en électrophysiologie et en imagerie calcique. Les résultats de cette étude mettent en avant le déséquilibre qui caractérise le vieillissement de la synapse. Quels sont les facteurs menant aux modifications morphologiques et fonctionnelles de la synapse lors du vieillissement et à son passage en mode « survie » Il semble que ce vieillissement synaptique soit le résultat de l'accumulation de stress et de traumatismes au court du temps. Le maintien, le développement et la réparation de la jonction neuromusculaire requièrent la libération de facteurs neurotrophiques de la part des trois membres de la synapse. Lors du vieillissement une diminution de la libération de facteurs trophiques pourrait expliquer les changements que l'on observe à la synapse âgée. À la jonction neuromusculaire adulte, le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) est une molécule sécrétée par les fibres musculaires aidant au maintien de l'intégrité des récepteurs nicotiniens à la plaque motrice et jouant un rôle dans la plasticité synaptique (Loeb et al., 2002, Lipsky and Marini, 2007). Lors du vieillissement, il y a une

baisse du niveau de BDNF dans le muscle qui pourrait être une des causes de la fragmentation de la plaque motrice et une diminution de la plasticité synaptique (Ulfhake et al., 2000). De plus, le vieillissement s'accompagne aussi d'une diminution de la production d'autres molécules au niveau systémique tel que IGF-1 (*Insulin-like growth factor*) (Delbono, 2003, Messi and Delbono, 2003). Cette molécule possède plusieurs fonctions, dont la maintenance du neurone moteur et sa protection contre le stress oxydatif. Elle promeut aussi le développement de la masse et de la force musculaire et sa surexpression prévient les effets de l'âge sur la masse musculaire (Yuan et al., 2000, Payne et al., 2007, Payne et al., 2006). La réduction de l'expression de cette molécule avec le vieillissement pourrait expliquer la sensibilité accrue de la jonction neuromusculaire au stress oxydatif, ce qui ultimement mènerait à la dégénérescence de la synapse. L'expression d'autres molécules telles que GDNF (*Glial derived neurotrophic factor*), molécule sécrétée par les cellules de Schwann myélinisantes lors de la dégénération en cas de blessure, est augmentée durant le vieillissement. Cette augmentation est en accord avec le fait que le vieillissement s'accompagne de l'altération de la jonction neuromusculaire et que les CSP tentent de réparer la synapse endommagée. Agrin molécule produite entre autres par les CSP est importante au maintien de la plaque motrice. Agrin interagit avec le complexe Lrp4 et MusK qui induit ensuite le maintien de rapsyn et des AChR de la plaque motrice. L'utilisation de souris transgénique KO pour l'agrén précipite le vieillissement musculaire et la sarcopénie (Drey et al., 2013).

Conclusion

Le vieillissement de la jonction neuromusculaire est un phénomène complexe dans lequel les cellules gliales semblent jouer un rôle important. Nos résultats montrent que des changements interviennent au niveau de l'interaction neurone-glie qui est essentielle au maintien de la stabilité de la synapse. Cette étude pose donc la base des modifications du fonctionnement des CSP lors du vieillissement normal. Les mécanismes responsables de l'équilibre entre les fonctions réparatrices et les fonctions modulatrices des cellules gliales ne sont pas encore connus, mais il semble que la contribution des récepteurs muscariniques joue un rôle primordial. Nous savons que chez l'adulte, les cellules gliales sont capables de moduler l'activité synaptique. Le caractère modulateur des cellules gliales de la transmission synaptique reste encore à déterminer. Les CSP sont-elles encore capables de moduler la transmission synaptique à la synapse âgée ? Pour répondre à cette problématique, il serait possible par électroporation en cellule unique ou par photo-activation, de bloquer les cellules gliales afin de vérifier spécifiquement leur contribution aux modifications de la transmission synaptique chez la souris âgée. Aussi, nous savons que la contribution des récepteurs muscariniques diminue lors du vieillissement. Afin de « sauver » la jonction neuromusculaire, et de renverser les modifications morphologiques et fonctionnelles lors du vieillissement, il serait intéressant d'essayer de rééquilibrer cette balance d'activation gliale par l'injection de virus recombinant, afin de surexprimer ces récepteurs. Dans la même optique, il serait possible d'injecter chroniquement des agonistes des récepteurs muscariniques gliaux et de vérifier les effets sur la structure et la fonction de la jonction neuromusculaire. Les astrocytes dans le système nerveux central sont eux aussi associés à la modulation et au maintien de l'activité

synaptique (Araque et al., 2014, Panatier et al., 2011, Di Castro et al., 2011, Araque et al., 1999). Le vieillissement altère les capacités protectrices de ces cellules (Lin et al., 2007). Il serait intéressant d'investiguer le rôle des cellules gliales dans des maladies neuro-dégénératives du système nerveux central.

Bibliographie

- ALLEN, J. S., BRUSS, J., BROWN, C. K. & DAMASIO, H. 2005. Normal neuroanatomical variation due to age: the major lobes and a parcellation of the temporal region. *Neurobiol Aging*, 26, 1245-60; discussion 1279-82.
- ALVAREZ-ROYO, P., ZOLA-MORGAN, S. & SQUIRE, L. R. 1992. Impairment of long-term memory and sparing of short-term memory in monkeys with medial temporal lobe lesions: a response to Ringo. *Behav Brain Res*, 52, 1-5.
- ARAQUE, A., CARMIGNOTO, G., HAYDON, P. G., OLIET, S. H., ROBITAILLE, R. & VOLTERRA, A. 2014. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, 81, 728-39.
- ARAQUE, A., PARPURA, V., SANZGIRI, R. P. & HAYDON, P. G. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, 22, 208-15.
- ARBOUR, A., TREMBLAY, E., MARTINEAU, E., JULIEN, J.P. AND ROBITAILLE, R. 2015. Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS mouse model. *Journal of Neuroscience*, 35, 688 –706.
- AULD, D. S. & ROBITAILLE, R. 2003. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron*, 40, 389-400.
- BANKER, B. Q., KELLY, S. S. & ROBBINS, N. 1983. Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J Physiol*, 339, 355-77.
- BARNES, C. A. 1979. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93, 74-104.
- BELAIR, E. L., VALLEE, J. & ROBITAILLE, R. 2010. In vivo long-term synaptic plasticity of glial cells. *J Physiol*, 588, 1039-56.
- BELLUARDO, N., WESTERBLAD, H., MUDO, G., CASABONA, A., BRUTON, J., CANIGLIA, G., PASTORIS, O., GRASSI, F. & IBANEZ, C. F. 2001. Neuromuscular junction disassembly and muscle fatigue in mice lacking neurotrophin-4. *Mol Cell Neurosci*, 18, 56-67.
- BERSTEIN, G., BLANK, J. L., SMRCKA, A. V., HIGASHIJIMA, T., STERNWEIS, P. C., EXTON, J. H. & ROSS, E. M. 1992. Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, Gq/11, and phospholipase C-beta 1. *J Biol Chem*, 267, 8081-8.
- BEZZI, P., VESCE, S., PANZARASA, P. & VOLTERRA, A. 1999. Astrocytes as active participants of glutamatergic function and regulators of its homeostasis. *Adv Exp Med Biol*, 468, 69-80.
- BILLINGS, S. E., CLARKE, G. L. & NISHIMUNE, H. 2012. ELKS1 and Ca(2+) channel subunit beta4 interact and colocalize at cerebellar synapses. *Neuroreport*, 23, 49-54.
- BOURQUE, M. J. & ROBITAILLE, R. 1998. Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 512 (Pt 1), 197-209.
- CARROLL, S. L., MILLER, M. L., FROHNERT, P. W., KIM, S. S. & CORBETT, J. A. 1997. Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J Neurosci*, 17, 1642-59.

- CASTONGUAY, A. & ROBITAILLE, R. 2001. Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci*, 21, 1911-22.
- CHAI, R. J., VUKOVIC, J., DUNLOP, S., GROUNDS, M. D. & SHAVLAKADZE, T. 2011. Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle. *PLoS One*, 6, e28090.
- CHEN, J., MIZUSHIGE, T. & NISHIMUNE, H. 2012. Active zone density is conserved during synaptic growth but impaired in aged mice. *J Comp Neurol*, 520, 434-52.
- COUTEAUX, R. & PECOT-DECHAVASSINE, M. 1974. [Specialized areas of presynaptic membranes]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 278, 291-3.
- DARABID, H., ARBOUR, D. & ROBITAILLE, R. 2013. Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci*, 33, 1297-313.
- DARABID, H., PEREZ-GONZALEZ, A. P. & ROBITAILLE, R. 2014. Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nat Rev Neurosci*, 15, 703-18.
- DECHIARA, T. M., BOWEN, D. C., VALENZUELA, D. M., SIMMONS, M. V., POUEMYMIROU, W. T., THOMAS, S., KINETZ, E., COMPTON, D. L., ROJAS, E., PARK, J. S., SMITH, C., DISTEFANO, P. S., GLASS, D. J., BURDEN, S. J. & YANCOPOULOS, G. D. 1996. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell*, 85, 501-12.
- DELANEY, K. R., ZUCKER, R. S. & TANK, D. W. 1989. Calcium in motor nerve terminals associated with posttetanic potentiation. *J Neurosci*, 9, 3558-67.
- DELBONO, O. 2003. Neural control of aging skeletal muscle. *Aging Cell*, 2, 21-9.
- DESCHENES, M. R. 2011. Motor unit and neuromuscular junction remodeling with aging. *Curr Aging Sci*, 4, 209-20.
- DESCHENES, M. R., HURST, T. E., RAMSER, A. E. & SHERMAN, E. G. 2013. Presynaptic to postsynaptic relationships of the neuromuscular junction are held constant across age and muscle fiber type. *Dev Neurobiol*, 73, 744-53.
- DEUPREE, D. L., BRADLEY, J. & TURNER, D. A. 1993. Age-related alterations in potentiation in the CA1 region in F344 rats. *Neurobiol Aging*, 14, 249-58.
- DI CASTRO, M. A., CHUQUET, J., LIAUDET, N., BHAIKURALLY, K., SANTELLO, M., BOUVIER, D., TIRET, P. & VOLTERRA, A. 2011. Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat Neurosci*, 14, 1276-84.
- DREY, M., SIEBER, C. C., BAUER, J. M., UTER, W., DAHINDEN, P., FARIELLO, R. G., VRIJBLOED, J. W. & FI, A. T. I. G. 2013. C-terminal Agrin Fragment as a potential marker for sarcopenia caused by degeneration of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol*, 48, 76-80.
- ETHERINGTON, S. J. & EVERETT, A. W. 2004. Postsynaptic production of nitric oxide implicated in long-term depression at the mature amphibian (*Bufo marinus*) neuromuscular junction. *J Physiol*, 559, 507-17.
- FAHIM, M. A. 1997. Endurance exercise modulates neuromuscular junction of C57BL/6NNia aging mice. *J Appl Physiol (1985)*, 83, 59-66.
- GARCIA, M. L., FERNANDEZ, A. & SOLAS, M. T. 2013. Mitochondria, motor neurons and aging. *J Neurol Sci*, 330, 18-26.

- GARCIA-CHACON, L. E., NGUYEN, K. T., DAVID, G. & BARRETT, E. F. 2006. Extrusion of Ca²⁺ from mouse motor terminal mitochondria via a Na⁺-Ca²⁺ exchanger increases post-tetanic evoked release. *J Physiol*, 574, 663-75.
- GAUTAM, M., NOAKES, P. G., MOSCOSO, L., RUPP, F., SCHELLER, R. H., MERLIE, J. P. & SANES, J. R. 1996. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*, 85, 525-35.
- GAUTAM, M., NOAKES, P. G., MUDD, J., NICHOL, M., CHU, G. C., SANES, J. R. & MERLIE, J. P. 1995. Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*, 377, 232-6.
- GAWEL, M. & KOSTERA-PRUSZCZYK, A. 2014. Effect of age and gender on the number of motor units in healthy subjects estimated by the multipoint incremental MUNE method. *J Clin Neurophysiol*, 31, 272-8.
- GEINISMAN, Y., DE TOLEDO-MORRELL, L. & MORRELL, F. 1986. Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 3027-31.
- GEORGIU, J., ROBITAILLE, R. & CHARLTON, M. P. 1999. Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci*, 19, 3836-46.
- GEORGIU, J., ROBITAILLE, R., TRIMBLE, W. S. & CHARLTON, M. P. 1994. Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron*, 12, 443-55.
- GINIATULLIN, A. R., DARIOS, F., SHAKIRZYANOVA, A., DAVLETOV, B. & GINIATULLIN, R. 2006. SNAP25 is a pre-synaptic target for the depressant action of reactive oxygen species on transmitter release. *J Neurochem*, 98, 1789-97.
- GIORGI, C., AGNOLETTI, C., BONONI, A., BONORA, M., DE MARCHI, E., MARCHI, S., MISSIROLI, S., PATERGNANI, S., POLETTI, F., RIMESSI, A., SUSKI, J. M., WIECKOWSKI, M. R. & PINTON, P. 2012. Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion*, 12, 77-85.
- GONZALEZ, M., RUGGIERO, F. P., CHANG, Q., SHI, Y. J., RICH, M. M., KRANER, S. & BALICE-GORDON, R. J. 1999. Disruption of Trkb-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions. *Neuron*, 24, 567-83.
- GUMA, A., MARTINEZ-REDONDO, V., LOPEZ-SOLDADO, I., CANTO, C. & ZORZANO, A. 2010. Emerging role of neuregulin as a modulator of muscle metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298, E742-50.
- HERRUP, K. 2010. Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J Neurosci*, 30, 16755-62.
- HUANG, E. J. & REICHARDT, L. F. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24, 677-736.
- HUXLEY, A. F. 2000. Mechanics and models of the myosin motor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355, 433-40.
- JACKSON, M. J. 2005. Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360, 2285-91.
- JAHROMI, B. S., ROBITAILLE, R. & CHARLTON, M. P. 1992. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron*, 8, 1069-77.

- JANSSEN, I., BAUMGARTNER, R. N., ROSS, R., ROSENBERG, I. H. & ROUBENOFF, R. 2004a. Skeletal muscle cutpoints associated with elevated physical disability risk in older men and women. *Am J Epidemiol*, 159, 413-21.
- JANSSEN, I., SHEPARD, D. S., KATZMARZYK, P. T. & ROUBENOFF, R. 2004b. The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc*, 52, 80-5.
- KANG, H. & LICHTMAN, J. W. 2013. Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young adult and aged animals. *J Neurosci*, 33, 19480-91.
- KANG, H., TIAN, L., MIKESH, M., LICHTMAN, J. W. & THOMPSON, W. J. 2014. Terminal Schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury. *J Neurosci*, 34, 6323-33.
- KANNER, J., HAREL, S. & GRANIT, R. 1991. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*, 289, 130-6.
- KATZ, B. & MILEDI, R. 1968. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol*, 195, 481-92.
- KAWABUCHI, M., TAN, H. & WANG, S. 2011. Age affects reciprocal cellular interactions in neuromuscular synapses following peripheral nerve injury. *Ageing Res Rev*, 10, 43-53.
- KELLY, S. S. & ROBBINS, N. 1986. Sustained transmitter output by increased transmitter turnover in limb muscles of old mice. *J Neurosci*, 6, 2900-7.
- KO, C.-P., ROBITAILLE, R. 2014. Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular synapse: adaptable, multitasking glial cells. *Cold Spring Harbor Perspectives Barres, Freeman & Stevens editors*.
- LEXELL, J. 1995. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 50 Spec No, 11-6.
- LI, Y., LEE, Y. & THOMPSON, W. J. 2011. Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse. *J Neurosci*, 31, 14910-9.
- LIN, D. T., WU, J., HOLSTEIN, D., UPADHYAY, G., ROURK, W., MULLER, E. & LECHLEITER, J. D. 2007. Ca²⁺ signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiol Aging*, 28, 99-111.
- LIN, M. T. & BEAL, M. F. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787-95.
- LIN, W., SANCHEZ, H. B., DEERINCK, T., MORRIS, J. K., ELLISMAN, M. & LEE, K. F. 2000. Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 1299-304.
- LIPSKY, R. H. & MARINI, A. M. 2007. Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann N Y Acad Sci*, 1122, 130-43.
- LOEB, J. A., HMADCHA, A., FISCHBACH, G. D., LAND, S. J. & ZAKARIAN, V. L. 2002. Neuregulin expression at neuromuscular synapses is modulated by synaptic activity and neurotrophic factors. *J Neurosci*, 22, 2206-14.
- MAGILL, C. K., TONG, A., KAWAMURA, D., HAYASHI, A., HUNTER, D. A., PARSADANIAN, A., MACKINNON, S. E. & MYCKATYN, T. M. 2007. Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: a confocal microscopic study in transgenic mice. *Exp Neurol*, 207, 64-74.

- MANTILLA, C. B., ROWLEY, K. L., FAHIM, M. A., ZHAN, W. Z. & SIECK, G. C. 2004. Synaptic vesicle cycling at type-identified diaphragm neuromuscular junctions. *Muscle Nerve*, 30, 774-83.
- MESSI, M. L. & DELBONO, O. 2003. Target-derived trophic effect on skeletal muscle innervation in senescent mice. *J Neurosci*, 23, 1351-9.
- MOORE, C. I., BROWNING, M. D. & ROSE, G. M. 1993. Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. *Hippocampus*, 3, 57-66.
- MORLEY, J. E. 2012. Sarcopenia in the elderly. *Fam Pract*, 29 Suppl 1, i44-i48.
- MULKEY, R. M. & ZUCKER, R. S. 1992. Posttetanic potentiation at the crayfish neuromuscular junction is dependent on both intracellular calcium and sodium ion accumulation. *J Neurosci*, 12, 4327-36.
- NARITA, K., AKITA, T., HACHISUKA, J., HUANG, S., OCHI, K. & KUBA, K. 2000. Functional coupling of Ca(2+) channels to ryanodine receptors at presynaptic terminals. Amplification of exocytosis and plasticity. *J Gen Physiol*, 115, 519-32.
- NISHIMUNE, H., NUMATA, T., CHEN, J., AOKI, Y., WANG, Y., STARR, M. P., MORI, Y. & STANFORD, J. A. 2012. Active zone protein Bassoon co-localizes with presynaptic calcium channel, modifies channel function, and recovers from aging related loss by exercise. *PLoS One*, 7, e38029.
- NISHIMUNE, H., SANES, J. R. & CARLSON, S. S. 2004. A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature*, 432, 580-7.
- NORRIS, C. M., KOROL, D. L. & FOSTER, T. C. 1996. Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. *J Neurosci*, 16, 5382-92.
- OPALACH, K., RANGARAJU, S., MADORSKY, I., LEEUWENBURGH, C. & NOTTERPEK, L. 2010. Lifelong calorie restriction alleviates age-related oxidative damage in peripheral nerves. *Rejuvenation Res*, 13, 65-74.
- PAKKENBERG, B. & GUNDERSEN, H. J. 1997. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol*, 384, 312-20.
- PANATIER, A., VALLEE, J., HABER, M., MURAI, K. K., LACAILLE, J. C. & ROBITAILLE, R. 2011. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*, 146, 785-98.
- PARNAS, I., PARNAS, H. & DUDEL, J. 1982. Neurotransmitter release and its facilitation in crayfish. II. Duration of facilitation and removal processes of calcium from the terminal. *Pflugers Arch*, 393, 232-6.
- PAYNE, A. M., MESSI, M. L., ZHENG, Z. & DELBONO, O. 2007. Motor neuron targeting of IGF-1 attenuates age-related external Ca²⁺-dependent skeletal muscle contraction in senescent mice. *Exp Gerontol*, 42, 309-19.
- PAYNE, A. M., ZHENG, Z., MESSI, M. L., MILLIGAN, C. E., GONZALEZ, E. & DELBONO, O. 2006. Motor neurone targeting of IGF-1 prevents specific force decline in ageing mouse muscle. *J Physiol*, 570, 283-94.
- PINARD, A., LEVESQUE, S., VALLEE, J. & ROBITAILLE, R. 2003. Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *Eur J Neurosci*, 18, 3241-50.

- PINARD, A. & ROBITAILLE, R. 2008. Nitric oxide dependence of glutamate-mediated modulation at a vertebrate neuromuscular junction. *Eur J Neurosci*, 28, 577-87.
- 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, 563-80.
- REDDY, P. H. 2008. Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med*, 10, 291-315.
- REDMAN, R. S. & SILINSKY, E. M. 1994. ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J Physiol*, 477 (Pt 1), 117-27.
- ROBITAILLE, R. 1995. Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci*, 15, 7121-31.
- ROBITAILLE, R. 1998. Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron*, 21, 847-55.
- ROBITAILLE, R., BOURQUE, M. J. & VANDAELE, S. 1996. Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci*, 16, 148-58.
- ROBITAILLE, R., JAHROMI, B. S. & CHARLTON, M. P. 1997. Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 504 (Pt 2), 337-47.
- ROCHON, D., ROUSSE, I. & ROBITAILLE, R. 2001. Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci*, 21, 3819-29.
- ROSENHEIMER, J. L. & SMITH, D. O. 1985. Differential changes in the end-plate architecture of functionally diverse muscles during aging. *J Neurophysiol*, 53, 1567-81.
- ROUSSE, I., ST-AMOUR, A., DARABID, H. & ROBITAILLE, R. 2010. Synapse-glia interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties. *Neuroscience*, 167, 621-32.
- ROWLEY, K. L., MANTILLA, C. B., ERMILOV, L. G. & SIECK, G. C. 2007. Synaptic vesicle distribution and release at rat diaphragm neuromuscular junctions. *J Neurophysiol*, 98, 478-87.
- SALPETER, M. 1987. Vertebrate neuromuscular junctions: general morphology, molecular organization, and functional consequences. *Neurology and neurobiology*
- SATRUSTEGUI, J., VILLALBA, M., PEREIRA, R., BOGONEZ, E. & MARTINEZ-SERRANO, A. 1996. Cytosolic and mitochondrial calcium in synaptosomes during aging. *Life Sci*, 59, 429-34.
- SCHINDER, A. F., BERNINGER, B. & POO, M. 2000. Postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation. *Neuron*, 25, 151-63.
- SCHINDER, A. F. & POO, M. 2000. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 23, 639-45.
- SERPER, M., PATZER, R. E., CURTIS, L. M., SMITH, S. G., O'CONOR, R., BAKER, D. W. & WOLF, M. S. 2014. Health Literacy, Cognitive Ability, and Functional Health Status among Older Adults. *Health Serv Res*.
- SIKSOU, L., TRILLER, A. & MARTY, S. 2009. An emerging view of presynaptic structure from electron microscopic studies. *J Neurochem*, 108, 1336-42.
- SINE, S. M. 2012. End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease. *Physiol Rev*, 92, 1189-234.

- SMITH, D. O. 1988. Muscle-specific decrease in presynaptic calcium dependence and clearance during neuromuscular transmission in aged rats. *J Neurophysiol*, 59, 1069-82.
- SON, Y. J. & THOMPSON, W. J. 1995. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron*, 14, 125-32.
- TANG, Y. & ZUCKER, R. S. 1997. Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron*, 18, 483-91.
- THIBAUT, O., HADLEY, R. & LANDFIELD, P. W. 2001. Elevated postsynaptic [Ca²⁺]_i and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity. *J Neurosci*, 21, 9744-56.
- THOMAS, S. & ROBITAILLE, R. 2001. Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J Neurosci*, 21, 1087-95.
- TODD, K. J., DARABID, H. & ROBITAILLE, R. 2010. Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction. *J Neurosci*, 30, 11870-82.
- TRIMBLE, W. S., LINIAL, M. & SCHELLER, R. H. 1991. Cellular and molecular biology of the presynaptic nerve terminal. *Annu Rev Neurosci*, 14, 93-122.
- TRIOLO, D., DINA, G., LORENZETTI, I., MALAGUTI, M., MORANA, P., DEL CARRO, U., COMI, G., MESSING, A., QUATTRINI, A. & PREVITALI, S. C. 2006. Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *J Cell Sci*, 119, 3981-93.
- ULFHAKE, B., BERGMAN, E., EDSTROM, E., FUNDIN, B. T., JOHNSON, H., KULLBERG, S. & MING, Y. 2000. Regulation of neurotrophin signaling in aging sensory and motoneurons: dissipation of target support? *Mol Neurobiol*, 21, 109-35.
- VALDEZ, G., TAPIA, J. C., KANG, H., CLEMENSON, G. D., JR., GAGE, F. H., LICHTMAN, J. W. & SANES, J. R. 2010. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 14863-8.
- VALDEZ, G., TAPIA, J. C., LICHTMAN, J. W., FOX, M. A. & SANES, J. R. 2012. Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One*, 7, e34640.
- VASILAKI, A. & JACKSON, M. J. 2013. Role of reactive oxygen species in the defective regeneration seen in aging muscle. *Free Radic Biol Med*, 65, 317-23.
- WAERHAUG, O. & OTTERSEN, O. P. 1993. Demonstration of glutamate-like immunoreactivity at rat neuromuscular junctions by quantitative electron microscopic immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)*, 188, 501-13.
- WANG, Q., HEBERT, S. L., RICH, M. M. & KRANER, S. D. 2011. Loss of synaptic vesicles from neuromuscular junctions in aged MRF4-null mice. *Neuroreport*, 22, 185-9.
- WANG, X., HU, B., ZIEBA, A., NEUMANN, N. G., KASPER-SONNENBERG, M., HONSBEIN, A., HULTQVIST, G., CONZE, T., WITT, W., LIMBACH, C., GEITMANN, M., DANIELSON, H., KOLAROW, R., NIEMANN, G., LESSMANN, V. & KILIMANN, M. W. 2009. A protein interaction node at the neurotransmitter release site: domains of Aczonin/Piccolo, Bassoon, CAST, and rim converge on the N-terminal domain of Munc13-1. *J Neurosci*, 29, 12584-96.

- WASHIO, H., IMAZATO-TANAKA, C., KANDA, K. & NOMOTO, S. 1987. Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in muscles of aged mice. *Brain Res*, 416, 69-74.
- WRIGHT, M. C., POTLURI, S., WANG, X., DENTCHEVA, E., GAUTAM, D., TESSLER, A., WESS, J., RICH, M. M. & SON, Y. J. 2009. Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses. *J Neurosci*, 29, 14942-55.
- YUAN, Q., WU, W., SO, K. F., CHEUNG, A. L., PREVETTE, D. M. & OPPENHEIM, R. W. 2000. Effects of neurotrophic factors on motoneuron survival following axonal injury in newborn rats. *Neuroreport*, 11, 2237-41.
- ZUCKER, R. S. & REGEHR, W. G. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 64, 355-405.

