

Université de Montréal

Étude de l'effet de la surcharge compensatoire du plantaire sur la dynamique de la  
transmission synaptique, *in situ*

par

Anteneh Argaw

Département de Kinésiologie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.) en science de l'activité physique

Septembre 2003

© Anteneh Argaw, 2003



GV

201

U54

2004

v. 011

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'effet de la surcharge compensatoire du plantaire sur la dynamique de la  
transmission synaptique, *in situ*

présenté par

Anteneh Argaw

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Marc Lavoie     *président-rapporteur*

Phillip Gardiner     *directeur de recherche*

Luc Léger             *membre du jury*

Mémoire accepté le.....

## Résumé

Les contractions musculaires exigées pour assurer les activités quotidiennes nécessitent une transmission fiable et efficace du stimulus du nerf moteur aux fibres musculaires. Or, la terminaison nerveuse assure, en partie, cette efficacité en secrétant plus de neurotransmetteurs que ce qui est nécessaire pour initier un potentiel d'action à la membrane de la fibre musculaire.

Il est techniquement difficile de mesurer directement, par des moyens biochimiques, la quantité de neurotransmetteurs libérés par la terminaison nerveuse. L'enregistrement électrophysiologique de l'effet de ces transmetteurs sur la composante post-synaptique de la plaque motrice s'est avérée être une technique plus appropriée. Cependant, l'enregistrement de potentiels de la plaque motrice (EPP) requiert l'abolition de la contraction musculaire. Les méthodes initialement utilisées à cet égard telles que : la manipulation de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , l'utilisation de la d-turbocurarine et la lacération de la fibre musculaire affectent l'intégrité de la transmission neuromusculaire. La découverte récente de la conotoxine, qui bloque de manière sélective les canaux  $\text{Na}^+$  musculaires, permet désormais l'enregistrement des EPPs dans leur intégralité.

Il a été rapporté que les jonctions neuromusculaires démontraient des caractéristiques uniques dépendamment du type de fibres musculaires I, II ou IIX. Du point de vue morphologique, les éléments post-synaptiques de la jonction deviennent de plus en plus complexes en allant des fibres de type I (qui expriment les structures les plus simples) aux fibres de type IIX (qui expriment les structures les plus élaborées).

Ainsi, les replis de la plaque motrice des fibres lentes (type I) sont plus courts et moins nombreux que ceux des fibres rapides (type IIX). Sur le plan physiologique, les fibres rapides libèrent davantage de neurotransmetteurs comparées aux fibres lentes, mais aussi démontrent une diminution plus prononcée des EPPs lors d'une stimulation continue.

La jonction neuromusculaire est une structure fortement adaptable subissant une transformation perpétuelle. Celle-ci est continuellement remodelée lors de la croissance, du vieillissement et des conditions pathologiques. La capacité modulatrice de l'activité physique sur les éléments morphologiques et physiologiques de la jonction a été démontrée dans plusieurs études.

La majorité des adaptations physiologiques de la jonction neuromusculaire chez le rat ont été démontrées *in vitro*, en utilisant des techniques de stimulation électrique. Or cette technique comporte des restrictions méthodologiques considérables qui affectent la transmission synaptique et biaisent ainsi l'analyse. La particularité de la présente étude est qu'elle s'efforce d'éliminer ces restrictions en utilisant un modèle *in situ* où les EPPs sont enregistrés dans leur intégralité et ce, à une température physiologique. De plus, cette étude innove en investigant l'effet de la combinaison d'une surcharge compensatoire et de la course volontaire sur les propriétés physiologiques de la transmission synaptique du plantaire, muscle composé majoritairement de fibres rapides.

La surcharge compensatoire combinée à la course volontaire a provoqué l'altération de plusieurs propriétés physiologiques de la jonction. Ainsi, l'amplitude du EPP à la suite d'une stimulation, donc la quantité de neurotransmetteurs libérés par

stimulus ou le contenu quantique (QC), et la quantité cumulative de transmetteurs libérés lors des stimulations continues ont augmenté de façon significative comparés au groupe témoin composé de sujets sédentaires. L'amplitude des potentiels miniatures de la plaque (MEPPs) du groupe expérimental était plus petite que celle du groupe contrôle. De plus, lors des stimulations continues, on observe une diminution plus prononcée de l'amplitude des EPPs dans le groupe expérimental.

Ces observations suggèrent une augmentation du coefficient de sûreté pour la transmission synaptique. En outre, ces résultats soutiennent, mais aussi complètent les évidences concernant les améliorations dans l'efficacité de la transmission neuromusculaire causées par l'activité physique rapportées précédemment.

**Mots clés :** transmission neuromusculaire, potentiel de la plaque motrice, électrophysiologie, *in situ*, surcharge compensatoire du muscle plantaire, activité physique

## Summary

In order to carry out a daily function, muscle contraction requires a reliable and efficient transmission of information from the motor nerve to the muscle fibers. The nerve terminal ensures this efficiency, in part, by releasing more neurotransmitters than are required to initiate an action potential.

It is technically difficult, using biochemical methods, to directly measure the quantity of neurotransmitter released by the nerve terminal. The electrophysiological recording of the post-synaptic effects of these transmitters proved to be a more realizable technique. However, the recording of endplate potentials (EPP) requires the elimination of action potential in the muscle fiber. The methods initially used in this regard, manipulation of ion concentration ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ), the use of d-tubocurarine and damaging of the muscle fiber, affect the integrity of synaptic transmission at the neuromuscular junction. However, the recent discovery of conotoxine, a potent mammalian muscle  $\text{Na}^+$  channel blocker, has allowed the recording of full-sized EPPs.

It has been reported that the neuromuscular junction properties vary according to muscle fiber type: I, II or IIX. Morphologically, the post-synaptic elements of the junction become increasingly complex as we move from type I fibers (which express the simplest structures) to type IIX fibers (which express the most elaborate structures). Thus the post-synaptic folds, at the motor endplate, of slow fibers (type I) are shorter and fewer than those of fast fibers (type IIX). Physiologically, fast fibers release more neurotransmitters compared to slow fibers, but also show a more marked rundown in EPP amplitude during continuous stimulation.

The neuromuscular junction is a highly adaptable structure undergoing a lifelong remodeling process. Its structure is altered by growth, aging and pathological states. The modulatory capacity of physical activity on the morphological and physiological properties of the junction has been shown by several studies.

Most of the physiological adaptations of the rat neuromuscular junction have been demonstrated, *in vitro*, using electrical stimulation. This technique involves considerable methodological limitations thus hindering an unbiased study of neuromuscular transmission. The characteristic of the present study is that it bypasses these restrictions by using an *in situ* model where full-sized EPPs are recorded under physiological conditions. Furthermore, this study innovates by investigating the combined effects of compensatory overload and voluntary wheel cage activity on the physiological properties of synaptic transmission of the plantaris muscle, mainly composed of fast fibers.

The combination of compensatory overload and voluntary wheel cage activity increased, significantly, the quantal content (QC) and the cumulative quantal release. Miniature endplate potential (MEPP) amplitude was lower in the overload group as well as EPP amplitude rundown during continuous stimulation.

When considered together, these data suggest that the safety factor for neuromuscular transmission could have increased in the overload group. Furthermore, these findings support and supplement previously reported activity-dependent improvements in neuromuscular transmission efficacy.

**Key words:** neuromuscular transmission, endplate potential, *in situ* electrophysiology, overloaded plantaris muscle, physical activity

## Table des matières

Résumé.....	iii
Summary.....	vi
Table des matières.....	ix
Listes des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xvii
<b>Chapitre 1 : Revue de littérature.....</b>	<b>1</b>
1. La jonction neuromusculaire et la transmission	
synaptique.....	2
1.1 Organisation fonctionnelle de la jonction neuromusculaire.....	4
Structures pré-synaptiques et la sécrétion de neurotransmetteurs.....	4
Structures post-synaptiques et l'effet des neurotransmetteurs.....	9
Fente synaptique et la terminaison de la transmission	
synaptique.....	10
1.2 Le concept de « coefficient de sûreté ».....	11
Différentes techniques utilisées pour estimer le coefficient de	
sûreté .....	12
Facteurs influençant le coefficient de sûreté.....	16
Facteurs pré-synaptiques.....	16
Facteurs post-synaptiques.....	18

Jonction neuromusculaire et types de fibres.....	20
2. Rôle de l'exercice dans la modulation de la jonction neuromusculaire.....	25
2.1 Effet de l'exercice sur les paramètres morphologiques de la jonction neuromusculaire.....	25
2.2 Effet de l'exercice sur les paramètres physiologiques de la jonction neuromusculaire.....	29
<b>Chapitre 2 : Enhanced neuromuscular transmission efficacy in overloaded rat plantaris muscle <i>in situ</i>.....</b>	<b>36</b>
Abstract.....	37
Introduction .....	38
Methods.....	40
Results.....	43
Discussion.....	44
Article abbreviations.....	49
Article references.....	50
Tables.....	54
Legends.....	56
Figures.....	58
<b>Chapitre 3 : Conclusions.....</b>	<b>63</b>
<b>Chapitre 4 : Bibliographie.....</b>	<b>67</b>

## Listes des figures : Chapitre 1

**Figure 1. La jonction neuromusculaire.** La jonction neuromusculaire possède trois grandes composantes : une structure pré-synaptique, une structure post-synaptique et une fente synaptique. La structure pré-synaptique contient plusieurs composantes telles que des mitochondries, des vésicules synaptiques renfermant de l'acétylcholine (ACh) et des canaux ioniques voltage-dépendants dont les canaux calciques voltage-dépendants (VGCC). Les vésicules synaptiques contenant l'ACh sont groupées près de la zone active (site de libération de l'ACh). La structure post-synaptique est formée par différents types de canaux ioniques et par la partie du sarcolemme faisant face à la terminaison nerveuse communément appelée plaque motrice. Les récepteurs d'ACh (AChR) sont concentrés de façon significative aux crêtes ainsi que le long des côtés supérieurs des replis tandis que les canaux sodiques voltage-dépendants (VGNC) sont concentrés dans le creux de ces replis. La fente synaptique, large de 50-100 nm, sépare la terminaison nerveuse de la plaque motrice. On retrouve à l'intérieur de cette fente une couche de matrice extracellulaire appelée le « basal lamina ». (Tiré de Kandel et al. 2000).....3

## **Figure 2. Protéines pré-synaptiques impliquées dans la transmission synaptique.**

La libération de neurotransmetteurs à la jonction neuromusculaire implique certaines protéines et comporte plusieurs étapes. Les vésicules synaptiques sont regroupées dans plusieurs pools dont le pool de réserve (1). Dans ce pool de réserve, les vésicules sont attachées à un réseau de filaments cytosquelettiques par le biais de la synapsine. La

mobilisation vers les sites de sécrétion semble être assurée par des protéines de la famille rab (2). L'ancrage (3) et la fusion des vésicules synaptiques (4) sont assurées par une multitude de protéines (Tirée de Kandel et al. 2000).....5

## Listes des figures : Chapitre 2

**Figure 1.** Enregistrements électrophysiologiques de potentiels de la plaque motrice (EPP) durant un train de stimulation continu à une fréquence de 50 Hz. A : Diminution de l'amplitude des EPPs échantillonnés durant les premières 180 ms d'une stimulation continue dans le groupe contrôle (panneau supérieur) et le groupe surcharge compensatoire ( panneau inférieur). L'amplitude des EPPs dans le group de surcharge compensatoire est plus grande, mais diminue aussi de façon plus prononcée. B : Un exemple de « doublet » observés durant une stimulation continue d'une jonction neuromusculaire de rat adulte du groupe de surcharge compensatoire. Des doublets ont été exprimés dans une fraction des jonctions du groupe contrôle et du groupe surcharge compensatoire. La barre de calibrage dans figure 1A est de 1 mV et 10 ms.....58

**Figure 2.** Comparaison de la diminution de l'amplitude des EPPs entre le groupe surcharge compensatoire et le groupe contrôle. Une vue de plan rapprochée des premières 500 ms et des 10 s suivantes d'un train de stimulation continue à 25 Hz (A), 50 Hz (B) et 75 Hz (C). L'ANOVA factoriel a démontré un effet de groupe significatif pour toutes les fréquences. n = 15 (25 Hz), 14 (50 et 75 Hz) dans le groupe contrôle et 18 (25 Hz), 16 (50 Hz) et 14 (75 Hz) dans le groupe surcharge compensatoire.....60

**Figure 3.** Diminution de l'amplitude des EPPs en fonction de la fréquence de stimulation dans le groupe contrôle (A) et le groupe surcharge compensatoire (B). À la fin des 10 s de stimulation continue, dans le groupe contrôle, l'amplitude du EPP à 25 Hz est significativement différente de celle à 50 Hz. Dans le groupe surcharge compensatoire, la différence de grandeur d'EPP est significative entre les trois fréquences de stimulation. \* Significativement différent de 25 Hz, dans les groupes respectifs  $P < 0.01$ . # Différent de manière significative de 50 Hz,  $P < 0.01$ . n = 15 (25 Hz), 14 (50 et 75 Hz) dans le groupe contrôle et 18 (25 Hz), 16 (50 Hz) et 14 (75 Hz) dans le groupe surcharge compensatoire.....62

## Abréviations

ACh: acétylcholine

AChE: acétylcholinestérase

AChR : récepteur d'ACh

Ca<sup>2+</sup> : ion de calcium

Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> : ion calcique libre intracellulaire

CAT : choline-acétyltransférase

CGRP : peptide lié au gène de calcitonin

Ctrl : contrôle

EDL : long extenseur des orteils

EPP : potentiel de la plaque motrice

GDP: guanine di-phosphate

GTP: guanine tri-phosphate

MEPP : potentiel miniature de la plaque motrice

Mg<sup>2+</sup> : ion de magnésium

Na<sup>+</sup> : ion de sodium

N-CAM : molécule d'adhérence neurale

NMJ : jonction neuromusculaire

NSF : facteur sensible au N-ethylmaleimide

Ovrd : surcharge

QC : quantité d'ACh libérée par simulation; contenu quantique

RMP : potentiel membranaire de repos

SOL : soléaire

VGCC : canaux calciques voltage-dépendants

VGNC : canaux sodiques voltage-dépendants

## Remerciements

Premièrement, je tiens à exprimer ma gratitude envers Phillip Gardiner, qui a dirigé mon travail. Son intérêt pour la recherche m'a poussé à me dépasser.

Je suis très reconnaissant envers Patrice Desaulniers pour avoir mis à profit ses connaissances pour la réalisation de mon projet de recherche.

J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance envers mes parents, Argaw Wari et Aster Assefa, pour m'avoir offert la possibilité de réaliser ce mémoire. Leur dévouement et leur support inconditionnel tout au long de mon cheminement est digne de mention. J'aimerais également remercier : Eleni Assefa et Behebret Argaw pour leur soutien et leur encouragement et Dagnachew Argaw pour ses conseils et son aide au niveau de la technologie de l'information.

Finalement, je tiens à remercier Stéphanie Dauphin pour son amour indéfectible, son soutien dans les moments difficiles et sa patience durant les longues journées d'expériences dans la « Chambre Faraday ».

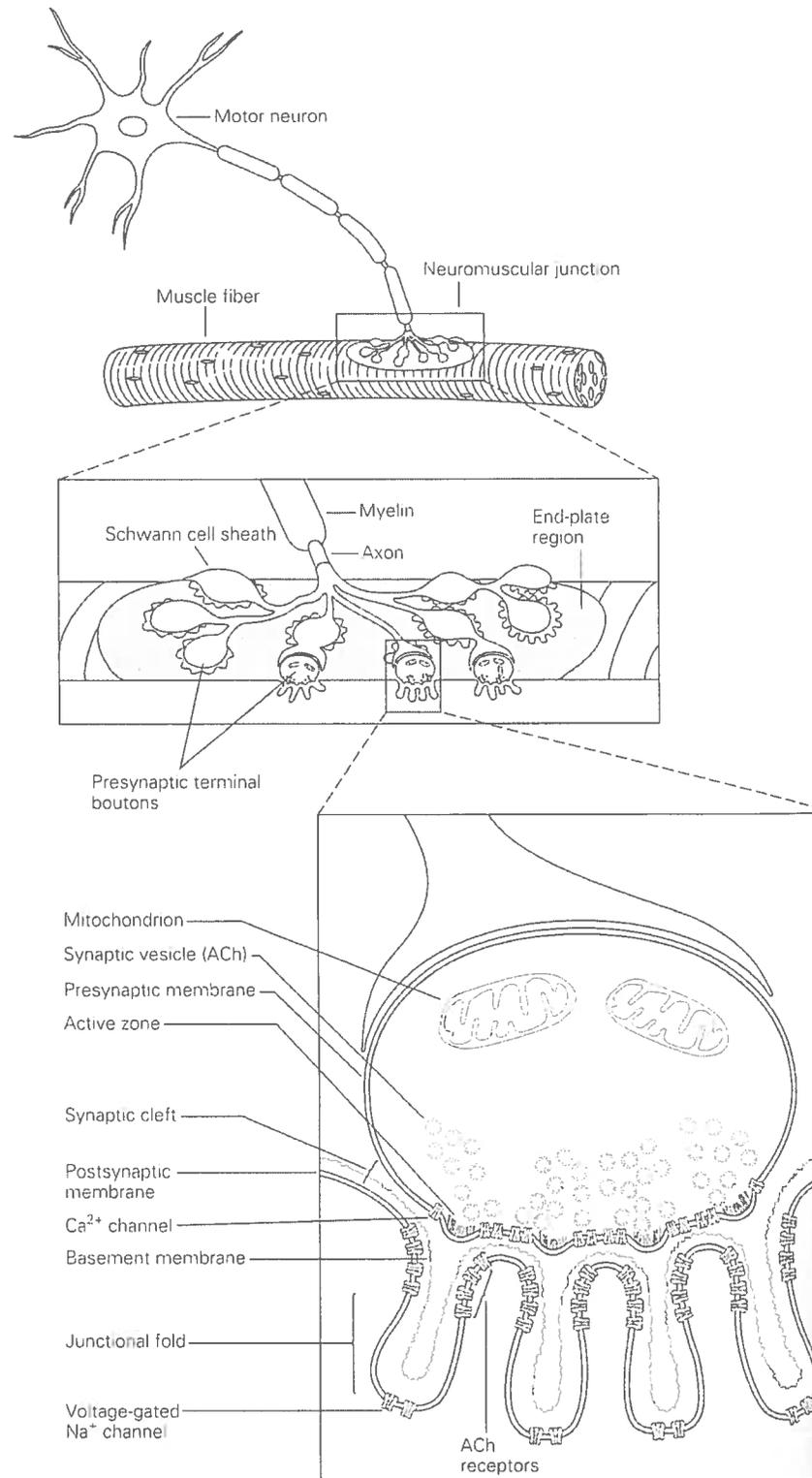
## **CHAPITRE 1**

### **REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1. LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE ET LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE

Chez les mammifères, les cellules des muscles squelettiques sont directement stimulées par les neurones moteurs dont le corps cellulaire se trouve dans la substance grise de la moelle épinière. Les axones myélinisés de ces neurones passent dans les racines antérieures des nerfs rachidiens, se regroupent par la suite en nerfs, avant d'atteindre les muscles squelettiques. À son entrée dans le muscle, le nerf moteur est démyélinisé et l'axone de chaque neurone moteur présente une multitude de ramifications, chacune de ses terminaisons axonales constituant une jonction neuromusculaire. Chaque fibre musculaire est innervée de façon singulière par une branche d'un axone moteur. Par contre, un axone moteur innerve plusieurs fibres musculaires (Kandel et al. 2000).

La jonction neuromusculaire joue un rôle crucial dans la stimulation des fibres musculaires. Ainsi, lorsque le nerf moteur est stimulé, celui-ci transmet cette stimulation aux fibres musculaires par le biais de neurotransmetteurs. De manière générale, tel qu'indiqué à la Figure 1, la jonction neuromusculaire possède trois grandes composantes : une structure pré- et post-synaptique et une fente qui les sépare. La structure pré-synaptique est formée par la terminaison du nerf moteur et les protéines qu'elle renferme. La partie du sarcolemme qui fait face à cette terminaison nerveuse est appelée plaque motrice et forme la structure post-synaptique. Finalement, la fente synaptique qui sépare la plaque motrice de la terminaison nerveuse contient les protéines nécessaires afin de maintenir l'intégrité de la transmission synaptique.



**Figure 1. La jonction neuromusculaire**

## **1.1 Organisation fonctionnelle de la jonction neuromusculaire**

### Structures pré-synaptiques

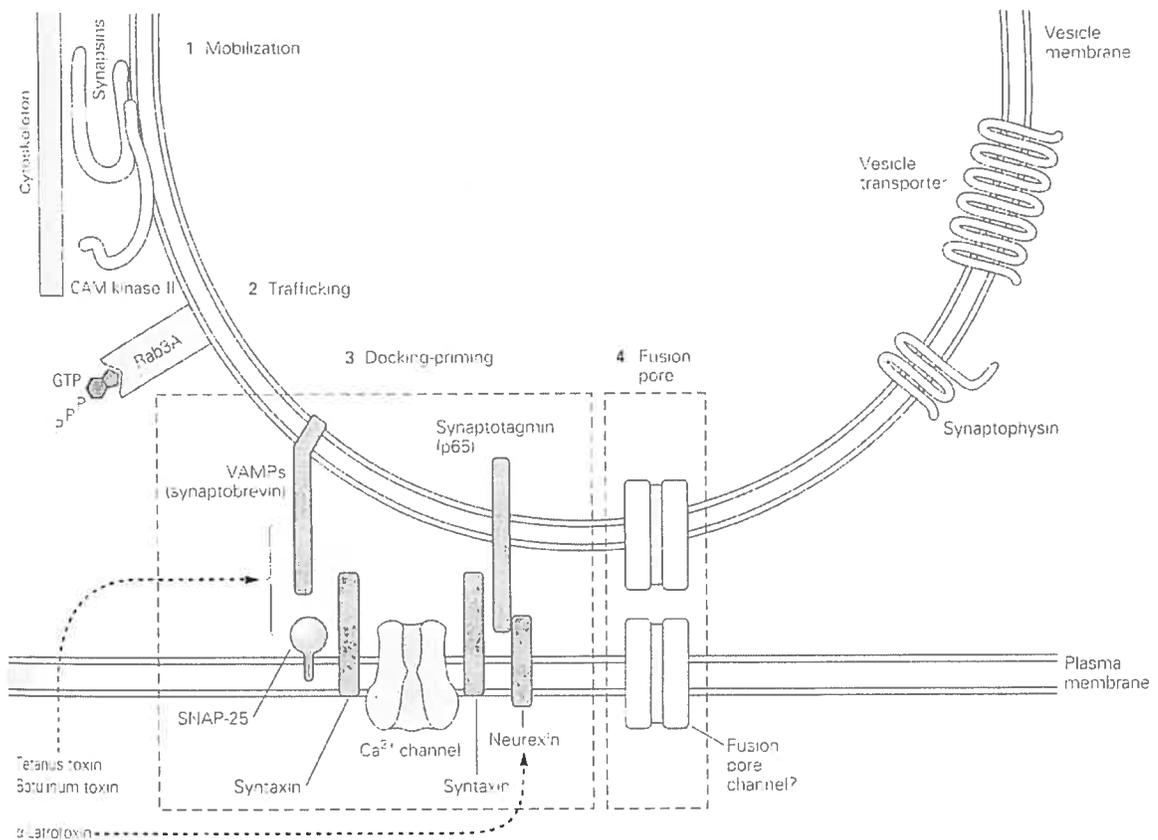
Au niveau ultra-structurel, chaque terminaison axonale est constituée de plusieurs composantes dont des mitochondries, des vésicules synaptiques, des protéines filamenteuses et des canaux ioniques (Hille 1992; Sanes et Lichtman 1999; Kandel et al. 2000). La partie de l'axone moteur qui précède la terminaison nerveuse contient relativement peu de vésicules synaptiques et de mitochondries comparée à la terminaison nerveuse.

Les vésicules synaptiques contenant l'acétylcholine (ACh), neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire, se regroupent, en partie, autour d'un endroit bien défini de la membrane pré-synaptique appelé « active zone » ou zone active, où a lieu la fusion entre les vésicules et la membrane pré-synaptique permettant de libérer l'ACh (Sanes et Lichtman 1999). La zone active, tel qu'indiqué à la Figure 2, est constituée de plusieurs protéines intra-membranaires, parmi lesquelles on retrouve : les canaux calciques et les protéines réceptrices intégrées à la membrane pré-synaptique SNAP-25 et la syntaxine aussi connue sous le nom de t-SNARES (Macleod et al. 1999; Kandel et al. 2000).

### Sécrétion de neurotransmetteurs

La première étape de la sécrétion des neurotransmetteurs est l'activation de la terminaison pré-synaptique. Cette dernière est stimulée par la propagation d'un potentiel d'action à la terminaison nerveuse.

Lorsque le potentiel d'action rejoint la terminaison pré-synaptique, celui-ci provoque la dépolarisation de la membrane pré-synaptique. Cette dépolarisation agit sur une multitude de canaux ioniques voltage-dépendants tels que les canaux sodiques, les canaux calciques, les canaux potassiques, les canaux chloriques et les canaux non-sélectifs. Cette dépolarisation augmente de façon significative la probabilité que ces canaux soient dans une conformation ouverte (Hille 1992). Ce qui suscite un intérêt particulier à la jonction neuromusculaire est l'activation des canaux calciques voltage-dépendants (VGCC).



**Figure 2. Protéines pré-synaptiques impliquées dans la transmission synaptique**

En effet, leur ouverture entraîne l'entrée d'ions calciques ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans la terminaison nerveuse. Ainsi, l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  libres ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) déclenche une cascade d'événements encore mal connus qui provoquerait la sécrétion de neurotransmetteurs (Figure 2). Cette augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}_i]$  entraîne l'attachement des ions calciques à des protéines intra-membranaires sensibles au calcium. L'identification des protéines senseurs de calcium à la terminaison pré-synaptique n'est pas entièrement complétée. Cependant, la synaptotagmine semble être l'un des sites principaux d'ancrage pour le  $\text{Ca}^{2+}_i$  (Meir et al. 1999). La synaptotagmine est une protéine intégrée à la membrane de la vésicule synaptique possédant un domaine C2 cytoplasmique qui interagit avec les phospholipides par l'intermédiaire d'ions calciques (Davletov et Sudhof 1994; Kandel et al. 2000). Ceci suggère l'insertion de synaptotagmines dans la membrane phospholipidique pré-synaptique à la suite de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, plusieurs études signalent une interaction entre la synaptotagmine et la syntaxine par le biais du  $\text{Ca}^{2+}_i$  dans le déclenchement de la sécrétion de neurotransmetteurs (Chapman et al. 1995; Chapman et al. 1996). Ce qui demeure toutefois incontestable est la nécessité de l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}_i]$  pour le déclenchement du processus d'exocytose des neurotransmetteurs.

Les vésicules synaptiques de la terminaison nerveuse sont entreposées dans au moins deux pools bien distincts. Une partie des vésicules sont ancrées, tel que mentionné précédemment, à la zone active formant ainsi un peloton de tête prêt pour la fusion à la membrane pré-synaptique (Betz et Angleson 1998; Wu et Betz 1998). L'autre partie est liée, non loin de la zone active, à un réseau de filaments cytosquelettiques par le biais d'une famille de protéines appelées synapsines (Wu et

Betz 1998). Ces protéines servent de substrats aux kinases cAMP-dépendante et  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline dépendantes. Lorsque la synapsine n'est pas phosphorylée, celle-ci immobilise les vésicules synaptiques en les liant aux structures cytosquelettiques. Lors de la dépolarisation de la terminaison nerveuse et de l'entrée des ions calciques, la synapsine est phosphorylée par la protéine kinase  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-dépendante (Kandel et al. 2000; Fon et Edwards 2001). Ceci libère donc les vésicules synaptiques leur permettant de se diriger vers le site de sécrétion. Une fois libérées ces dernières sont acheminées vers la zone active. Cette mobilisation vers les sites d'exocytose semble être assurée par les protéines de la famille rab (Fon et Edwards 2001). Rab3a et rab3c sont les isoformes prédominantes à la terminaison nerveuse pré-synaptique. On retrouve ces protéines sous deux états : solubles dans le cytoplasme ou liées à la membrane vésiculaire. Lorsque rab3a est lié à une molécule de GTP, on le retrouve associé à une vésicule synaptique. Il semblerait que lorsque la molécule de GTP est hydrolysée en GDP, la vésicule synaptique devient ancrée de façon irréversible à la membrane pré-synaptique (Fon et Edwards 2001). Lorsque la vésicule se fusionne à la membrane, le complexe rab3a-GDP est libéré de la vésicule synaptique.

L'étape qui suit, dans la sécrétion des neurotransmetteurs, est la fusion des vésicules synaptiques à la membrane plasmique (Figure 2). Depuis déjà quelques années, on a identifié des protéines associées aux synapses qui forment ensemble un complexe stable appelé SNARE (récepteur-SNAP). Ce complexe est composé du SNARE, qui lui est associé aux vésicules (v-SNARE), à la synaptobrevine (VAMP), et à deux SNARE cibles ou de la membrane plasmique (t-SNARE) : SNAP-25 et syntaxine (Kandel et al. 2000). Les protéines v- et t-SNARE forment, ensemble, un

complexe très stable qui se dissocie difficilement. Le rôle précis du complexe SNARE ainsi que le mécanisme par lequel la fusion de la vésicule synaptique à la membrane pré-synaptique est entreprise ne sont pas encore élucidés. Le tableau 1 présente un résumé des protéines impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques.

Il a été démontré que l'ATPase, le "N-ethylmaleimide-sensitive factor" (NSF) et la protéine associée à NSF  $\alpha$ -SNAP (aucun lien avec SNAP-25) interagissent avec le complexe SNARE. En effet, le NSF et  $\alpha$ -SNAP semblent impliqués dans le recyclage des vésicules synaptiques et ce, à une étape post-ancrage des vésicules. NSF et  $\alpha$ -SNAP accompliraient cette tâche en désassemblant ou du moins en réorganisant le complexe v-et t-SNARE, maintenant ainsi le pool de réserve de vésicules synaptiques (Tolar et Pallanck 1998).

Les vésicules synaptiques peuvent être recyclées de plusieurs façons. Au lieu d'une fusion complète avec la membrane pré-synaptique, la vésicule synaptique peut former un pore transitoire avec la membrane plasmique afin de libérer l'ACh, par diffusion, dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme est connu sous le nom de "Kiss-and-run exocytosis". Cependant, ce mécanisme n'a pas encore été démontré de façon directe sur les vésicules synaptiques (Fon et Edwards 2001).

Après la libération d'ACh, les vésicules synaptiques vides fusionnées à la membrane pré-synaptique sont récupérées par endocytose. Ce processus est initié par la couche de clathrine qui se forme sur les vésicules sujettes à l'endocytose ainsi que par sa protéine adaptrice AP-2 (Fon et Edwards 2001).

**Tableau 1.** Protéines impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques

	Protéines	Fonctions
Ancrage	Synapsine	Phosphoprotéine qui lie les vésicules synaptiques au cytosquelette
Fusion	Synaptobrevine	v-SNARE
	SNAP-25	t-SNARE
	Syntaxine	t-SNARE
	NSF	ATPase, dissocie le complexe SNARE
	$\alpha$ -SNAP	Se lie à la protéine NSF
Trafique	Rab3a	GTPase, régule l'ancrage de la vésicule synaptique
	Canaux calciques	Se lie à SNAP-25 et syntaxin
	Synaptotagmine	Senseur d'ions $Ca^{2+}$
Endocytose	Clathrine	Couvre et provoque l'invagination des portions de la membrane pré-synaptic pour la formation de vésicules synaptiques
	AP-2	Recrute le clathrin pour l'endocytose

### Structures post-synaptiques et l'effet des neurotransmetteurs

La partie du sarcolemme faisant face à la terminaison nerveuse s'invagine pour former la gouttière synaptique communément appelée plaque motrice (Hille 1992; Kandel et al. 2000). Celle-ci possède de très nombreux replis, ce qui augmente la superficie de cette plaque motrice. Ces replis font directement face à la zone active de manière à maximiser la transmission neuromusculaire. On retrouve différents types de canaux ioniques et ce, à des endroits différents de ces plis jonctionnels. Les récepteurs

d'ACh (AChR) sont concentrés de façon significative aux crêtes ainsi que le long des côtés supérieurs des replis tandis que les canaux sodiques voltage-dépendants (VGNC) et les « neural adhesion molecule » (N-CAM) sont concentrés dans le creux des replis (Sanes et Lichtman 1999). Cet arrangement morphologique de la plaque motrice augmente l'efficacité de la transmission synaptique (Wood et Slater 1997).

Les molécules d'ACh libérées dans la fente synaptique diffusent rapidement vers la plaque motrice où elles se lient à l'AChR. Ces récepteurs d'ACh ne sont nul autres que des canaux ioniques activés par l'ACh (Kandel et al. 2000). Au contact avec l'ACh, ces canaux s'ouvrent laissant ainsi passer un net flux d'ions positifs à l'intérieur de la cellule. Ce courant cause la dépolarisation de la plaque motrice générant ainsi le potentiel de la plaque motrice. Si cette dépolarisation est adéquate, i.e. franchit le seuil d'activation, les VGNC qui se trouvent dans le creux des replis de la plaque sont activés provoquant ainsi l'entrée d'ions sodiques ( $\text{Na}^+$ ) à l'intérieur de la cellule. Cette dépolarisation progressive de la membrane cellulaire entraîne donc l'ouverture d'un plus grand nombre de VGNC générant en conséquence un potentiel d'action qui est acheminé le long de la fibre et initie sa contraction.

#### Fente synaptique et la terminaison de la transmission synaptique

La cellule nerveuse n'est pas en contact direct avec la fibre musculaire à la jonction neuromusculaire. En effet, ces deux cellules sont séparées par un espace appelé fente synaptique qui est large de 50-100 nm. On retrouve à l'intérieur de cette fente ainsi qu'autour de chaque cellule nerveuse et fibre musculaire, une couche de matrice extracellulaire, le « basal lamina » (Figure 1) (Sanes et Lichtman 1999). La

partie synaptique de ce « basal lamina » renferme des protéines et glycoprotéines spécifiques aux synapses qu'on ne peut retracer dans les régions non-synaptiques. Parmi ces protéines mentionnons : l'acétylcholinestérase (AChE), la laminine  $\beta 2$ , l'agrine et l'ARIA (Sanes et Lichtman 1999). Parmi ces molécules, la plus importante dans la transmission synaptique est l'AChE. En effet, celui-ci est un enzyme qui finalise rapidement l'action de l'ACh. L'AChE hydrolyse l'ACh en choline et en acide acétique, limitant ainsi son action dans le plan spatio-temporel (Hille 1992; Kandel et al. 2000).

## 1.2 Le concept de « coefficient de sûreté »

La fiabilité de la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire repose sur le fait que la quantité de neurotransmetteur sécrété par la terminaison nerveuse dépasse largement la quantité nécessaire pour générer un potentiel d'action au niveau de la fibre musculaire. Cet excès est décrit dans la littérature sous le nom de « Safety Factor » ou le coefficient de sûreté (Wood et Slater 2001). Initialement, ce concept a été développé dans un contexte où on essayait de comprendre l'initiation ainsi que la propagation des potentiels d'actions dans les axones myélinisés. Ce concept a évolué pour décrire à présent l'interaction qui existe au niveau de la transmission synaptique entre deux cellules, en occurrence, à la jonction neuromusculaire.

### Définition de coefficient de sûreté

La définition de coefficient de sûreté a été façonnée par les différents types d'expériences menées par les investigateurs. Ainsi, d'après certaines études antérieures ayant utilisé une approche pharmacologique (Chang et al. 1975; Wood et Slater 2001), le coefficient de sûreté est défini comme étant la fraction de AChR qu'on peut bloquer sans compromettre la génération d'un potentiel d'action. Cependant, d'après la majorité des études qui ont utilisé l'électrophysiologie, le coefficient de sûreté est le ratio entre l'effet des neurotransmetteurs sécrétés, à la suite d'une impulsion nerveuse, sur l'élément post-synaptique ainsi que l'effet nécessaire pour déclencher un potentiel d'action à la fibre musculaire. En présence d'une activité normale de la transmission neuromusculaire le potentiel de la plaque motrice (EPP), qui est une indication indirecte de la quantité de neurotransmetteurs sécrétés à la jonction, démontre une grande variabilité. Il est donc logique d'exprimer le coefficient de sûreté en fonction de la quantité de neurotransmetteurs sécrétés et de la quantité nécessaire pour provoquer un potentiel d'action à la fibre musculaire. La littérature définit donc le coefficient de sûreté comme étant le rapport entre la quantité d'ACh sécrétée et la quantité nécessaire pour générer un potentiel d'action (Wood et Slater 1997; Wood et Slater 2001).

### Différentes techniques utilisées pour estimer le coefficient de sûreté

Pour estimer de façon précise le coefficient de sûreté, il est nécessaire de connaître la quantité d'ACh sécrétée par impulsion nerveuse ou le contenu quantique (QC) ainsi que la quantité nécessaire pour initier un potentiel d'action. Or, il est techniquement très difficile de mesurer de manière directe la quantité de

neurotransmetteurs secrétée à la terminaison du nerf moteur. Ceci a amené les chercheurs à estimer la quantité de transmetteurs libérée en mesurant, par le biais d'enregistrements électrophysiologiques, les effets des molécules d'ACh sur l'élément post-synaptique. Cependant, pour mesurer de manière précise l'effet des neurotransmetteurs sur l'élément post-synaptique, il faut abolir le potentiel d'action de la fibre musculaire. L'abolition du potentiel d'action musculaire représente donc un défi majeur dans la détermination du coefficient de sûreté. En effet, cette difficulté repose sur le fait que le potentiel d'action à la fibre musculaire voile le potentiel de la plaque motrice, qui est le résultat de l'action des transmetteurs, mais entraîne aussi une perturbation mécanique provenant de la contraction de la fibre. Pour contourner cet obstacle, les chercheurs ont développé deux approches différentes pour abolir la contraction musculaire : en agissant sur l'élément pré-synaptique ou en intervenant sur l'élément post-synaptique (Wood et Slater 2001). Une discussion brève des avantages et des limites de ces deux approches est présentée à la section suivante.

#### Intervention pré-synaptique

Jusqu'à récemment, les études électrophysiologiques étaient effectuées en préparation *in-vitro*, au cours de laquelle les muscles ainsi que les nerfs qui les innervent sont minutieusement disséqués et mis en immersion dans un fluide qui possède les mêmes caractéristiques physiologiques que leur environnement naturel. En manipulant les concentrations d'ions clés ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) pour la libération des transmetteurs de ce fluide, on peut influencer la quantité de neurotransmetteurs libérés. Ainsi, en diminuant le ratio de  $\text{Ca}^{2+}$  sur  $\text{Mg}^{2+}$ , on limite la quantité de transmetteurs

secrétés à un niveau sous-seuil supprimant de la sorte la génération de potentiel d'action au niveau de la fibre musculaire. Le désavantage majeur de cette approche est qu'elle ne permet pas de mesurer l'activité pré-synaptique en sa totalité (Wood et Slater 2001).

#### Intervention post-synaptique

Une approche alternative pour supprimer la contraction musculaire est la manipulation des éléments post-synaptiques. La d-turbocurrarine affecte la transmission neuromusculaire en bloquant les AChR (Meir et al. 1999). Pour éliminer toute contraction musculaire, il faut bloquer 80% des AChR, rendant de ce fait possible l'enregistrement d'EPP. Cependant, l'utilisation de cette méthode entraîne deux difficultés majeures dans l'interprétation des données. Premièrement, la d-turbocurrarine occasionne une diminution considérable de l'amplitude du EPP et une réduction des potentiels miniatures de la plaque motrice (MEPP) à un niveau non-mesurable, empêchant donc une estimation précise de la quantité de quanta libérée par la terminaison nerveuse. Deuxièmement, cette toxine peut réduire la quantité de neurotransmetteurs secrétés en interagissant avec des auto-récepteurs nicotiques se trouvant à la membrane pré-synaptique (Wood et Slater 2001).

Une autre méthode utilisée dans plusieurs études est l'endommagement de la fibre musculaire par une coupure à un endroit quelque peu éloigné de la jonction neuromusculaire. Ceci a pour but de diminuer le potentiel membranaire de repos à environ  $-40$  mV (Wood et Slater 2001). Par conséquent, les VGNC sont inactivés, supprimant toute génération de potentiel d'action. Cette méthode comporte aussi plusieurs désavantages. La réduction du potentiel membranaire de repos ainsi que de la

résistance électrique de la fibre musculaire affectent les EPPs et les MEPPs, les rendant difficiles pour un enregistrement électrophysiologique. De plus, un dommage important de la fibre a pour conséquence une fuite d'ions potassiques dans le milieu extracellulaire. Ceci peut entraîner la dépolarisation des portions intramusculaires des fibres nerveuses, empêchant ainsi le potentiel d'action d'atteindre la terminaison présynaptique et compromettant une transmission synaptique normale.

Récemment, la découverte de la conotoxine a permis une étude approfondie de la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire. La  $\mu$ -conotoxine GIIIB, isolée à partir du venin de l'escargot *Conus geographus*, bloque de manière sélective les canaux sodiques musculaires sans affecter les canaux sodiques du nerf moteur, freinant ainsi la génération de potentiel d'action musculaire (Cruz et al. 1985; Li et al. 2000). Cette action discriminatoire de la conotoxine vis-à-vis des canaux musculaires permet donc l'enregistrement d'EPPs en leur intégralité. À une concentration élevée, il a été démontré que la conotoxine affecte le nerf moteur. Cependant, à faible concentration, l'usage de  $\mu$ -conotoxine pour bloquer le potentiel d'action musculaire demeure la meilleure façon d'étudier l'EPP en son intégralité à la plaque motrice (Wood et Slater 2001).

### Facteurs influençant le coefficient de sûreté

Le coefficient de sûreté pour la transmission synaptique est modulé par plusieurs facteurs qui caractérisent les structures pré- et post-synaptiques. Ces facteurs modulateurs peuvent être d'ordre structurel, donc relativement stables dans le temps, ou être des facteurs dynamiques reflétant des changements physiologiques rapides.

#### Facteurs pré-synaptiques

La quantité de neurotransmetteurs libérés est directement liée aux dimensions de la terminaison nerveuse du nerf moteur (Wood et Slater 2001). De manière générale, plus la terminaison du nerf moteur est large, plus la quantité d'ACh secrétée sera importante et inversement, plus la terminaison est petite, moins grande sera la quantité de neurotransmetteurs libérée. Cette relation structurelle sous-entend que le nombre de quanta libéré par unité de surface de la membrane pré-synaptique est relativement constant et se situe entre 0.15 et 0.30 quanta /  $\mu\text{m}^2$ . Ces valeurs ont été observées à la jonction neuromusculaire de différentes espèces telles que la grenouille, la poule, la souris, le rat et l'humain (Wood et Slater 2001). Il semble que les quanta libérés dépendent de la densité des zones actives, et par conséquent, de la concentration de VGCC. Chez les vertébrés, la densité de la zone active est approximativement de 2.5 zones actives par  $\mu\text{m}^2$  (Wood et Slater 2001). Lorsque l'on considère ces différentes valeurs, elles semblent indiquer que pour un stimulus isolé, que seulement 10% des zones actives libèrent les vésicules synaptiques qui se regroupent autour d'elles. Ceci suppose évidemment la possibilité d'augmenter de manière significative la quantité de quanta libérée par unité de surface.

Un autre facteur pré-synaptique qui influence le quanta est le patron d'activité de la jonction. Ainsi, des études du contenu quantique durant des trains de stimulations continus (100 Hz) *in vitro*, ont mis en évidence deux comportements distincts des EPP (Wood et Slater 2001). Ainsi, lorsque stimulé à 100 Hz, on observe une augmentation initiale (facilitation) de la quantité de transmetteurs libérés suivie par une diminution (dépression) de cette dernière. Cette facilitation semble être le résultat d'une accumulation de  $Ca^{2+}_i$  à l'intérieur de la terminaison nerveuse.

À l'opposé de cette potentiation, la dépression de la quantité de neurotransmetteurs libérés semble être le résultat d'une diminution du nombre de vésicules synaptiques ancrées à la zone active. Selon le modèle proposé par Wu et Betz (1998), les vésicules synaptiques résident dans trois pools bien distincts; un premier pool, prompt à être libéré, est ancré à la zone active, un deuxième pool, communément appelé pool de réserve, est situé à l'écart de la zone active et est lié au cytosquelette par le biais de la protéine synapsine (Hilfiker et al. 1999) et le troisième pool, constitué de vésicules synaptiques fusionnées à la membrane pré-synaptique, est directement exposé au milieu extra-cellulaire. Lorsque la jonction est activée, la dépression quasi-instantanée qui en résulte serait causée par la diminution du nombre de vésicules ancrées limitant ainsi la quantité de neurotransmetteurs sécrétés. Cependant, cette dépression abrupte est ralentie par la mobilisation de vésicule du pool de réserve vers les sites de sécrétion, en l'occurrence la zone active.

De plus en plus d'études semblent suggérer la sensibilité de la libération synaptique à différents facteurs physiologiques, modulant ainsi à la minute et même à la seconde près le contenu quantique. Ces facteurs physiologiques modulent la sécrétion

synaptique en activant une variété de récepteurs tels que les récepteurs cholinergiques, purinergiques et adrénergiques se trouvant à la membrane pré-synaptique ou dans les cellules de schwann de la jonction neuromusculaire (Wood et Slater 2001).

#### Facteurs post-synaptiques

L'effet des transmetteurs sur la composante post-synaptique de la jonction est modulé par l'AChE, la densité et la distribution de AChR, la concentration de VGSC et le diamètre de la fibre musculaire innervée. Lorsque les vésicules sont libérées de la terminaison nerveuse, elles doivent traverser le « basal lamina », une matrice extracellulaire renfermant l'AChE, avant de se lier aux AChR. Grâce à la vitesse de cette réaction, la majorité des molécules d'ACh réussissent à s'attacher aux récepteurs sans être hydrolysée par l'AChE. Cependant, une fois dissociées des récepteurs, ces molécules sont rapidement désactivées par l'AChE freinant ainsi leurs actions. Ce processus prévient la molécule d'ACh de se lier à un deuxième AChR se trouvant dans le voisinage. Par conséquent, l'AChE a pour fonction de limiter l'effet spatio-temporel de chaque quanta, permettant une activation à haute fréquence du muscle.

La densité ainsi que la distribution de AChR influence l'effet des neurotransmetteurs sur la composante post-synaptique de la jonction. La concentration de AChR présente dans la portion de la membrane post-synaptique, à l'opposé du site d'exocytose de la terminaison pré-synaptique, est d'environ 10 000 par  $\mu\text{m}^2$  (Wood et Slater 2001). Les molécules d'ACh formant le quanta parcourent à peine 0.3 – 0.5  $\mu\text{m}$  avant de se lier aux AChR. Cette proximité entre le site de libération et les récepteurs ainsi que la rapidité de la liaison saturent les AChR de la membrane post-synaptique.

La densité d'AChR est, de manière générale, supposée être similaire à toutes les jonctions neuromusculaires. Il faut toutefois souligner l'absence d'études démontrant de manière explicite cette uniformité. La densité et la distribution d'AChR peuvent être modifiées à la suite de situations pathologiques.

La membrane post-synaptique comporte également une forte concentration de VGSC. Ces derniers sont localisés dans les creux des replis de la membrane, dans une proportion de 10 pour 1, comparés à leur localisation dans la membrane à l'écart de la jonction. Cette concentration spatiale de VGSC adjacente à des canaux ioniques activés par l'ACh diminue de façon significative le seuil requis pour générer un potentiel d'action. En conséquence, l'ouverture des VGSC à la suite de la dépolarisation de la plaque motrice amplifie l'effet des neurotransmetteurs provoquant l'augmentation du coefficient de sûreté et assurant ainsi une transmission efficace (Wood et Slater 1997).

Le diamètre de la fibre musculaire varie selon son usage. Cette variation affecte l'effet des neurotransmetteurs sur la composante post-synaptique de la jonction. En effet, la dépolarisation causée par l'influx de courant dans la fibre musculaire est proportionnelle à la résistance d'entrée de la cellule qui est inversement reliée au diamètre de la fibre musculaire (Katz et Thesleff 1957). La conséquence de cette relation structurelle est le fait que les fibres musculaires petites, comparées aux fibres larges, requièrent moins de quanta pour franchir le seuil d'activation.

### Jonction neuromusculaire et types de fibres

Plusieurs études ont démontré la présence d'une variabilité morphologique de la jonction neuromusculaire entre les différents types de fibres. Padykula et Gauthier (1970) ont été parmi les premiers à douter de l'uniformité de cette jonction. Ces deux chercheurs ont étudié certaines caractéristiques de la jonction telles que : la forme et l'aire de la terminaison axonale, la distribution et l'espacement des replis de la plaque motrice, le nombre de vésicules synaptiques et ce, au niveau des différents types de fibres. Ils ont constaté que la jonction neuromusculaire de chaque type de fibre avait des caractéristiques uniques. Ils ont rapporté les points suivants : 1) les synapses au niveau des fibres rouges (majoritairement des fibres de type I) étaient elliptiques et plus petites que celles des fibres blanches (majoritairement des fibres de type IIX), 2) les replis de la plaque motrice des fibres rouges étaient plus courts et moins nombreux que ceux des fibres blanches, 3) l'axolème des fibres blanches refermait beaucoup plus de vésicules synaptiques que celui des fibres rouges (Padykula et Gauthier 1970).

Ogata et Yamaska (1985), en utilisant un microscope à balayage électronique, ont rapporté des variations dans la jonction en fonction des types de fibres. Leurs résultats ont démontré que la gouttière synaptique des fibres lentes est plus petite et plus ovale que celle des fibres rapides. Ils ont aussi démontré que la plaque motrice des fibres rapides possédait un plus grand nombre de replis comparée à celle des fibres lentes. Il est évident que ces résultats confirment ceux rapportés par Padykula et Gauthier (1970).

Cependant, l'étude d'Oki et al (1990) concernant la plaque motrice des fibres rapides, comme celles du long extenseur des doigts (EDL), et des fibres lentes comme

celles du soléaire (SOL) a fourni des résultats qui entrent en conflit avec ceux rapportés par Ogata et Yamaska (1985). Oki et al. (1990) ont trouvé que la largeur de la jonction neuromusculaire des fibres rapides était similaire à celle des fibres lentes. Selon Deschenes et al. (1994), cette inconsistance est due au fait que l'étude d'Ogata et Yamaski (1985) a comparé les jonctions des fibres de différentes grosseurs. Or, Oki et al. (1990) ont comparé les jonctions des fibres lentes et rapides de diamètres plus ou moins similaires. Après avoir normalisé la grosseur des fibres, ces derniers ont quand même rapporté que la plaque motrice de l'EDL avait beaucoup plus de replis.

Des études plus récentes ont été menées par Prakash et al (1996) sur les différents types de fibres présentes au niveau diaphragme chez le rat. Ils ont utilisé une combinaison de techniques de coloration par immunofluorescence et de microscopie confocale pour visualiser la structure tridimensionnelle des jonctions neuromusculaires dans différents types de fibres. Une première constatation a été que les éléments post synaptiques de la jonction devenaient de plus en plus complexes en allant des fibres de type I (qui exhibent les structures les plus simples) aux fibres de types II (qui exhibent les structures les plus élaborées) (Prakash et al. 1996). Ils ont trouvé que l'aire bidimensionnelle des fibres allait en augmentant des fibres lentes (qui possédaient la superficie la plus petite) aux fibres rapides (qui avaient la superficie la plus grande). Cependant, l'aire tridimensionnelle était plus grande dans les fibres lentes que rapides. Ces variations dans la superficie bidimensionnelle et tridimensionnelle démontrent la profondeur plus prononcée des gouttières synaptiques des fibres de types I. Ces chercheurs ont également démontré que le niveau de chevauchement entre les éléments pré- et post-synaptiques était plus important au niveau des fibres lentes.

Mais existe-t-il une relation entre la jonction neuromusculaire et la grosseur de la fibre? Selon Seick et Prakash (1997), la différence de grosseur qui existe entre les différents types de fibres musculaires peut être en partie la cause des différences de grosseur qui existent entre les jonctions neuromusculaires. Pour démontrer ceci, ces chercheurs ont effectué une analyse des interrelations spatiales qui existent entre les structures des jonctions, la dimension des fibres et le type de fibre du diaphragme chez le rat. Les résultats ont montré que les fibres lentes avaient les synapses les plus petites (Seick et Prakash 1997). Cependant, lorsqu'ils ont normalisé les données de superficies bi- et tridimensionnelles en fonction du diamètre de la fibre, ils ont constaté que l'étendue de la terminaison nerveuse des fibres lentes était plus grande que celle des fibres rapides. Ces analyses plus approfondies n'ont pu établir de manière évidente les différences morphologiques qui existent entre les différents types de fibres. Ces derniers demeurent sujets à discussion.

Au point de vue physiologique, on peut observer sans équivoque une différence entre les deux types de fibres. Cette différence peut facilement être mise en évidence en déterminant la concentration de vésicules synaptiques qui existe dans les terminaisons nerveuses (Padykula et Gauthier 1970). En effet, la quantité d'ACh sécrétée par impulsion est le principal modulateur dans la transmission du potentiel d'action entre la cellule nerveuse et la fibre musculaire. On peut apprécier ces variations en observant les caractéristiques de l'EPP (Reid et al. 1999). La quantité d'ACh sécrétée dans la fente synaptique dépend de plusieurs facteurs dont la concentration de vésicules synaptiques à la terminaison nerveuse (Wood et Slater 1997). Plusieurs études ont confirmé les observations rapportées par Padykula et Gauthier (1970) voulant que la

terminaison des fibres rapides aient une plus grande agglomération de vésicules synaptiques (Reid et al. 1999). Ceci a évidemment pour conséquence un plus grand QC dans les fibres rapides en comparaison aux fibres lentes. Gertler et Robbins (1978) ont comparé la physiologie de la transmission neuromusculaire des fibres musculaires majoritairement lentes (SOL) et des fibres majoritairement rapides (EDL) chez le rat. Leur étude a abouti à deux constatations majeures. Premièrement, le QC initial (dès la première stimulation) et les suivants étaient plus importants dans les jonctions des fibres rapides que lentes et ce, à différentes fréquences (5, 10, 20 et 40 Hz) de stimulation. Deuxièmement, durant les stimulations, le QC des fibres EDL diminuait avec une pente beaucoup plus prononcée, tandis que les fibres SOL ont maintenu un QC qui diminuait moins rapidement.

Reid et al. (1999) ont étudié la dynamique des vésicules synaptiques entre les fibres lentes et rapides. Ces derniers ont observé les mêmes résultats que Gertler et Robbins (1978) soit : une plus grande amplitude de l'EPP, mais aussi une diminution plus prononcée de celui-ci lors de stimulations continues au niveau des fibres rapides. De plus, les terminaisons des fibres lentes ont démontré une amplitude plus basse (un QC moins élevé) et une diminution moins prononcée de l'amplitude de l'EPP durant les stimulations continues. Étant donné que l'amplitude des MEPP est restée constante, la diminution de l'amplitude du EPP peut être expliquée par une diminution du nombre de vésicules synaptiques libérées par impulsion nerveuse. Reid et al. (1999) ont mentionné que le pool de vésicules présent dans les terminaisons des fibres rapides n'est que 70% du pool de vésicules des fibres lentes. En plus du nombre important de vésicules libérées, le nombre peu élevé de vésicules qui composent le pool justifie

cette diminution rapide. Il faut souligner qu'une fraction importante de ce pool est disponible pour une libération immédiate lors de stimulations de hautes fréquences et de courtes durées. Par contre, la diminution moins prononcée du EPP démontre la facilité de la jonction de la fibre lente à garder un nombre plus ou moins constant de vésicules libérées par impulsion. Selon Reid et al. (1999), il semble que ces deux types de terminaisons nerveuses sont adaptées en fonction de leurs demandes fonctionnelles. Ainsi, les synapses des fibres rapides sont mieux conçues pour une libération phasique tandis que celles des fibres lentes sont accommodées pour une activité tonique.

## **2. RÔLE DE L'EXERCICE DANS LA MODULATION DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE**

### **2.1 Effet de l'exercice sur les paramètres morphologiques de la jonction neuromusculaire**

Chez les mammifères, la jonction neuromusculaire est une structure qui est soumise, de façon perpétuelle, à un réarrangement morphologique et physiologique. Ces changements sont causés par plusieurs facteurs dont le vieillissement (Rosenheimer 1985; Andonian et Fahim 1988), la dénervation (Sieck et Prakash 1997), le stress (Rosenheimer 1985), l'inactivité (Wernig et al. 1984) et l'exercice (Deschenes et al. 1993). Selon Roelevelled et Sandberg (1998), ces modifications synaptiques sont caractérisées par une excroissance, un bourgeonnement, une rétraction et une dégénération des terminaisons nerveuses. De plus, ces changements sont plus fréquents au niveau des jonctions neuromusculaires âgées (Roelevelled et al. 1998).

En effet, Prakash et Seick (1998) ont étudié l'effet de l'âge sur la jonction des différents types de fibres du diaphragme. En général, ils ont rapporté que les synapses compactes des fibres lentes ont exhibé des changements minimaux tandis que les synapses plus complexes des fibres rapides ont montré des modifications plus significatives. D'après les résultats qu'ils ont obtenus, le vieillissement est associé à une augmentation de la superficie bi et tridimensionnelle de la plaque motrice des fibres rapides. Ils proposent que cette modification de la plaque est la conséquence de son arborisation et des changements de la gouttière synaptique.

La dénervation et l'inactivité physique ont également été associés à une diminution des capacités fonctionnelles de la jonction. Des études ont rapporté une augmentation des AChRs distribués de façon aléatoire le long de la fibre musculaire (Deschenes et al. 1994).

Par ailleurs, il a été démontré, dans plusieurs études, que l'activité physique pouvait moduler la morphologie de la jonction neuromusculaire (Tableau 2). Malheureusement, il y a encore à ce jour beaucoup de controverses dans les résultats obtenus (Deschenes et al. 1994). Selon Panenic et Gardiner (1998), la raison majeure de cette confusion quant aux résultats obtenus est le manque d'un consensus sur les paramètres morphologiques à investiguer. L'utilisation de paramètres morphologiques différents d'une étude à l'autre a pour effet de compliquer la compréhension, d'un point de vue physiologique, et la signification de ces adaptations morphologiques. La superficie de la terminaison nerveuse, le périmètre, la longueur ainsi que le nombre de branches sont parmi les paramètres utilisés pour décrire les changements.

Dans leur étude, Andonian et Fahim (1988) ont constaté que l'entraînement en endurance augmentait l'aire de la jonction neuromusculaire des muscles EDL et SOL. La magnitude de cette adaptation a été plus importante dans les fibres du EDL, suggérant une variabilité dans l'adaptation entre les deux types de fibres. Il apparaît également, d'après l'étude de Rosenheimer (1985), que les modifications causées par l'exercice en endurance ont pour conséquence d'opposer les diminutions des branches ainsi que du bourgeonnement causé par le vieillissement. D'ailleurs, Tomas et al. (1989) ont observé que l'entraînement en endurance causait une augmentation de la grosseur et de la complexité de la jonction chez le rat adulte, mais aussi que l'exercice

avait un effet contraire sur les synapses de rat plus jeune (Tomas et al. 1989). Le tableau qui suit présente un résumé des changements morphologiques de la jonction neuromusculaire résultant de l'activité physique.

**Tableau 2.** Changements morphologiques de la jonction neuromusculaire résultant de l'activité physique

Références	Stimulus	Effets
Andonian & Fahim (1988)	Course sur tapis roulant	↑ de l'aire de la terminaison nerveuse, nombre de branche
Banks et al. (1991)	Surcharge compensatoire	↑ de l'aire de la composante post-synaptique de la plaque motrice ↓ du ratio entre la plaque motrice et la fibre musculaire
Deschenes et al. (1993)	Course sur tapis roulant	↑ de l'aire et de la complexité synaptique de la plaque motrice
Tomas et al. (1989)	Course sur tapis roulant	↓ de la longueur de la terminaison nerveuse et du nombre de branche
Waerhaug et al. (1992)	Course sur tapis roulant	↑ de la longueur et de l'aire de la terminaison nerveuse

Deschenes et al. (1993) ont démontré que l'intensité de l'exercice avait une influence sur la morphologie. Ainsi, l'exercice à haute et à faible intensité a eu pour effet d'augmenter l'aire de la jonction neuromusculaire. Cependant, le groupe de rats entraînés à une intensité élevée a démontré une adaptation plus marquée. De plus, Deschenes et al. (1993) ont rapporté que l'hypertrophie de la jonction neuromusculaire

était indépendante de l'hypertrophie des fibres musculaires. Ils concluent en suggérant que les mécanismes par lesquels l'exercice cause la croissance de la jonction sont différents des mécanismes de croissance observés durant le développement du muscle. De plus, une surcharge compensatoire du plantaire a résulté, dès la troisième semaine, en une hypertrophie de 100 % des fibres musculaires et une augmentation de 25 % de l'aire de la plaque motrice (Banks et al. 1991).

Les mécanismes responsables des changements morphologiques causés par l'exercice n'ont pas encore été identifiés. Cependant, les travaux de Waerhaug et al (1992) et Waerhaug et Lomo (1994), suggèrent que le nerf moteur joue un rôle modulateur. En effet, dans leur étude publiée en 1992, Waerhaug et al. ont rapporté que l'entraînement en endurance causait : 1) une augmentation de la superficie absolue de la terminaison nerveuse dans le muscle soléaire; 2) une diminution du diamètre des fibres musculaires EDL; 3) une diminution de la densité de la terminaison nerveuse EDL et non de celle du SOL. Ils expliquent la diminution du diamètre de la fibre musculaire sans affecter l'aire de la terminaison comme étant un effet de l'entraînement. Ce changement morphologique augmente évidemment le ratio entre l'aire de la terminaison et le diamètre de la fibre. Ceci est une adaptation due à une utilisation fréquente de la jonction (Waerhaug et al. 1992). Ils ont de plus mentionné des résultats obtenus antérieurement qui démontrent une diminution de la densité de la terminaison nerveuse avec stimulation chronique (10 Hz) des nerfs moteurs innervant les fibres EDL, pour suggérer la transition de la jonction de rapide à lente. Ces résultats sous-entendent que le modèle de la fréquence de décharges du motoneurone influence la morphologie de la jonction neuromusculaire. Des travaux plus récents de Waerhaug et Lomo (1994) ont

démontré la contribution du nerf moteur dans la détermination des caractéristiques de la jonction. Lorsqu'ils ont innervé les fibres dénervées du soléaire avec un motoneurone rapide-fibulaire (R-FIB) et un motoneurone lent-soléaire (L-SOL), les motoneurones (R-FIB) et (L-SOL) ont formé des jonctions différentes. En effet, les nerfs R-FIB ont formé des jonctions plus larges, élaborées et plus denses tandis que les nerfs L-SOL ont formé des jonctions plus petites et moins complexes et ce, sur les mêmes fibres musculaires du SOL (Waerhaug et Lomo 1994). Ceci souligne l'influence du type de motoneurone sur la morphologie de la jonction. Il faut souligner que le protocole de stimulation (10 Hz) n'est cependant pas physiologiquement représentatif du niveau d'activité des fibres rapides qui, à cette fréquence de décharge, ne sont pratiquement pas recrutées (Gardiner 2000). Il faut donc approfondir les recherches pour élucider les mécanismes gouvernant les adaptations morphologiques de la jonction à la suite de l'entraînement. Il convient de souligner que, pour mieux comprendre les implications physiologiques et fonctionnelles de la morphologie de la jonction, il faut créer un consensus sur les paramètres à étudier. Il va de soit que des recherches approfondies dans ce domaine s'imposent.

## **2.2 Effet de l'exercice sur les paramètres physiologiques de la jonction**

### **neuromusculaire**

Au point de vue physiologique, plusieurs études ont démontré le pouvoir modulateur de l'exercice (Tableau 3). Une revue exhaustive a été présentée par Panenic et Gardiner (1998). Les paramètres physiologiques affectés par l'exercice sont : les AChRs (Desaulniers et al. 1998), le QC (Dorlöchter et al. 1991), l'activité de la choline-

acétyltransférase (CAT) et l'AChE (Crockett et al. 1976; Jasmin et Gisiger 1990; Gisiger et al. 1991; Jasmin et al. 1991).

Les AChRs sont des glycoprotéines trans-membranaires qui sont majoritairement concentrées sur la membrane de la fibre musculaire de la jonction neuromusculaire faisant directement face à la terminaison nerveuse (Kandel et al., 1995). Ces récepteurs sont composés de cinq sous-unités chacun et forment ensemble un canal (Kandel et al. 1995). La dénervation ainsi que l'activité physique sont des facteurs qui influencent la distribution, la quantité et la demi-vie de ces récepteurs (Deschenes et al. 1994). Ces derniers auteurs ont rapporté que la dénervation a pour effet de transformer le AChR adulte, (caractérisé par une plus longue demi-vie, une haute conductance et un temps d'ouverture du canal court) en AChR embryonnaire (caractérisé par une courte demi-vie, une faible conductance et un temps d'ouverture du canal plus longue).

Récemment, Desaulniers et al. (1998) ont étudié l'effet de l'entraînement en endurance sur ces récepteurs. Ils ont rapporté que l'exercice provoquait une augmentation d'AChR synaptique tant au niveau des fibres EDL que SOL. Cette augmentation ne résulte pas en une augmentation de la densité des récepteurs car tel que mentionné plus haut on observe avec l'entraînement une variation de la superficie de la jonction. Cette augmentation est peut-être modulée par des substances neurotrophiques comme les peptides reliés aux gènes de la calcitonine, impliquée dans la synthèse d'AChR (Desaulniers et al. 1998). D'ailleurs, Deschenes et al. (1994) soulignent l'importance des ions  $Ca^{2+}$  extra-cellulaires dans la stabilisation de ces

récepteurs. Panenic et al (1998) ont rapporté que ces résultats vont à l'encontre des évidences pharmacologiques.

L'AChE joue un rôle important dans la régulation de l'ACh. L'AChE, qui est localisé dans la fente synaptique, est un enzyme qui termine l'action de l'ACh sur les AChRs en hydrolysant l'ACh (Kandel et al. 2000). AChE existe sous plusieurs formes moléculaires qui possèdent les mêmes activités catalytiques (Legay 2000). On les classe, de façon générale, en deux groupes : globulaires (formés des monomères  $G_1$ , dimère  $G_2$  ou tétramère  $G_4$  sous unité catalytique) et asymétriques (qui comprennent un ( $A_4$ ), deux ( $A_8$ ) ou trois ( $A_{12}$ ) tétramères catalytiques attachés à une structure de collagène (Fernandez et Donoso 1988)). Les différentes formes d'AChE sont synthétisées et sécrétées par des neurones, des cellules musculaires et les cellules de Schwann (Legay 2000). L'activité enzymatique, le modèle ainsi que la distribution d'AChE le long de la fente dépendent du type de fibre musculaire. En terme de formes moléculaires d'AChE, la forme  $A_8$  est généralement plus concentrée dans les fibres lentes, comparée à la forme  $A_{12}$ .  $A_8$  est pratiquement absente des fibres rapides (Legay 2000). De plus, les muscles rapides sont pourvus d'une grande quantité de  $G_4$  (Gisiger et Stephens 1982; Legay 2000). Legay (2000) rapporte que l'expression de l'AChE est régulée conjointement par le nerf et le type de fibre musculaire. D'après ce même chercheur, le nerf semble exercer un contrôle plus déterminant sur l'activité enzymatique et les formes moléculaires.

AChE démontre une capacité adaptative face à l'activité physique. Ceci a été démontré par plusieurs études dont Fernandez et Donso (1988), Gisiger et al. (1991), Jasmin et al. (1991). Les fibres rapides répondent en apportant des variations au pool

de G4, tandis que les fibres lentes ne démontrent presque aucun effet (Legay 2000). En effet, Fernandez et Donso (1988) ont étudié l'effet de l'entraînement sur la variation des formes d'AChE dans le muscle squelettique du rat. Ils ont uniquement observé une augmentation de la forme G4 et cette augmentation a été observée au niveau des fibres rapides. Ils n'ont noté aucune augmentation de G4 au niveau des fibres lentes. L'absence de la forme G4 pourrait justifier l'absence de résultats au niveau des fibres lentes. De plus, Gisiger et al. 1991 ont rapporté que la variation de G4 dépendait du type d'activité imposé aux fibres musculaires. Ils ont montré qu'une activité prédominément dynamique, où on observe un raccourcissement plus ample du muscle comme la natation, augmentait de façon significative la concentration de G4 comparé à une activité tonique, comme la course, où ils ont observé une diminution de G4. Ces changements n'ont été observés qu'au niveau des fibres rapides. Même si on ne connaît pas encore le rôle fonctionnel de ces changements, la justification de Panenic et Gardiner (1998) voulant que l'augmentation de G4 prévienne la désensibilisation, lors des stimulations à haute fréquence des récepteurs, semble raisonnable, d'autant plus que les synapses au niveau des fibres rapides ont un QC plus élevé.

Par ailleurs, l'activité physique affecte la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Dorlöchter et al. (1991) ont étudié l'effet de l'exercice sur la transmission synaptique dans l'EDL. Ils ont observé que l'entraînement en endurance a résulté en une augmentation de l'amplitude des EPPs des fibres rapides. Ils ont de plus observé qu'une stimulation chronique (10 Hz) a également entraîné une augmentation du QC. Panenic et Gardiner (1998) déduisent, de l'augmentation du QC des fibres rapides à la suite d'un entraînement en endurance et de stimulations chroniques, que la

libération de neurotransmetteurs dépend de la quantité et non du modèle d'activité musculaire. Ils avancent aussi plusieurs hypothèses pour expliquer les mécanismes responsables de cette augmentation. Une augmentation de la grosseur de la terminaison nerveuse résultant de l'entraînement pourrait être responsable de l'augmentation du QC car il a été montré par Kono et al. (1971) que l'exercice était responsable de l'augmentation de zones actives. Un autre facteur proposé est l'augmentation de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison nerveuse car cet ion régule la libération de vésicules synaptiques. De plus, une étude faite par Kang et al. (1995) a démontré que l'exercice augmentait la concentration de SNAP-25, une protéine impliquée dans l'interaction de la vésicule synaptique et la membrane synaptique de la terminaison nerveuse. Le tableau qui suit présente un résumé des changements physiologiques de la jonction neuromusculaire résultant de l'activité physique.

**Tableau 3.** Changements physiologiques résultant de l'activité physique

Références	Stimulus	Effets
Crockett et al. (1976)	Course sur tapis roulant	↑ de l'activité d'AChE, pas de changement dans l'activité de CAT
Desaulniers et al. (1998)	Course sur tapis roulant	↑ AChR
Desaulniers et al. (2001)	Course sur tapis roulant	↑ QC, ↓ de la dépression de l'EPP durant des trains de stimulus continu
Dorlochter et al. (1991)	Course en cage (wheelcage)	↑ QC, ↓ de la dépression de l'EPP durant des trains de stimulus continu
Fernandez & Donoso (1988)	Course sur tapis roulant	↑ de l'activité de G4, aucun changement dans l'activité d'AChE
Gisiger et al. (1991)	Natation	↑ de l'activité de G4 (fibres rapides), ↓ de l'activité de G4 (fibres lentes)
Jasmin & Gisiger (1990)	Course sur tapis roulant	↑ ou ↓ de l'activité totale d'AChE et ce dépendamment du muscle de la cheville
Jasmin et al. (1991)	Surcharge compensatoire	Aucun changement de l'activité totale d'AChE, ↑ de l'activité G1

La CAT est l'enzyme responsable de la synthèse de l'ACh (Kandel et al. 2000). Celui-ci est localisé dans la terminaison nerveuse. Il y a des évidences voulant que l'exercice module son activité (Crockett et al. 1976). En effet, Crocett et al. (1976) ont étudié les conséquences de l'entraînement en endurance sur l'activité de l'acétyltransférase. Ils ont observé que celle-ci augmentait mais, de façon non

significative. De plus, les études menées à ce jour ne sont pas concluantes (Panenic and Gardiner 1998).

En conclusion, la jonction neuromusculaire est probablement la synapse la plus étudiée du système nerveux. Malgré la similarité structurelle de base entre différents types de fibres, celle-ci possède des caractéristiques propres au nerf ainsi qu'à la fibre qui la compose. Ainsi, plusieurs études mentionnées auparavant ont démontré les variances qui existent entre la jonction de la fibre lente et rapide. Parmi les variations morphologiques rapportées, on retrouve généralement une différence au niveau de la superficie, des branches collatérales ainsi que de la complexité de la jonction. Il a également été démontré des différences physiologiques entre les deux fibres. Ainsi les deux types de fibres ont un QC différent. De plus la jonction neuromusculaire démontre une capacité adaptative tant au niveau morphologique que physiologique. Au point de vue morphologique, la jonction neuromusculaire a démontré une augmentation de sa superficie. On a aussi observé une augmentation du bourgeonnement de la terminaison nerveuse. Au point de vue physiologique, on a observé une augmentation du QC, de l'activité de l'AChE, de l'activité G4 et de la quantité d'AChR. Il faut signaler que certaines de ces adaptations, comme l'activité de l'AChE et G4, ont été observées de façon plus prononcée au niveau de la jonction des fibres rapides. Il est cependant clair que des études futures sont nécessaires pour une compréhension de la signification fonctionnelle de ces changements morphologiques et physiologiques.

**CHAPITRE 2**

**ENHANCED NEUROMUSCULAR TRANSMISSION EFFICACY IN  
OVERLOADED RAT PLANTARIS MUSCLE *IN SITU***

**ABSTRACT**

Using *in situ* approach, we investigated neuromuscular transmission (NMT) efficacy in overloaded rat plantaris muscle. In the overload (Ovrd) group, following bilateral tenotomy of plantaris synergists, rats were confined to wheel-cages. Age-matched rats in the control (Ctrl) group were restrained to plastic cages. During the terminal experiment, muscle action potentials were blocked using  $\mu$ -conotoxin and full-sized endplate potentials (EPPs) were recorded at 25, 50 and 75 Hz, to determine their amplitude rundown. Quantal content for the Ctrl and Ovrd groups were 37.0 and 74.3 respectively,  $P < 0.01$ . There was a significant group difference in EPP amplitude rundown at all frequencies examined, with increased rundown occurring in the Ovrd group ( $P < 0.01$ ). Cumulative quantal release was 139 and 153% higher in the Ovrd group at 25 and 50 Hz, respectively ( $P < 0.05$ ). Together, these data suggest the safety factor for NMT is increased by neuromuscular overload. Furthermore, these findings support and supplement previously reported activity-dependent improvements in NMT efficacy that are probably mediated via pre-synaptic adaptations.

Key words: neuromuscular transmission efficacy; endplate potential; synaptic transmission; overloaded plantaris; neuromuscular junction

## INTRODUCTION

The vertebrate neuromuscular junction (NMJ) is a highly adaptable structure undergoing a lifelong remodeling process. It is continuously being remodeled by growth, aging, use, disuse, and pathological states (Wood and Slater 2001). This plasticity plays an important role in assuring adequate communication between the nerve and the muscle fiber it is innervating. In the past, several studies have reported morphological and physiological differences between NMJs from fast- and slow-twitch muscles. NMJs innervating the soleus muscle have larger endplate area (Prakash et al. 1995; Sieck and Prakash 1997; Wood and Slater 1997) higher total vesicle pool size and are better adapted to maintaining transmitter release during tonic activity (Reid et al. 1999), whereas NMJs innervating the fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) muscle have higher quantal content (QC) (Gertler and Robbins 1978; Wood and Slater 1997; Reid et al. 1999) and more pronounced rundown or decrease in endplate potential (EPP) amplitude as a result of repeated stimuli (Reid et al. 1999).

Recent studies have demonstrated the modulatory capacity of physical activity on physiological properties of the NMJ. Chronic exercise is known to increase the nerve terminal dimensions (Andonian and Fahim 1988; Deschenes et al. 1994), improve neuromuscular transmission efficacy (Dorlöchter et al. 1991; Desaulniers et al. 2001), and modify the axoplasmic delivery and concentrations of various proteins involved in neuromuscular transmission, such as SNAP-25 (Kang et al. 1995; Panenic and Gardiner 1998), calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Gharakhanlou et al. 1999), acetylcholine (ACh) receptors (Desaulniers et al. 1998), and acetylcholinesterase (Gisiger et al. 1991).

Most of the physiological adaptations of the NMJ have been demonstrated using electrical stimulation, *in vitro*, with considerable methodological limitations (Wood and Slater 2001). The various pharmacological manipulations used to isolate the EPP affect presynaptic function and thus, hinder an unbiased study of neuromuscular transmission. Using  $\mu$ -conotoxin GIIb, a potent mammalian muscle  $\text{Na}^+$  channel blocker (Cruz et al. 1985; Li et al. 2000), it has been possible to record full-sized EPPs at the NMJ without compromising the integrity of neuromuscular transmission (Hong and Chang 1989). Recently, using a novel *in situ* approach, Desaulniers et al (2001) have been able to bypass the previously mentioned methodological limitations and have established the modulatory effect of chronic endurance exercise on neuromuscular transmission efficacy of the rat soleus muscle. In that study, habitual exercise increased QC by 31% and maintained EPP amplitude during continuous stimulation, enhancing neuromuscular transmission efficiency.

Using the same *in situ* approach, we have investigated the combined effect of compensatory overload and chronic voluntary wheel cage activity on neuromuscular transmission efficacy of the adult rat plantaris muscle. To our knowledge, this represents the first *in situ* study of full-sized EPPs at mammalian fast-twitch motor endplates, as well as the first description of neuromuscular transmission of rat plantaris muscle. Presuming the electrophysiological properties and their adaptability depend on the type of activity to which NMJs are subjected, as demonstrated previously in mouse EDL (Dorlöchter et al. 1991) *in vitro* and rat soleus (Desaulniers et al. 2001) *in situ*, two muscles relatively homogenous in fiber type, we hypothesized that NMJs of plantaris,

containing a mixture of fiber types, would express adaptations in physiological properties.

## **MATERIALS AND METHODS**

The procedures used here have been described in detail in a previous article (Desaulniers et al. 2001).

*Animal care.* Female Sprague-Dawley rats obtained from Charles River (St. Constant, Quebec) were housed in individual cages in a light- and temperature-controlled environment. They were given free access to food and water. The procedures in these experiments were approved by the animal ethics committee of the Université de Montréal and were in accordance with guidelines set by the Canadian Council on Animal Care. In these experiments, all efforts were made to minimize animal suffering.

*Surgical procedures.* On arrival in our animal facilities, rats were randomly selected to undergo a surgical procedure aimed at inducing compensatory hypertrophy of the plantaris muscle. The rats were anesthetized with ketamine-xylazine mixture (62 and 8 mg/kg ip, respectively) and were maintained anesthetized during the procedure. A 3 cm skin incision was made along the dorsal plan of both hind-limbs. A bilateral tenotomy was then performed by sectioning the distal tendon of the medial- and lateral-gastrocnemius muscle, both functional synergists of the plantaris and soleus. The sectioned muscles were sutured back onto covering hamstring musculature to prevent reattachment. During the recovery period, rats were administered injections of buprenorphin (0.05 mg/kg) every 12 hours during 48 hours following the surgery. Once

recovered from tenotomy, ~7 days, rats were placed in voluntary wheel-cages for 13-16 weeks. Un-operated age-matched Ctrl group rats were kept cage confined.

The day of the experiment, rats were anesthetized with ketamine-xylazine as mentioned above and kept under deep anesthesia throughout the experiment with additional injections of 20.5 and 2.5 mg/kg of ketamin-xylazine mixture, respectively, every 45 minutes. The left hind-limb was dissected and the plantaris muscle and the sciatic nerve were isolated for later electrophysiological experimentation. This was executed cautiously without damaging the blood supply feeding the muscle.

A catheter inserted into the left jugular vein was used to deliver  $\mu$ -conotoxin GIIIb (Almone, Israel) into the animal's circulatory system. A tracheotomy was performed and the animal was ventilated for the duration of the experiment (Harvard miniature ventilator model 50-1700). Expired CO<sub>2</sub> and core temperature were monitored during the experiment and ranged from 2.5 to 4.5% and 35.5 to 37.7°C, respectively. A heating pad was used to maintain core temperature. The spine was clamped to prevent any random movement. The surrounding skin flaps from the dissected left hind-limb were used to form a pool-like structure, which was filled with heated light mineral oil kept at 35.5-37.7°C.

*Electrophysiological recordings.* Using  $\mu$ -conotoxin to block muscle Na<sup>+</sup> channels, we were able to record full-size EPPs. Muscle contraction was gradually reduced following an initial 500  $\mu$ l injection of 25  $\mu$ g/ml  $\mu$ -conotoxin in saline solution and completely abolished 60-70 min into the injection scheme (~100  $\mu$ l/10 min). Muscle force was maintained at its lowest level by injecting 100  $\mu$ l of the toxin solution approximately every 30 min.

Intracellular muscle fiber resting membrane potential (RMP), miniature endplate potentials (MEPPs) and EPPs were recorded using glass microelectrodes ( $<10\text{ M}\Omega$ ) filled with KCl solution (3.0 M). The microelectrode was inserted into the muscle fiber using a micro-positioner. The proximity of the electrode to an endplate was determined by the presence of MEPPs. Once inserted close to a junction, the RMP was allowed to stabilize for 2 min. MEPPs were recorded and stored on computer for a subsequent analysis. Then, the sciatic nerve was stimulated (0.05-ms square-wave supramaximal pulse, delivered by S88D Grass stimulator via a bipolar electrode) in order to elicit single EPPs (sampled at 33 kHz) for an indirect estimation of QC. These recordings were followed by 10 s of continuous stimulation evoked at 25, 50 and 75 Hz in either ascending or descending order of frequency. These trains were digitized (10 kHz) and stored for a later analysis of stimulation-induced EPP amplitude rundown. Between each frequency of intra- and inter-cell stimulation, 3- and 5 min rest intervals were instituted to allow full recovery of stimulation-induced EPP amplitude and MEPP frequency changes (Zengel and Sosa 1994). Cells with a RMP  $< -60\text{ mV}$  were excluded from this study. Also, if any cell depolarized by more than 10 mV during these procedures, the data from that cell were eliminated. Each group consisted of four animals and the number of endplates from which data were recorded ranged from 2 to 7 per animal. At the end of the experiment rats were killed by an overdose of anesthetic.

*Analysis.* For each cell, average MEPP amplitude, frequency and rise time were obtained from 5 to 10 3-s time bins (15 to 30 s of recordings), which were analyzed using a specially designed event detection software with the amplitude threshold set at  $150\ \mu\text{V}$ . Cells that did not obey the following criteria were excluded from this study:

EPP and MEPP rise time  $< 1$  ms, mean MEPP amplitude and frequency  $>180 \mu\text{V}$  and  $> 1/\text{s}$ . The QC and the cumulative quantal release (EPP amplitudes added together consecutively) were estimated using the direct method and corrected for nonlinear summation using the empirical correction factor of 0.8, as proposed by Mc Lachlan and Martin (McLachlan and Martin 1981).

*Statistics.* Student's t-test and Factorial ANOVA were used to analyze the data pertaining to passive properties of the motor endplates, QC and EPP amplitude rundown. A Tukey's honest significant difference test was used as a follow-up test. Maximum probability of error was set at 5%.

## RESULTS

Overload resulted in an increase in plantaris wet weights of approximately 74% ( $0.76 \pm 0.13$  g in overload, vs.  $0.45 \pm 0.07$  g in control). Table 1 summarizes the main effects of compensatory overload and voluntary wheel activity on the passive properties and quantal content of the adult rat plantaris neuromuscular junction. The combination of compensatory overload and regular wheel activity decreased MEPP amplitude but had no significant effect on MEPP frequency or rise time. RMP was on average higher in the active group of rats. EPP amplitude was also higher in the Ovrlid rats. QC values, which reflect the number of synaptic vesicles released in response to a single nerve impulse, showed a two-fold increase in the Ovrlid group compared to the Ctrl group (Table 1).

Figure 1 shows an example of the data acquired during the stimulation protocols. An example of paired potentials (PP); the appearance of two EPPs as a result of a single

stimulus, which were observed in a fraction of the motor endplates, is presented in Figure 1B. The percentage of cells that expressed PPs, in the Ctrl and Ovrld groups was less than 7% when stimulated at 25 Hz. This number tripled when stimulated at 75 Hz. Despite the similarity between the two groups in the number of cells that expressed PPs, their expression was variable in the Ovrld group.

Figure 2A, B and C show EPP amplitude rundown comparisons between the Ctrl and the Ovrld groups at 25, 50 and 75 Hz, respectively. Factorial ANOVA revealed significant group and time effects on EPP amplitude decline with no interaction among the group and time factors for all frequencies ( $P < 0.01$ ). Figure 3A and B show EPP amplitude at the end of the 10 s continuous stimulation, in the Ctrl and Ovrld groups, respectively. There was a significant increase in amplitude rundown between 25 and 50 Hz in the Ctrl group ( $P < 0.01$ ). On the other hand, in the Ovrld group, the frequency effect on EPP size was significant among all 3 frequencies.

The cumulative quantal release during the first 500 ms of 10 s continuous stimulation is presented in Table 3. In the Ovrld group, the cumulative quantal release was 139 and 153% higher than the Ctrl group at 25 and 50 Hz, respectively (both  $P < 0.05$ ). At 75 Hz, the increase was 100% ( $P = 0.055$ ).

## **DISCUSSION**

Previous studies (Gisiger et al. 1991; Panenic and Gardiner 1998; Desaulniers et al. 2001) have reported the improved nature of neurotransmitter release in response to increased activity of the rat NMJ. The present study corroborates and extends these findings.

In our experiment, the combination of compensatory overload and voluntary wheel cage activity reduced MEPP amplitude by ~25% (Table 1). Since MEPP amplitude is directly related to the size of ACh-quantum and post-synaptic density of ACh receptors (Katz and Thesleff 1957), and given that the amount of ACh contained within each vesicle is thought to be constant (Katz 1996), the decline in MEPP amplitude might seem to contradict a previously reported, exercise-induced increase in ACh receptor quantity at the motor end-plate (Desaulniers et al. 1998). However, the different quality and quantity of activity imposed in the different studies may explain this disparity. It is well established that compensatory overload induces hypertrophy of rat plantaris muscle (Gardiner 1991; Kano et al. 1997). This hypertrophy is characterized by increases in muscle mass and fiber cross-sectional area. Considering muscle fiber input resistance is inversely proportional to muscle fiber diameter and directly related to MEPP amplitude (Katz and Thesleff 1957; Grinnell and Herrera 1980; Katz 1996) an increase in muscle fiber size would necessarily cause a decrease in MEPP amplitude. Therefore, a 25% decrease in MEPP amplitude may be the consequence of a decrease in input resistance accompanying an increase in muscle fiber size, induced by compensatory overload and voluntary wheel activity. Furthermore, although MEPP frequency in the Ctrl group was similar to values found in rat EDL muscle (Reid et al. 1999), previously reported activity-dependent increases in MEPP frequency (~100 %) observed in rat soleus muscle (Desaulniers et al. 2001) following treadmill training were not apparent in this study, although a tendency for an increase (~40 %, not significant) was in evidence (Table 1).

A surprising finding in the present study was the emergence of PPs, also referred as “doublets”, in response to a single stimulus. To our knowledge, this represents the first description of doublets at a mammalian NMJ. The similarity between the Ctrl and the Ovrld groups in the number of NMJs that expressed doublets seems to indicate an intrinsic characteristic found in some of the rat plantaris NMJs. Furthermore, the increased number of doublets in the Ovrld group shows its sensitivity to chronic activation. At this moment, we do not have an explanation for their expression.

In accordance with previously reported activity-dependent alterations of QC (Gisiger et al. 1991; Desaulniers et al. 2001) evoked transmitter release was significantly increased in active rats. However, the magnitude of the change found in the present study is much higher than the approximate 30% increase reported by Desaulniers et al. (2001) and Dorlöchter et al. (1991). Our study, as opposed to the aforementioned studies, combined compensatory overload and voluntary wheel-cage activity, which may have had an additive effect in increasing the number of quanta released per impulse.

Any increase in muscle fiber diameter, as a result from compensatory overload and wheel-cage running, would be expected to reduce the input resistance of the muscle fiber and hence lower EPP amplitude. However, there is evidence that increased activity leads to an enlargement of the motor nerve terminal (Panenic and Gardiner 1998), and this may help to compensate for the effect of muscle fiber hypertrophy. Furthermore, it is well established that evoked transmitter release at the NMJ is triggered by the influx of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ions, through voltage-gated calcium channels (VGCC) localized at the active zones (Meir et al. 1999; Atwood and Karunanithi 2002).

It is also well known that the quantity of transmitter liberated is directly proportional to the amount of free  $\text{Ca}^{2+}$  ions within the presynaptic terminal. Therefore greater calcium entry, probably due to an increased number of presynaptic VGCC, could account for the enhanced transmitter release observed in the Ovrld NMJs.

According to the model proposed by Wu and Betz (1998), synaptic vesicles reside in at least three pools: 1) a “docked” pool or the readily releasable pool which resides at the membrane; 2) a larger “reserve” pool that is located away from the membrane and which replenishes the readily releasable pool and 3) the “fused” pool which is exposed to the extracellular milieu, i.e. during the time between exocytosis and endocytosis. Accordingly, synaptic vesicle trafficking between the different pools is regulated by the kinetics of the following irreversible reactions: mobilization of vesicles from the reserve to the docked pool and endocytosis of vesicles from the fused to the reserve pool. Effective synaptic vesicle replenishment into the docked and reserve pools is essential to maintain efficient synaptic transmission. EPP amplitude decline during 10 s trains of continuous stimulations observed in our study reflects the relationship between the rate of depletion of the docked pool and its concomitant refill and maintenance by the reserve pool. In the Ctrl group, the lack of further EPP amplitude rundown between 50 and 75 Hz indicates that the degree of decline attains a plateau at 50 Hz, thus preventing accentuated rundown when stimulated at higher frequency. On the other hand, the marked decline in EPP amplitude in the Ovrld group (at 75 Hz) might be ascribed to limitations in the ability to mobilize quanta from the reserve to the readily releasable pool, suggesting a limitation in the adaptive capacity of the synaptic vesicle transport machinery and seemingly predisposing the junction for

transmission failure. This predisposition to neurotransmission failure is considered unlikely when we take into account the absolute amount of neurotransmitter released during stimulation (Table 2). Considering a 100% increase in cumulative quantal release in the Ovrlld group (Table 2), and that EPP amplitude at the end of continuous stimulation protocols was never less than 53% of initial EPP amplitude (Figure 3), the absolute quantal release during 10 s of continuous stimulation is consistently higher in the Ovrlld group at all frequencies however, this does not rule out a more pronounced depletion of synaptic vesicles in the Ovrlld group when EPP amplitude is normalized to the first EPP in any given train.

The safety factor for neuromuscular transmission, in rats, varies according to muscle fiber-type composition. Estimates range from 1.8X and 2.0X (Gertler and Robbins 1978) to 3.5X and 5.0X (Wood and Slater 1997), for the soleus and EDL muscle, respectively. Although the safety factor was not estimated in our study, the above-mentioned increase in cumulative transmitter release suggests an increase in NMT safety factor in the Ovrlld group, thus assuring efficient neuromuscular communication during short bouts of continuous stimulation.

In conclusion, compensatory overload combined with voluntary wheel activity induced important modulatory effects at the adult rat plantaris neuromuscular junction. The increase in QC and cumulative quantal release, which implies improved safety factor for NMT, seem to be the result of adaptations that occurred at the active zones of the pre-synaptic terminal.

**Abbreviations:**

ACh, acetylcholine

Ca<sup>2+</sup>, calcium

CGRP, calcitonin gene-related peptide

Ctrl, control

EDL, extensor digitorum longus

EPP, endplate potential

MEPP, miniature endplate potential

NMJ, neuromuscular junction

NMT, neuromuscular transmission

Ovrl, overload

QC, quantal content

RMP, resting membrane potential

VGCC, voltage-gated calcium channel

**REFERENCES**

- Andonian MH and Fahim MA. Endurance exercise alters the morphology of fast- and slow-twitch rat neuromuscular junctions. *Int J Sports Med* 1988;9: 218-223.
- Atwood HL and Karunanithi S. Diversification of synaptic strength: Presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* 2002;3: 497-516.
- Cruz L, Gray W, Olivera B, Zeikus R, Kerr L, Yoshikami D, and Moczydlowski E. Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 1985;260(16): 9280-9288.
- Desaulniers P, Lavoie P-A, and Gardiner PF. Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at the neuromuscular junctions of adult rat skeletal muscle. *NeuroReport* 1998;9: 3549-3552.
- Desaulniers P, Lavoie P-A, and Gardiner PF. Habitual exercise enhances neuromuscular transmission efficacy of rat soleus muscle in situ. *J Appl Physiol* 2001;90: 1041-1048.
- Deschenes MR, Covault J, Kraemer WJ, and Maresh CM. The Neuromuscular Junction; Muscle Fiber Type Differences, Plasticity and Adaptability to Increased and Decreased Activity. *Sports Medicine* 1994;17(6): 358-372.
- Dorlöchter M, Irintchev A, Brinkers M, and Wernig A. Effects of Enhanced Activity on Synaptic Transmission in Mouse Extensor Digitorum Longus Muscle. *J Physiol (Lond)* 1991;436: 283-292.
- Gardiner PF. Effects of exercise training on components of the motor unit. *Can J Sport Sci* 1991;16(4): 271-88.

- Gertler RA and Robbins N. Differences in neuromuscular transmission in red and white muscles. *Brain Research* 1978;142: 160-164.
- Gharakhanlou R, Chadan S, and Gardiner P. Increased activity in the form of endurance training increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies and in sciatic nerve in the rat. *Neuroscience* 1999;89(4): 1229-1239.
- Gisiger V, Sherker S, and Gardiner PF. Swimming training increases the G<sub>4</sub> acetylcholinesterase content of both fast ankle extensors and flexors. *FEBS Lett* 1991;278: 271-273.
- Grinnell AD and Herrera AA. Physiological regulation of synaptic effectiveness at frog neuromuscular junctions. *J Physiol (Lond)* 1980;307: 301-317.
- Hong S and Chang C. Use of geographutoxin II (mu-conotoxin) for the study of neuromuscular transmission in mouse. *Br J Pharmacol* 1989;97(3): 934-940.
- Kang C-M, Lavoie P-A, and Gardiner PF. Chronic exercise increases SNAP-25 abundance in fast-transported proteins of rat motoneurons. *NeuroReport* 1995;6: 549-553.
- Kano Y, Shimegi S, Masuda K, Ohmori H, and Katusta S. Morphological adaptation of capillary network in compensatory hypertrophied rat plantaris muscle. *Eur J Appl Physiol* 1997;75: 97-101.
- Katz B and Thesleff S. On the Factors which determine the Amplitude of the Minature End-Plate Potential. *J Physiol (Lond)* 1957;137: 267-278.
- Katz B. Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond. *J Neurocytol* 1996;25: 677-686.

- Li RA, Ennis IL, Velez P, Tomaselli GF, and Marban E. Novel Structural Determinants of  $\mu$ -Conotoxin (GIIIB) Block in Rat Skeletal Muscle ( $\mu$ 1) Na<sup>+</sup> Channels. *J Biol Chem* 2000;275(36): 27551-27558.
- McLachlan EM and Martin AR. Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol (Lond)* 1981;311: 307-324.
- Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaiserman I, Ahdut R, Demirgoren S, and Rahamimoff R. Ion Channels in Presynaptic Nerve Terminals and Control of Transmitter Release. *Physiol Rev* 1999;79(3): 1019-1088.
- Panenic R and Gardiner PF. The Case for Adaptability of the Neuromuscular Junction to Endurance Exercise Training. *Canadian J Appl Physiol* 1998;23(4): 339-360.
- Prakash YS, Zhan WZ, Miyata H, and Sieck GC. Adaptations of diaphragm neuromuscular junction following inactivity. *Acta Anat (Basel)* 1995;154: 147-161.
- Reid B, Slater CR, and Bewick GS. Synaptic Vesicle Dynamics in Rat Fast and Slow Motor Nerve Terminals. *J Neurosci* 1999;19(7): 2511-2521.
- Sieck GC and Prakash YS. Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on fiber type. *Can J Appl Physiol* 1997;22(3): 197-230.
- Wood SJ and Slater CR. The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles. *J Physiol (Lond)* 1997;500(1): 165-176.
- Wood SJ and Slater CR. Safety factor at the neuromuscular junction. *Progress in Neurobiology* 2001;64: 393-429.

Zengel JE and Sosa MA. Changes in MEPP frequency during depression of evoked release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 1994;477: 267-277.

**Table 1.** Passive properties and quantal content in control and overload conditions.

Group	RMP, mV	MEPP rise time, $\mu$ s	MEPP amplitude, $\mu$ V	MEPP frequency, Hz	EPP rise time, $\mu$ s	EPP amplitude, mV	QC	QC Corrected
Control	$-65.7 \pm 4.3$	$729.1 \pm 42.7$	$293 \pm 68$	$2.5 \pm 1.5$	$591.7 \pm 137.9$	$9.19 \pm 3.87$	$32.1 \pm 14.3$	$37.0 \pm 19.1$
Overload	$-71.8 \pm 7.2$	$741.1 \pm 40.3$	$235 \pm 34$	$3.5 \pm 2.1$	$646.7 \pm 99.0$	$14.29 \pm 7.19$	$59.9 \pm 25.2$	$74.3 \pm 38.5$
	$P < 0.05$	NS	$P < 0.01$	NS	NS	$P < 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.01$

Values are means  $\pm$  SD. RMP, resting membrane potential; EPP, endplate potential; MEPP, miniature endplate potential; QC, quantal content. Bottom row denotes statistically significant differences between group means (NS = not significant). Control  $n = 12$  cells, Overload  $n = 15$  cells.

**Table 2.** Estimated Cumulative Quantal release during the first 500 ms of continuous stimulation.

Frequency (Hz)	Cumulative Quantal Release		
	Control	Overload	
25	323.7 ± 106.1	772.1 ± 392.2	P < 0.05
n/N	5/2	13/4	
50	646.1 ± 215.7	1,634.9 ± 821.4	P < 0.05
n/N	5/2	8/4	
75	984.4 ± 350.0	1,976.7 ± 970.8	P = 0.055
n/N	5/2	7/4	

Values are means ± SD; n/N, number of cells/Number of rats. Values compared using Student's *t*-test. Cumulative quantal releases were estimated using the direct method, by adding together, consecutively, EPP amplitudes during the first 500 ms of the continuous stimulation. The number of rats and cells are limited to those in which all the data (MEPPs, EPPs and trains) were acquired.

### Figure Legends

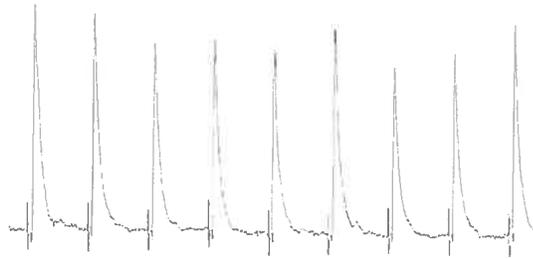
**Figure 1.** Electrophysiological recordings of EPPs during continuous trains of stimulation at 50 Hz. A: EPP amplitude decline sampled during the initial 180 ms of continuous stimulation in the control (upper panel) and overload groups. EPP amplitudes are higher in the overload group, which also express a more pronounced rundown. B: representative example of paired potentials, with encapsulated close-up view, observed during continuous activation of an overloaded adult rat plantaris neuromuscular junction at 25 Hz. Paired potentials were observed in a fraction of the motor endplates from the control and overload groups. Calibration bar within the first panel is 1 mV and 10 ms.

**Figure 2.** EPP amplitude rundown comparisons between the overload and the control groups. Close-up view of the first 500 ms and the following 10s continuous trains of stimulation on EPP amplitude decline at 25 Hz (A), 50 Hz (B) and 75 Hz (C). Factorial ANOVA reveals significant group effect for all frequencies. The total numbers of cells included are 15 (25 Hz), 14 (50 and 75 Hz) in the control group and 18 (25 Hz), 16 (50 Hz) and 14 (75 Hz) in the overload group.

**Figure 3.** Frequency dependent EPP amplitude decline in the control (A) and in the overload (B) group. In the control group, the EPP amplitude at the end of 10 s continuous stimulation was significantly different between 25 and 50 Hz. In the overload group the differences in EPP amplitude are significant among all 3 frequencies. \* Significantly different from 25 Hz in respective group,  $P < 0.01$ . #

Significantly different from 50Hz,  $P < 0.01$ . The total numbers of cells included are 15 (25 Hz), 14 (50 and 75 Hz) in the control group and 18 (25 Hz), 16 (50 Hz) and 14 (75 Hz) in the overload group.

A



L

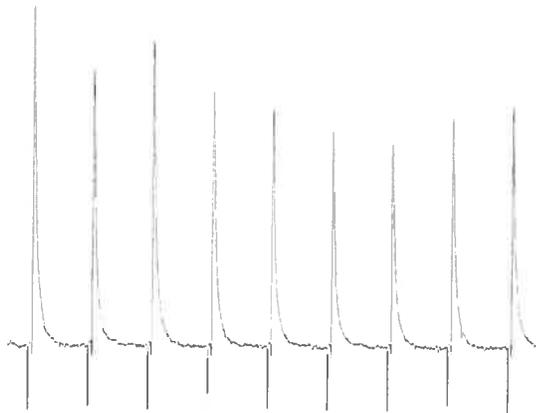
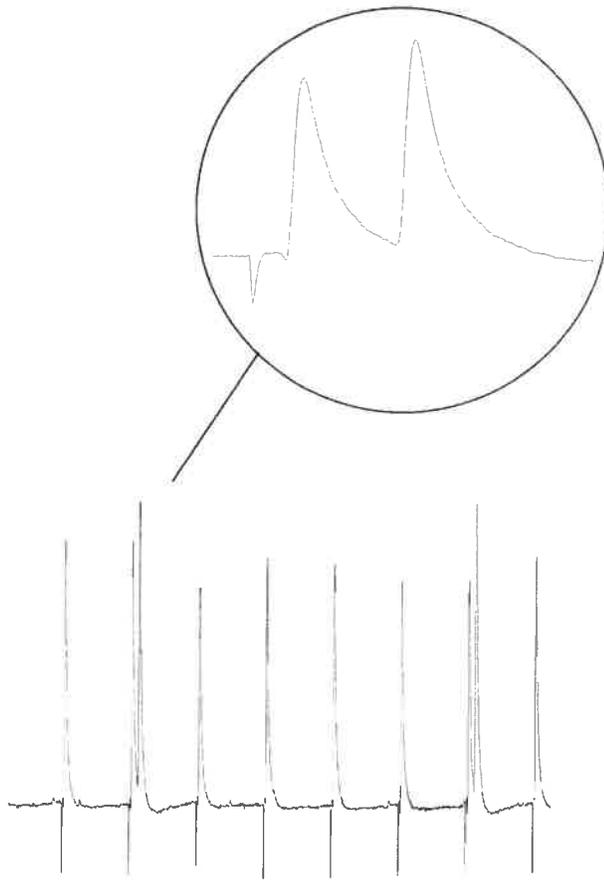


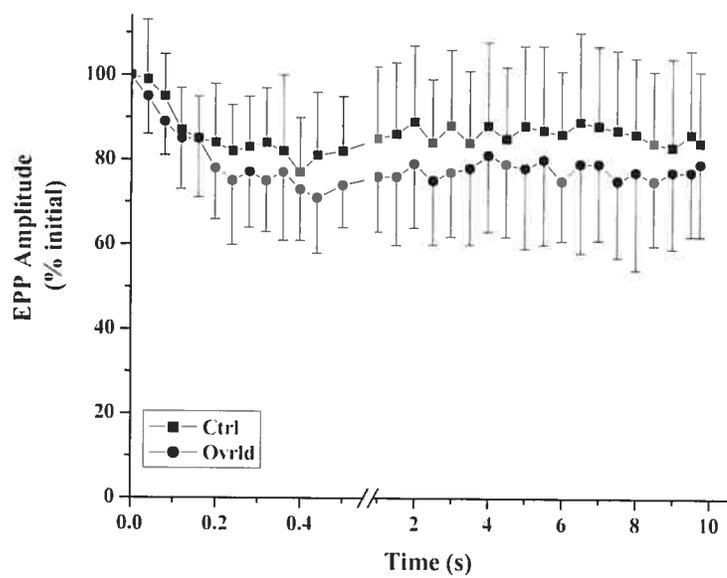
FIGURE 1

**B**



**FIGURE 1**

A



B

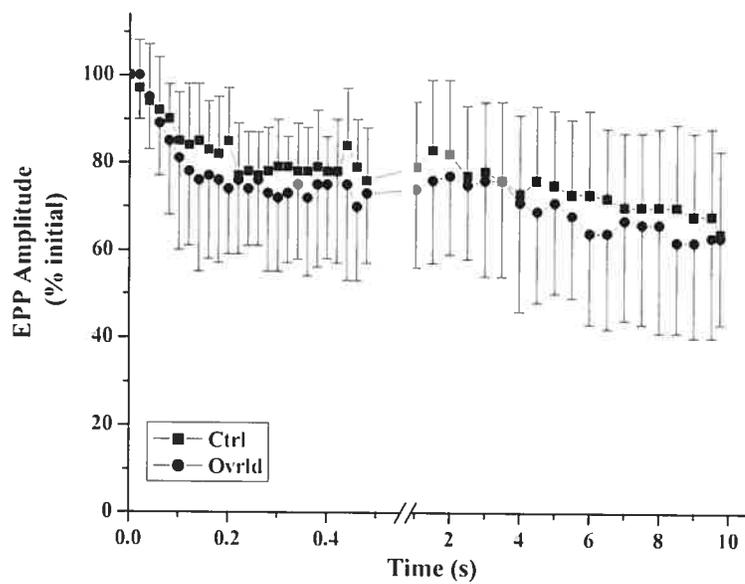


FIGURE 2

C

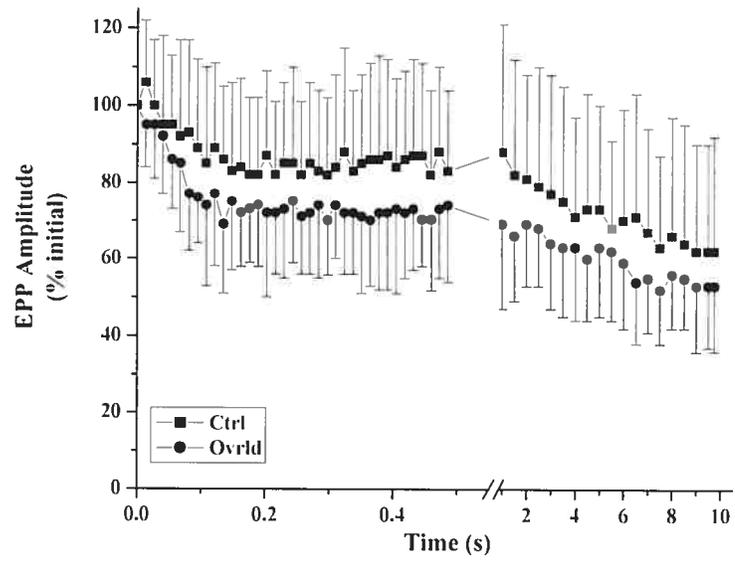
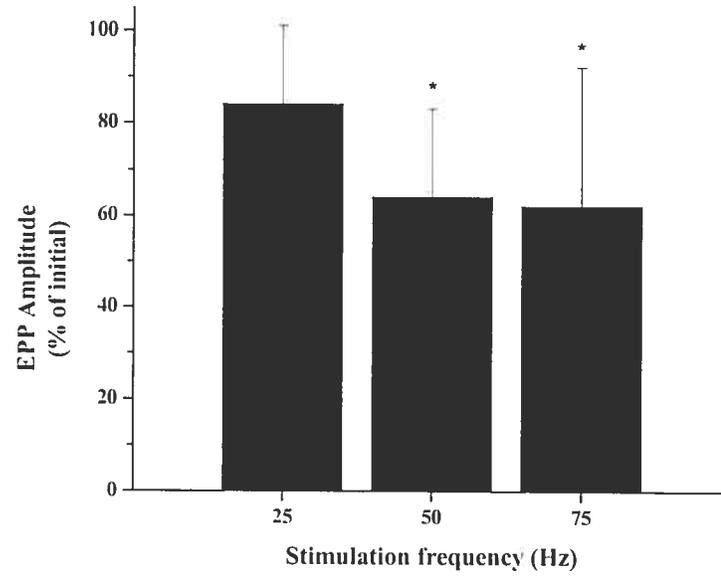
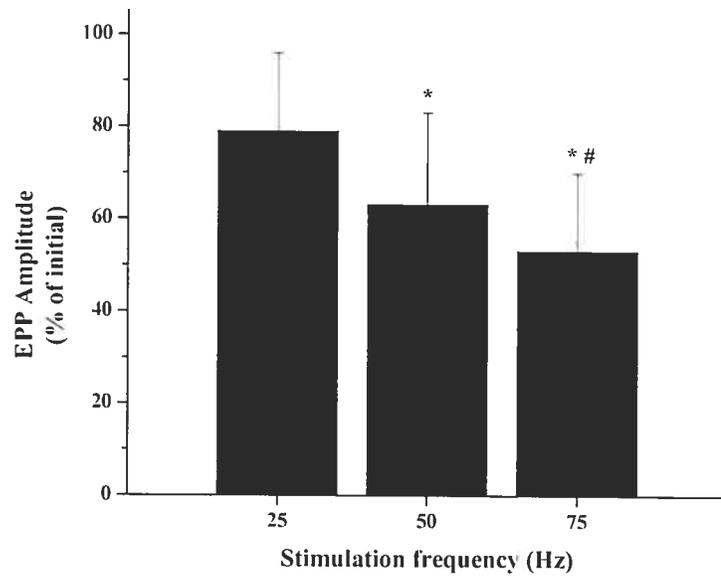


FIGURE 2

**A****B****FIGURE 3**

## **CHAPITRE 3**

## **CONCLUSIONS**

Cette étude a utilisé une technique d'électrophysiologie où une micro-électrode est insérée le plus près possible de la plaque motrice afin d'étudier la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire du rat adulte. C'est une technique couramment utilisée pour étudier la libération de transmetteurs.

Cette étude comporte plusieurs particularités. Premièrement, il a été possible d'enregistrer des EPPs dans leur intégralité et ce, sans compromettre la fonction des éléments pré- et post-synaptiques responsables de la libération des neurotransmetteurs. L'abolition de la contraction musculaire a été rendue possible grâce à la conotoxine qui, de manière discriminatoire, bloque les canaux sodiques musculaires.

Deuxièmement, contrairement à plusieurs études qui ont utilisé un modèle *in vitro* pour l'étude de la transmission synaptique, les enregistrements des EPPs ont été effectués *in situ*. Cette technique permet d'étudier la transmission synaptique le plus près possible de la température métabolique, ce qu'un modèle *in vitro* ne permet pas.

Troisièmement, cette étude a utilisé la surcharge compensatoire jumelée à la course volontaire pour stimuler une adaptation morphologique et physiologique du muscle plantaire du rat.

Les données de cette étude corroborent, mais aussi complètent ce que des études antérieures avaient rapporté sur l'effet bénéfique de l'activité sur la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire chez le rat. En accord avec ce qui avait été rapporté antérieurement, la combinaison de l'hypertrophie par surcharge compensatoire et la course volontaire a provoqué l'augmentation significative de la concentration de neurotransmetteurs sécrétés par la terminaison pré-synaptique. Cependant, la grandeur de cette augmentation (~ 100 %) est supérieure à ce qui a été observé précédemment (~

30 %) par Desaulniers et al. (2001) et Dorlöchter et al. (1991). Cette différence de variation peut s'expliquer par le fait que l'étude présente a combiné la surcharge à la course volontaire, ce qui semble avoir un effet additif sur la libération de neurotransmetteurs.

Les mécanismes responsables de cette adaptation n'ont pas été entièrement élucidés. Cependant, il a été clairement établi que la libération de transmetteurs à la suite de la stimulation du nerf moteur est enclenchée par l'influx de  $Ca^{2+}$  dans la terminaison pré-synaptique. On sait aussi que la quantité d'ACh libérée est directement proportionnelle à la concentration de  $Ca^{2+}$  se trouvant à l'intérieur de la terminaison pré-synaptique. Il est donc possible que l'entrée massive de  $Ca^{2+}$ , résultant probablement d'une augmentation de la quantité de VGCC pré-synaptiques, soit responsable de la concentration élevée de transmetteurs secrétés dans le groupe expérimental.

Durant les trains de stimulation continue de 10 s, l'amplitude des EPPs du groupe surcharge compensatoire a démontré une diminution plus prononcée que le groupe contrôle. Cette réduction d'amplitude semble être attribuée à une limitation dans la mobilisation de quanta du pool de réserve au pool ancré près de la zone active, suggérant ainsi une contrainte dans la capacité adaptative de la machinerie qui assure le transport de vésicules synaptiques.

Une découverte particulière dans cette étude est la présence de doublet (l'émergence de deux EPPs à la suite d'une stimulation unique), à la jonction neuromusculaire du muscle plantaire. Ces doublets ont été observés tant dans le groupe surcharge compensatoire que le groupe contrôle.

La libération provoquée de transmetteurs de la terminaison du nerf moteur est un processus complexe. Comme mentionné plus-tôt, cela implique la synthèse et l'emmagasinage de molécules d'ACh dans des vésicules synaptiques, l'ouverture des canaux ioniques pour l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  et l'activation subséquente d'un complexe multi-protéique menant à la libération de neurotransmetteurs. Des maladies affectant chacune de ces étapes ont été répertoriées. Malheureusement, les observations de cette étude ne peuvent être directement utilisées, du moins dans l'immédiat, pour la réhabilitation des pathophysiologies affectant la transmission synaptique. Cependant, elles ont le potentiel, jumelées à un traitement pharmaceutique, d'améliorer la transmission synaptique à la jonction musculaire.

Pour conclure, la combinaison d'une surcharge compensatoire et de la course volontaire a eu pour effet d'augmenter la quantité de transmetteurs secrétés à la jonction neuromusculaire. La magnitude de cette augmentation est supérieure à ce qui a été observé antérieurement. Les mécanismes qui régulent cette adaptation ne sont pas entièrement connus. Par conséquent, des études plus poussées s'imposent pour une meilleure compréhension et application de ces connaissances.

## **CHAPITRE 4**

## **BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

- Andonian, M. H. and M. A. Fahim (1988). "Endurance exercise alters the morphology of fast- and slow-twitch rat neuromuscular junctions." *Int J Sports Med* 9: 218-223.
- Atwood, H. L. and S. Karunanithi (2002). "Diversification of synaptic strength: Presynaptic elements." *Nat Rev Neurosci* 3: 497-516.
- Banks, F., M. Miriti and M. S. Brodwick (1991). "On the time course of surgically induced compensatory muscle hypertrophication of the rat plantaris muscle." *Comp Biochem Physiol A* 98(1): 55-60.
- Betz, W. J. and J. K. Angleson (1998). "THE SYNAPTIC VESICLE CYCLE." *Annu. Rev. Physiol.* 60(1): 347-363.
- Chang, C. C., S. T. Chuang and M. C. Huang (1975). "Effects of chronic treatment with various neuromuscular blocking agents on the number and distribution of acetylcholine receptors in the rat diaphragm." *The Journal Of Physiology* 250(1): 161-173.
- Chapman, E. R., S. An, J. M. Edwardson and R. Jahn (1996). "A Novel Function for the Second C2 Domain of Synaptotagmin." *J. Biol. Chem.* 271(10): 5844-5849.
- Chapman, E. R., P. I. Hanson, S. An and R. Jahn (1995). "Ca<sup>2+</sup> Regulates the Interaction between Synaptotagmin and Syntaxin 1." *J. Biol. Chem.* 270(40): 23667-23671.
- Crockett, J. L., V. R. Edgerton, S. R. Max and R. J. Barnard (1976). "The neuromuscular junction in response to endurance training." *Exp Neurol* 51(1): 207-15.

- Cruz, L., W. Gray, B. Olivera, R. Zeikus, L. Kerr, D. Yoshikami and E. Moczydlowski (1985). "Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels." *J. Biol. Chem.* 260(16): 9280-9288.
- Davletov, B. A. and T. C. Sudhof (1994). "Ca<sup>2+</sup>-dependent Conformational Change in Synaptotagmin I." *J. Biol. Chem.* 269: 28547-28550.
- Desaulniers, P., P.-A. Lavoie and P. F. Gardiner (1998). "Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at the neuromuscular junctions of adult rat skeletal muscle." *NeuroReport* 9: 3549-3552.
- Desaulniers, P., P.-A. Lavoie and P. F. Gardiner (2001). "Habitual exercise enhances neuromuscular transmission efficacy of rat soleus muscle in situ." *J. Appl. Physiol.* 90: 1041-1048.
- Deschenes, M. R., J. Covault, W. J. Kraemer and C. M. Maresh (1994). "The Neuromuscular Junction; Muscle Fiber Type Differences, Plasticity and Adaptability to Increased and Decreased Activity." *Sports Medicine* 17(6): 358-372.
- Deschenes, M. R., C. M. Maresh, J. F. Crivello, L. E. Armstrong, W. J. Kraemer and J. Covault (1993). "The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology." *J Neurocytol* 22(8): 603-15.
- Dorlöchter, M., A. Irintchev, M. Brinkers and A. Wernig (1991). "Effects of Enhanced Activity on Synaptic Transmission in Mouse Extensor Digitorum Longus Muscle." *J Physiol (Lond)* 436: 283-292.
- Fernandez, H. L. and J. A. Donoso (1988). "Exercise selectively increases G4 AChE activity in fast-twitch muscle." *J Appl Physiol* 65(5): 2245-52.

- Fon, E. A. and R. H. Edwards (2001). "Molecular Mechanisms of Neurotransmitter Release." *Muscle & Nerve* 24: 581-601.
- Gardiner, P. F. (1991). "Effects of exercise training on components of the motor unit." *Can J Sport Sci* 16(4): 271-88.
- Gertler, R. A. and N. Robbins (1978). "Differences in neuromuscular transmission in red and white muscles." *Brain Research* 142: 160-164.
- Gharakhanlou, R., S. Chadan and P. Gardiner (1999). "Increased activity in the form of endurance training increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies and in sciatic nerve in the rat." *Neuroscience* 89(4): 1229-1239.
- Gisiger, V., S. Sherker and P. F. Gardiner (1991). "Swimming training increases the G<sub>4</sub> acetylcholinesterase content of both fast ankle extensors and flexors." *FEBS Lett.* 278: 271-273.
- Gisiger, V. and H. Stephens (1982). "Acetylcholinesterase content in both motor nerve and muscle is correlated with twitch properties." *Neurosci Lett* 31(3): 301-5.
- Grinnell, A. D. and A. A. Herrera (1980). "Physiological regulation of synaptic effectiveness at frog neuromuscular junctions." *J Physiol (Lond)* 307: 301-317.
- Hilfiker, S., V. A. Pieribone, A. J. Czernik, H.-T. Kao, G. J. Augustine and P. Greengard (1999). "Synapsins as regulators of neurotransmitter release." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 354(1381): 269-279.
- Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates inc.

- Hong, S. and C. Chang (1989). "Use of geographutoxin II (mu-conotoxin) for the study of neuromuscular transmission in mouse." *Br. J. Pharmacol.* 97(3): 934-940.
- Jasmin, B. J., P. F. Gardiner and V. Gisiger (1991). "Muscle acetylcholinesterase adapts to compensatory overload by a general increase in its molecular forms." *J Appl Physiol* 70(6): 2485-9.
- Jasmin, B. J. and V. Gisiger (1990). "Regulation by exercise of the pool of G4 acetylcholinesterase characterizing fast muscles: opposite effect of running training in antagonist muscles." *J Neurosci* 10(5): 1444-54.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz and T. M. Jessell (2000). *Principles of Neural Science*. New-York, McGraw-Hill.
- Kang, C.-M., P.-A. Lavoie and P. F. Gardiner (1995). "Chronic exercise increases SNAP-25 abundance in fast-transported proteins of rat motoneurons." *NeuroReport* 6: 549-553.
- Kano, Y., S. Shimegi, K. Masuda, H. Ohmori and S. Katusta (1997). "Morphological adaptation of capillary network in compensatory hypertrophied rat plantaris muscle." *Eur J Appl Physiol* 75: 97-101.
- Katz, B. (1996). "Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond." *J Neurocytol* 25: 677-686.
- Katz, B. and S. Thesleff (1957). "On the Factors which determine the Amplitude of the Minature End-Plate Potential." *J Physiol (Lond)* 137: 267-278.
- Legay, C. (2000). "Why so many forms of acetylcholinesterase?" *Microsc Res Tech* 49(1): 56-72.

- Li, R. A., I. L. Ennis, P. Velez, G. F. Tomaselli and E. Marban (2000). "Novel Structural Determinants of  $\mu$ -Conotoxin (GIIIB) Block in Rat Skeletal Muscle ( $\mu$ 1) Na<sup>+</sup> Channels." *J. Biol. Chem.* 275(36): 27551-27558.
- Macleod, G. T., J.-B. Gan and M. R. Bennett (1999). "Vesicle-Associated Proteins and Quantal Release at Single Active Zones of Amphibian (*Bufo marinus*) Motor-Nerve Terminals." *J Neurophysiol* 82(3): 1133-1146.
- McLachlan, E. M. and A. R. Martin (1981). "Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse." *J Physiol (Lond)* 311: 307-324.
- Meir, A., S. Ginsburg, A. Butkevich, S. G. Kachalsky, I. Kaiserman, R. Ahdut, S. Demirgoren and R. Rahamimoff (1999). "Ion Channels in Presynaptic Nerve Terminals and Control of Transmitter Release." *Physiol. Rev.* 79(3): 1019-1088.
- Padykula, H. and G. Gauthier (1970). "The ultrastructure of the neuromuscular junctions of mammalian red, white, and intermediate skeletal muscle fibers." *J. Cell Biol.* 46(1): 27-41.
- Panenic, R. and P. F. Gardiner (1998). "The Case for Adaptability of the Neuromuscular Junction to Endurance Exercise Training." *Canadian J. Appl. Physiol.* 23(4): 339-360.
- Prakash, Y. S., S. M. Miller, M. Huang and G. C. Sieck (1996). "Morphology of diaphragm neuromuscular junctions on different fiber types." *J. Neurocytol.* 25: 88-100.
- Prakash, Y. S., W. Z. Zhan, H. Miyata and G. C. Sieck (1995). "Adaptations of diaphragm neuromuscular junction following inactivity." *Acta Anat (Basel)* 154: 147-161.

- Reid, B., C. R. Slater and G. S. Bewick (1999). "Synaptic Vesicle Dynamics in Rat Fast and Slow Motor Nerve Terminals." *J. Neurosci.* 19(7): 2511-2521.
- Roeleveld, K., A. Sandberg, E. V. Stalberg and D. F. Stegeman (1998). "Motor unit size estimation of enlarged motor units with surface electromyography." *Muscle Nerve* 21(7): 878-86.
- Rosenheimer, J. L. (1985). "Effects of chronic stress and exercise on age-related changes in end-plate architecture." *J Neurophysiol* 53(6): 1582-1589.
- Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (1999). "DEVELOPMENT OF THE VERTEBRATE NEUROMUSCULAR JUNCTION." *Annu. Rev. Neurosci.* 22(1): 389-442.
- Sieck, G. C. and Y. S. Prakash (1997). "Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on fiber type." *Can. J. Appl. Physiol.* 22(3): 197-230.
- Tolar, L. A. and L. Pallanck (1998). "NSF Function in Neurotransmitter Release Involves Rearrangement of the SNARE Complex Downstream of Synaptic Vesicle Docking." *J. Neurosci.* 18(24): 10250-10256.
- Tomas, J., R. Fenoll, M. Santafe, J. Batlle and E. Mayayo (1989). "Motor nerve terminal morphologic plasticity induced by small changes in the locomotor activity of the adult rat." *Neuroscience Letters* 106(1-2): 137-140.
- Waerhaug, O., H. A. Dahl and K. Kardel (1992). "Different effects of physical training on the morphology of motor nerve terminals in the rat extensor digitorum longus and soleus muscles." *Anat Embryol* 186: 125-128.
- Waerhaug, O. and T. Lomo (1994). "Factors causing different properties at neuromuscular junctions in fast and slow rat skeletal muscles." *Anat Embryol (Berl)* 190(2): 113-25.

Wernig, A., J. J. Carmody, A. P. Anzil, E. Hansert, M. Marciniak and H. Zucker (1984).

"Persistence of nerve sprouting with features of synapse remodelling in soleus muscles of adult mice." *Neuroscience* 11(1): 241-253.

Wood, S. J. and C. R. Slater (1997). "The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles." *J Physiol (Lond)* 500(1): 165-176.

Wood, S. J. and C. R. Slater (2001). "Safety factor at the neuromuscular junction." *Progress in Neurobiology* 64: 393-429.

Wu, L.-G. and W. J. Betz (1998). "Kinetics of Synaptic Depression and Vesicle Recycling after Tetanic Stimulation of Frog Motor Nerve Terminals." *Biophys. J.* 74(6): 3003-3009.

Zengel, J. E. and M. A. Sosa (1994). "Changes in MEPP frequency during depression of evoked release at the frog neuromuscular junction." *J Physiol (Lond)* 477: 267-277.

