

Université de Montréal

Les effets de l'activité physique à la jonction neuromusculaire chez le rat

par

Patrice Desaulniers

Département de kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences de l'activité physique

Avril 2005

© Patrice Desaulniers 2005



001

U54

2005

V. 016

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.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Les effets de l'activité physique à la
jonction neuromusculaire chez le rat

présentée par :
Patrice Desaulniers

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Claude Alain
Président-rapporteur
Université de Montréal

Phillip F. Gardiner
Directeur de recherche
Université du Manitoba

Pierre-André Lavoie
Codirecteur
Université de Montréal

Yan Burelle
Membre du jury
Université de Montréal

Claude H. Côté
Examineur externe
Université Laval

Représentant du doyen de la FES
Université de Montréal

SOMMAIRE

Les résultats d'études morphologiques indiquent que l'entraînement en endurance provoque des changements à la jonction neuromusculaire (JNM) qui incluent une augmentation de l'aire de la plaque motrice aux fibres musculaires rapides et lentes (Deschenes 1993, Tomas 1997). Par contre, il n'est pas connu si cet élargissement s'effectue par l'intermédiaire d'une augmentation de la quantité de récepteurs à l'acétylcholine (AChRs) ou d'une plus grande aire de dispersion d'AChRs existants.

L'objectif de la première étude était de déterminer l'effet de l'entraînement en endurance sur la quantité d'AChRs à la JNM, telle que quantifiée par leur liaison à l' $(^{125}\text{I})\text{-}\alpha\text{-bungarotoxine}$. Les résultats de cette étude indiquent que l'augmentation de l'aire de la plaque motrice qui est provoquée par l'entraînement en endurance (Deschenes 1993, Tomas 1997) est accompagnée par une augmentation de la quantité d'AChRs aux JNMs de fibres musculaires rapides et lentes, et suggèrent donc que l'entraînement en endurance ne change pas la densité d'AChRs à la plaque motrice.

Ensuite, une série d'études impliquant des enregistrements électrophysiologiques *In Situ* a permis de caractériser l'efficacité et la plasticité de la transmission neuromusculaire (TNM) du muscle soléaire chez le rat. Lors de ces projets, des potentiels de plaques (PdPs) de pleine amplitude ont été évoqués suite à l'inactivation des canaux sodiques musculaires par leur exposition à la $\mu\text{-conotoxine}$.

Les résultats de la deuxième étude indiquent que l'entraînement en endurance améliore l'efficacité de la TNM du muscle soléaire. Spécifiquement, le stimulus a augmenté le contenu quantique (30%) et a atténué la diminution de l'amplitude du PdP lors de l'activation répétitive (10%). Puisque l'ampleur et la direction des changements sont comparables aux effets documentés aux JNMs de fibres musculaires rapides (Dorlochter 1991), il semble que l'entraînement en endurance provoque des adaptations physiologiques similaires aux JNMs de fibres rapides et lentes.

Le troisième projet a été effectué afin de déterminer si l'amplitude du PdP se rétablit significativement entre les trains de stimulation lorsque le nerf moteur est activé de façon intermittente. Les résultats diffèrent de ceux préalablement documentés à la JNM du muscle diaphragme (Moyer 1999) et indiquent que la récupération de l'amplitude du PdP lors des périodes quiescentes est incomplète, n'excédant jamais ~80% de l'amplitude du PdP initial.

Des études portant sur les effets potentiels d'autres formes d'activité sur la JNM sont rares, mais indiquent néanmoins que l'activité neuromusculaire qui mène à l'hypertrophie musculaire provoque certaines adaptations à la JNM. Les résultats de la quatrième étude indiquent qu'une surcharge du muscle soléaire améliore la TNM, et que cet effet se fait aussi valoir lorsque le nerf moteur est activé de façon intermittente. Les changements observés suggèrent que ces effets se manifestent par des mécanismes différents que ceux empruntés lors d'un entraînement en endurance.

Ces adaptations peuvent être considérées comme étant des moyens importants par lesquels le système neuromusculaire repousse l'avènement de la fatigue en évitant l'échec de la TNM.

MOTS-CLÉS

- Exercice
- Entraînement en endurance
- Hypertrophie
- Surcharge
- Transmission synaptique
- Potentiel de Plaque
- Fibre musculaire

SUMMARY

The results of morphological studies indicate that endurance training provokes changes at the neuromuscular junction (NMJ) which include an increased endplate size at fast- and slow-twitch muscle fibers (Deschenes 1993, Tomas 1997). However, whether this increase is the result of an increased quantity of acetylcholine receptors (AChRs), or an increased dispersion of existing AChRs is not known

The objective of the first study was to determine the effect of endurance exercise training on the number of AChRs at the NMJ, as quantified by their labeling with (^{125}I)- α -bungarotoxin. The results show, that the increased endplate size that occurs as the result of endurance training (Deschenes 1993, Tomas 1997) is accompanied by an increased AChR quantity at NMJs of fast- and slow-twitch muscle fibers, and therefore suggest that endurance exercise training does not alter the density of AChRs at the motor endplate.

Subsequently, a series of studies involving *In Situ* electrophysiological recordings allowed the efficacy and plasticity of neuromuscular transmission (NMT) at rat soleus muscle to be assessed. During these projects, full size endplate potentials (Epps) were evoked following muscle sodium channel inactivation with μ -conotoxin.

The results of the second study indicate that endurance training improves the efficacy of NMT at rat soleus muscle. This effect is mediated by an increased quantal content (30%) and an improved resistance to the rundown of Epp amplitude during bursts of activation (10%). Because the degree and direction of these changes are comparable to what has been observed at fast-twitch NMJs (Dorlochter 1991), it seems that endurance exercise training induces similar physiological adaptations at NMJs of fast- and slow-twitch muscle fibers.

The third project was carried out in order to determine if Epp amplitude recovers significantly during quiescent periods when the soleus motor nerve is activated intermittently. The results differ from the previously reported data at rat diaphragm NMJs (Moyer 1999), and show that Epp amplitude recovery is incomplete, never exceeding ~80 % of initial Epp amplitude.

Studies on the effects of other forms of activity at the NMJ are scarce, but nonetheless indicate that neuromuscular activity which leads to muscle fiber hypertrophy provokes adaptations at the NMJ. The results of the fourth study show that overloading the soleus muscle improves NMT efficacy, and that this effect is also prevalent when the motor nerve is activated intermittently. The observed changes suggest that these effects come about through different mechanisms than when induced by endurance exercise training.

These adaptations may be considered important ways by which the neuromuscular system delays the onset of fatigue by avoiding NMT failure.

KEYWORDS

- Exercise
- Endurance Training
- Hypertrophy
- Overload
- Synaptic Transmission
- Endplate Potential
- Muscle Fiber

TABLE DES MATIÈRES

- SOMMAIRE (FRANÇAIS)	...iii
- SOMMAIRE (ANGLAIS)	...v
- LISTE DES TABLEAUX	...xi
- LISTE DES FIGURES	...xiii
- LISTE DES ABBRÉVIATIONS	...xv
- REMERCIEMENTS	...xvi

• <u>CHAPITRE I- INTRODUCTION</u>	...1
• <u>CHAPITRE II- REVUE DE LA LITTÉRATURE</u>	...4
○ <u>2.1- La jonction neuromusculaire (JNM)</u>	
▪ <u>2.1.1- La structure et fonction fondamentale de la JNM</u>	...5
▪ <u>2.1.2- Une brève revue historique de la recherche à la JNM</u>	...6
○ <u>2.2- La transmission synaptique à la JNM</u>	
▪ <u>2.2.1- L'hypothèse SNARE</u>	...7
▪ <u>2.2.2- La fusion vésiculaire</u>	...8

- 2.3- Le facteur de sécurité et l'échec de la transmission neuromusculaire
 - 2.3.1- Le facteur de sécurité à la JNM ...10
 - 2.3.2- Le facteur de sécurité lors de trains d'impulsions ...11
 - 2.3.3- Le facteur de sécurité lors de l'activation intermittente ...11
 - 2.3.4- L'échec de la transmission neuromusculaire ...12

- 2.4- Le développement de la JNM
 - 2.4.1- Effets de l'innervation à la JNM chez le rat en développement ...13
 - 2.4.2- Effets de l'activité neuromusculaire à la JNM chez le rat adulte ...14
 - 2.4.3- Effets des facteurs neurotrophiques à la JNM ...14

- 2.5- L'activité physique et la JNM
 - 2.5.1- Les types de fibres musculaires ...15
 - 2.5.2- La JNM aux fibres musculaires rapides et lentes ...16
 - 2.5.3- Effets de l'entraînement en endurance à la JNM ...17
 - 2.5.3.1- Les adaptations morphologiques ...18
 - 2.5.3.2- Les adaptations physiologiques ...21
 - 2.5.3.3- La direction des adaptations ...22
 - 2.5.4- Effets d'un stimulus hypertrophique à la JNM ...23

○ <u>2.6- Des considérations méthodologiques lors d'études électrophysiologiques</u>	
▪ <u>2.6.1- La composition du milieu d'incubation</u>	...24
▪ <u>2.6.2- La température du milieu d'incubation</u>	...25
▪ <u>2.6.3- La μ-conotoxine, l'antagoniste des canaux sodiques musculaires</u>	...25
▪ <u>2.6.4- L'approche <i>In Situ</i></u>	...26
▪ <u>2.6.5- Le choix du muscle</u>	...26
● <u>CHAPITRE III- Article 1</u>	...28
● <u>CHAPITRE IV- Article 2</u>	...46
● <u>CHAPITRE V- Article 3</u>	...77
● <u>CHAPITRE VI- Article 4</u>	...103
● <u>CHAPITRE VII- DISCUSSION</u>	...129
○ <u>4.1- Effet de l'activité physique sur l'amplitude du PdPmini et la quantité d'AChRs</u>	...130
○ <u>4.2- Effet de l'activité physique sur la fréquence des PdPmini</u>	...132
○ <u>4.3- Effet de l'activité physique sur le PdPmini « géant »</u>	...132

○ <u>4.4- Effet de l'activité physique sur le CQ et l'amplitude du PdP au muscle soléaire</u>	...133
○ <u>4.5- Effet de l'activité physique sur le CQ et l'amplitude du PdP de muscles rapides et lents</u>	...134
○ <u>4.6- Effet de l'activité physique sur l'amplitude du PdP lors de trains d'activation continus</u>	...134
○ <u>4.7- Effet de l'activité physique sur l'amplitude PdP en réponse aux trains intermittents</u>	...135
○ <u>4.8- Est-ce que les adaptations suivent une certaine direction?</u>	...136
○ <u>4.9- Les observations principales</u>	...137
○ <u>4.10- Effets de l'activité physique sur la population vésiculaire</u>	...138
○ <u>4.11- Mécanismes d'adaptation</u>	...139
○ <u>4.12- Un survol de la JNM entraînée en endurance</u>	...139
• <u>CHAPITRE VIII- CONCLUSION</u>	...141
• <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	...143
• <u>ANNEXE</u>	
○ <u>Annexe A; Les événements historiques</u>	...xvii

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre II – Revue de la littérature

Tableau 1. Comparaison des caractéristiques morphologiques et physiologiques à la JNM de fibres musculaires rapides et lentes.

Tableau 2. Les effets de l'entraînement en endurance à la JNM du petit rongeur.

Chapitre III - Article 1

Tableau 1. *The effect of chronic exercise on whole muscle weights and endplate specific (125 I)- α -Btx binding/mg of muscle in 5 rat skeletal muscles.*

Chapitre IV - Article 2

Tableau 1. *Passive properties and quantal content in control and active conditions.*

Chapitre V - Article 3

Tableau 1. *Resting membrane potential and endplate potential rise-time and amplitude at the onset of each stimulation protocol in this study.*

Tableau 2. *Decay-rate constants estimated using a single-order exponential equation.*

Chapitre VI - Article 4

Tableau 1. *EPP and MEPP characteristics at control and overloaded rat soleus NMJs.*

Chapitre VII – Discussion

Tableau 1. Sommaire des adaptations documentées lors des études effectuées dans le cadre de cette thèse.

LISTE DES FIGURES

Chapitre II – Introduction

Figure 1. Schéma des protéines impliquées dans le processus de fusion vésiculaire à la JNM.

Chapitre III - Article 1

Figure 1 (A). *Endplate-specific (^{125}I)- α -Btx binding in skeletal muscles of sedentary ($n=6$) and endurance trained ($n=6$) rats.*

Figure 1 (B). *D-tubocurarine chloride-induced endplate-specific (^{125}I)- α -Btx binding inhibition in sedentary ($n=6$) and trained ($n=6$) rats.*

Figure 2. *(^{125}I)- α -Btx endplate-specific binding in sedentary ($n=5$) and trained ($n=4$) TA muscle, 20 and 40 hours following an unlabelled α -Btx intramuscular injection i.m. designed to saturate existing nAChR.*

Chapitre IV - Article 2

Figure 1. *EPP amplitude rundown provoked by a train of continuous stimulation.*

Figure 2. *Neuromuscular transmission efficacy in control and active rats.*

Figure 3. *EPP amplitude rundown evoked by 3 s trains of continuous stimulation.*

Figure 4. *Effect of exercise on neuromuscular transmission efficacy within NMJs ranked according to their “fatigue resistance”.*

Chapitre V - Article 3

Figure 1. *Epp amplitude during continuous trains of activation.*

Figure 2. *Epp amplitude during intermittent trains of activation.*

Figure 3. *Electrophysiological recordings of epps evoked intermittently at 25 Hz.*

Figure 4. *Epp amplitude frequency comparisons during intermittent trains.*

Chapitre VI - Article 4

Figure 1. *Epp amplitude rundown during continuous trains of activation in the control and overloaded conditions.*

Figure 2. *Epp amplitude rundown during intermittent trains of activation in the control and overloaded conditions.*

Figure 3. *Electrophysiological recordings of Epps during intermittent activation.*

Figure 4. *Percent Epp amplitude recovery during intermittent activation in the control and overloaded conditions.*

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **ACh** (Acétylcholine)
- **AChR** (Récepteur à l'acétylcholine)
- **AChE** (Acétylcholinestérase)
- **CSSV** (Canaux sodiques sensibles aux voltage)
- **CCSV** (Canaux calciques sensibles aux voltage)
- **CQ** (Contenu quantique)
- **JNM** (Jonction neuromusculaire)
- **PdP** (Potentiel de plaque)
- **PdPmini** (Potentiels de plaque miniature)
- **↓PdP** (Diminution de l'amplitude du PdP)
- **TNM** (Transmission neuromusculaire)

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à ce projet de doctorat et plus particulièrement:

Le docteur Phillip F. Gardiner, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Sans aucun doute, le soutien et la confiance qu'il m'a témoignés ont su créer un environnement agréable et favorable au succès éventuel de cette thèse. Je le remercie pour son enthousiasme, sa patience et son sens de l'humour lors de l'exécution de ce projet.

Le docteur Pierre-André Lavoie, à qui j'offre l'expression de ma reconnaissance et ma très grande considération. Je le remercie pour son analyse systématique des travaux, ainsi que ses conseils judicieux.

Pierre Corriveau, pour son assistance technique qui a toujours facilité l'avancement des projets. Sa contribution, passée et présente, est sincèrement appréciée.

Tous mes collègues du laboratoire qui m'ont apporté de grands moments de divertissements, plus particulièrement: AJ, Anteneh, Bruno, Eric et Robert.

Le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada et l'Université de Montréal pour le financement de ce projet

Ma famille et mes amis, pour leur soutien et leur présence. Merci.

CHAPITRE I
INTRODUCTION

Une caractéristique commune de tout concepts de stress physiologique est la perturbation de l'homéostasie qu'il induit. Afin de minimiser le stress, les tissus, organes et systèmes affectés s'adaptent à la perturbation. La littérature est chargée d'exemples de mécanismes élégants qui permettent aux organismes d'exister et de croître sous une large gamme de demandes environnementales (Telfer 1984, Fletcher 2001, Hochachka 2002, Storey 2004). Parmi les systèmes les mieux caractérisés, le muscle squelettique est probablement le tissu le plus adaptable chez les mammifères.

Il y a plus de 40 ans, les expériences d'innervation croisée ont fourni l'évidence déterminante du rôle essentiel de l'activité neuromusculaire sur la détermination des propriétés de fibres musculaires squelettiques (Buller 1960a, Buller 1960b). Ces expériences ont révélé que le phénotype d'une fibre musculaire différenciée n'est pas inaltérable, mais est plutôt versatile, ayant la capacité de s'adapter en fonction des exigences neuromusculaires actuelles. Aujourd'hui, il est bien connu que le tissu musculaire s'adapte à la contrainte qui lui est imposée (Booth 1991). Un exemple approprié de cette capacité adaptative se fait valoir lorsque les fibres musculaires s'adaptent au stress que représente l'activité physique. Par exemple, les effets de l'entraînement en endurance sur le muscle squelettique incluent une biogénèse mitochondriale (Adhihetty 2003), une augmentation de sa capacité oxydative (Holloszy 1967), ainsi qu'une transition du type de myosine envers un qui est plus approprié pour les exigences étant placées sur les unités motrices (Baldwin 1975, Green 1984, Wahrman 2001). En effet, l'entraînement aérobique améliore significativement une diversité de capacités fonctionnelles liées aux systèmes impliqués dans l'activité. Conséquemment, de la même façon que l'activité physique induit certains changements au niveau de la fibre musculaire, tel est aussi le cas de plusieurs autres composantes systémiques, dont le système hépatique (Donovan 1990, Nieto 1996, Burelle 2000) et le système cardiovasculaire (Hearn 1956, Gaesser 1994, Burelle 2004).

D'intérêt particulier au sujet actuel sont les adaptations induites par l'activité physique qui se produisent ailleurs dans la hiérarchie des commandes neuromusculaires. Puisque la capacité que possède le système nerveux à s'adapter en réponse aux stimuli externes est principalement lié à la plasticité des connexions synaptiques (Lu 2003), il est logique de postuler que la synapse neuromusculaire peut constituer un site où se produiraient certaines adaptations afin d'améliorer l'efficacité de la transmission neuromusculaire (TNM) et ainsi, potentiellement retarder l'avènement de la fatigue. L'objectif primaire de cette thèse est de contribuer de façon significative au corps de connaissances scientifiques dont l'objet d'étude est de déterminer les effets de l'activité physique sur la jonction neuromusculaire (JNM) et plus particulièrement, d'élucider les effets de l'activité physique sur l'efficacité de la TNM chez le rat.

L'ensemble des recherches effectuées dans le cadre de cette thèse a été réalisées par l'auteur principal, à savoir l'étudiant candidat. Les contributions spécifiques incluent: l'exécution des projets en laboratoire, l'analyse des résultats, l'analyse statistique, la rédaction des manuscrits et la rédaction de la thèse.

CHAPITRE II
REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1- LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

2.1.1- La structure et fonction fondamentale de la JNM

La JNM est formée par la juxtaposition d'éléments de deux différentes cellules; un élément pré-synaptique du nerf moteur et un élément post-synaptique de la fibre musculaire. La terminaison pré-synaptique contient des vésicules qui emmagasinent le neurotransmetteur acétylcholine (ACh). Au niveau de la membrane post-synaptique de la fibre musculaire se situe la plaque motrice, qui effectue des plis sous la terminaison nerveuse. L'aire de la plaque motrice est délimitée par la distribution des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (AChRs). Des études portant sur la structure du récepteur ont dévoilé qu'il est composé de 4 sous-unités ayant la stochiométrie $\alpha_2 \beta \delta \gamma (\epsilon)$ ¹. Son poids moléculaire est d'environ 250 kD et il possède un diamètre de 8.5 nm. Ces attributs physiques confèrent au récepteur une densité maximale théorique d'environ 12 000 / μm^2 . A cet effet, certaines études ont démontré que la densité d'AChRs se situe entre 10 000 et 20 000 / μm^2 à la plaque motrice chez le rat adulte.

La transmission synaptique à la JNM s'effectue lorsqu'un potentiel d'action envahit l'élément pré-synaptique et provoque la libération d'ACh, qui traverse ensuite l'espace synaptique séparant le nerf du muscle et s'associe aux sous-unités α des AChRs. Cet événement engendre l'ouverture des canaux ioniques et permet le mouvement d'ions vers l'intérieur de la cellule. Le taux de transport d'ions par l'AChR (environ 10 000 ions/ms) ainsi que sa sélectivité pour les cations sont conférés par 3 anneaux d'acides aminés de charge négative aux abords de la lumière du récepteur. Le changement du potentiel membranaire de la fibre musculaire produit par l'ouverture quasi-simultanée de plusieurs milliers d'AChRs, est nommé le potentiel de plaque (PdP). L'effet de l'ACh sur les AChRs est abruptement terminé par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) qui est hautement concentré à la JNM. Sans l'effet de l'AChE, la concentration d'ACh à la

¹ Les AChRs chez le mammifère adulte sont dotés d'un court temps d'ouverture et d'une grande conductance par rapport aux AChRs foetaux. Ces propriétés sont induites par une modification de la structure du récepteur, notamment par l'insertion de la sous-unité ϵ au lieu de la sous-unité γ .

plaque motrice resterait élevée pour une telle période que s'installerait un état désensibilisé des AChRs (Katz 1957a, Ruff 2003). Lorsque le nerf moteur est activé suite à une période de repos, le PdP est d'une amplitude suffisante pour activer les canaux sodiques sensibles au voltage de type 1 (CSSV) situés le long du sarcolemme musculaire, ce qui engendre un potentiel d'action le long de la membrane et déclenche la contraction de la fibre musculaire.

2.1.2- Une brève revue historique de la recherche à la JNM

Plusieurs recherches datant du début du 20^e siècle ont exposé certains aspects importants, tant morphologiques que physiologiques, de la transmission synaptique à la JNM. Un recensement de plusieurs de ces événements est présenté à l'annexe A. Par exemple, Henry Dale (1936) a révolutionné la façon dont les physiologistes perçoivent la transmission synaptique quand il a découvert que l'ACh joue le rôle de principal médiateur chimique à la JNM. Auparavant, on croyait que la fonction synaptique neuromusculaire s'effectuait via la transmission électrique directe. Ensuite, les travaux de Fatt et Katz ont élucidé plusieurs particularités électrophysiologiques de la transmission synaptique à la JNM (Katz 1996). Leurs expériences ont exploité la technique d'enregistrement intracellulaire, qui consiste à insérer une électrode dans la membrane d'une fibre musculaire à proximité d'une plaque motrice et ainsi, d'y enregistrer les événements électriques reliés à l'activation du nerf moteur. Cette technique est toujours utilisée afin d'étudier les potentiels électriques à la JNM et demeure conséquemment un instrument essentiel à l'avancement des connaissances scientifiques de la transmission ainsi que de la plasticité synaptique.

Vers le milieu du 20^e siècle, en effectuant des enregistrements électrophysiologiques à la JNM amphibienne, Bernard Katz et ses associés ont découvert l'existence de potentiels électriques spontanés qu'ils ont nommés « PdP miniatures » (PdPmini) (Katz 1996). Leurs observations de ces PdPmini ont révélé qu'ils possèdent plusieurs caractéristiques physiologiques similaires à celles du PdP (Fatt 1952). Ils ont aussi noté qu'en réduisant la concentration de calcium dans le milieu

d'incubation, l'amplitude du PdP s'atténue en unités quantiques et ont donc conclu que le PdP normal se décompose en unités miniatures individuelles (del Castillo 1954). Ainsi, il a été établi que le PdP est composé de PdPmini. Cette découverte a instigué l'hypothèse quantique, qui stipule qu'un PdPmini représente un quantum d'ACh et le PdP représente des multiples de ce quantum, avec le nombre total de quantum libérés lors de l'activation de la JNM étant nommé le Contenu Quantique (CQ). Katz a su produire maintes évidences supportant cette hypothèse, qu'il a ensuite présentées dans « *Nerve, Muscle and Synapse* » (1966). C'est surtout pour cet oeuvre que Katz, en 1970, a partagé le Prix Nobel pour la physiologie/médecine. Plusieurs aspects de la théorie quantique de Katz sont toujours considérés valides et encadrent effectivement la recherche décrivant la transmission synaptique médiée par la libération de neurotransmetteur.

2.2- LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE A LA JNM

Les neurones communiquent avec leurs cellules cibles via l'exocytose de neurotransmetteurs, qui s'effectue lorsqu'une dépolarisation pré-synaptique provoque l'ouverture des canaux calciques sensibles au voltage de type P/Q (CCSV) concentrés à la terminaison nerveuse. Cet événement engendre une augmentation rapide et localisée de Ca^{++} intra-cellulaire et déclenche la fusion de vésicules synaptiques accolées aux régions spécialisées de la membrane pré-synaptique, nommées zones actives. Ces zones actives contiennent les canaux calciques mentionnés ci-dessus, ainsi que d'autres protéines, comme par exemple les protéines SNARE, qui sont essentielles pour la fusion organisée et séquentielle des vésicules d'ACh avec la membrane pré-synaptique (Jahn 1994, Matthews 1996, Sheng 1998).

2.2.1- L'hypothèse SNARE

Vers la fin du 20^e siècle, des études s'intéressant aux mécanismes de sécrétion vésiculaire ont permis l'identification de certains polypeptides pouvant participer à l'exocytose des vésicules accolées aux zones actives (Schiavo 1992, Schiavo 1994). La

proposition « Rothman » (Sollner 1994), aussi appelée l'hypothèse SNARE, identifie quatre composantes-clefs pouvant médier ce processus:

(1) Des protéines associées à la vésicule synaptique nommées V-SNARE (*Vesicle SNARE*). Une de ces protéines, originalement connue sous le nom de « VAMP » (*Vesicle Associated Membrane Protein*), est maintenant nommée Synaptobrevine (Hua 1999). Un deuxième V-SNARE, nommé Synaptotagmine, semble être impliqué dans le processus d'exocytose à titre de détecteur de Ca^{++} dans l'élément pré-synaptique (Littleton 1995, Bennett 1999).

(2) Des protéines membranaires nommées T-SNARE (*Target SNARE*). Deux protéines membranaires plasmiques ont été reconnues comme étant les T-SNARES; la Syntaxine et le SNAP 25 (*Synaptosome Associated Protein of 25K*) (Augustine 1999).

(3) Une protéine cytosolique qui serait exigée pour la fusion membranaire nommée «protéine de fusion sensible au N-ethylmaleimide» (NSF). Cette protéine est l'ATPase qui fournit l'énergie nécessaire pour la fusion membranaire (Goda 1997).

(4) Des protéines qui servent d'adapteurs pour la NSF, appelés SNAP (*Soluble NSF Attachment Proteins*, à ne confondre avec le SNAP 25 mentionné ci-dessus) (Sollner 1993).

2.2.2- La fusion vésiculaire

Une vésicule à l'abord d'une zone active n'est pas immédiatement en mesure de fusionner avec la membrane plasmique. Elle doit auparavant y être conditionnée, ce qui nécessite la formation d'un complexe de fusion (Augustine 1999). En bref, l'accolement

d'une vésicule à une zone active s'effectue grâce à la complémentarité entre les V- et les T-SNARE. La syntaxine et le SNAP25 accrochent la synaptobrevine lorsque certaines molécules chaperonnes, tels le Rab-3 (Geppert 1998, Johannes 1998), le munc-13 et le munc-18 (Sollner 2003), permettent leur interaction. Rassemblées, les V- et le T-SNARE agissent alors comme récepteurs pour les SNAP, qui incorporent à leur tour la protéine de fusion, NSF (Figure 1). On appelle cet agencement contenant les quatre parties fondamentales, le complexe SNARE (Goda 1997). Le rôle central qu'occupent ces protéines dans la fusion vésiculaire est confirmé par des études démontrant qu'il est possible d'inhiber la libération d'ACh à la JNM via leur inactivation par les toxines botuléniques.

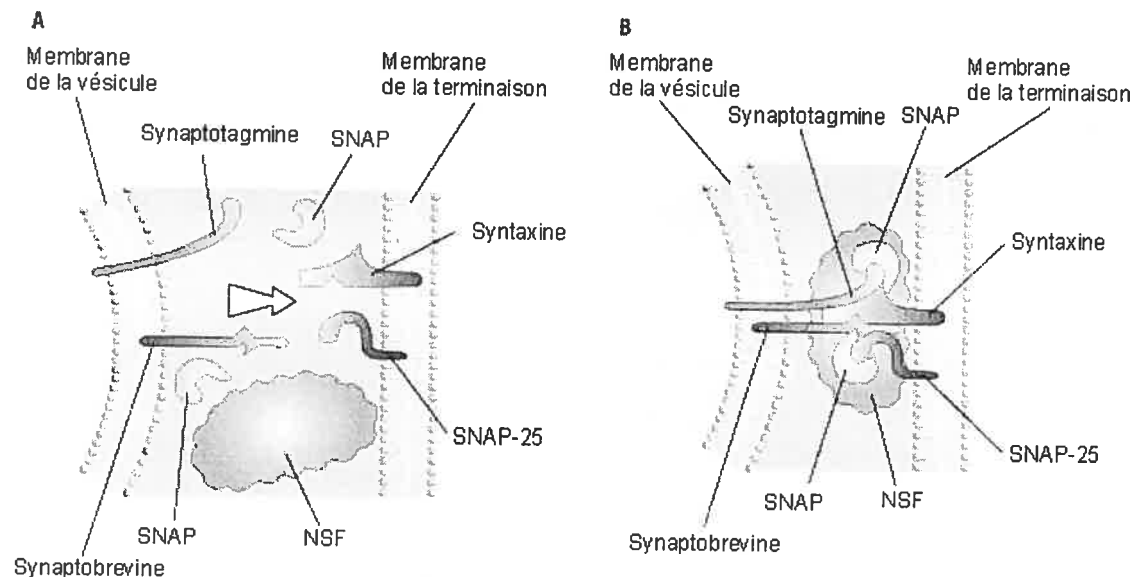


Figure 1. Schéma des protéines impliquées dans le processus de fusion vésiculaire à la JNM.

A ce stade, la vésicule conditionnée n'attend que le signal de déclenchement de l'exocytose. Cette dernière étape survient lorsque la dépolarisation de l'élément pré-synaptique ouvre les CCSV localisés aux zones actives et crée une augmentation de la concentration intra-cellulaire de Ca^{++} . Le calcium se fixe alors à la synaptotagmine, ce

qui entraîne une tension de rupture entre la membrane vésiculaire et la membrane plasmique (Kidokoro 2003). Ainsi s'effectue l'exocytose de l'ACh qui se trouvait à l'intérieur de la vésicule. L'exocytose vésiculaire est rapidement suivie par une endocytose, qui permet de maintenir constante les dimensions de la membrane plasmique de la terminaison nerveuse (vonGersdorff 1999). Suite au recouvrement de la membrane vésiculaire, elle débute un autre cycle qui s'initie avec un rechargement d'ACh (Bauerfeind 1996).

Un cycle vésiculaire complet de l'état conditionné, à l'état fusionné, et de retour à l'état conditionné exige environ 2 minutes (Reid 1999). La terminaison nerveuse doit conséquemment être munie d'une importante population de vésicules en réserve afin d'assurer un certain niveau d'efficacité de la TNM. Reid *et al.* (1999) ont démontré que l'élément pré-synaptique du muscle soléaire contient ~250 000 vésicules d'ACh. Il est estimé qu'environ 95% de ces vésicules sont maintenues en recul et servent à alimenter les zones actives lorsque les vésicules conditionnées subissent l'exocytose.

2.3- LE FACTEUR DE SÉCURITÉ ET L'ÉCHEC DE LA TNM

2.3.1- Le facteur de sécurité à la JNM

Le facteur de sécurité est une mesure de la libération excessive d'ACh suite à une impulsion nerveuse et décrit la capacité que possède la JNM à maintenir une certaine efficacité de la TNM sous diverses conditions d'activation (Wood 2001). L'ampleur du facteur de sécurité dépend du type de fibre musculaire sous-tendant et varie d'environ 2 à 5 (Section 2.52). Ceci signifie que la quantité d'ACh libéré à la JNM génère un PdP dont l'amplitude est de 2 à 5 fois plus grande que l'amplitude requise pour l'initiation d'un potentiel d'action dans la fibre musculaire. La raison d'être d'un tel facteur de sécurité est sans doute pour compenser l'importante diminution de l'amplitude du PdP (\downarrow PdP) qui survient lors de l'activation répétitive du nerf moteur (Bauerfeind 1996).

2.3.2- Le facteur de sécurité lors de trains d'impulsions

En dépit du fait que la terminaison nerveuse est chargée de plusieurs dizaines de milliers de vésicules d'ACh, il est bien connu que l'amplitude du PdP diminue significativement lors de trains d'impulsions. L'ampleur de la \downarrow PdP dépend de la fréquence ainsi que de la durée du train d'activation (Trontelj 2002) et si elle s'avère être d'une amplitude suffisamment importante, il est possible que le PdP atteigne une amplitude en deçà du seuil d'activation des CSSV. Une telle situation signifie l'échec de la TNM et suggère que dans la hiérarchie des commandes neuromusculaires, la JNM est un site pouvant contribuer à la fatigue périphérique lors de l'activation répétitive.

Moyer *et al.* (1999) ont observé que l'amplitude du PdPmini demeure inchangée suite à un train d'activation qui cause une \downarrow PdP. Conséquemment, la \downarrow PdP est le résultat d'une diminution de la libération d'ACh (\downarrow CQ), plutôt que de la taille des quantum ou d'une diminution de la réponse des AChRs à la plaque motrice (Reid 1999).

2.3.3- Le facteur de sécurité lors de l'activation intermittente

Typiquement, la \downarrow PdP est étudiée à l'aide de paradigmes dans lesquels les nerfs moteurs sont activés continuellement (i.e, sans interruption dans le train de stimulation). Bien que ce type d'activation soit physiologiquement pertinent dans certaines circonstances, les muscles locomoteurs sont généralement activés de façon intermittente lors d'activités motrices (Gorassini 2000). Dans les seules études ayant évalué l'ampleur de la \downarrow PdP lors de l'activation intermittente, Moyer *et al.* (1999, 2001) ont démontré que l'efficacité de la TNM se rétablit significativement lors des périodes quiescentes à la JNM du muscle diaphragme chez le rat. Leurs résultats indiquent que la récupération de l'amplitude du PdP lors de trains intermittents est de 100%, même lorsque les PdPs sont évoqués à une fréquence de 100 Hz. Par contre, ils ont aussi démontré que la récupération est atténuée par ~20% lors des trains d'impulsions subséquents. Il n'est pas connu si la JNM d'un muscle locomoteur chez le rat répond similairement.

2.3.4- L'échec de la transmission neuromusculaire

Afin de démontrer que l'échec de la TNM peut constituer un site de fatigue chez le rat, Pagala *et al.* (1984), Kuei *et al.* (1990), et ensuite Johnson *et al.* (1993), ont directement activé le tissu musculaire via un stimulus maximal lors d'un protocole de fatigue via le nerf moteur. Ils ont observé que le stimulus direct permet de rétablir une importante proportion du décrement de la production de force évoquée par l'activation nerveuse. Ces recherches ont donc mis en évidence qu'un protocole d'activation neuromusculaire qui mène à la fatigue exerce au moins une part de ses effets par l'intermédiaire de l'échec au niveau de la TNM. Bien que ces résultats ne soient pas ubiquitaires (Fournier 1991), il a été démontré que ce mécanisme contribue significativement à la fatigue périphérique chez le rat et que sa contribution relative à la fatigue s'accroît en tandem avec la fréquence d'activation (Aldrich 1986, vanLunteren 1996, Moyer 1999).

Malgré que la méthodologie actuelle ne permet pas de suffisamment isoler la JNM chez l'humain, il est néanmoins possible d'y mesurer l'efficacité de la propagation neuromusculaire en enregistrant le signal électromyographique (EMG) évoqué par un stimulus nerveux maximal lors d'une contraction effectuée volontairement. Dans une telle situation, si l'amplitude du signal EMG évoqué s'abaisse en tandem avec la production de force volontaire, il doit être conclu que la fatigue s'effectue au moins partiellement au niveau de l'activation de la fibre musculaire et donc potentiellement au niveau de la JNM.

En exploitant cette approche, Merton *et al.* (1954) ont observé que l'amplitude du signal EMG évoqué par le stimulus nerveux ne diminue pas lors d'une contraction volontaire maximale du muscle adducteur du pouce et ce, en dépit d'une perte substantielle de la production de force. Au contraire, Stephens *et al.* (1972) ont démontré que le signal EMG évoqué diminue de façon significative lors d'une contraction volontaire maximale du muscle abducteur du doigt. Afin de déterminer si cette contradiction peut être attribuée aux différents muscles étudiés, Bigland-Ritchie *et*

al. (1979) ont repris ces expériences parmi les deux muscles et ont conclu que l'échec de la propagation neuromusculaire ne constitue pas un site important de fatigue lors d'un effort maximal soutenu. Les auteurs ont suggéré et que les résultats de Stephens *et al.* (1972) peuvent potentiellement être attribués à des problèmes méthodologiques.

Dans le but de déterminer si l'échec de la TNM peut constituer un site de fatigue lors de tâches motrices plus habituelles, Fuglevand *et al.* (1993) ont mesuré l'efficacité de la propagation neuromusculaire lors d'une contraction isométrique sous-maximale du muscle abducteur du doigt. Ils ont observé que l'amplitude du signal EMG évoqué est atténué lorsque la limite de l'endurance est atteinte pour ce muscle. Par ailleurs, il a aussi été démontré qu'une série de contractions sous-maximales intermittentes du muscle soléaire chez l'humain provoque un certain degré d'échec au niveau de l'activation de la fibre musculaire (Bigland-Ritchie 1986).

Nous devons donc conclure que l'échec de la TNM peut survenir sous certaines conditions, mais sa contribution à la fatigue lors de tâches motrices chez l'humain demeure controversée. Ces inconsistances peuvent être attribuées au muscle étudié, à la méthodologie employée, ou au type de contraction effectué.

2.4- LE DÉVELOPPEMENT DE LA JNM

2.4.1- Effets de l'innervation à la JNM chez le rat en développement

Le développement embryonnaire du rat s'effectue sur une période d'environ 22 jours. Au 13^e jour de la période de gestation, la distribution d'AChRs sur la fibre musculaire est uniforme tout le long du sarcolemme. L'innervation neuromusculaire s'effectue généralement lors du 14 et 15^e jour et est suivie par une agrégation d'AChRs au site de contact synaptique (Lomo 2003). Au même moment, la structure et les propriétés fonctionnelles du récepteur sont alors changées pour celles d'un récepteur adulte (Section 2.1) et l'expression des récepteurs extra-synaptiques est largement inhibée (Changeux 1992). Ces effets engendrent une densité d'AChRs à la plaque motrice qui est

environ 1000 fois plus élevée qu'aux régions de membrane extra-synaptique. Cet état persiste aussi longtemps qu'il y a contact neuromusculaire fonctionnel (Karin 1991, Changeux 1992).

2.4.2- Effets de l'activité neuromusculaire à la JNM chez le rat adulte

Il est bien connu que l'innervation et l'activité neuromusculaire qui en découle jouent un rôle important dans l'établissement et le maintien d'une JNM fonctionnellement efficace (Lomo 2003). Par exemple, Lavoie *et al.* (1977) ont démontré chez le rat adulte, que l'inactivité induite par l'application de tétrotoxine² au nerf sciatique crée une augmentation de la quantité d'AChRs le long du sarcolemme. Linden *et al.* (1979) ont ensuite démontré que cet effet peut être inhibé par la stimulation électrique du muscle. Ensemble, ces résultats ainsi que des résultats de plusieurs autres études, indiquent que l'activité neuromusculaire supprime les AChRs en région extra-synaptique de la fibre musculaire (Drachman 1972, Hogan 1976, Shainberg 1976, Brenner 1991, Gilmour 1995, Meier 1998).

2.4.3- Effets des facteurs neurotrophiques à la JNM

L'expression d'AChRs à la JNM est assurée par certains facteurs neurotrophiques qui l'emportent sur l'effet inhibiteur de l'activité neuromusculaire mentionné ci-dessus. En effet, il a été démontré que la synthèse et l'agrégation d'AChRs au site de contact synaptique est assurée par l'effet de 3 facteurs, soit l'ARIA (*Acetylcholine Receptor Inducing Activity*), le CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*) et l'agrine.

L'ARIA est un facteur trophique libéré par le motoneurone qui promeut l'expression d'AChRs à la surface de la membrane plasmique (Duclert 1995). L'ARIA semble activer la transcription des gènes de l'AChR parmi les noyaux sous-synaptiques, soit à l'endroit où la molécule est libérée (Falls 1990, Si 1998). Le CGRP est

² La tétrotoxine provoque la paralysie neuromusculaire sans affecter le transport du matériel protéinique dans l'axone.

antérogradement transporté dans l'axone et libéré en tandem avec l'ACh. Laufer *et al.* (1989) ont démontré que la quantité d'AChRs augmente parmi les myotubes en développement traités au CGRP. Il a aussi été démontré que cet effet est médié par l'activation de l'AMP cyclique au site de contact synaptique (Uchida 1991). Buffelli *et al.* (2001) ont démontré que le CGRP induit des agrégats d'AChRs sur le muscle soléaire dont le nerf moteur est bloqué à la tétrodothine. Cet effet semble être induit par une augmentation du taux de synthèse du récepteur plutôt qu'une augmentation du taux d'incorporation d'AChRs existants ou d'une diminution du taux de dégradation (New 1986). L'agrine est une molécule qui est incorporée à la lame basale et provoque l'agrégation d'AChRs et d'AChE à la JNM (Meier 1998). Quantitativement, elle cause l'agrégation d'environ 50 % des AChRs dans les myotubes en culture (Wallace 1989). Il a été démontré que l'agrine provoque la migration latérale du récepteur et crée une zone extra-cellulaire collante, puisque les agrégats d'AChRs ne sont pas prévenus par des inhibiteurs de la synthèse protéique (Hoch 1999).

2.5- L'ACTIVITÉ PHYSIQUE ET LA JNM

2.5.1- Les types de fibres musculaires

Des études histologiques du muscle squelettique ont révélé l'existence de deux types majeurs de fibres musculaires : les fibres oxydatives à contraction lente de type I ainsi que les fibres glycolytiques à contraction rapide de type II. Les fibres de type I sont habituellement petites et possèdent une activité de l'ATPase de la myosine qui est lente. Elles possèdent de nombreuses mitochondries et les enzymes impliquées dans la voie de synthèse aérobie de l'ATP sont très actives. Ces caractéristiques démontrent l'importance du pouvoir oxydatif de ces fibres assurant leur grande résistance à la fatigue, ce qui leur permet de soutenir un exercice modéré de longue durée lorsque l'apport en oxygène est suffisant. Alternativement, les fibres musculaires de type II à contraction rapide, et plus particulièrement les fibres de type IIb, sont généralement grosses, peu vascularisées et pauvres en mitochondries. Elles utilisent principalement les voies de dégradation

anaérobies pour la synthèse de l'ATP. Ces propriétés accordent donc à ce type de fibre la capacité de se contracter intensément pour une courte durée. (Pette 1993, Pette 2000).

2.5.2- La JMN aux fibres musculaires rapides et lentes

Afin de déterminer s'il existe des différences au niveau de la morphologie et de la physiologie des JNMs innervant ces deux types de fibres, plusieurs recherches ont documenté les aspects quantitatifs et qualitatifs des JNMs innervant deux muscles dont la composition myofibrillaire est tout à fait différente, soit le soléaire et l'extenseur long du pied (EDL). Le muscle soléaire, dont les motoneurones peuvent être actifs pendant plusieurs minutes à la fois à une fréquence relativement continue d'environ 20Hz (Hennig 1985), est composé d'au moins 85% de fibres lentes de type I (Armstrong 1984). Au contraire, les unités motrices du muscle EDL ne sont actifs que pour de brèves séquences et déchargent de courts trains d'impulsions à une fréquence d'environ 100Hz (Hennig 1985). Ce muscle est composé d'environ 80% de fibres rapides de type II (Armstrong 1984).

En effet, les JMN innervant les fibres musculaires rapides et lentes se distinguent morphologiquement et physiologiquement (Tableau 1). Par exemple, les terminaisons nerveuses du muscle EDL libèrent un CQ plus élevé que les JNMs innervant le muscle soléaire (Tonge 1974, Gertler 1978, Reid 1999) et ont par conséquent un plus haut facteur de sécurité pour la TNM (Gertler 1978, Wood 1997, Wood 2001). De plus, la \downarrow PdP lors de train d'activation est plus prononcée à la JNM du muscle EDL qu'à la JNM du muscle soléaire (Reid 1999). D'autres paramètres qui varient entre les JNMs de ces 2 muscles incluent une plus grande aire de la plaque motrice (Prakash 1995a, Prakash 1995b, Wood 1997), ainsi qu'une plus grande quantité totale de vésicules d'ACh à la JNM du muscle soléaire (Reid 1999). Ainsi, nous pouvons conclure, que de façon analogue aux patrons d'activation et aux capacités fonctionnelles de ces 2 muscles, les JNMs innervant les fibres du muscle EDL sont dotées de caractéristiques qui assurent une TNM efficace pour des contractions brèves (\uparrow CQ, importante \downarrow PdP), alors que les JNMs du muscle soléaire semblent être dotées de

caractéristiques qui assurent une libération d'ACh pour des périodes prolongées (\downarrow CQ, moyenne \downarrow PdP).

TABLEAU 1.
Comparaison des caractéristiques morphologiques et physiologiques à la JNM de fibres musculaires rapides et lentes.

Variable Dépendante	Effet du type de fibre	Références
Facteur de sécurité	Rapide > Lente (11% à 43%)	Gertler 1978, Wood 1997, Wood 2001
Contenu Quantique	Rapide > Lente (17% à 54 %)	Gertler 1978, Tonge 1979, Reid 1999
Diminution de l'amplitude du PdP (\downarrow PdP)	Rapide > Lente (22%)	Reid 1999
Fréquence des PdPmini	Rapide > Lente (153% à 266%)	Florendo 1983, Wood 1997
Densité des plis post-synaptiques	Rapide > Lente (10% à 15%)	Ogata 1988, Bewick 2003
Activité de AChE (G4)	Rapide > Lente (G4; 300%)	Gisiger 1983
Aire de la terminaison nerveuse	Rapide < Lente (30% à 46%)	Waerhaug 1992, Prakash 1995a
Aire de la plaque motrice	Rapide < Lente (24% à 80%)	Prakash 1995a, Prakash 1995b, Wood 1997
Quantité totale de vésicules d'ACh	Rapide < Lente (42%)	Reid 1999
Temps de recyclage des vésicules	Rapide = Lente (~2 minutes)	Reid 1999

2.5.3- Effets de l'entraînement en endurance à la JNM

La JNM constitue un site potentiel de fatigue neuromusculaire (Section 2.3) et est une synapse qui s'adapte en fonction du degré d'activité neuromusculaire (Section 2.4). Il est donc logique de postuler, que de façon analogue à l'appareil contractile qui s'adapte au stress de l'activité physique afin de retarder l'avènement de la fatigue (Pette 2000), tel le font aussi certains aspects morphologiques et/ou physiologiques à la JNM.

En effet, il est connu que plusieurs composantes de la JNM changent en fonction de conditions externes qui créent une perturbation de l'homéostasie cellulaire. Celles-ci incluent, l'inactivité (Robbins 1971, Snider 1979, Prakash 1995a, Prakash 1999), la thérapie hormonale (Davies 1994), la blessure par brûlure (Edwards 1999) et le vieillissement (Kelly 1978, Wilson 1984, Alshuaib 1990, Fahim 1997). Par contre, bien que la JNM soit la synapse la mieux caractérisée, l'état actuel de nos connaissances des changements induits par l'activité physique à la JNM, plus particulièrement les adaptations physiologiques, est faible. Le tableau 2 présente un recensement des publications scientifiques dont le but fut d'établir les effets de l'entraînement en endurance sur la morphologie et la physiologie de la JNM chez le petit rongeur.

2.5.3.1- Les adaptations morphologiques

Les résultats d'études s'intéressant aux adaptations morphologiques de l'élément pré-synaptique à la JNM indiquent que l'entraînement en endurance augmente l'aire occupée par la terminaison nerveuse des muscles EDL (Waerhaug 1992), gastrocnémien (Andonian 1988, Fahim 1997) et soléaire (Andonian 1988, Deschenes 1993), quoiqu'une étude n'ait pas été en mesure de montrer de changement significatif à la JNM de ce dernier (Waerhaug 1992). Il est à noter que l'augmentation est exprimée de façon relative au diamètre de la fibre musculaire (i.e., rapport « aire de la JNM / aire de la fibre musculaire ») et est ainsi indépendante d'un changement possible du diamètre de la fibre musculaire. De plus, Tomas *et al.* (1997) ont démontré que l'entraînement en endurance augmente la longueur et le nombre de zones actives et améliore la capacité oxydative de l'élément pré-synaptique du muscle EDL. Les résultats d'études sur le transport axonal de protéines indiquent que l'activité physique provoque une accélération de la vitesse de transport (Jasmin 1988), ainsi qu'une augmentation de l'abondance du SNAP-25 parmi le matériel transporté (Kang 1995). Puisque le SNAP-25 est une protéine impliquée dans le processus de fusion vésiculaire (Section 2.2), tout changement dans son expression parmi la terminaison nerveuse pourrait avoir des implications fonctionnelles importantes.

TABLEAU 2. Les effets de l'entraînement en endurance à la JNM du petit rongeur.

RÉFÉRENCE	MÉTHODE	STIMULUS	ESPÈCE ET MUSCLE (tissu)	ADAPTATION
Dorlochter <i>et al.</i> (1991)	-Electrophysiologie intra-cellulaire	Course en cages volontaires	Souris EDL	↑ CQ (30%) Atténuation de la ↓PdP
Fahim <i>et al.</i> (1997) ¹	-Histologie -Electrophysiologie intra-cellulaire	Course sur tapis roulant	Souris Gastrocnémien	↑ CQ (25%) ↑ Amplitude des PdPmini (23%) ↑ Aire de la terminaison nerveuse (24%) ↓ Fréquence des PdPmini (31%)
Tomas <i>et al.</i> (1997)	-Histochimie	Course sur tapis roulant	Rat EDL	↑ Longeur et quantité de zones actives ↑ Quantité de mitochondries pré-synaptique ↑ Longeur et profondeur de la plaque motrice
Waerhaug <i>et al.</i> (1992)	-Histochimie -Microscopie	Course sur tapis roulant	Rat EDL Soléaire	↑ Longeur et l'aire de la terminaison nerveuse dans EDL
Andonian <i>et al.</i> (1988)	-Histochimie	Course sur tapis roulant	Rat EDL Soléaire	↑ Aire de la terminaison nerveuse dans soléaire (22%) et EDL (32%)
Deschenes <i>et al.</i> (1993)	-Histochimie -Microscopie	Course sur tapis roulant	Rat Soléaire	↑ Aire de la terminaison nerveuse (25%) et de la plaque motrice (23%)
Gisiger <i>et al.</i> (1994)	-Analyse Sédimentaire	Course en cages volontaires	Rat Gastrocnémien, Plantaire, Tibialis Antérieur (TA), EDL, Soléaire	↑ AChE (G4) dans le muscle rapide (420%) ↓ AChE (A12) dans le soléaire (45%)

¹ Etude sur les effets du vieillissement. Les résultats présentés proviennent d'un groupe de souris dites "jeunes".

RÉFÉRENCE	MÉTHODE	STIMULUS	ESPÈCE ET MUSCLE (tissu)	ADAPTATION
Jasmin <i>et al.</i> (1990)	- Analyse Sédimentaire	Course sur tapis roulant	Rat <i>Gastrocnémien, Plantaire, Tibialis Antérieur (TA), EDL, Soléaire</i>	↑ AChE (G4) dans Gastrocnémien et plantaire (50%) ↓ AChE (G4) dans TA et EDL (40%) ↓ AChE dans soléaire
Sveistrup <i>et al.</i> (1995)	-Electrophorèse	Course en cages volontaires	Rat <i>EDL Soléaire</i>	↑ AChE (G4 et AChE total dans EDL; 300% et 72%) Légère augmentation de l'AChE totale dans soléaire
Herscovich (1987) ²	-Pharmacologie	Course sur tapis roulant	Souris <i>Gastrocnémien, Quadriceps, Diaphragme</i>	Activité de l'AChE inchangée. Quantité d'AChRs inchangée
Stebbins <i>et al.</i> (1985)	-Histochimie -Microscopie	Course en cages volontaires	Rat <i>Gastrocnémien Soléaire</i>	↑ Bourgeonnement des terminaisons nerveuses dans soléaire
Kang <i>et al.</i> (1995)	-Immunoprécipitation -Fluorographie	Course sur tapis roulant	Rat <i>Nerf Sciatique</i>	↑ Transport protéinique (32%)
Jasmin <i>et al.</i> (1988)	-Radiométrie -Pharmacologie	Course sur tapis roulant	Rat <i>Nerf Sciatique</i>	↑ Abondance du SNAP-25
Gharakhanlou <i>et al.</i> (1999)	-Immunohistochimie	Course sur tapis roulant	Rat <i>Soléaire</i>	↑ Transport protéinique rapide (~40%) ↑ CGRP dans le corps cellulaire des motoneurones (90%) ↑ CGRP dans le nerf sciatique (37%)
Wehrwein <i>et al.</i> (2002)	-Immunohistochimie	Course sur tapis roulant	Rat <i>Gastrocnémien Soléaire</i>	↑ GDNF dans gastrocnémien (200%) et soléaire (500%)

² Etude sur les effets du vieillissement. L'analyse des résultats n'indique pas si l'entraînement a un impact significatif chez les souris jeunes.

Les changements morphologiques documentés à la plaque motrice incluent une augmentation de l'aire de la plaque motrice à la JNM du muscle soléaire (Deschenes 1993). Ceci suggère que l'activité physique augmente soit la dispersion ou la quantité d'AChRs à la JNM, puisque l'aire de la plaque motrice est délimitée par la distribution des récepteurs. A cet effet, Herscovich *et al.* (1987) ont trouvé que l'entraînement en endurance n'induit aucun changement de la quantité d'AChRs parmi des muscles de composition myofibrillaire mixte. Par contre, certaines insuffisances au niveau de l'analyse statistique rendent ces résultats difficiles à évaluer de façon indépendante. Conséquemment, l'effet que peut avoir l'entraînement en endurance sur l'expression des AChRs à la JNM demeure ambigu.

2.5.3.2- Les adaptations physiologiques

Bien que ces études aient documenté certains effets de l'entraînement en endurance sur la morphologie de la JNM, il existe très peu d'études démontrant comment ceux-ci affectent la fonction de la JNM. Dans la seule étude ayant directement exploré cet aspect, Dorlochter *et al.* (1991) ont voulu déterminer l'effet de la course en cage volontaire sur l'efficacité de la TNM du muscle EDL chez la souris. Leurs enregistrements électrophysiologiques indiquent qu'au moment de l'activation du nerf moteur, la JNM de la souris entraînée libère un CQ 30 % plus élevé que celle de la souris sédentaire. Les auteurs ont aussi mis en évidence que l'ampleur de la \downarrow PdP est atténuée chez le groupe actif. Il est à noter que la pertinence physiologique de cette étude est contestable en raison de considérations méthodologiques (Section 2.6).

Les résultats d'une autre étude combinant les effets de l'exercice et du vieillissement sur l'efficacité de la TNM du muscle gastrocnémien indique que l'entraînement en endurance augmente le CQ de 25 %, augmente l'amplitude des PdPmini de 23 %, et diminue la fréquence des PdPmini de 31 % aux JNMs d'un muscle ayant une composition myofibrillaire mixte (Fahim 1997). Par contre, ces résultats sont difficilement comparables à l'étude précédente puisque ces données ont été acquises de souris dites jeunes. Etant donné que les résultats de cette même étude indiquent que le

vieillesse a un effet limitant sur la capacité adaptative de la JNM, l'absence d'un groupe adulte minimise l'impact de cette étude dans le présent contexte.

2.5.3.3- La direction des adaptations

L'activité neuromusculaire provoque une transformation des propriétés phénotypiques du muscle d'un profil rapide à un profil lent (Pette 1984, Pette 2000). Par exemple, Wahrmann *et al.* (2001) ont démontré que l'entraînement en endurance augmente la proportion de fibres de type 1 parmi des muscles de composition myofibrillaire principalement rapide ou principalement lente. Puisque plusieurs paramètres qui servent à évaluer la morphologie et la physiologie de la JNM expriment une association fonctionnelle avec le type de fibre associé (Section 2.5.2) et que la JNM est une synapse qui exhibe certaines adaptations dans des muscles de composition myofibrillaire rapide et lente (Section 2.5.3), il serait intéressant de déterminer si la direction dans laquelle survient les changements à la JNM peut suivre celle de l'appareil contractile, soit une transition d'un profil rapide à un profil lent.

En se référant à l'analyse fournie dans les sections précédentes, nous pouvons affirmer que même si certaines caractéristiques des JNMs du muscle EDL exhibent un profil plus lent en réponse à l'entraînement en endurance, un principe directif ne peut être établi. Par exemple, les JNMs du muscle EDL s'accaparent d'un profil lent au niveau de l'aire de terminaison nerveuse (\uparrow) et de l'ampleur de la \downarrow PdP en réponse à l'activation répétitive (une diminution atténuée), mais semblent devenir plus rapides en termes du CQ (\uparrow). Quoiqu'il n'existe aucune étude décrivant les effets de l'activité physique sur les caractéristiques électrophysiologiques de fibres musculaires lentes, les adaptations morphologiques à la JNM du muscle soléaire indiquent que l'entraînement en endurance augmente l'aire des éléments pré et post-synaptique, deux paramètres normalement plus élevés aux JNMs de fibres musculaires lentes.

Ainsi, de façon similaire aux fibres musculaires qui s'adaptent à l'entraînement en endurance, plusieurs caractéristiques des JNMs de fibres musculaires rapides et lentes

acquièrent un profil plus lent. Par contre, certains aspects fondamentaux de la fonction neuromusculaire, tels que les adaptations au niveau du CQ du muscle EDL, ne semblent pas suivre cette direction. Malheureusement, il n'existe actuellement aucune étude décrivant les effets physiologiques de l'activité physique à la JNM du muscle soléaire. Une telle étude permettrait de déterminer si l'activité physique affecte similairement la JNM d'un muscle rapide et lent, et si la direction des changements suit une transition d'un profil rapide à un profil lent.

2.5.4- Effets d'un stimulus hypertrophique à la JNM

De la même manière qu'il existe très peu d'études s'intéressant aux effets de l'entraînement en endurance sur la JNM du petit rongeur, rares sont les études qui décrivent les effets d'un stimulus hypertrophique sur la morphologie et/ou la physiologie de la JNM. Deschenes *et al.* (2000) ont constaté que le stimulus de l'entraînement en résistance est suffisant pour augmenter l'aire de la plaque motrice du muscle soléaire, et ce par une magnitude semblable à celle incitée par l'entraînement en endurance. Jasmin *et al.* (1991) ont observé une modeste augmentation de l'isoforme G4 de l'AChE à la JNM du muscle plantaire⁵ hypertrophié par ténotomie et course à pied, mais la magnitude de cet effet est bien en-deçà du niveau atteint suite à un entraînement en endurance. (Gisiger 1994, Sveistrup 1995). Banques *et al.* (1991) ont aussi induits une hypertrophie compensatoire du muscle plantaire du rat et ont constaté que même si l'aire de la JNM était augmentée de 25 % dans le groupe expérimental, la taille de la fibre musculaire était augmentée de 100 %, ce qui diminue conséquemment le rapport « aire JNM/ aire fibre musculaire ». Récemment, Argaw *et al.* (2004) ont démontré que l'efficacité de la TNM du muscle plantaire du rat est significativement améliorée suite à une hypertrophie induite par surcharge compensatoire + course en cage volontaire, mais que l'ampleur et/ou la direction de certains changements observés sont différents de ceux induits à la JNM du muscle EDL entraîné en endurance. Ainsi, parmi ces résultats, certains indiquent qu'un stimulus hypertrophique induit des changements équivalents à ceux induits par l'entraînement en endurance (Gisiger 1994, Deschenes 2000, Argaw

⁵ Muscle dont la composition myofibrillaire est principalement rapide.

2004), alors que d'autres ne suggèrent pas de parallélisme entre les deux formes d'entraînement (Banques 1991, Gisiger 1994, Svestrup 1995, Argaw 2004). Incontestablement, des études supplémentaires sont requises afin de clarifier cette question.

2.6- DES CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES LORS D'ÉTUDES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

Les chercheurs voulant réaliser des enregistrements électrophysiologiques *In Vitro* font typiquement face à 2 facteurs qui peuvent significativement modifier la pertinence de leurs résultats. Elles sont; 1) la composition et 2) la température du milieu d'incubation.

2.6.1- La composition du milieu d'incubation

Un aspect important à considérer lors d'études électrophysiologiques à la JNM est le mode par lequel est éliminé le potentiel d'action musculaire. Puisqu'en stimulant un nerf moteur, la réponse prévue est la contraction musculaire, une électrode intracellulaire ne peut résister à la force de cette contraction et à moins de prendre certaines précautions, l'électrode se fracture. De plus, il est impossible d'analyser le PdP en présence d'un potentiel d'action musculaire, puisqu'un événement électrique d'une telle rapidité et amplitude cache le PdP sous-jacent.

Afin d'abolir le potentiel d'action le long du sarcolemme et par conséquent la contraction musculaire, l'amplitude du PdP peut être réduite en diminuant la libération d'ACh par incubation dans un milieu faible en Ca^{++} et/ou fort en Mg^{++} . Similairement, il est aussi possible de diminuer l'amplitude du PdP en diminuant la réponse post-synaptique à l'ACh avec des compétiteurs aux AChRs, comme par exemple, le curare. Ainsi, lorsque le nerf moteur est activé dans de telles conditions, le PdP n'atteint pas le seuil de déclenchement des CSSV du sarcolemme. Une méthode alternative qui sert à abolir le potentiel d'action musculaire est de couper les extrémités des fibres

musculaires. Ceci a comme effet de diminuer le potentiel membranaire de la fibre à environ -40mV , ce qui inactive les CSSV et crée donc la paralysie musculaire désirée (Hong 1989, Prior 1993). Par contre, en plus du potentiel membranaire amoindri, ce type d'approche réduit la résistance membranaire. Ensemble, ces effets peuvent significativement moduler la conductance des AChRs et donc l'amplitude du PdP (Prior 1993). Malgré le fait que ces moyens permettent de caractériser le PdP sans les effets restreignants du potentiel d'action musculaire, ils imposent certaines restrictions quant à la pertinence physiologique des données. De toute évidence, si nous devons directement manipuler un système afin de permettre sa caractérisation, toutes conclusions émergeant de telles études sont, au moins partiellement, erronées à la source.

2.6.2- La température du milieu d'incubation

La température à laquelle une préparation neuromusculaire *In Vitro* est incubée pour la durée des enregistrements électrophysiologiques a un effet important sur la fonction des éléments pré- et post-synaptique. Glavinovic *et al.* (1979) ont démontré que la libération vésiculaire évoquée (PdPs) et spontanée (PdPminis) augmente en parallèle avec la température du milieu d'incubation. De plus, Moyer *et al.* (2001) ont démontré que la température a un effet modulateur sur la dynamique de la diminution et de la récupération de l'amplitude du PdP lors de trains de stimulation intermittents. Ainsi, afin d'évaluer l'efficacité et l'adaptabilité de la TNM, une température physiologique devrait être utilisée. Malgré ces évidences, afin d'assurer une préparation neuromusculaire métaboliquement stable *In Vitro*, et en somme éviter l'hypoxie cellulaire (Garber 1976), il est généralement nécessaire de maintenir la température du milieu d'incubation à environ $20\text{-}22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6.3- La μ -conotoxine, l'antagoniste des canaux sodiques musculaires

La découverte et la caractérisation d'une toxine isolée du venin de l'escargot de mer, *Conus geographus*, a révolutionné l'étude de la transmission synaptique à la JNM. Cette toxine, la μ -conotoxine, s'avère être un bloqueur spécifique des CSSV du

sarcolemme (Cruz 1985, Hong 1989). Cet attribut distingue la μ -conotoxine d'autres toxines similaires, comme la tétrodotoxine et la saxitoxine, puisque ces dernières se lient aux CSSV tant musculaires que nerveux. En ayant une affinité d'au moins dix fois plus grande pour les CSSV du muscle (Sosa 1993), il est possible d'éliminer le potentiel d'action musculaire et inciter la paralysie, sans toutefois supprimer l'activité neuronale et donc la fonction de la JNM. Il a été établi que la μ -conotoxine n'exerce aucun effet sur le potentiel membranaire de la cellule musculaire, sur l'activité de l'AChE, ou sur les caractéristiques du PdP ou du PdPmini (Hong 1989, Zengel 1994).

2.6.4- L'approche *In Situ*

Au cours des expériences électrophysiologiques réalisées dans le cadre de cette thèse, plusieurs démarches ont été entreprises afin de minimiser les considérations méthodologiques mentionnées ci-dessus. Afin d'y parvenir, nous avons développé une approche *In Situ*. Cette approche permet à la JNM d'être étudiée à une température physiologiquement pertinente (i.e., $\sim 37^\circ\text{C}$), puisque dans un tel cas, le métabolisme musculaire est assuré par le système circulatoire du rat. Nous avons aussi opté d'utiliser la μ -conotoxine afin d'abolir le potentiel d'action et inciter la paralysie musculaire. Ainsi, il a été possible d'évoquer des PdPs d'amplitude normale à partir de JNMs intactes, sans avoir recours aux diverses manipulations qui ont entravé la pertinence physiologique des études préalables.

2.6.5- Le choix du muscle

Les études électrophysiologiques présentées dans le cadre de cette thèse ont été effectuées à la JNM du muscle soléaire. Nous avons choisi ce muscle pour les raisons suivantes :

- Des études morphologiques ont démontré que la JNM du muscle soléaire s'adapte à diverses formes d'activités physiques, mais il n'existe actuellement

aucune étude portant sur les effets physiologiques de l'activité physique à la JNM de ce muscle,

et

- Sa composition myofibrillaire est quasi-homogène ($> 85\%$ type I, Armstrong 1984) et dans ce muscle, les fibres de type I ont un plus gros calibre que les fibres de type II (Gardiner 1980). Ces caractéristiques assurent que la majorité des JNMs échantillonnées proviennent d'un type de fibre connu.

CHAPITRE III

ARTICLE 1

ARTICLE I**ENDURANCE TRAINING INCREASES ACETYLCHOLINE RECEPTOR QUANTITY AT NEUROMUSCULAR JUNCTIONS OF ADULT RAT SKELETAL MUSCLE.**

Desaulniers P, Lavoie P.-A. et Gardiner P.F.

NeuroReport (1998) 9, 3549-3552.

RAISONNEMENT

Chez le rat adulte, l'expression des AChRs à la surface de la membrane plasmique musculaire est largement restreinte à la plaque motrice. Cette régionalisation est induite et maintenue tant par l'activité musculaire que par des influences neurotrophiques. Certaines études ont démontré que l'aire occupée par la plaque motrice augmente de 20% suite à un programme d'entraînement en endurance (Deschenes 1993, Tomas 1997). Par contre, il n'est pas connu si l'activité physique induit une augmentation de la quantité d'AChRs, ou une redistribution d'AChRs existants. Le but de cette étude était d'évaluer l'hypothèse que l'abondance d'AChRs à la plaque motrice est altérée par l'entraînement en endurance et de déterminer si l'entraînement affecte le taux de synthèse et/ou de dégradation d'AChRs aux JMN de plusieurs muscles du membre inférieur du rat.

RÉSULTATS

Les résultats indiquent que l'entraînement en endurance augmente la quantité d'AChRs dans des régions de tissus musculaire riches en plaques motrices (20%) et que cet effet est similaire parmi tous les muscles étudiés. Cette augmentation est provoquée par un ajustement des taux de synthèse et de dégradation des récepteurs. Ces résultats suggèrent que l'activité physique affecte de manière similaire les plaques motrices de divers types de fibres musculaires.

ABSTRACT

The aim of the study was to test the hypothesis that a 16 week endurance training program would alter the abundance of endplate-associated nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) in various rat skeletal muscles. We found a 20% increase in endplate-specific (^{125}I)-alpha-Bungarotoxin binding in several muscles of trained rats, accompanied by equal susceptibility of toxin binding to the inhibitory effect of D-tubocurarine in sedentary and trained muscles. We conclude that the neuromuscular junction adaptations that occur with increased chronic activation include an increase in nAChR number. Results of experiments designed to determine nAChR turnover also suggest that this effect is mediated by an alteration in the receptor's metabolic state. The potential implications and mechanisms of this adaptation are discussed.

KEYWORDS

Acetylcholine receptor

Alpha-bungarotoxin

Motor endplate

Neuromuscular junction

Rat skeletal muscle

Endurance training

INTRODUCTION

The neuromuscular junction's (NMJ) primary responsive element, the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), is the best characterized of all ligand-gated channels. Its expression on the surface of the cell membrane, at the mature NMJ, is mainly restricted to areas directly opposite the nerve endings. This regionalisation is induced and maintained by the motor nerve via the activity that it confers upon the muscle, as well as trophic substances released into the synaptic cleft during periods of activity¹. These control mechanisms alter the level of nAChR synthesis throughout the muscle, prolong the nAChR half-life at the motor endplate, and cause the receptor's cell surface mobility to become largely restricted to the postsynaptic area of the muscle².

There is increasing evidence that the function and morphology of the mammalian NMJ may demonstrate adaptations to physiological levels of increased activation. For example, endurance training increases presynaptic terminal size³ and quantal content⁴. These adaptations are most likely supported by the increased synthesis and fast axonal transport of proteins⁵, some of which may have trophic effects on neuromuscular components. In addition, we have previously shown that SNAP-25, which is destined for the nerve terminal and is instrumental in quantal release of acetylcholine⁶, is increased in abundance among fast-transported proteins in sciatic nerves of endurance-trained rats⁷. Such adaptations could constitute a strategy to reduce the possibility of neuromuscular transmission failure which is suggested to occur during continuous neuromuscular activity⁸.

Knowledge of the response of postsynaptic elements to increased activity is limited. Prakash *et al*⁹ have demonstrated that the size of the pre- and postsynaptic elements at the NMJ are tightly coupled, and that the extent to which the overlap occurs can be adjusted in situations of altered levels of activity. Also, Deschenes *et al*³ have shown that exercise training increases the area occupied by both the pre- and postsynaptic elements of the NMJ. However, whether increased activity results in a concomitant increase in endplate nAChR number, or in a redistribution of existing

nAChR is not known. The purpose of the present study was to test the hypothesis that the abundance of endplate-associated nAChR would be altered by chronic exercise.

MATERIALS AND METHODS

Treatment of animals

During these experiments, animals were treated according to the guidelines of the Canadian Council of Animal Care, and all procedures were approved by the University of Montreal animal ethics committee. Female Sprague-Dawley rats were endurance-trained on a treadmill for 12-16 weeks (30m/min, 5% grade, 2h/day, 5 days/wk). This training program evokes adaptations in muscle metabolism and in fast transport of proteins in motor axons^{5,7}. Control group animals were kept cage confined. At least 24 hours after the last training session, rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (40mg/kg, i.p.), and several muscles of various fiber-type composition (diaphragm, tibialis anterior, soleus, adductor longus, vastus lateralis (white)) were quickly excised. A sedentary animal was always treated in parallel with a trained animal.

nAChR quantity

nAChR number was determined by incubating the muscles for 60 minutes in an oxygenated mammalian-Krebs solution containing 1 $\mu\text{g/ml}$ of (¹²⁵I)Tyr⁵⁴-alpha-Bungarotoxin ((¹²⁵I)- α -Btx). The excess unbound toxin was subsequently eliminated by wash-out periods consisting of a single 1-hour wash, two 2-hour washes, and an overnight wash, all of which were carried out in 100 ml of mammalian-Krebs solution at 4°C. The following morning, the endplates were identified by staining for acetylcholinesterase¹⁰ and, under 10X magnification, the muscles were dissected into endplate-containing and non-endplate segments which were individually assayed for radioactivity content with a LKB Universal gamma counter. Endplate-specific binding of (¹²⁵I)- α -Btx was determined by subtracting c.p.m. of the non-endplate segments from c.p.m. of the endplate-containing segments on a weight-adjusted basis. The mean endplate-specific binding of each pair of muscles was then used for analysis purposes. Evidence that the toxin was truly binding to nAChR in the trained and sedentary muscles was provided by a series of competition experiments in which incubation with (¹²⁵I)- α -Btx in one member of each pair of muscles was both preceded by a 20 minute incubation in a Krebs solution containing 1 mM D-tubocurarine chloride and carried out in the

presence of 1 mM D-tubocurarine chloride, all other procedures being as described above.

nAChR turnover

The rate of nAChR synthesis was determined in a separate group of animals by injecting the tibialis anterior (TA) muscle of sedentary and trained rats with a saturating dose of unlabelled α -Btx¹¹. Twenty or 40 hours after the injection period, the muscles were excised and assayed for nAChR quantity as described above. nAChR degradation was evaluated by injecting the TA muscles with a saturating dose of (¹²⁵I)- α -Btx. Four days after the injection period, the muscles were excised and processed for endplate-specific binding determination.

Statistics

Data are expressed as mean \pm s.e.m. A two-way analysis of variance (ANOVA) was used for comparison between the groups except when indicated. The critical level of probability was set at 0.05.

RESULTS

We found a significant increase in endplate-specific (^{125}I)- α -Btx binding in the trained muscles (20%; $P < 0.002$); this increase occurred in the absence of any change in toxin binding to non-endplate muscle regions ($P > 0.50$) and presumably reflects an increased number of nAChR at the endplates. Figure 1A depicts the magnitude of this endplate-specific upregulation in the various muscles. The degree of endplate-specific binding inhibition caused by exposure to D-tubocurarine was similar in trained and control muscles ($P > 0.75$, Fig. 1B), confirming the nAChR nature of the increased endplate-specific radiolabelled toxin binding to trained muscles. Table 1 outlines the effect of the training program on whole muscle weight and shows that in 4 of the 5 muscles, endplate-specific toxin binding/mg muscle is increased by chronic exercise.

Figure 2 shows that the quantity of receptors that were synthesized 20 and 40 hours after blockade of existing receptors was 38% and 45% greater, respectively, in the trained TA. We found an overall training effect ($P < 0.03$) on nAChR synthesis, but no statistical difference in the rate of synthesis between 20 and 40 hours (there is no interaction between the “training” and “injection time” effects; $P > 0.55$). The amount of labelled nAChR remaining 4 days after a saturating (^{125}I)- α -Btx injection was identical for both groups (Sed = 65623 ± 7107 cpm, Trained = 65190 ± 4010 cpm; t-test, $P > 0.96$). Thus, endurance training appeared to decrease nAChR half-life.

DISCUSSION

The increased nAChR number of 20% is consistent with the 22% (soleus) and 32% (extensor digitorum longus) increase that has been reported for nerve terminal size with endurance training¹². A corresponding increase in endplate area, the pre- and postsynaptic elements of the neuromuscular junction having been shown to be tightly coupled⁹, would therefore imply no change in receptor density. The increased nAChR number may therefore indicate an increased endplate area to accommodate the increased terminal size. Evidence corroborating this interpretation has been reported by Deschenes *et al*³, who found that pre- and postsynaptic area is increased by endurance exercise. If muscle fiber diameter had increased following the training program, the increased endplate size would likely occupy a similar proportion of the total muscle surface. However, the type of training employed in this study has been shown to be of little consequence on muscle fiber diameter³ and we found no difference in whole muscle weights between the two groups (Table 1. All muscles; $P > 0.85$).

The increased nAChR quantity in the trained muscles is, therefore, probably accompanied by an increased endplate size, itself occupying a larger proportion of the muscle surface than its sedentary counterpart. Since nAChR are in considerable excess at the NMJ¹³, the functional consequences, if any, of the endurance training-induced increase in nAChR may be related to the phenomenon of receptor desensitization which occurs under conditions of high ACh release¹⁴. Thus, the increased nAChR number, along with the increased G4 form of acetylcholinesterase which we have previously documented in this model¹⁵, may limit the potential of the higher quantal content to produce receptor desensitization during sustained ACh release.

Interestingly, the increase in nAChR was a phenomenon which appeared to occur independently of the recruitment level of the muscles during training. We have previously shown that endurance training increases fast axonal transport to a similar extent in nerves innervating muscles with differing recruitment levels⁵, and we have recently found that the content of calcitonin gene-related peptide in motoneurons

innervating fast and slow muscles also increases similarly in trained rats¹⁶. The fact that the muscles we examined in this study all behaved analogously (Fig.1A) regardless of fiber-type composition or recruitment level may therefore indicate that this adaptation is related to these previously reported adaptations, and is mediated by trophic neural substances.

We also observed that exercise training may increase the rate at which nAChR are synthesized and inserted into the endplate area, and decrease receptor half-life. Figure 2 shows that the amount of nAChR was consistently greater at the trained NMJ, although the effect seems to manifest itself primarily in the first 20 hours of recuperation from the unlabelled α -Btx injection. Because the amount of toxin injected into the trained and sedentary groups was identical, it is arguable that we failed to bind all nAChR in the trained muscles given the increase in total receptor number we have found in this study. However, visual inspection of the animals' locomotive ability following the injections confirmed that the procedure induced paralysis of ankle flexion in both groups of animals. Four days after having saturated the muscles with (¹²⁵I)- α -Btx, the amount of persisting radiolabelled receptors was found to be identical in both experimental groups. Inferring a larger amount of receptors in the trained TA at the time of injection, we interpret this result as an indication that nAChR degradation is accelerated in trained muscles. The balance of the apparent enhanced synthesis and decreased half-life results in a steady-state 20% increase in nAChR at the NMJ of trained rats.

CONCLUSION

Endurance training increased nAChR quantity in endplate-rich regions of various rat skeletal muscles. This effect seems to be accompanied by an increased rate of nAChR synthesis by the muscle fiber. Such an adaptation may occur via increased motoneuronal synthesis, transport and secretion of neuropeptides such as calcitonin gene-related peptide, which elevates the level of nAChR synthesis during the developmental stages of the neuromuscular junction². This altered state of nAChR turnover on the surface of the muscle cell membrane of endurance-trained rats is indicative of a neuromuscular system having effective remodeling capabilities.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Phillip F. Gardiner.

REFERENCES

1. Brenner HR. *NIPS* 6, 281-286 (1991).
2. Duclert A and Changeux JP. *Phys Rev* 75(2), 339-368 (1995).
3. Deschenes MR, Maresh CM, Crivello JF *et al.* *J Neurocytol* 22, 603-615 (1993).
4. Dorlochter M, Irintchev A, Brinkers M *et al.* *J Physiol* 436, 283-292 (1991).
5. Jasmin BJ, Lavoie PA and Gardiner PF. *Am J Physiol* 255, C731-C736 (1988).
6. Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M *et al.* *Nature* 362, 318-324 (1993).
7. Kang C-M, Lavoie PA and Gardiner PF. *NeuroReport* 6, 549-553 (1995).
8. Sieck GC, Prakash YS. Fatigue at the neuromuscular junction: Branch point *vs.* Presynaptic *vs.* Postsynaptic mechanisms. In Gandevia SC *et al.*, eds. *Fatigue: neural and muscular mechanisms*. New-York, Plenum Press, 1995(vol 384): 83-100.
9. Prakash YS, Smithson KG and Sieck GC. *J Neurocytol* 24, 225-235 (1995).
10. Buckley GA and Heaton J. *J Physiol* 199, 743-749 (1968).
11. Fumagalli G, Balbi S, Cangiano A *et al.* *Neuron* 4, 563-569 (1990).
12. Andonian MH and Fahim MA. *Int J Sports Med* 9, 218-223 (1988).
13. Rochel S and Robbins N. *Brain Res* 435, 41-47 (1987).
14. Magleby KL and Pallota BS. *J Phys* 316, 225-250 (1981).
15. Gisiger V, Bélisle M and Gardiner PF. *Eur J Neuroscience* 6, 673-680 (1994).
16. Gharakhoulou R, Chadan S, Gardiner PF *Can. J. Appl. Physiol.* 22 (Suppl), 20P (1997).

FIGURE LEGENDS

Figure 1(A). Endplate-specific (^{125}I)- α -Btx binding in skeletal muscles of sedentary (n=6) and endurance trained (n=6) rats. The mean from the left and right hindlimbs (and both hemi-diaphragms) were used for each animal. Data for individual muscles (\pm s.e.m.), along with a 2-way ANOVA on the pooled results (ALL) are provided. **(B).** D-tubocurarine chloride-induced endplate-specific (^{125}I)- α -Btx binding inhibition in sedentary (n=6) and trained (n=6) rats. Percent inhibition was obtained by comparing endplate-specific binding from muscles which were exposed to 1 mM D-tubocurarine chloride with that of their contralateral counterparts which were not exposed to the D-tubocurarine chloride .

Figure 2. (^{125}I)- α -Btx endplate-specific binding in sedentary (n=5) and trained (n=4) TA muscle, 20 and 40 hours following an unlabelled α -Btx intramuscular injection i.m. designed to saturate existing nAChR. The increased quantity of radiolabelling in the trained muscles reflects an enhanced rate of nAChR synthesis in these muscles, although the effect seems to primarily manifest itself during the initial 20 hour period.

TABLE 1

The effect of chronic exercise on whole muscle weights and endplate-specific (¹²⁵I)- α -Btx binding/mg of muscle in 5 rat skeletal muscles.

Muscle (n)	Sedentary		Trained	
	Weight (mg)	cpm/mg	Weight (mg)	cpm/mg
Diaph (6)	234 \pm 15	287 \pm 13	233 \pm 11	348 \pm 21*
TA (6)	542 \pm 24	126 \pm 18	548 \pm 28	153 \pm 14 *
Adl (6)	40 \pm 7	415 \pm 23	43 \pm 10	421 \pm 37
Sol (6)	108 \pm 13	256 \pm 11	102 \pm 9	324 \pm 18 *
VLW (6)	268 \pm 37	79 \pm 11	271 \pm 33	123 \pm 16 *

(* $P < 0.05$).

FIGURE 1-A

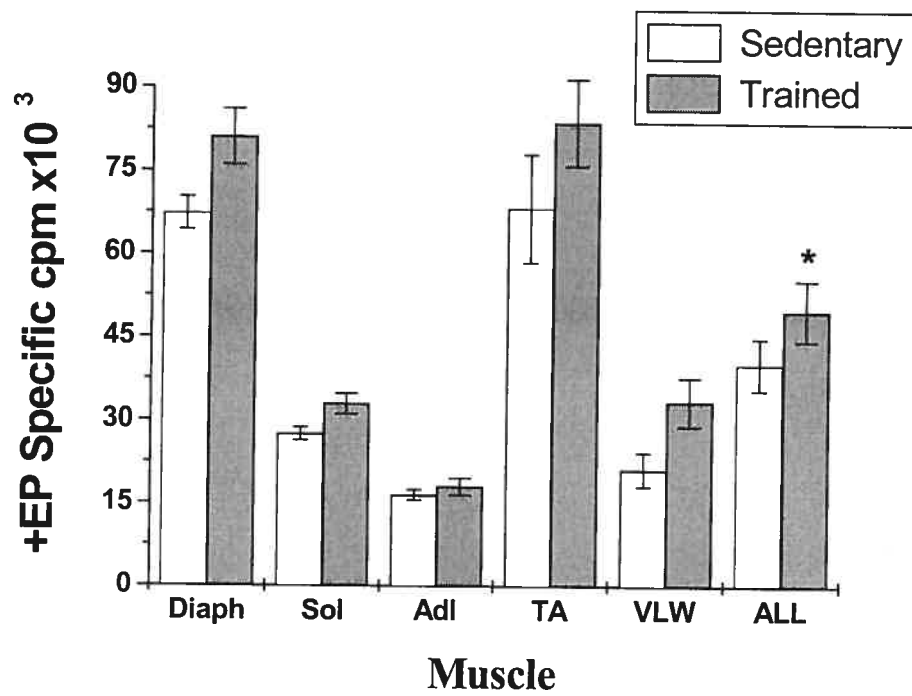


FIGURE 1-B

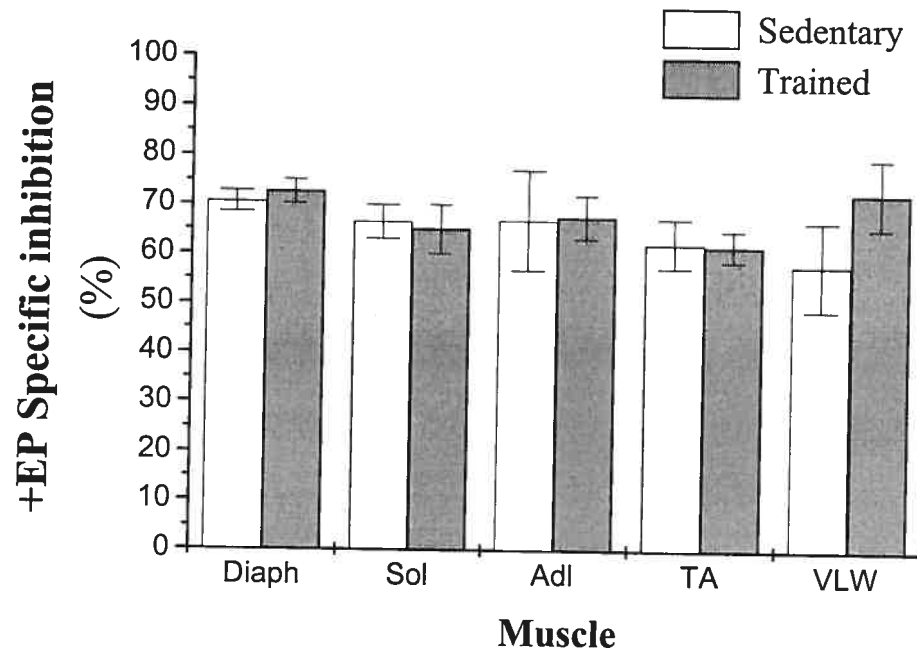
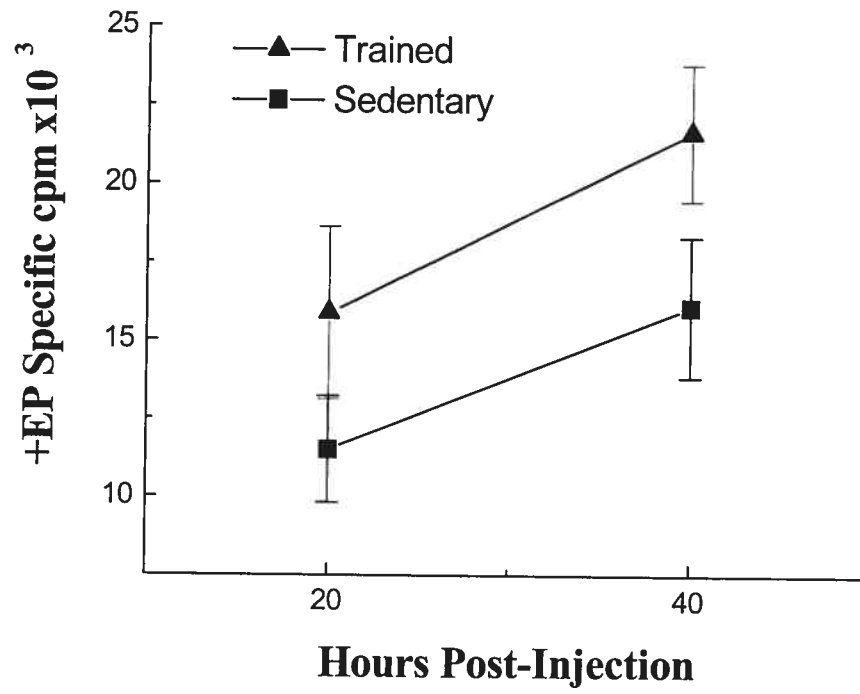


FIGURE 2



CHAPITRE IV
ARTICLE 2

ARTICLE II

HABITUAL EXERCISE ENHANCES NEUROMUSCULAR TRANSMISSION EFFICACY OF RAT SOLEUS *IN SITU*.

Desaulniers P, Lavoie P.-A. et Gardiner P.F.

Journal of Applied Physiology (2001) 90, 1041-1048.

RAISONNEMENT

Il est connu que l'entraînement en endurance provoque plusieurs changements morphologiques à la JNM. Le degré par lequel ces changements se traduisent en effets physiologiques est incertain. Dorlochter et al. (1991) ont démontré que la course à pied régulière augmente le CQ à la JNM du muscle EDL chez la souris, mais il n'existe actuellement aucune étude décrivant les effets de l'activité physique sur la JNM de fibres musculaires lentes. Le but de cette étude est de déterminer l'effet de l'entraînement en endurance sur l'efficacité de la TNM du muscle soléaire.

RÉSULTATS

Les résultats de cette étude indiquent qu'une augmentation du CQ et une atténuation de la \downarrow PdP sont les conséquences de l'activation régulière des JNMs du muscle soléaire chez le rat. La direction et la magnitude de ces changements sont similaires à ceux observés aux JNMs de fibres musculaires rapides. Il semble donc, qu'analogiquement au phénotype des fibres musculaires rapides et lentes qui changent dans la même direction suite à un entraînement en endurance, telles le font aussi certaines caractéristiques fonctionnelles à la JNM. Cependant et contrairement aux adaptations de l'appareil contractile, cette transformation ne semble pas suivre un cheminement strictement rapide à lent, puisque l'entraînement a augmenté le CQ, une mesure normalement plus élevée aux JNMs de fibres musculaires rapides.

ABSTRACT

Rat motor nerve terminals and the endplates they interact with exhibit changes to varying patterns of use, as when exposed to increased activation in the form of endurance exercise training. The extent to which these changes affect neuromuscular transmission efficacy is uncertain. In this study, the effects of habitual exercise on the electrophysiological properties of neuromuscular transmission in rat soleus muscle were investigated using a novel *in situ* approach. Consistent with previous reports, miniature endplate potential frequency was enhanced by habitual exercise. Other passive properties, such as resting membrane potential, miniature endplate potential amplitude, and “giant” miniature endplate potential characteristics were unaltered by the training program. Full size endplate potentials were obtained by blocking soleus muscle action potentials with μ -conotoxin GIIIb. Quantal content values were 91.5 and 119.9 for control and active groups respectively ($P < 0.01$). We also measured the rate and extent of EPP amplitude rundown during 3-second trains of continuous stimulation at 25, 50, and 75Hz; at 50 and 75Hz, we found both the rate and extent of rundown to be significantly attenuated (10-20%) in a specific population of cells from active rats ($P < 0.05$). The results establish the degree of activity-dependent plasticity as it pertains to neuromuscular transmission in a mammalian slow-twitch muscle.

KEYWORDS

Motor activity

Exercise

Neuromuscular junction

Synaptic transmission

Endplate potential

INTRODUCTION

The mammalian neuromuscular junction (NMJ) is continuously being remodelled in response to different physiological and pathological situations. It is known that NMJs from adult vertebrates can exhibit long-term signs of plasticity when subjected to altered usage (6, 40, 44). Among the known stimuli for neuromuscular remodelling, endurance exercise training constitutes a physiological manner of increasing neuromuscular activity to an extent where changes in both muscular and neural constituents of the NMJ occur (33). For example, in rat, habitual exercise is known to induce an overall enlargement of the neuromuscular synapse (10, 42), as well as to alter the abundance of several proteins implicated in the process of neuromuscular transmission (8, 15, 26).

It is well documented that NMJs from fast- and slow-twitch muscles have different properties. NMJs innervating the fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) muscle are known to have higher quantal content (QC) (14, 38, 46) and miniature endplate potential (MEPP) frequency (46), whereas NMJs from slow-twitch muscle fibres have a larger endplate area (34, 35, 46) and total presynaptic vesicle pool size (38). Many differences have also been noted with respect to their adaptive capacities, fast-twitch NMJs often showing more substantial change in response to altered levels of activity (2, 15, 34, 43). In the only study to directly address the potential effect of exercise on neuromuscular transmission efficacy, Dorlochter *et al.* (1991) have shown that in the fast-twitch mouse EDL muscle, habitual exercise increases QC as well as the safety margin for neuromuscular transmission. Considering the differences between slow NMJs and their fast-twitch counterparts (cited above), an intra-cellular electrophysiological study of soleus motor endplates was carried out with the aim of determining what effect exercise may have on the efficacy of neuromuscular transmission at NMJs innervating a predominantly slow-twitch muscle. We hypothesize that transmission efficacy at soleus motor endplates may be well adapted to frequencies of activation which resemble its postural activation frequency (i.e. ~25Hz) (19, 20), and

may yet show signs of functional adaptation to increased usage when tested at higher frequency bursts which occur during treadmill running in the rat (39).

To date, electrophysiological studies have been limited to the range of muscles that lend themselves to *in vitro* investigations. Garber *et al.* (1976) have shown that muscles exceeding 30 mg of weight, such as is the case with most hindlimb muscles from an adult rat, show signs of altered metabolic integrity and develop a hypoxic core at 37° C *in vitro*, which eventually renders the preparation ineffective over time. Also, most previous electrophysiological studies at mammalian motor endplates have been hindered by methodological limitations including pharmacological manipulations known to affect presynaptic function (18, 21, 22, 30, 44). In an attempt at minimizing these issues, we have developed a mammalian *in situ* approach using μ -conotoxin GIIb, thereby allowing a reliable and physiological characterization of neuromuscular transmission in the anaesthetised rat. The aforementioned toxin is quite effective in preferentially blocking muscle Na⁺ channels in mammalian nerve-muscle preparations (7, 21), and thus allows investigators to evoke full size endplate potentials (EPPs) from NMJs unaltered by various manipulations that have been necessary in the past. To our knowledge, this constitutes the first description of full size endplate responses *in situ*. Some of these results have already been published in abstract form (9).

METHODS

Animal Care

Female Sprague-Dawley rats in the active group were trained to run on a motor driven treadmill at 30m/min, 30 min/day, gradually increasing the time spent on the treadmill so that by the ninth week they were running 2 h/day. The animals were trained 5 days/wk, and the duration of the training program was 24 to 28 weeks. This program has been used in this laboratory to induce neuromuscular adaptations in several rat hindlimb muscles including the soleus. These changes include enhanced muscle oxidative enzyme activity and motoneuron metabolism (16, 23, 26), as well as increased nAChR number (8), SNAP25 abundance (26), and motoneuron cell body CGRP content (16). Age-matched control group rats were kept cage-confined. All animals were housed in a light- and temperature-controlled environment, and 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 the guidelines set by the Canadian Council on Animal Care. All efforts were made to minimize animal suffering in these experiments.

Surgery

At least 24 hours after the last training session, rats were anaesthetised with a Ketamine/Xylazine mixture (62 and 8 mg/Kg i.p., respectively), and were maintained under deep anaesthesia throughout the experiment with additional injections of 20.5 and 2.5 mg/Kg, respectively, every 45 minutes. The left hindlimb was dissected so that the soleus muscle and its innervating neural branch were easily accessible for the subsequent electrophysiological experimentation. Special care was taken not to damage any of the blood supply feeding the muscle, as this would adversely affect the muscle's long term viability as well as the conotoxin's mode of delivery to the muscle.

A catheter was inserted into the left jugular vein, through which μ -conotoxin GIIIb (Alomone, Israel) could be delivered to the animal's circulatory system. We found this to be the most efficient way of obtaining the desired paralytic effect. A tracheotomy

was performed so the animal could breathe via a ventilator for the duration of the experiment (Harvard miniature-ventilator model 50-1700). Expired CO₂ was monitored throughout the experiment and ranged from 2.7% to 4.2%. The rat rested on a heating pad (core temperature (°C): 35-37.7) and the spine was clamped to prevent any random movement. The left hindlimb was prepared for the electrophysiological measurements by pulling up the surrounding skin flaps to form a pool-like structure, which was filled with heated circulating light mineral oil (bath temperature (°C): 35-37.7).

Electrophysiological recordings

Full size endplate potentials were obtained by blocking muscle Na⁺ channels with conotoxin. Evoked force, which would begin to decrease ~10 min following an initial 500 µl injection of 25µg/ml µ-conotoxin in saline solution, was typically abolished 45 min into the injection scheme (~100µl/10 min). Thereafter, very low levels of force were maintained throughout the experiment by infusing 100µl of the toxin solution when deemed necessary (approx. every 30 min).

Intracellular resting membrane potential (RMP), MEPPs, and EPPs were recorded using KCl-filled (3.0M) glass microelectrodes (< 10 MΩ). Mammalian muscle NMJs are typically located at the midpoint of each muscle fibre thereby facilitating endplate localization within a relatively unipennate muscle such as the rat soleus. Once the microelectrode was inserted at close proximity to an endplate, as determined by the presence of MEPPs, the RMP was allowed to stabilise for 2 min. MEPPs were then recorded onto FM tape (Vetter model 420-K) for later digitization (10KHz) and analysis as described below. An EPP was then evoked (0.05ms square wave supramaximal pulse, delivered by a S88D Grass stimulator via a bipolar electrode) and sampled (33KHz) for estimation of QC. These procedures were followed by 3s of continuous indirect stimulation evoked at frequencies of 25, 50, and 75Hz, either in ascending or descending order of frequency, in alternate successfully impaled muscle fibres. These trains of EPPs were digitized (10KHz) and stored for later analysis of stimulation-induced change of EPP amplitude (i.e. EPP amplitude rundown). A minimum period of 3 min was allowed to elapse between trains within a cell; inter-cell interval was at least 5 min. These rest

periods are sufficient to allow proper recovery of stimulation-induced change in EPP amplitude and MEPP frequency (49). All cells included in this study had a RMP of no less than -60mV . If any cell depolarized by more than 10mV during the sampling, the data were eliminated. Both groups included in this study consisted of 8 animals, the number of endplates from which data were acquired ranged from 3 to 11 per animal. The total number of data points included in the passive properties and QC analysis was 37 for the control group and 41 for the active group. The total number of data points included in the EPP amplitude rundown analysis depended on the frequency of stimulation, and is given within Fig. 3. At the end of each experiment (i.e. when muscle fibres were no longer being successfully impaled), the animals were euthanized with an overdose of anaesthetic.

Analysis

For each cell, average MEPP amplitude, frequency, and rise time were obtained from 15-20 3s time bins (i.e. 45 to 60s of recordings) which were analyzed using a specially designed event detection software with the amplitude threshold set at $150\mu\text{V}$. Individual MEPPs were not included if they occurred on the tail end of a previous MEPP. Giant MEPPs (GMEPP), defined here as a MEPP having either 3X the mean MEPP amplitude or rise time, were removed from the pool of MEPPs and analyzed separately. The following criteria were retained as minimum requirement for a cell to be included in this study: EPP and MEPP rise time $<1\text{ms}$, mean MEPP amplitude and frequency $>225\mu\text{V}$ and $>1/\text{s}$. QC was estimated using the direct method and corrected for non-linear summation using the empirical correction value of 0.8 as proposed by McLachlan and Martin (31).

Statistics

The results are expressed as means \pm SD. Student's t-test was used to compare data sets pertaining to QC. ANOVA was employed to analyze the data produced in the rundown experiments. A Tukey honest significant difference (HSD) procedure was used as a follow-up test. Pearson product moment coefficient of correlation was used to

establish extent of linear relationships between variables. Maximum probability of error was set at 5%.

RESULTS

We have attempted to determine if regular motor activity has a beneficial effect on the functional aspects of the NMJ in the adult rat soleus muscle by a novel *in situ* electrophysiological design. An example of the data acquired in these experiments is shown in Fig. 1. The traces highlight some of the measurements retained as dependent variables.

Of particular concern in these types of experiments is the variable yield of data from animal to animal. It is possible that combining data from several experiments having dissimilar yield can bias the range of data and influence mean values. A way of addressing this problem is to show how data distribution from a single high-yield experiment is similar to that from all experiments, independent of yield. Figure 2 clearly shows that both these distributions are very similar, the yield-independent plot (all data points) having only a slightly larger range than the single highest-yield experiment for both groups included in the present study. This suggests that combining data from varying yield experiments will have a negligible effect on mean values, and we therefore feel justified in combining all data points because no discernible bias is being introduced into the analysis.

Effect of activity on MEPPs and QC

Table 1 summarizes the main results of this study as they pertain to passive membrane properties and QC. Regular physical activity increased the frequency of MEPPs at motor endplates of rat soleus muscle (see also Fig. 2A), but had no significant effect on MEPP amplitude or rise time, nor on GMEPP characteristics (mean GMEPP amplitude (μV)/frequency (min^{-1}); Control: $960 \pm 102 / 1.2 \pm 0.5$, Active $911 \pm 76 / 1.1 \pm 0.9$). The mean evoked EPP amplitude was on average larger in the active group of rats, as was the corrected value of QC (see also Fig. 2B). This represents a 31% increase in the number of synaptic vesicles released upon a single nerve impulse from cells that have been active on a long-term basis.

Effect of activity on EPP rundown

Figure 2, *C-E*, show the extent of EPP amplitude rundown (after 3s) at 25, 50, and 75Hz for both groups. The drop lines indicate mean value for each group, which is also plotted in figure 3A. Such modest differences in mean value, accompanied by suprisingly large standard deviations result in non-significant differences. However, upon closer inspection it is clear that in all cases, a subset of terminals showed a rather large degree of exercise-induced adaptation in EPP amplitude rundown resistance (Fig 2, *C-E*). We have consequently divided the response for both groups into quartiles after ranking according to the amplitude of the plateau EPP, which is obtained by averaging the last 5 EPPs in a train (Quartile assignments; Q1-Q2 (resistant), Q3-Q4 (fatiguable)). The quartiled data are plotted in Fig. 3, *B-D*.

As a general observation, the amplitude at the fifth and plateau EPPs were higher in the active group in all situations, but significant differences are only present in Q3-Q4 quartiles. No significant effect of exercise on the extent of rundown (i.e. plateau attained after 3s) was observed during trains evoked at 25Hz, although the rate of rundown (i.e. at 5th EPP) was attenuated in Q4 terminals (Fig. 3*B*). Except for rate of rundown for Q3 terminals at 50Hz, the effects of exercise were found to be significant for terminals comprising the fatigable quartiles at the higher frequencies of activation (Fig. 3, *C* and *D*). Interestingly, in all control group terminals, most of the rundown induced by 25Hz trains had occurred by the fifth pulse. Conversely, at higher frequencies of activation, further EPP amplitude rundown occurred. Q1 terminals aside, the extent of rundown was, as expected, highest during high-frequency trains of activation.

We found very little correlation between QC and the amplitudes of the fifth EPP (control $r = 0.46$, active $r = 0.40$; both $P < 0.05$) and plateau EPP (control $r = 0.24$ (not significant), active $r = 0.38$ ($P < 0.05$)). However, a strong positive correlation between the rundown at the 5th pulse and plateau rundown (Control $r = 0.69$, Active $r = 0.90$; both $P < 0.05$) supports our choice of the fifth EPP as an indicator of the rate at which EPPs rundown (as shown in Fig. 1). Figure 4 shows the effect of habitual exercise on QC and MEPP frequency when these data are ranked according to plateau rundown resistance

(i.e. quartiled as described above). The increased QC value from active rats occurred within quartiles Q1-Q2-Q3 (Fig. 4A), whereas the increased MEPP frequency occurred within quartiles Q2-Q3 (Fig. 4B). As previously shown in Fig. 3D for all cells, improved EPP amplitude rundown resistance occurred within quartiles Q3-Q4 in the same cells as in Fig. 4, *A* and *B*. These adaptations therefore seem to be spread across quartile rankings, and thus possibly across muscle-fibre subsets.

NMJs in which transmission failure occurred during continuous stimulation were found only in the control group and occurred exclusively at the higher rates of activation. It is conceivable that this failure is the result of cellular damage; however we have no reasonable basis to support this interpretation, given that the RMP of these cells did not abnormally decrease during the trains. Also, the occurrence of failed pulses in a train was dependent on both the frequency of stimulation ($75\text{Hz} > 50\text{Hz}$), and on the allowed inter-train recuperation period (not shown). These types of failed pulses may be attributed to axonal conduction failure (29), as the estimated total vesicle pool size within soleus nerve terminals is $\sim 250\,000$ vesicles (38), and is most certainly not depleted by 3 s trains of stimulation.

DISCUSSION

Rat motor nerve terminals and the endplates they interact with exhibit changes to varying usage. Our experiments show that, under physiological conditions, neuromuscular transmission efficacy can be enhanced by habitual exercise, an EPP evoked by stimulation of the motor nerve innervating a soleus muscle belonging to an active rat being on average 22% larger than an EPP evoked with an equivalent rise-time in a corresponding sedentary animal. QC was also significantly increased in active rats (31% corrected for non-linear summation, 22% uncorrected; both $P < 0.01$), which is suggestive of a change in synaptic transmission properties. These results are in accordance with previously reported alterations of QC induced by regular physical activity, which has been shown to increase by 30% in mouse EDL (11). The present results show that this adaptation also occurs in rat soleus muscle, where motor units belonging to sedentary animals are active 30% of the time *in vivo* (20). Despite such frequent postural activation, daily bouts of increased firing prompts functional remodelling at the soleus NMJ.

We have found endurance exercise to have no effect on MEPP amplitude (Table 1). Endurance-trained rats have previously been shown to possess an increased quantity of motor endplate-associated acetylcholine receptors (8). The current results therefore support the interpretation that these additional receptors increase the effective endplate area rather than increasing receptor density at motor endplates. We conclude this because the latter scenario would influence the post-synaptic response to a single quantum of transmitter, thereby increasing MEPP amplitude (25). A control MEPP frequency of 3/s (Table 1) is at the higher end of previously reported frequencies of spontaneous synaptic activity for rat soleus muscle (1, 28, 38, 48). This may be related to differences in age and temperature, but may also reflect the use of certain selection criteria pertaining to MEPP frequency (see *Analysis* above). A 100% increase in MEPP frequency at endplates of active rats is consistent with the results of previous experiments (1). Other factors being equal, enlarged pre- and post-synaptic elements, which have been shown to be a consequence of endurance exercise at rat soleus muscle

(2, 10), would necessarily induce a higher MEPP frequency by means of an enlarged area over which MEPPs could occur.

Typical estimates of QC for adult rat soleus muscle are quite variable and depend on factors such as temperature (17), age (1, 27, 45), and presence of drugs (36). A reliable assessment of QC for adult rat soleus obtained from full size EPPs *in vitro* at room temperature is 61.8 (46). Previous studies examining the effect of temperature on neuromuscular transmission have shown that QC increases by 20% as incubation temperature increases from 23 to 37°C (17). Our estimated QC of 91.5 for control soleus is 48% higher than the aforementioned estimate. A QC value of 86.9 for adult rat soleus has recently been reported (38), although it is not clear at what temperature this value was obtained.

At the normal adult NMJ, the number of quanta released by a nerve impulse greatly exceeds the amount required to reach the threshold for generating a muscle action potential. Soleus nerve terminals have been found to release 3.5 times as many quanta as are required (46). Although no attempts were made to quantify this safety factor in the present investigation, a 31% increase in quantal output from NMJs belonging to active rats most likely increases this margin. This interpretation is in accordance with the results of previous experiments showing a 30% increased quantal content to be paralleled by an increased safety factor (11).

This safety factor is thought to be essential at times when neuromuscular transmission is under stress, as during high frequency activation. Thus, 3-second trains of EPPs at 25, 50, and 75Hz were evoked to determine if the rate and extent of EPP amplitude rundown can be altered by regular use. If we are justified in assigning the Q1-Q2 and Q3-Q4 quartiles to NMJs having resistant and fatigable neuromuscular transmission respectively, then the effect of exercise we have found indicates improved EPP amplitude rundown resistance in the most fatigable population of NMJs. The origin of this effect is most likely presynaptic since MEPP amplitude, thus presumably

endplate reactivity, was unchanged by the exercise program, and suggests a change in the cellular machinery involved in the fusion and cycling of synaptic vesicles.

In mammals, evoked transmitter release at the NMJ is triggered by Ca^{++} influx through voltage-dependent Ca^{++} channels at active zones (24, 32). The rate at which EPP amplitude rundown occurs at the onset of a train of stimulation seems to be related to the quantity of vesicles docked in the immediate vicinity of the active zones (4, 47). Increased length of active zones and percent of axolemma occupied by active zones has previously been observed in active rats (42), and we have previously shown that habitual exercise increases the abundance of transported SNAP-25 within motor axons (26), a protein which is known to be essential for the docking and fusion of synaptic vesicles (41). Accordingly, enlarged active zones from exercised animals could support more fusion-ready vesicles and account for the relative resistance in the rate of rundown observed in Q3-Q4 terminals (Fig. 3). Enlarged active zones can also account for the exercise-induced enhancement of QC, as research on amphibian muscle has shown a good correlation between active zone length and QC (5, 37).

In our experiments, the extent of plateau rundown (i.e., EPP amplitude rundown after 3s) most likely reflects the rate at which vesicles are being cycled from the reserve pool to the docked position. Vesicle recycling and replenishment (reuse) is not a factor here considering an entire cycle from docked to fused to docked in adult rat soleus takes ~2 min (38). The improved EPP amplitude rundown resistance in exercised Q3-Q4 terminals at 50 and 75Hz (Fig 3, C and D) therefore implies a more efficient and/or a more widespread reserve to docked cycling system in these terminals. The lack of further rundown between the fifth and plateau EPP at 25Hz for both groups (Fig 3B), suggests neuromuscular transmission efficacy in control rats to be well adapted to this rate of activation, which corresponds to its postural activation frequency *in vivo* (19, 20).

The changes in neuromuscular transmission efficacy we have observed in these experiments seem to have occurred within different NMJ populations (Fig. 4). For example, the Q1-Q2 motor-nerve terminals did not exhibit enhanced plateau rundown

resistance, yet these same terminals account for most of the improvement in QC, whereas Q4 terminals showed improved plateau rundown resistance yet no improvement in QC. It is therefore conceivable that these changes reflect the total load of activity to which the specific motor nerve terminals are subjected. Thus, the Q1-Q2 terminals may already be active enough in the control group to have reached the threshold for enhanced EPP amplitude rundown resistance, while changes in QC may require a substantial rise in the muscle's activity level which are not attained by the Q4 terminals during this form of exercise. This heterogeneity of responses consequently implies different mechanisms by which these changes take place, or may be related to a gradation effect of a single mechanism.

It is particularly interesting to note that the changes in neuromuscular transmission efficacy in the soleus have occurred in the same direction as previously reported changes in the EDL (11), although fast- and slow-twitch NMJs are known to have different morphological and functional properties. A possible explanation for this is that the adaptations we have shown in a subset of NMJs reflect changes occurring in the ~15% of fast-twitch fibres within the soleus muscle (3), and that we are oversampling from this fibre population. However, this is highly unlikely given the smaller diameter of fast- *versus* slow-twitch muscle fibres within this muscle (13). Therefore, the results suggest improved neuromuscular transmission efficacy to be a genuine activity-dependent adaptation at NMJs innervating slow-twitch muscle fibres, and that the adaptive capacity of the neuromuscular synapse is not directly related to fibre-type as determined by histochemical methods. It is also conceivable that the previously reported changes in the mouse EDL are specific to that species, and that reproducing these experiments in a fast-twitch muscle from the rat would yield different results. Thus, the true value of our *in situ* approach will become apparent as larger plantar-flexor muscles (i.e. plantaris and gastrocnemius), previously ineffective under *in vitro* conditions, will be analysed under various physiological and pathological situations.

In conclusion, we have investigated the effects of exercise on neuromuscular transmission efficacy in the slow-twitch rat soleus muscle. The data indicate that

enhanced quantal content and EPP amplitude rundown resistance are the functional consequences of regular activation, particularly at frequencies above what is considered postural activation for rat soleus motor units. The data also suggest that the mechanisms involved are sensitive to the quantity of activity placed upon the neuromuscular synapse, as the adaptations have occurred within different motor nerve terminal populations within the muscle.

REFERENCES

1. Alshuaib, W.B, and M.A. Fahim. Effect of exercise on physiological age-related change at mouse neuromuscular junctions. *Neurobiol. Aging* 11(5): 555-561, 1990.
2. Andonian, M.H., and M.A. Fahim. Endurance exercise alters the morphology of fast- and slow-twitch rat neuromuscular junctions. *Int. J. Sports Med.* 9: 218-223, 1988.
3. Armstrong, R.B., and R.O. Phelps. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 171: 259-272, 1984.
4. Bauerfiend, R., T. Galli, and P. DeCamilli. Molecular mechanisms in synaptic vesicle recycling. *J. Neurocytol.* 25: 701-715, 1996.
5. Bennett, M.R., N.A. Lavidis, and F. Lavidis-Armson. The probability of quantal secretion at release sites of different length in toad (*Bufo Marinus*) muscle. *J. Physiol., Lond.* 418: 235-249, 1989.
6. Buonanno, A., and N. Rosenthal. Molecular control of muscle diversity and plasticity. *Dev. Genet.* 19(2): 95-107, 1996.
7. Cruz, L.J., W.R. Gray, B.M. Olivera, R.D. Zeikus, L. Kerr, D. Yoshikami, and E. Moczydowski. Conus Geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J. Biol. Chem.* 260(16): 9280-9288, 1985.
8. Desaulniers, P., P.-A. Lavoie, and P.F. Gardiner. Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at neuromuscular junctions of adult rat skeletal muscle. *NeuroReport* 9: 3549-3552, 1998.

9. Desaulniers, P., P.-A. Lavoie, and P.F. Gardiner. In situ endplate electrophysiology of rat soleus muscle: Enhanced neuromuscular transmission efficacy induced by habitual exercise (abstract). *The FASEB Journal* 14(4); A569, 2000.
10. Deschenes, M.R., C.M. Maresh, J.F. Crivello, L.E. Armstrong, W.J. Kraemer, and J. Covault. The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology. *J. Neurocytol.* 22: 603-615, 1993.
11. Dorlochter, M., A. Irintchev, M. Brinkers, and A. Wernig. Effects of enhanced activity on synaptic transmission in mouse extensor digitorum longus muscle. *J. Physiol., Lond.* 436: 283-292, 1991.
12. Garber, A.J., Karl, I.E., and D.M. Kipnis. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 251: 826-835, 1976.
13. Gardiner, P.F., G. Montanaro, D.R. Simpson, and V.R. Edgerton. Effects of glucocorticoid treatment and food restriction on rat hindlimb muscles. *Am. J. Physiol.* 238: E124-E130, 1980.
14. Gertler, R.A., and N. Robbins. Differences in neuromuscular transmission in red and white muscle. *Br. Res.* 142: 160-164, 1978.
15. Gisiger, V., M. Bélisle, and P.F. Gardiner. Acetylcholinesterase adaptation to voluntary wheel running is proportional to the volume of activity in fast, but not slow, rat hindlimb muscles. *Eur. J. Neurosci.* 6:673-680, 1994.
16. Gharakhanlou, R., S. Chadan, and P.F. Gardiner. 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, 1999.

17. Glavinovic, M.I. Change of statistical parameters of transmitter release during various kinetic tests in unparalysed voltage-clamped rat diaphragm. *J. Physiol., Lond.* 290: 481-497, 1979.
18. Glavinovic, M.I. Presynaptic action of curare. *J. Physiol., Lond.* 290: 499-506, 1979.
19. Gorassini, M., T. Eken, D.J. Bennett, O. Kiehn, and H. Hultborn. Activity of hindlimb motor units during locomotion in the conscious rat. *J. Neurophysiol.* 83: 2001-2011, 2000.
20. Hennig, R., and T. Lomo. Firing pattern of motor units in normal rats. *Nature* 214: 297-299, 1985.
21. Hong, S.J., and C.C. Chang. Use of geographutoxin II (mu-conotoxin) for the study of neuromuscular transmission in mouse. *Br. J. Pharmacol.* 97: 934-940, 1989.
22. Hubbard, J.I., and D.F. Wilson. Neuromuscular transmission in a mammalian preparation in the absence of blocking drugs and the effect of d-Tubocurarine. *J. Physiol., Lond.* 228: 307-325, 1973.
23. Jasmin B.J., and V. Gisiger. Regulation by exercise of the pool of G4 acetylcholinesterase characterizing fast muscles: Opposite effect of running training in antagonist muscles. *J. Neurosci.* 10(5): 1444-1454, 1990.
24. Katz, B., and R. Miledi. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J. Physiol., Lond.* 207: 789-801, 1970.

25. Katz, B., and S. Thesleff. On the factors which determine the amplitude of the "miniature end-plate potential". *J. Physiol., Lond.* 137: 264-278, 1957.
26. Kang, C.-M., P.-A. Lavoie, and P.F. Gardiner. Chronic exercise increases SNAP-25 abundance in fast-transported proteins of rat motoneurons. *NeuroReport* 6: 549-553, 1995.
27. Kelly, S.S. The effect of age on neuromuscular transmission. *J. Physiol., Lond.* 274: 51-62, 1978.
28. Kim, Y.I., T. Lomo, M.T. Lupa, and S. Thesleff. Miniature end-plate potentials in rat skeletal muscle poisoned with botulinum toxin. *J. Physiol., Lond.* 356: 587-599, 1984.
29. Krnjevic, K., and R. Miledi. Presynaptic failure of neuromuscular propagation in rats. *J. Physiol., Lond.* 149: 1-22, 1959.
30. Magleby, K.L., B.S. Pallotta, and D.A. Terrar. The effect of (+)-tubocurarine on neuromuscular transmission during repetitive stimulation in the rat, mouse, and frog. *J. Physiol., Lond.* 312: 97-113, 1981.
31. McLachlan, E.M., and A.R. Martin. Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J. Physiol., Lond.* 311: 307-324, 1981.
32. Meir, A., S. Ginsburg, A. Butkevich, S.G. Kachalsky, I. Kaiserman, R. Ahdut, S. Demirgoren, and R. Rahamimoff. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol. Rev.* 79(3): 1019-1088, 1999.
33. Panenic, R., and P.F. Gardiner. The case for adaptability of the neuromuscular junction to endurance exercise training. *Can. J. Appl. Physiol.* 23(4): 339-360, 1998.

34. Praksash, Y.S., W.Z. Zhan, H. Miyata, and G.C. Sieck. Adaptations of diaphragm neuromuscular junction following inactivity. *Acta Anat.* 154; 147-161, 1995.
35. Prakash, Y.S., K.G. Smithson, and G.C. Sieck. Growth-related alterations in motor endplates of type-identified diaphragm muscle fibres. *J. Neurocyt.* 24; 225-235, 1995.
36. Prior, C., J. Dempster, and I.G. Marshall. Electrophysiological analysis of transmission at the skeletal neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 30(1): 1-17, 1993.
37. Propst, J.W., and C.-P. Ko. Correlations between active zone ultrastructure and synaptic function studied with freeze-fracture of physiologically identified frog neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 7: 3654-3664, 1987.
38. Reid, B., C.R. Slater, and G.S. Bewick. Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *J. Neurosci.* 19(7): 2511-2521. 1999.
39. Roy, R.R., D.L. Hutchinson, D.J. Pierotti, J.A. Hodgson, and V.R. Edgerton. EMG patterns of rat extensors and flexors during treadmill locomotion and swimming. *J. Appl. Physiol.* 70(6): 2522-2529, 1991.
40. Sieck, G.C., and Y.S. Prakash. Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on fibre type. *Can. J. Appl. Physiol.* 3: 197-230, 1997.
41. Sollner, T., S.W. Whiteheart, and M. Brunner. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362(6418): 318-323, 1993.

42. Tomas, J., M. Santafé, M.A. Lanuza, and M.R. Fenoll-Brunet. Physiological activity-dependent ultrastructural plasticity in normal adult rat neuromuscular junctions. *Biol. Cell* 89: 19-28, 1997.
43. Waerhaug, O., H. A. Dahl, and K. Kardel. 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, 1992.
44. Wernig, A., and A.A. Herrera. Sprouting and remodelling at the nerve-muscle junction. *Prog. Neurobiol.* 27: 251-291, 1986.
45. Wilson, D.F., and R.C. Cardaman. Age-associated changes in neuromuscular transmission in the rat. *Am. J. Physiol.* 247: C288-C292, 1984.
46. Wood, S.J., and C.R. Slater. 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, 1997.
47. Wu, L.-G., and W.J. Betz. Kinetics of synaptic depression and vesicle recycling after tetanic stimulation of frog motor nerve terminals. *Biophys. J.* 74: 3003-3009 1998.
48. Yamashita, T., S. Ishii, and I. Oota. Effect of muscle stretching on the activity of neuromuscular transmission. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24(1): 80-84, 1992.
49. Zengel, J.E., and M.A. Sosa. Changes in MEPP frequency during depression of evoked release at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol., Lond.* 477.2: 267-277, 1994.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant (to P.F. Gardiner) from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. EPP amplitude rundown provoked by a train of continuous stimulation.

Rundown induced by 3-s trains evoked at 75Hz in control (*A*) and active (*B*) terminals. Cells were chosen to reflect the more pronounced effects of habitual exercise on neuromuscular transmission we have observed in these experiments. Downward stimulation artifact from control trace has been removed. *C* and *D*: close-up views of the first 10 EPPs in these same trains. 15 mV calibration bars for *A-B* and *C-D* are provided at left of *A* and *C* respectively.

Figure 2. Neuromuscular transmission efficacy in control and active rats.

Percentile distribution of MEPP frequency (*A*), quantal content (*B*), and EPP amplitude rundown in response to 3s trains of continuous stimulation at 25Hz (*C*), 50Hz (*D*), and 75Hz (*E*). Drop lines indicate mean value for each group, control (o) and active (•). Arrows establish the distribution range for the single highest-yield experiment for each parameter and group.

Figure 3. EPP amplitude rundown evoked by 3 s trains of continuous stimulation.

A: Extent of EPP amplitude rundown before quartiling, the number of data points for each group is given at the top of each column (open bars, control; solid bars, active). Rate and extent of rundown by the fifth EPP (solid) and at the plateau EPP (open) for each quartile (Q1,Q2,Q3,Q4), at all 3 frequencies (25Hz (*B*), 50Hz (*C*), 75Hz (*D*)), in both control (ctrl) and active (act) physiological conditions. Each mean corresponds to the EPP amplitude expressed as a percentage of the first EPP in the train. Number of data points comprising each quartile is given at the base of each column. *Different from respective quartile value in the control group at the same frequency of activation, $P < 0.05$.

Figure 4. Effect of exercise on neuromuscular transmission efficacy within NMJs ranked according to their “fatigue resistance”. Mean QC (*A*), and MEPP frequency (*B*) values for both groups (open bars, control; solid bars, active), from NMJs in which all

values were successfully sampled (i.e. both QC and rundown data). Graphs show how the effect of exercise on these parameters manifests itself within different quartiles ($*P < 0.05$).

TABLE 1*Passive properties and quantal content in control and active conditions.*

	RMP (mV)	MEPP rise time (ms)	MEPP amplitude (V)	MEPP frequency (Hz)	EPP rise time (ms)	EPP amplitude (mV)	Quantal Content (QC)	QC Corrected
Control	85.7 ± 6.7	672 ± 62	253 ± 34	3.5 ± 2.9	652.4 ± 43.5	19.45 ± 6.79	73.4 ± 22.1	91.5 ± 33.4
Active	86.1 ± 9.4	649 ± 68	266 ± 33	6.0 ± 3.1	684.1 ± 63.2	23.64 ± 8.76	89.8 ± 30.7	119.9 ± 39.0
	NS	NS	NS	$P < 0.01$	NS	$P < 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.01$

Values are means ± SD. Bottom row denotes statistically significant differences between group means (NS = not significant). Control *n*; 37 cells, 8 animals, >6000 MEPPs. Active *n*; 41 cells, 8 animals, >12000 MEPPs.

FIGURE 1

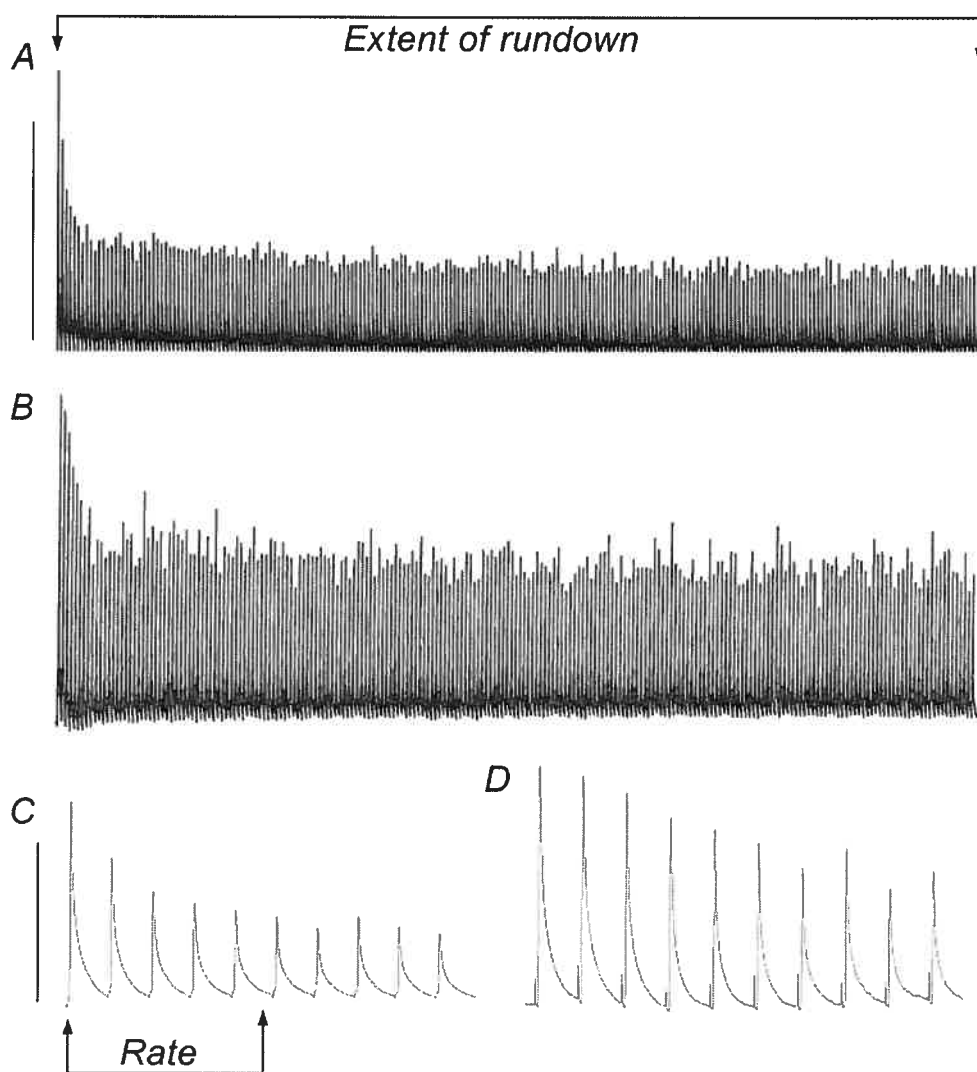


FIGURE 2

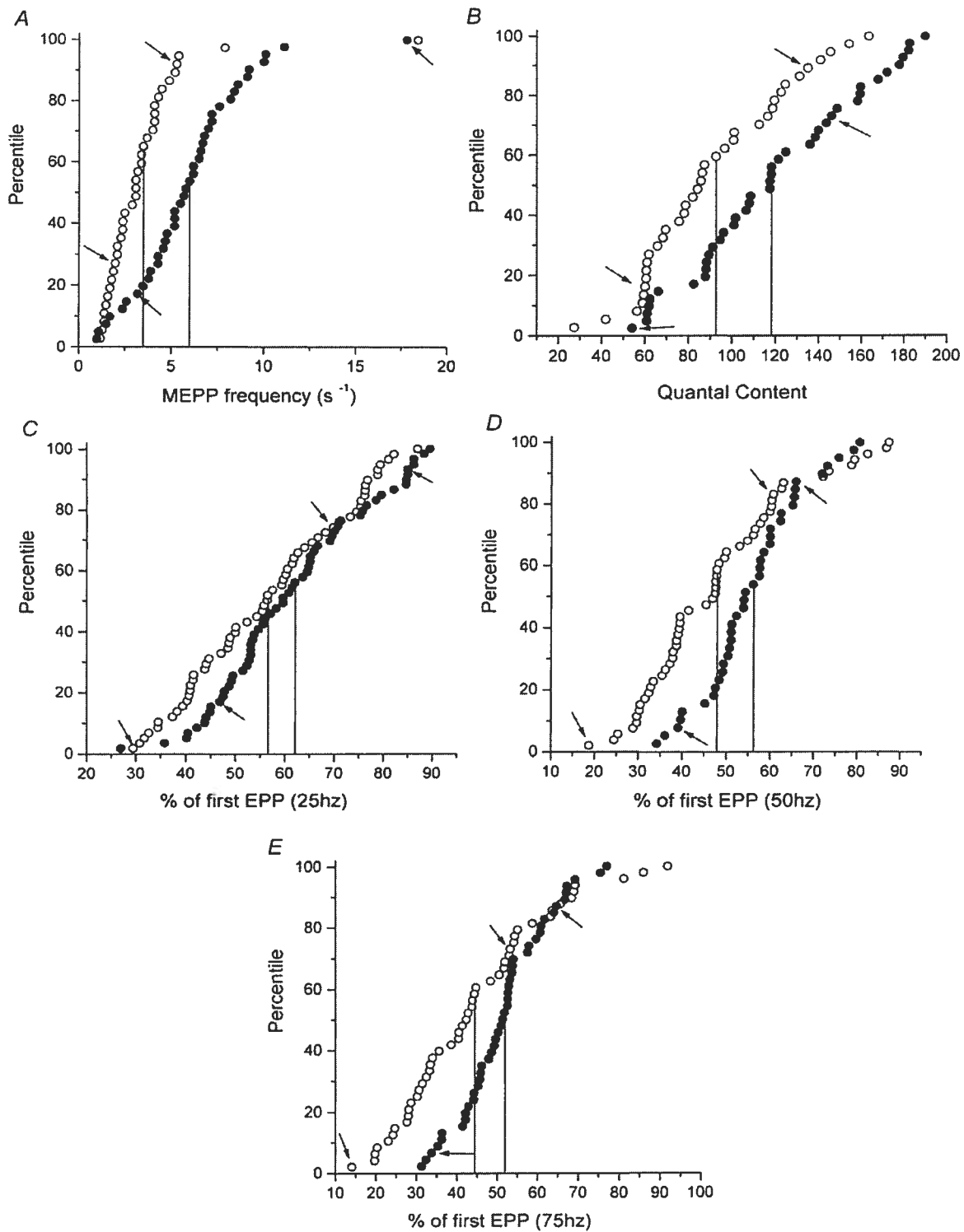


FIGURE 3

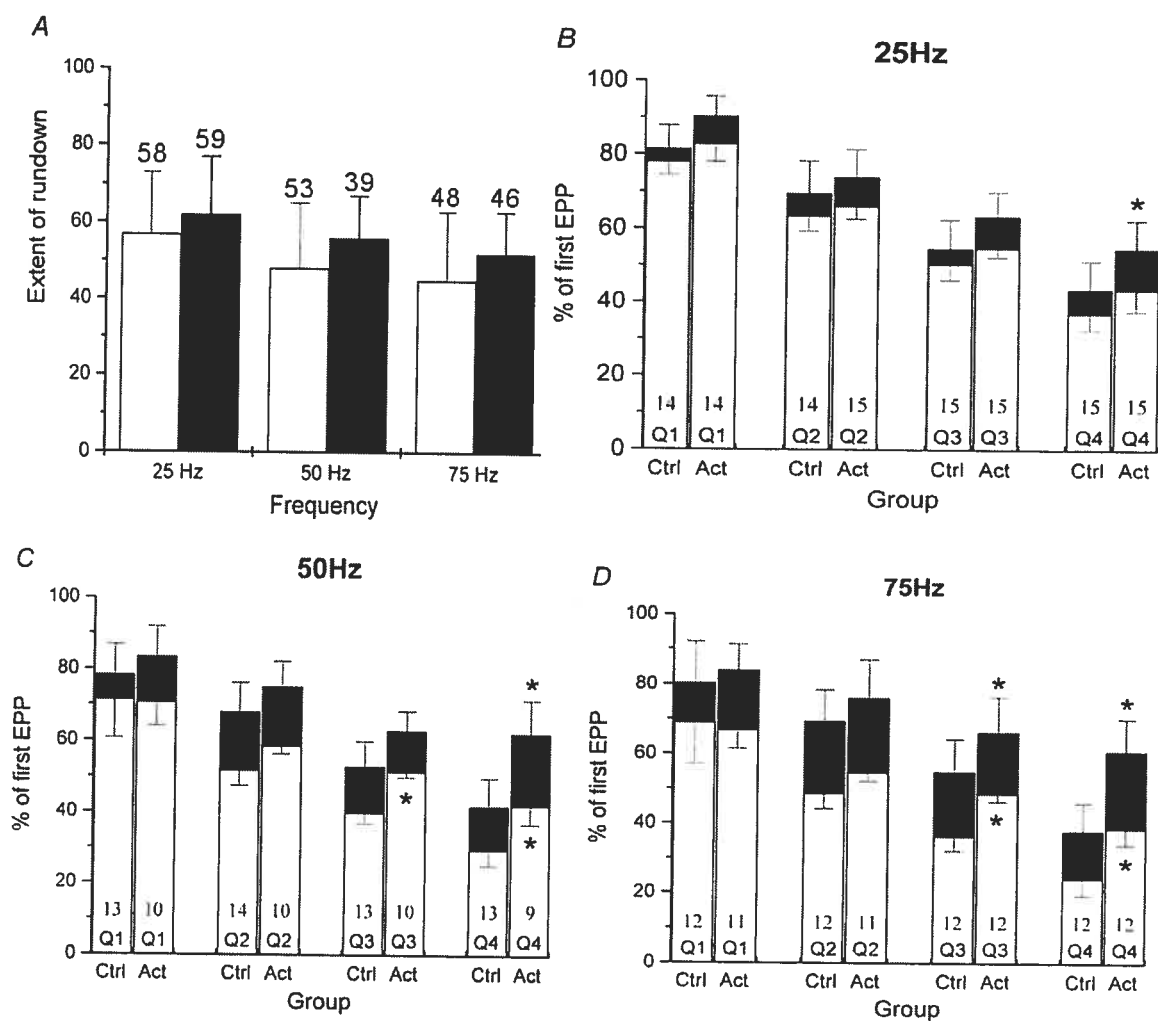
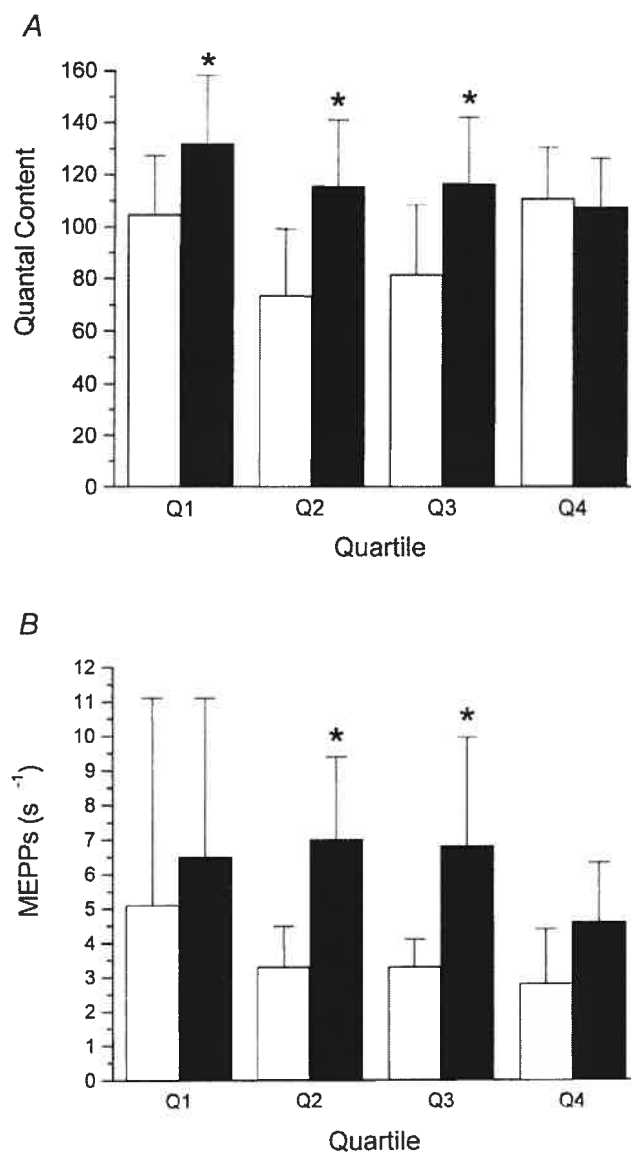


FIGURE 4

CHAPITRE V
ARTICLE 3

ARTICLE III**INCOMPLETE RECOVERY OF ENDPLATE POTENTIAL AMPLITUDE
WHILE INTERMITTENTLY ACTIVATING RAT SOLEUS
NEUROMUSCULAR JUNCTIONS *IN SITU*.**

Desaulniers P, Lavoie P.-A. et Gardiner P.F.

Muscle & Nerve (2002) 26, 810-816.

RAISONNEMENT

Dans une étude à la JNM du muscle diaphragme chez le rat, Moyer et al. (1999) ont démontré que les périodes quiescentes lors de l'activation intermittente du nerf moteur permettent à l'ampleur du PdP de se rétablir significativement. Il n'est pas connu si une telle récupération s'effectue aussi bien à la JNM d'un muscle locomoteur du rat. Nous avons donc évalué l'ampleur de la diminution et de la récupération de l'amplitude du PdP lors de trains de stimulation continuels et intermittents, à la JNM du muscle soléaire.

RÉSULTATS

Les résultats divergent de ceux obtenus à partir du muscle diaphragme puisque la récupération de l'amplitude du PdP lors des périodes quiescentes est incomplète, n'excédant jamais ~ 80 % de l'amplitude du PdP initial. Ceci suggère que l'ampleur de la diminution et de la récupération de l'amplitude du PdP lors de trains d'activation intermittents est potentiellement dépendante du type de fibre musculaire à l'étude.

ABSTRACT

Studies dealing with neuromuscular transmission efficacy typically employ continuous patterns of activation to demonstrate decrements in endplate potential (epp) amplitude. Recent evidence from rat diaphragm muscle has shown that including periods of quiescence to the stimulation protocol allows epp amplitude to recover between series of contractions. Whether similar recovery occurs in rat hindlimb muscle is unknown. In this study, we have measured declines in epp amplitude in rat soleus muscle during trains of stimulation evoked either continuously (10 s) or intermittently (400 ms repeated every second), using an in situ approach. As in diaphragm, we found that rest periods within the intermittent trains significantly improved neuromuscular transmission efficacy. However, unlike the diaphragm, epp amplitude recovery was incomplete even by the 2nd train in the intermittent protocols, recovery being frequency-dependent and ranging from 40 to 50%. The results suggest that the kinetics of epp amplitude rundown and recovery may be muscle-specific, and should be considered when evaluating situations in which neuromuscular transmission efficacy may be altered.

KEY WORDS

- Endplate Potential
- Intermittent Stimulation
- Neuromuscular Junction
- Neuromuscular Transmission Efficacy
- Synaptic Transmission

INTRODUCTION

The efficacy of neuromuscular transmission is determined by the amplitude of the endplate potential (epp), to which both pre- and postsynaptic factors contribute. When repeatedly evoked, epp amplitude is known to decline quickly, and this decline can, if substantial enough, result in failure of muscle contraction¹⁸.

Most studies concerned with neuromuscular transmission efficacy have adopted an approach in which continuous trains of activation are applied to motor nerves to demonstrate epp amplitude rundown in various neuromuscular preparations. However, Moyer and van Lunteren^{13,14} have shown, in rat diaphragm, that intermittent stimulation of motor nerves (epps evoked with a 33% duty cycle) allows neuromuscular transmission to recover between contractions. Whether similar recovery occurs in a hindlimb neuromuscular system, such as rat soleus, is not known.

Neuromuscular junction morphology and certain features characterizing the process of neuromuscular transmission, such as quantal content (QC), are known to vary according to muscle fiber-type composition^{5,15,16,17,19}. Although burst characteristics for soleus motor units are not as repetitive as in the diaphragm and vary substantially in their duration, the average burst when executing locomotor tasks consists of a 400 ms to 500 ms train at a mean frequency of 20-30 Hz^{3,7,8}. Considering the particularly active nature of rat soleus muscle⁸, and presuming a similar response from muscles with similarly elevated activity loads, we hypothesized that, as in rat diaphragm, the periods of quiescence while intermittently activating soleus motor nerves would allow for substantial recovery of epp amplitude in time for the onset of a subsequent train. In this study, we measured declines in epp amplitude in rat soleus muscle during trains of stimulation evoked either continuously or intermittently, using an in situ approach.

MATERIALS AND METHODS

Six female Sprague-Dawley rats were obtained from Charles-River (St-Constant, Canada) and housed in a light- and temperature-controlled environment. The rats were given free access to food and water. All rats included in this study were between 18 and 24 weeks old at the time of data acquisition. All procedures in this experiment were pre-approved by the animal ethics committee of the Université de Montréal, and were in accordance with the guidelines set by the Canadian Council on Animal Care

Detailed procedures of the in situ electrophysiological experimentation have been described elsewhere ². Rats were anaesthetised with a ketamine/xylazine mixture (62/8 mg/kg; i.p.), and were maintained under deep anesthesia throughout the experiment with additional injections of 20.5/2.5 mg/kg every 45 minutes. Briefly, the soleus muscle and its neural branch were surgically isolated with blood supply intact. Electrophysiological recordings were carried out with the muscle submerged in heated circulating light mineral oil, with bath and rat core temperature maintained between 35 and 38°C. Recording of full-size endplate potentials was made possible by infusing μ -conotoxin G3b (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) through a catheter inserted into the jugular vein. The rat was placed on a ventilator for the duration of the experiment.

A glass micro-electrode was inserted into individual soleus muscle fibers at close proximity to endplates as determined by the presence of miniature endplate potentials, and the membrane potential was allowed to stabilize for 2 minutes. Trains of epps (continuous or intermittent) were then evoked by stimulating the motor nerve with a bipolar electrode at three frequencies (25Hz, 50Hz, 75Hz). These frequencies fall within the normal operating range of soleus motor units ⁸. The continuous trains consisted of 10-s trains, the intermittent trains consisted of 25 s of activation with a 40% duty cycle (trains last 400 ms and are repeated every second). In an attempt to maximize data yield, continuous trains were evoked before intermittent trains, and low frequencies were tested before high frequencies. A minimum of 3 min was allowed to elapse between trains. This rest period is sufficient for electrophysiological characteristics of endplates

to recover fully from the stress of stimulation²¹. Epp amplitude at the onset of any given protocol was comparable among stimulation protocols, which suggests this period was sufficient for full recovery. Whenever possible, all trains were evoked from each successfully impaled muscle fiber. However, due to self-imposed criteria pertaining to the quality of the impalement, this was not always possible. Albeit uncommon, trains in which complete failure of epp generation occurred, presumably as a consequence of axon conduction block¹², were removed from the data pool. This occurred within 2 endplates from 2 different animals, during both continuous and intermittent stimulation, at 50 Hz and 75 Hz (a total of 8 trains). These reasons account for the divergent number of endplates for trains evoked at 25 Hz, 50 Hz, and 75 Hz (Table 1). For each rat, data from 4 to 8 endplates were acquired. Each muscle fiber endplate was considered as an individual sample.

Epp amplitudes and rise-times were determined with the help of an event-detection software program specifically developed for this purpose. To allow the kinetics of epp amplitude rundown and recovery to be compared among the various stimulation protocols, epp amplitudes within a train were normalized to the amplitude of the first epp in that train. The initial rate of rundown during intermittent stimulation was estimated using a single-order exponential decay equation. The equations were used to fit the mean data, because high variability among individual data points prevented any conclusions to be formulated. As such, no statistical analysis of the decay rate constants was possible. All other values are presented as means \pm SD. Unless otherwise stated, factorial ANOVA was used to identify main effects and interactions. Because the time effect within the first 500 ms of activation is analyzed in Figure 1A, statistical analysis on Figures 1B and 1C were carried out on all time points except for time 0 (i.e., the first pulse). Including this time point within subsequent analyses inevitably incurs an interaction of time and frequency factors, which in this particular situation is unnecessary. The Tukey honest significant difference test (for equal or unequal n) was used during post-hoc analysis. Critical level of significance was set at 0.05.

RESULTS

Mean values of resting membrane potential, epp rise-time, and epp amplitude at the onset of each stimulation protocol are presented in Table 1. A one-way MANOVA on all three variables indicates no significant differences among the six protocols ($P = 0.96$).

Figure 1A shows how epp amplitude rundown occurs within the initial pulses of a train. Depending on the frequency of activation, rundown was statistically significant by the 2nd or 3rd pulse, and remained significant for the duration of the continuous stimulation protocols. Figure 1A shows significant effects of the time and frequency factors, with a significant interaction among them (all $P < 0.05$). Figure 1B shows a significant effect of frequency on epp amplitude rundown ($P < 0.01$), without a corresponding effect of time (first epp removed from statistical analysis, see *Materials and Methods*). This frequency-dependence on the extent of epp amplitude rundown is also present if the data are compared as a function of pulse number rather than time (Fig. 1C, frequency effect $P < 0.01$).

The outcome of stimulating soleus endplates intermittently is shown in Figure 2. As with the continuous protocols, significant main effects (of train number and pulse number) and interactions are present (Fig. 2). Again, significant rundown occurs within the initial pulses of the first train at all three frequencies, and the amplitude remains significantly depressed for the duration of the 25 s stimulation protocol. Significant intra-train rundown (i.e., rundown within each individual 400 ms train) occurred within each train at all frequencies ($P < 0.05$). Following the end of each train, significant recovery occurred by the onset of each subsequent train in the protocol (all frequencies, $P < 0.01$). Even though the first pulse of a subsequent train could be significantly larger than the last pulse of its previous train, it remained significantly depressed compared to the first pulse of the first train (all trains, all frequencies; $P < 0.01$). Thus, epp amplitude recovery was incomplete during intermittent stimulation in rat soleus when pulses are

evoked at these frequencies. A representative example of the intermittent electrophysiological recordings is provided in Figure 3.

The amplitudes of the first and last epp for each intermittent train are plotted in Figures 4A and 4B, respectively. Unexpectedly, significant inter-train rundown (i.e., rundown observed among the 1st pulse of each intermittent train) occurs solely between the first train and subsequent trains, and not otherwise (Fig. 4A). Furthermore, mean epp amplitude values for the 1st pulse in each train were not frequency-dependent [Fig. 4A; mean of all trains per frequency excluding the first train: 78.3% (25 Hz), 76.9% (50 Hz), 78.4% (75 Hz)]. Conversely, epp amplitude values for the last epp in each train were frequency-dependent, increased rundown having occurred during the highest frequencies of activation [Fig. 4B; mean amplitudes (all trains): 61.1% (25 Hz) > 57.6% (50 Hz) > 54.6% (75 Hz), all $P < 0.05$]. Consequently, mean percent recovery of epp amplitude during quiescent periods was significantly greater when intermittent trains were evoked at 75 Hz vs. 50 Hz and 25 Hz [mean values were obtained by averaging all recovery periods for each frequency; 49% (75 Hz) > 42.6% (50 Hz) and 40.9% (25 Hz); $P < 0.05$].

Table 2 shows the results of non-linear curve-fitting sessions where single-order functions were used to fit data in Figure 2. Rundown occurred relatively slowly at 25 Hz, whereas very little difference was noted between the values at 50 Hz and 75 Hz.

DISCUSSION

Epp amplitude is known to decline when pulses are evoked continuously. We found that greater rundown was the consequence of increased frequencies of stimulation (Fig. 1), but such frequency-dependence was generally more substantial in previously published studies^{2, 4, 9, 11, 13}. This disparity may be related to the temperature at which the recordings were acquired, which is known to have an effect on QC at the rat neuromuscular junction⁶.

Moyer and van Lunteren¹³ have shown that integrating periods of quiescence to trains of activation allows epp amplitude to recover substantially by the onset of a subsequent train. In those experiments (carried out *in vitro* at rat diaphragm endplates), recovery was ~100% for a short period of time even when evoked at 100 Hz, after which it was reduced so that by 25 s the amplitude of the first epp in the train was ~80% of initial (in those experiments, trains were repeated every second with a 33% duty cycle at frequencies ranging from 5 to 100 Hz). Our results from soleus endplates (*in situ*; 40% duty cycle) contrast with these to a certain extent. Figures 2, 3 and 4 show how recovery, although significant, was incomplete even by the 2nd train in the protocol, and the amplitude of the first epp in the train never exceeded 80% of initial (Fig. 4A).

Although epp amplitude recovery during intermittent stimulation was incomplete, it nevertheless was substantial. When comparing the extent of rundown during intermittent and continuous stimulation, the rest periods within the intermittent trains led to considerable improvement in the efficacy of neuromuscular transmission. Epp amplitude never fell below 52% of initial value during intermittent activation compared to 42% during continuous activation (Fig. 4B, 75 Hz). However, unlike the diaphragm, recoverability was not reduced over time (Fig. 4A). No clear explanation for this difference between the two studies is apparent. Recent evidence showing that values of rundown and recovery during intermittent stimulation are dependent on the temperature of the nerve-muscle preparation¹⁴ cannot account for the differences, because our experiments (performed at a higher temperature than the aforementioned

experiments) should have yielded data in which enhanced recovery was the end result, whereas the opposite occurred. Our results therefore suggest that changes in epp amplitude during intermittent stimulation are muscle specific.

The initial decline in epp amplitude to a relative plateau during a short tetanus can be ascribed to a progressive depletion of the readily releasable pool of quanta of acetylcholine¹. Table 2 shows that during intermittent stimulation patterns, the initial rate of rundown is slowest at 25 Hz, but surprisingly similar between 50 Hz and 75 Hz for all trains. Moyer and van Lunteren¹³ found that, in diaphragm, any shortening of the rate between 50 Hz and 100 Hz was not significant. Together these data suggest that the maximal rate of vesicle liberation from active zones is nearly achieved at 50 Hz. The lower plateau attained during stimulation at increasing frequencies (Figs. 2 and 4B) can be ascribed to limitations in the ability to mobilize quanta from the reserve to readily releasable pools¹. Similar decay-rate values (Table 2) ending in different plateau levels (Fig. 4B) when epps are evoked at increasing frequencies indicates that the mechanism underlying the mobilization of neurotransmitter vesicles within the presynaptic terminal is more sensitive to frequency than the mechanism underlying vesicular fusion.

Ultimately, the success or failure of neuromuscular transmission depends on the extent of epp amplitude rundown. In a non-fatigued neuromuscular system, the number of vesicles released by a single nerve impulse greatly exceeds the amount required to generate a muscle action potential. This safety factor for neuromuscular transmission varies according to muscle fiber-type composition and species. Estimates for rat soleus muscle range from 1.8X⁵ to 3.5X¹⁹. Such a range of safety factor implies that epp amplitude must fall to 56% and 29% of initial baseline values, respectively, before the integrity of neuromuscular transmission is compromised. In our experiments, the decline in epp amplitude to 42% (75 Hz continuous) and 52% (75 Hz intermittent) of initial baseline values suggests that the degree of rundown has attained, or is approaching, values at which transmission failure occurs, and further illustrates the postulated improvement in neuromuscular transmission efficacy during intermittent activation.

As a result of the lower plateau values attained at 75 Hz than 25 Hz, high-frequency activation should result in a higher probability of muscle contraction failure. However, we found that during intermittent activation, percent recovery is greatest when rundown is greatest. Thus, as previously suggested¹³, epp amplitude recovery may occur over a second-order exponential time-course with the relative contribution of the fast and slow components being frequency dependent. In such a model, high-frequency trains of activation trigger a primarily fast recovery phase, whereas low-frequency trains trigger a primarily slow recovery phase. If this were not the case, the increased rundown that occurs at high frequencies of activation would be additive in succeeding intermittent trains and quickly compromise the integrity of neuromuscular transmission. Such a biphasic recovery pattern may therefore be viewed as a protective or compensatory mechanism, without which high-frequency activation could not be maintained.

The processes implicated in epp amplitude rundown and recovery are essentially pre-synaptic¹⁰, the contributing factors being the availability of “docked” and “reserve” neurotransmitter vesicles, and the speed at which the vesicles can be liberated or moved from one pool to the next. Wu and Betz²⁰ have shown that increasing the duration of stimulus trains from 10 s to 5 min increases the time course of recovery from synaptic depression. They proposed a model in which this delayed recovery is ascribed to a slowing of both the rate of endocytosis and the rate of mobilization from the reserve pool of quanta to the docked position. With an entire vesicular cycle (from docked to liberated to docked) requiring ~2 min in rat soleus¹⁷, the relative contribution of the former on recovery during 25 s of intermittent activation is most likely minimal. Our results, showing epp amplitude recovery within an allotted time frame (i.e., 600 ms) increases with stimulation frequency, is therefore suggestive of an *increased* rate of mobilization from the reserve to the docked pool when activation frequency increases. These observations imply that the delayed recovery model by Wu and Betz²⁰ may only apply to situations in which additional pulses are evoked by increasing the duration of activation rather than increasing the frequency of activation, thus suggesting the pathways through which epp amplitude recovery occurs may vary according to train duration and intensity.

REFERENCES

1. Bennett MR, Lavidis NA, Lavidis-Armson F. The probability of quantal secretion at release sites of different length in toad (*Bufo Marinus*) muscle. *J Physiol (Lond)* 1989; 418:235-249.
2. Desaulniers P, Lavoie P-A, Gardiner PF. Habitual exercise enhances neuromuscular transmission efficacy of rat soleus muscle in situ. *J Appl Physiol* 2001; 90:1041-1048.
3. Eken T. Spontaneous electromyographic activity in adult rat soleus muscle. *J Neurophysiol* 1998; 80:365-376.
4. Fournier M, Alula M, Sieck GC. Neuromuscular transmission failure during postnatal development. *Neurosci Lett* 1991; 125:34-36.
5. Gertler RA, Robbins N. Differences in neuromuscular transmission in red and white muscle. *Brain Res* 1978; 142:160-164.
6. Glavinovic, M.I. Change of statistical parameters of transmitter release during various kinetic tests in unparalysed voltage-clamped rat diaphragm. *J Physiol (Lond)* 1979; 290:481-497.
7. Gorassini M, Eken T, Bennett DJ, Kiehn O, Hultborn H. Activity of hindlimb motor units during locomotion in the conscious rat. *J Neurophysiol* 2000; 83:2001-2011.
8. Hennig R, Lomo T. Firing pattern of motor units in normal rats. *Nature* 1985; 214:297-299.

9. Hubbard JI, Wilson DF. Neuromuscular transmission in a mammalian preparation in the absence of blocking drugs and the effect of d-Tubocurarine. *J Physiol (Lond)* 1973; 228:307-325.
10. Katz B, Thesleff S. A study of the desensitisation produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol (Lond)* 1957; 138:63-80.
11. Krnjevic K, Miledi R. Failure of neuromuscular propagation in rats. *J Physiol (Lond)* 1958; 140:440-461.
12. Krnjevic K, Miledi R. Presynaptic failure of neuromuscular propagation in rats. *J Physiol (Lond)* 1959; 149:1-22.
13. Moyer M, van Lunteren E. Effect of phasic activation on endplate potential in rat diaphragm. *J Neurophysiol* 1999; 82:3030-3040.
14. Moyer M, van Lunteren E. Effect of temperature on endplate potential rundown and recovery in rat diaphragm. *J Neurophysiol* 2001; 85:2070-2075.
15. Prakash YS, Zhan WZ, Miyata H, Sieck GC. Adaptations of diaphragm neuromuscular junction following inactivity. *Acta Anat* 1995; 154:147-161.
16. Prakash YS, Smithson KG, Sieck GC. Growth-related alterations in motor endplates of type-identified diaphragm muscle fibres. *J Neurocyt* 1995; 24:225-235.
17. Reid B, Slater CR, Bewick GS. Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *J Neurosci* 1999; 19:2511-2521.

18. Sieck GC, Prakash YS. Fatigue at the neuromuscular junction: branch point vs. presynaptic vs postsynaptic mechanisms. In: Gandevia SC, editor. *Fatigue*. New-York: Plenum Press; 1995. p 83-100.
19. Wood SJ, 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; 500:165-176.
20. Wu L-G, Betz WJ. Kinetics of synaptic depression and vesicle recycling after tetanic stimulation of frog motor nerve terminals. *Biophys J* 1998; 74:3003-3009.
21. Zengel JE, Sosa MA. Changes in MEPP frequency during depression of evoked release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 1994; 477:267-277.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Epp amplitude during continuous trains of activation.

Rundown of epp amplitude provoked by 10 s trains at 25, 50, and 75 Hz. Panel (A) is a close up view of the initial pattern of rundown in panel (B). (A) Significant time and frequency effects, with an interaction; arrows indicate significant rundown, asterisk indicates different from 25 Hz. (B) Statistical analysis reveals a significant effect of frequency on epp amplitude rundown (first pulse excluded). (C) Frequency effect is also significant when rundown is expressed as a function of pulse number rather than time.

Figure 2. Epp amplitude during intermittent trains of activation

Epp amplitude rundown and recovery provoked by 25 s of intermittent activation. Statistical analysis was carried out on the first and last pulses of each train. Results of post-hoc analysis of the interactions are shown. Asterisk indicates significant difference from previous epp (i.e. significant recovery), and cross indicates significantly lower than first epp in first train (i.e. inter-train rundown). Intra-train rundown occurred within each train.

Figure 3. Electrophysiological recordings of epps evoked intermittently at 25 Hz

Representative example of epp amplitude rundown and recovery during 400-ms intermittent trains of activation at rat soleus endplates. Trains are evoked every second for 25 s. The recordings show how recovery is substantial yet incomplete. Downward stimulation artifacts were removed for clarity. Calibration bar within first panel is 5 mV and 40 ms.

Figure 4. Epp amplitude frequency comparisons during intermittent trains

Statistical analysis restricted to every 5th train. A) Amplitudes of first epp in each train. No significant differences occur among the frequencies; significant effect of time only present between 1st and 5th train. B) Amplitudes of last epp in each train. No significant effect of time was noted, significant effect of frequency is present. Open symbols represent epp amplitude rundown during continuous activation at 75Hz.

TABLE 1.

Resting membrane potential and endplate potential rise-time and amplitude at the onset of each stimulation protocol in this study.

Protocol	n (N)	RMP (mV)	Epp rT (μ sec)	Epp amplitude (mV)
25Hz continuous	30 (6)	-66.3 \pm 3.9	671 \pm 108	17.1 \pm 7.4
50Hz continuous	26 (6)	-65.1 \pm 4.5	644 \pm 110	15.9 \pm 8.0
75Hz continuous	23 (6)	-65.5 \pm 5.0	623 \pm 104	16.2 \pm 8.7
25Hz Intermittent	25 (6)	-65.6 \pm 4.5	665 \pm 123	17.2 \pm 9.2
50Hz Intermittent	24 (6)	-65.1 \pm 4.5	648 \pm 146	14.3 \pm 6.0
75Hz Intermittent	21 (6)	-65.9 \pm 4.4	649 \pm 129	15.0 \pm 6.3

n, number of neuromuscular junctions; (N), number of animals; RMP, resting membrane potential; rT, rise-time.

TABLE 2.*Decay-rate constants estimated using a single-order exponential equation *.*

Frequency	Train 1	Train 2	Train 5	Train25
25Hz	120.0	113.1	143.0	174.8
50Hz	68.5	68.7	65.6	87.1
75Hz	65.7	57.8	58.8	73.9

*Values represent the time (in ms) it takes to reach 50% of the rundown incurred within each 400 ms train.

FIGURE 1

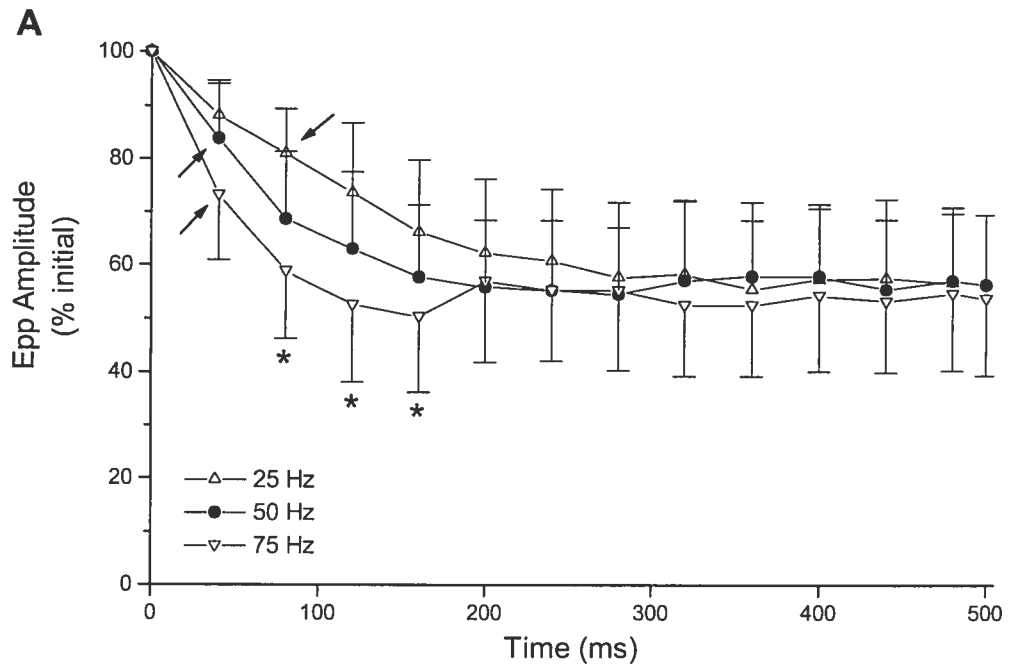


FIGURE 1

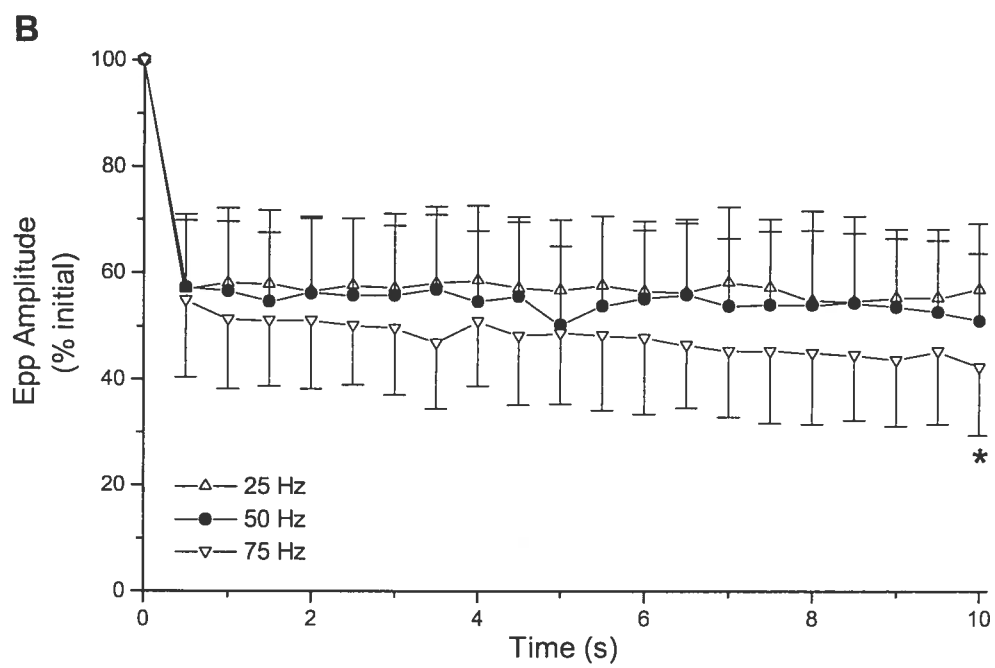


FIGURE 1

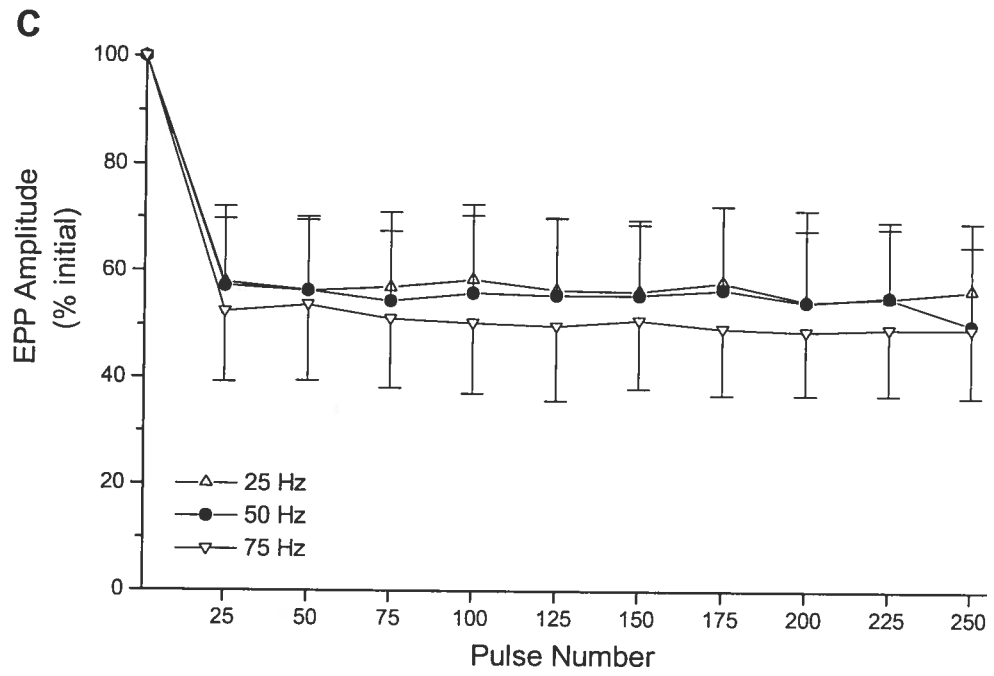


FIGURE 2

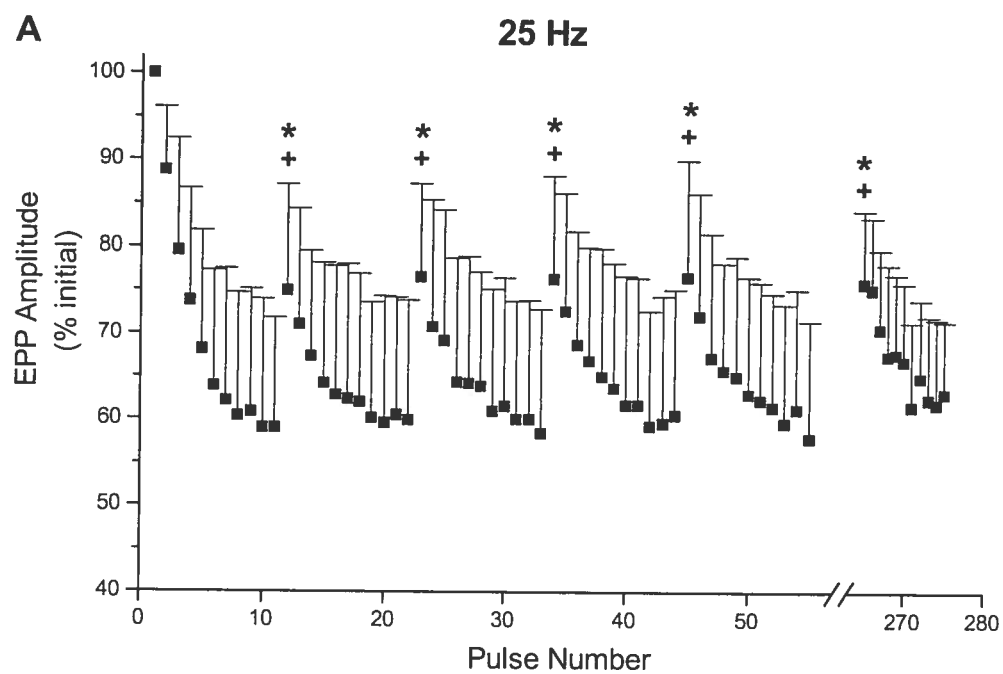


FIGURE 2

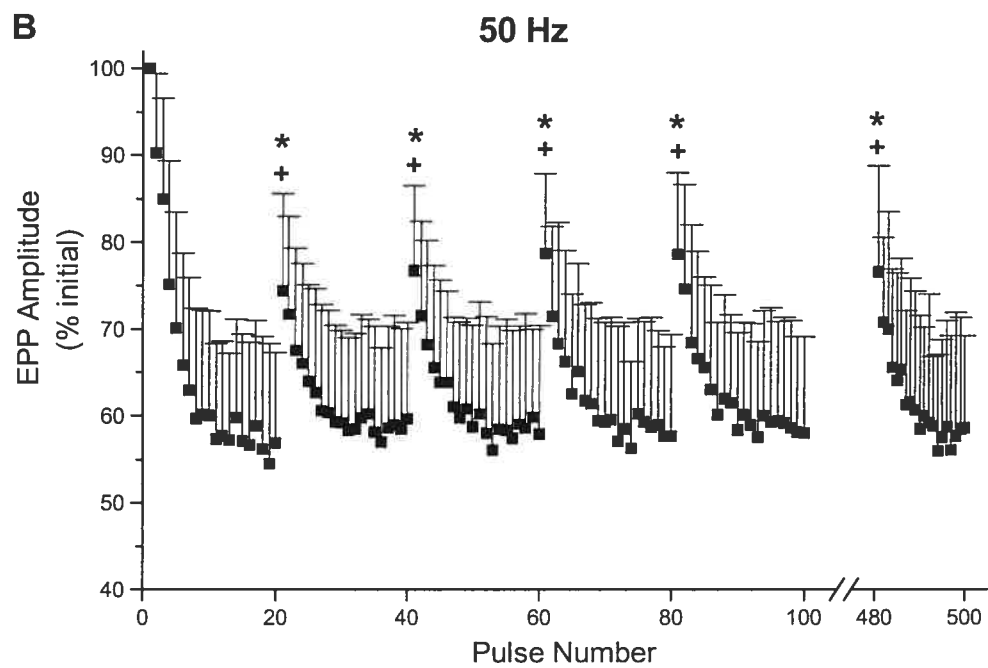


FIGURE 2

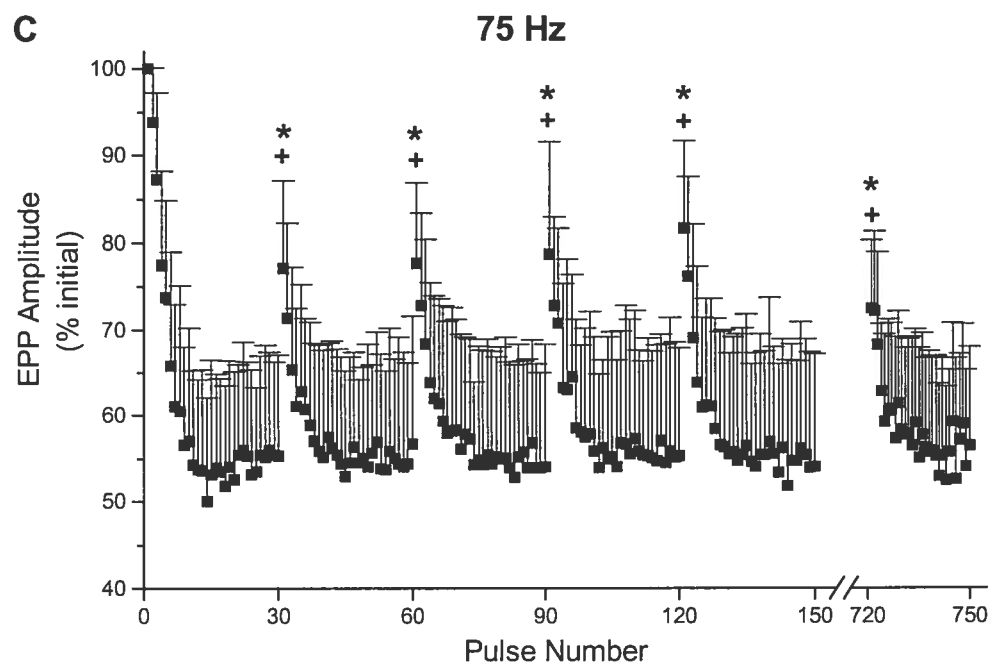


FIGURE 3

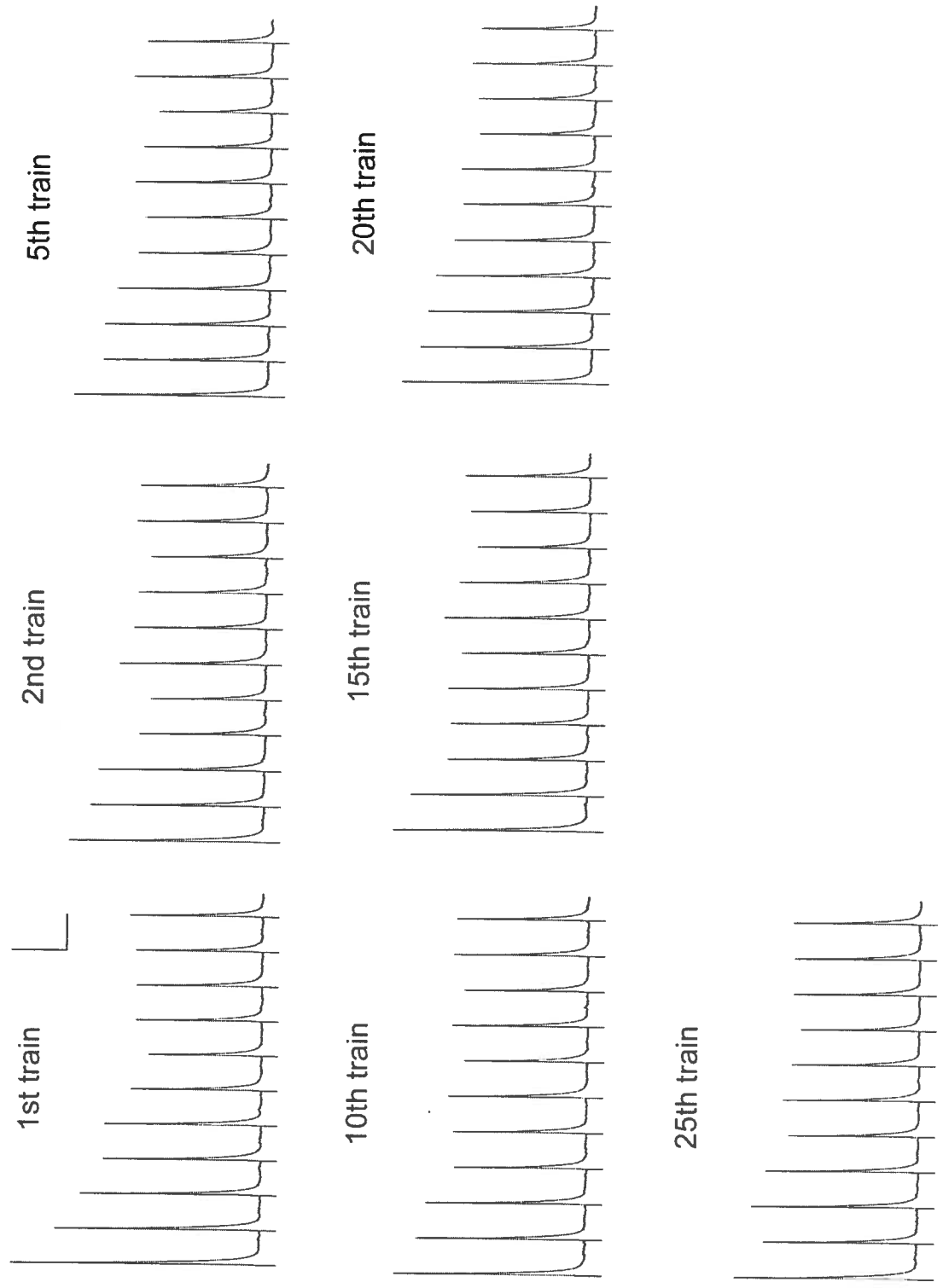


FIGURE 4

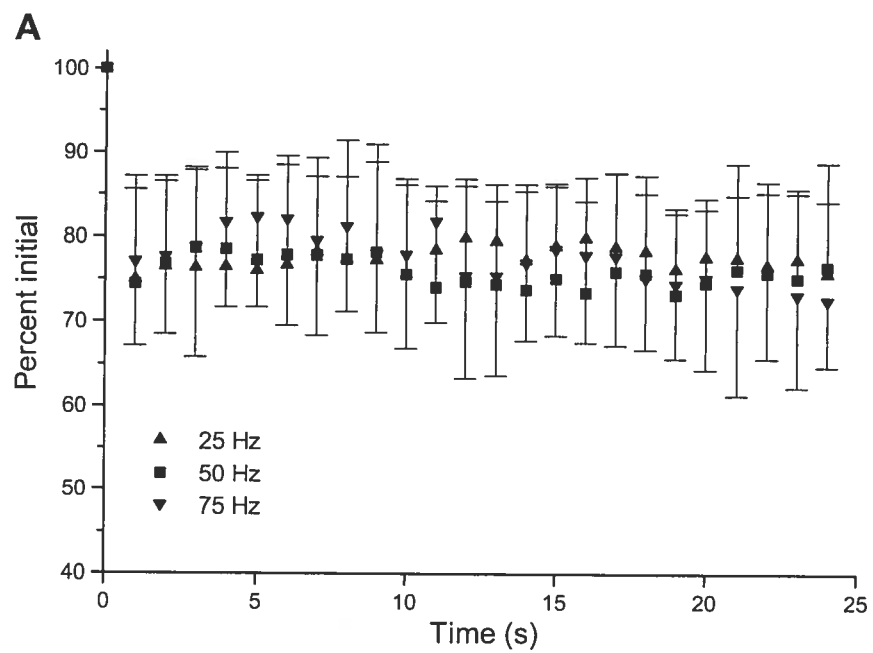
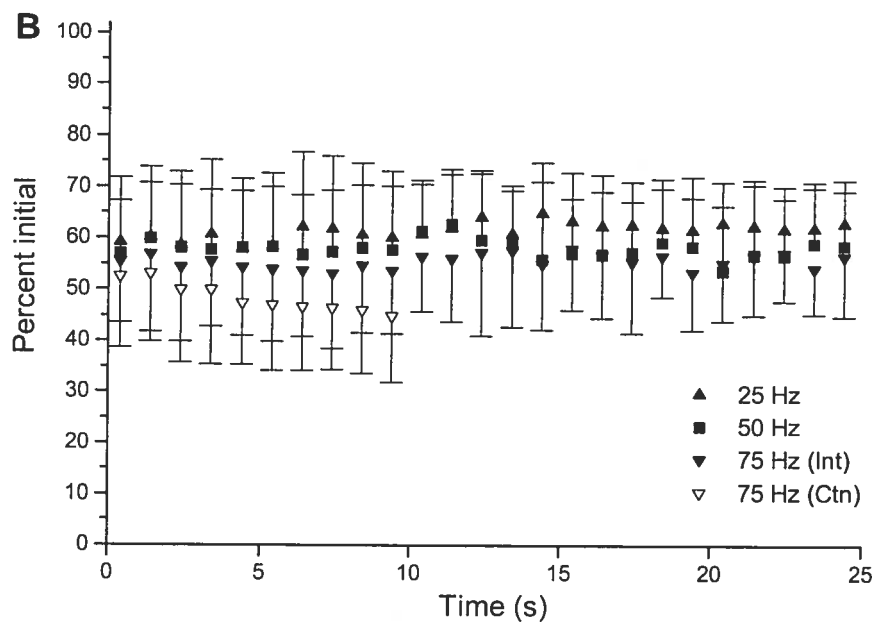


FIGURE 4



CHAPITRE VI

ARTICLE 4

ARTICLE IV

EFFECT OF RAT SOLEUS MUSCLE OVERLOAD ON NEUROMUSCULAR TRANSMISSION EFFICACY DURING CONTINUOUS AND INTERMITTENT ACTIVATION.

Desaulniers P, Lavoie P.-A. et Gardiner P.F.

Accepté par Experimental Physiology (Janvier 2005)

RAISONNEMENT

Les résultats d'études préalables, incluant les articles #1 et #2 de cette thèse, indiquent que la JNM a la capacité de s'adapter en réponse à l'entraînement en endurance. Au contraire, rares sont les études dont le but est de documenter les adaptations induites par d'autres formes d'activités, mais elles suggèrent néanmoins que certains changements peuvent aussi survenir suite à un programme d'exercice ayant un effet hypertrophique sur le muscle. Cette 4^e étude a été réalisée afin d'évaluer l'ampleur et la direction des adaptations de la transmission synaptique à la JNM du muscle soléaire de rats qui ont subi une période d'hypertrophie musculaire.

RÉSULTATS

Les résultats de cette étude indiquent que ce type d'activité améliore l'efficacité de la TNM par une amplitude similaire à celle documentée suite à un programme d'entraînement en endurance à la JNM du muscle soléaire chez le rat. Par contre, les résultats suggèrent que les changements s'effectuent par des mécanismes distincts, puisque contrairement aux résultats obtenus suite à un entraînement en endurance, cette approche a significativement augmenté l'amplitude du PdPmini.

ABSTRACT

Increased neuromuscular activity is known to provoke morphological and functional adaptations at the neuromuscular synapse. Most of these changes have been documented following endurance exercise training programmes. In this study, the effect of rat soleus muscle overload produced by tenotomy + voluntary wheel-cage activity on neuromuscular transmission efficacy was investigated. The overload protocol increased MEPP and EPP amplitudes by 17% and 19% respectively (both $P < 0.01$), and increased MEPP frequency by 86% ($P < 0.01$). EPP amplitude rundown during continuous trains of activation was attenuated by ~10% in the overloaded group ($P < 0.01$). Also, during intermittent activation, the overload protocol attenuated EPP amplitude rundown, mainly by enhancing EPP amplitude recovery by ~10% during the quiescent periods ($P < 0.01$). Although the current results show that both the degree and direction of adaptation is similar to what has been observed at rat soleus NMJs following an endurance training protocol, there are important nuances between the results, suggesting different mechanisms through which these changes may occur.

KEY WORDS

- Rat Soleus Muscle
- Neuromuscular Junction
- Neuromuscular Transmission
- Endplate Potential
- Tenotomy
- Overload

INTRODUCTION

Neuromuscular activity is a key contributor in regulating the morphology and physiology of the mammalian neuromuscular junction (NMJ). For example, neuromuscular activity is an important regulator of the quantity and distribution of acetylcholine receptors (AChRs) in skeletal muscle fibers (Lavoie *et al.* 1977). Also, increased neuromuscular activity in the form of endurance exercise training has been shown to increase the area occupied by the pre- and post-synaptic components of the NMJ (Andonian & Fahim, 1988, Deschenes *et al.* 1993, Fahim, 1997, Tomas *et al.* 1997, Waerhaug *et al.* 1992), to alter the abundance of certain proteins involved in neuromuscular transmission (Desaulniers *et al.* 1998, Kang *et al.* 1995), and to improve neuromuscular transmission (NMT) efficacy (Desaulniers *et al.* 2001, Dorlochter *et al.* 1991).

Regrettably, very little is known about NMJ adaptations incurred through models of increased activity other than treadmill running. Deschenes *et al.* (2000) have shown that the stimulus of resistance training is sufficient to increase soleus motor endplate area to a similar extent as that induced by endurance exercise training. Conversely, Jasmin *et al.* (1991), found that when rats whose plantaris muscles were overloaded by tenotomy of synergists are coerced to run on treadmill, G4 AChE isoform increases, but to levels well below those induced via endurance exercise training. (Gisiger *et al.* 1994, Sveistrup *et al.* 1995). Recently, Argaw *et al.* (2004) have shown NMT efficacy at rat plantaris NMJs to be significantly improved by a tenotomy-induced overload + voluntary wheel cage running type of stimulus.

The efficacy of NMT is a function of both the amplitude of the endplate potential (EPP) upon nerve stimulation, and of the degree of EPP amplitude rundown when EPPs are evoked in bursts. All previous studies detailing how neuromuscular activity impacts NMT efficacy have been conducted using continuous trains of stimuli (Argaw *et al.* 2004, Desaulniers *et al.* 2001, Dorlochter *et al.* 1991). However, when EPPs are evoked intermittently, neuromuscular transmission has been shown to recover significantly

during the quiescent periods (Desaulniers *et al.* 2002, Moyer & van Lunteren, 1999, Moyer & van Lunteren, 2001). Considering the lack of knowledge regarding the effects of increased neuromuscular activity on NMT efficacy, other than those obtained via treadmill running, it would be of interest to determine how an alternate form of activity affects NMT efficacy in a muscle known to respond positively to endurance exercise training. In addition, there are currently no studies examining if activity-dependent adaptations are in evidence when EPPs are evoked intermittently. The purpose of this study was to assess the effects of muscle overload + voluntary wheel cage running on the NMT efficacy of rat soleus NMJs in situ, using both continuous and intermittent stimulus patterns.

The soleus muscle was chosen because its NMT efficacy has been shown to improve following endurance exercise training (Desaulniers *et al.* 2001), and because its fiber type make-up is effectively homogenous, being composed of >85% type-1 fibers. (Armstrong & Phelps, 1984). This latter aspect is notable in view of the fact that NMJs innervating different muscle fiber types are known to have different morphological and functional properties (Gertler & Robbins, 1978, Prakash *et al.* 1995a, Prakash *et al.* 1995b, Reid *et al.* 1999, Wood & Slater, 1997). A subset of the control group results presented in this study has previously been published elsewhere (Desaulniers *et al.* 2002).

METHODS

Fourteen age-matched female Sprague-Dawley rats were obtained from Charles-River (St-Constant, Canada) and housed in a light- and temperature-controlled environment. The rats were given free access to food and water. All rats included in this study were between 18 and 24 weeks old at the time of data acquisition. All procedures in this experiment were pre-approved by the animal ethics committee of the University of Montreal, and were in accordance with the guidelines set by the Canadian Council on Animal Care

Upon arrival, seven rats were randomly selected to undergo a surgical procedure aimed at inducing compensatory overload of the soleus muscle. The rats were anaesthetised with a ketamine-xylazine mixture ($62/8 \text{ mg kg}^{-1}$; i.p., respectively) and were maintained anaesthetised during the procedure. An incision was made along the dorsal plane of both hindlimbs. A bilateral tenotomy was then performed by sectioning the distal tendon of the medial and lateral gastrocnemius muscle, the functional synergists of the plantaris and soleus muscles. The sectioned tendons were sutured back onto covering hamstring musculature to prevent reattachment. During the recovery period, rats were administered injections of buprenorphin (0.05 mg kg^{-1}) every 12 h for 48 h following surgery. After 7 days of recovery, the rats were placed in voluntary wheel-cages, and remained there until the electrophysiological experimentations were to be carried out, a period of 12 to 16 weeks. Unoperated age-matched control rats were kept in standard-type cages.

Detailed procedures of the in situ electrophysiological experimentation have been described elsewhere (Desaulniers *et al.* 2001, Desaulniers *et al.* 2002). Briefly, rats were anaesthetised with a ketamine-xylazine mixture ($62/8 \text{ mg kg}^{-1}$; i.p.), and were maintained under deep anaesthesia throughout the experiment with additional injections of $20.5/2.5 \text{ mg kg}^{-1}$ every 45 minutes. The soleus muscle and its neural branch were surgically isolated with blood supply intact. Electrophysiological recordings were carried out with the muscle submerged in heated circulating light mineral oil, with bath

and rat core temperature maintained between 35 and 38°C. Recording of full-size endplate potentials was made possible by infusing μ -conotoxin G3b (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) through a catheter inserted into the jugular vein. Muscle force was initially abolished by infusing conotoxin at a rate of 25 $\mu\text{g hr}^{-1}$, and was maintained at very low levels by subsequently infusing at a rate of 5 $\mu\text{g hr}^{-1}$. The rat was placed on a ventilator for the duration of the experiment. At the end of each experiment, the animals were euthanised with an overdose of anaesthetic.

Intracellular resting membrane potential (RMP), miniature endplate potentials (MEPPs), and EPPs were recorded using KCl-filled (3.0M) glass microelectrodes (resistance <10 MegaOhms). Once a microelectrode was inserted at close proximity to an endplate, as determined by the presence of MEPPs, the RMP was allowed to stabilise for 2 min. MEPPs were then recorded onto computer for 30s (sampling frequency; 10KHz) and were analysed off-line. The sciatic nerve was subsequently stimulated via a bipolar electrode in order to elicit single EPPs at a frequency of 0.5Hz for 30s (sampling frequency; 15KHz). These EPPs were digitally summed and the composite EPP was used to estimate the number of evoked vesicles upon nerve stimulation (i.e., quantal content (QC)).

Trains of EPPs (continuous or intermittent) were then evoked by stimulating the sciatic nerve at three frequencies (25Hz, 50Hz, 75Hz). These frequencies fall within the normal operating range of soleus motor units (Hennig & Lomo, 1985). The continuous trains consisted of 10-s trains; the intermittent trains consisted of 25 s of activation with a 40% duty cycle (trains last 400 ms and are repeated every second). In an attempt to maximize data yield, continuous trains were evoked before intermittent trains, and low frequencies were tested before high frequencies. A minimum of 3 min was allowed to elapse between trains. This rest period is sufficient for electrophysiological characteristics of endplates to recover fully from the stress of stimulation (Zengel & Sosa, 1994). All cells included in this study had a RMP of no less than -60mV . If any muscle cell depolarized by more than 10mV during the sampling, the data were eliminated. The number of endplates from which data were acquired ranged from 3 to 6

per animal. The total number of data points included in the passive properties and QC analysis was 37 for the control group and 35 for the overload group. The total number of data points included in the EPP amplitude rundown analysis was dependent on the frequency of stimulation, and is provided in their respective figure legends.

EPP and MEPP amplitudes and rise-times, as well as MEPP frequency were determined with the help of an event-detection software program specifically developed for this purpose. To allow the kinetics of EPP amplitude rundown and recovery to be compared among the various stimulation protocols, EPP amplitudes within a train were normalized to the amplitude of the first EPP in that train. All other values are presented as means \pm SD. Unless otherwise stated, factorial ANOVA was used to identify statistically significant main effects and interactions. The Tukey honest significant difference test was used during post-hoc analysis. QC was estimated using the direct method and corrected for non-linear summation using the empirical correction value of 0.8 as proposed by McLachlan & Martin (1981). Critical level of significance was set at 0.05.

RESULTS

The stimulus of compensatory muscle overload combined with voluntary wheel cage running increased soleus muscle wet weight by $94\% \pm 9\%$ ($P < 0.01$). The average distance covered by the rats in the experimental group was 8.6 ± 3.2 km/day. The consequent effect of this form of increased activity on MEPP and EPP characteristics are shown in table 1. The protocol significantly increased MEPP frequency by 86%, increased MEPP amplitude by 17%, and increased EPP amplitude by 19% (all $P < 0.01$). The outcome of both MEPP and EPP amplitudes increasing to similar extents is that no significant effect of overload on QC could be established (increased by 7% when corrected for non-linear summation; $P = 0.27$).

Figure 1 compares EPP amplitude rundown from the control group *versus* the overload group during continuous activation at all 3 tested frequencies. Control group EPP amplitudes (% of initial EPP) after 10s of continuous activation were $56.8\% \pm 12.7\%$ (25Hz), $51.1\% \pm 12.8\%$ (50Hz), and $42.3\% \pm 12.9\%$ (75Hz). Overload group EPP amplitudes (% of initial EPP) after 10s of continuous activation were $65.9\% \pm 12.8\%$ (25Hz), $62.8\% \pm 14.1\%$ (50Hz), and $54.8\% \pm 13.6\%$ (75Hz). Significantly greater rundown occurred as frequency increased from 25Hz to 50Hz to 75Hz for both groups (all $P < 0.01$). There was a significant group effect at all three tested frequencies ($P < 0.01$). These group differences, in which overload group values were significantly greater than control group values, became significant at 250ms (or pulse #7) for 25Hz, at 200ms (or pulse #10) for 50Hz, and at 160ms (or pulse #12) for 75Hz. Once significant, all group differences remained significant for the duration of the stimulation protocols, except at 75Hz where post-hoc analysis revealed no significant difference at time points 0.5s and 2s. Not shown are the initial pulses where, as expected, significant EPP amplitude rundown occurred within the first 2 to 3 pulses at all 3 frequencies for both groups ($P < 0.01$).

The outcome of stimulating control and overloaded soleus NMJs intermittently is shown in Fig. 2. An example of the data acquired during the intermittent protocols is

provided in Fig. 3. As was the case with the continuous stimulation protocols, significant rundown occurred within the first few pulses of the initial intermittent train, and EPP amplitude remained significantly depressed (as compared to first EPP of first train) for the duration of the intermittent stimulation protocols (all frequencies, both groups $P < 0.01$). Significant intra-train EPP amplitude rundown occurred within each train at all frequencies for both groups ($P < 0.01$). Control group percent EPP amplitude rundown values during intermittent activation (trains 2 to 25) were, $16.1\% \pm 2.4\%$ (25Hz), $19.6\% \pm 2.1\%$ (50Hz), $22.2\% \pm 4.3\%$ (75Hz). Overload group percent EPP amplitude rundown values were, $16.4\% \pm 1.9\%$ (25Hz), $20.4\% \pm 0.5\%$ (50Hz), $22.4\% \pm 3.1\%$ (75Hz) (group effect; n.s.). Significant inter-train rundown (EPP amplitude rundown comparison among the first EPP of each individual train for each group) occurred only between the first train and subsequent trains, but not otherwise ($P < 0.01$; all frequencies, both groups). Control group EPP amplitudes of the first pulse for each intermittent train (excluding train 1 where both groups have an initial value of 100%) were, $77.4\% \pm 11.9\%$ (26Hz), $76.1\% \pm 9.8\%$ (50Hz), $77.5\% \pm 10.4\%$ (75Hz) (frequency effect; n.s.). Overload group EPP amplitudes of the first pulse for each train were, $83.9\% \pm 5.8\%$ (25Hz), $83.4\% \pm 9.6\%$ (50Hz), $84.4\% \pm 9.2\%$ (75Hz) (frequency effect; n.s.). Control group EPP amplitudes of the last pulse for each intermittent train were, $61.4\% \pm 13.4\%$ (25Hz), $58\% \pm 11.1\%$ (50Hz), $55.4\% \pm 13.1\%$ (75Hz) (frequency effect; $P < 0.01$). Overload group EPP amplitudes of the last pulse for each train were, $66.6\% \pm 8.3\%$ (25Hz), $62.8\% \pm 6.9\%$ (50Hz), $60.5\% \pm 8.6\%$ (75Hz) (frequency effect; $P < 0.01$). The amplitudes of the first and last EPPs were significantly higher in the overload group at all three frequencies ($P < 0.01$).

EPP amplitude recovery during quiescent periods of intermittent stimulation is plotted in Fig. 4. Percent recovery is indicative of the percentage of EPP amplitude recovered *versus* the percentage of EPP amplitude lost. For example, if EPP amplitude falls by 40% (i.e., to 60% of initial EPP amplitude), and then recovers to 80% of initial during the quiescent period, then percent recovery is 50%. For both groups, significant recovery occurred at all three frequencies ($P < 0.01$). The effect of the overload protocol on percent recovery of EPP amplitude was significant among the groups at all three

frequencies ($P < 0.01$), with greater recovery being the consequence of increased neuromuscular activity. Percent recovery was greatest when soleus NMJs were activated at 75 Hz vs. 50Hz and 25Hz for both groups ($P < 0.01$).

DISCUSSION

The objective of these experiments was to determine the extent of activity-dependent change in NMT efficacy at the rat soleus NMJ when motor unit activity is increased via a hypertrophic stimulus. The results of this study show that overloaded soleus NMJs acquire a 19% increase in EPP amplitude (Table 1), and demonstrate an attenuated EPP amplitude rundown during continuous trains of activation by 9-13% (Fig. 1). The extent of these adaptations are comparable to those incurred via endurance exercise training, which increases EPP amplitude by 22%, and lessens EPP amplitude rundown during continuous activation by 7-10% in soleus (Desaulniers *et al.* 2001). We can therefore conclude that the protocol increased the efficacy of NMT.

Interestingly, although Argaw *et al.* (2004) have shown the overload + voluntary wheel cage running protocol improves NMT efficacy at rat plantaris NMJs, their results show the stimulus greatly increases quantal content (~100%), decreases Mepp amplitude, and exacerbates % Epp amplitude rundown. Thus, although the results of previous studies suggest that endurance training similarly affects the physiology of neuromuscular junctions innervating fast- and slow-twitch muscle (Dorlochter 1991, Desaulniers 2001), and the current results indicate that the overall extent and direction of physiological changes at soleus NMJs are similar whether they are induced by endurance training or overload + voluntary wheel cage running protocols, NMJs of fast-twitch muscle seem to respond in specific ways to the different types of activity.

Despite the comparable improvement in NMT efficacy at rat soleus NMJs in response to the different activity protocols, there are important nuances between the results, suggesting the mechanism(s) through which these changes occur may be different. Endurance training has been shown to increase EPP amplitude by increasing QC. Conversely, our results show that overloaded soleus NMJs acquire the increased EPP amplitude via a mechanism that increases MEPP amplitude. It is well known that small muscle fibers (with a high input resistance) produce larger MEPPs than large muscle fibers (with a low input resistance). Although no direct measure of muscle fiber

hypertrophy was carried out in the present study, the increased total muscle weight that occurs when soleus is overloaded has been shown to derive mainly from an increase in size of its predominant fiber type (Williams & Goldspink, 1981). In this study, the overloaded soleus wet weight increased by 94%, indicative of at least some degree of muscle fiber hypertrophy. All other factors being equal among the groups, the overloaded soleus fibers should therefore have produced smaller MEPPs due to a decreased input resistance, yet MEPP amplitude increased 17% in the overloaded group.

MEPP amplitude, for the most part, is thought to depend on the postsynaptic density of AChRs (Katz & Thesleff, 1957). However, several pre-synaptic factors, such as variations in the size of vesicles and in the intravesicular transmitter concentration, might also affect this variable (Atwood & Karunanithi, 2002). Karunanithi *et al.* (2002) have shown that functional differences in synaptic strength among glutamatergic neurons of *Drosophila* NMJs result from intrinsic differences in vesicle size, however no similar results have ever been demonstrated at the mammalian cholinergic NMJ. On the other hand, although an increased post-synaptic AChR density is possible, it must be considered unlikely due to physical limitations related to the size of the receptor. Estimates of post-synaptic AChR density range from 20000- to 30000-sites/ μm^2 (Edwards, 1979, Fertuck & Salpeter, 1974, Land *et al.* 1980), which would signify a quasi-complete saturation of AChRs on the surface of the junctional folds (Edwards, 1979). The contribution of either of these factors to the observed change in MEPP amplitude remains unknown.

Although the improvement of NMT efficacy during intermittent trains was not as considerable as during continuous trains (the overload procedure attenuated the percentage of EPP amplitude lost by ~5% following each individual train, Fig. 2), the effect was nonetheless significant. As could be expected from the data presented in Fig. 1, percent EPP amplitude was greater at the end of the first intermittent train in the overload group. However, the subsequent trains (trains 2 to 25) seem to maintain this improvement via an enhanced inter-train recovery mechanism rather than an attenuated EPP amplitude rundown mechanism. In fact, percent EPP amplitude rundown in trains 2

to 25 of the intermittent protocol ranged from ~16 to ~22%, depending of the frequency of activation, and were not significantly different between the groups. Conversely, percent recovery was significantly improved by ~10% in the overload group at all three tested frequencies (Fig. 4). The outcome of these effects is an improved NMT efficacy in the overloaded group when activated intermittently, but in a manner that departs from the activity-dependent improvements in NMT efficacy that occur during continuous trains of activation which come about through an attenuation of EPP amplitude rundown.

Even though EPP amplitude recovery was incomplete during the intermittent trains, EPP amplitudes within each group recovered to almost identical values regardless of the frequency of activation and thus level of rundown in the previous train. Hence, as previously reported, percent recovery was greatest when rundown was greatest (Desaulniers *et al.* 2002, Moyer & van Lunteren, 1999, Moyer & van Lunteren, 2001). Unlike previously reported in diaphragm muscle, however, our results show that soleus NMJs seem to possess a threshold as to how much recovery can occur in a recovery period such as the one allotted in this study (i.e., 600ms). Moyer *et al.* (1999) have suggested that high-frequency trains of activation may trigger a faster recovery phase than when trains are evoked at lower frequencies, thus implying the existence of a frequency-dependent second-order exponential time course for EPP amplitude recovery. An alternate possibility may be that partial recovery from short bursts of EPPs (400ms) may be frequency-independent and simply occur on a shorter time-scale than the allotted recovery period (600ms). Further recovery beyond the levels noted in this study may require considerably longer rest periods. Li & Schwarz (1999) have shown in *Drosophila*, that the pool of readily-releasable docked vesicles represents a subset of vesicles that is in equilibrium with the larger intra-cellular pool of vesicles. Considering that a complete vesicular cycle from docked to fused to docked requires ~2 minutes (Reid *et al.* 1999), the aforementioned equilibrium may account for the incomplete recovery noted in our study. If 100% recovery of docked vesicles can only occur once the total vesicle pool is completely replenished, then the quiescent periods employed in this study are undoubtedly of insufficient length to allow for full recovery during

intermittent stimulation. Studies employing variable recovery periods during intermittent neuromuscular activation are needed to resolve this issue.

In conclusion, compensatory overload combined with voluntary wheel-cage activity induced significant adaptations at rat soleus NMJs. The data show that increased EPP and MEPP amplitudes were induced by the stimulus. The outcome of stimulating NMJs with continuous or intermittent trains also confirms that the combined overload stimulus was effective in improving NMT efficacy when EPPs are evoked in bursts. When compared to previous findings, our results indicate that the degree and direction of activity-induced adaptations at rat soleus NMJs occur similarly irrespective of the type of activity implemented, but also suggest the locus of change may not be the same for endurance and hypertrophy-inducing stimuli. These adaptations most likely help conserve the integrity of NMT over time, and could delay the onset of neuromuscular fatigue.

REFERENCES

- Andonian MH & Fahim MA (1988). Endurance exercise alters the morphology of fast- and slow-twitch rat neuromuscular junctions. *Int J Sports Med* **9**, 218-223.
- Argaw A, Desaulniers P & Gardiner PF (2004). Enhanced neuromuscular transmission efficacy in overloaded rat plantaris muscle. *Muscle & Nerve* **29**(1), 97-103.
- Atwood HL & Karunanithi S (2002). Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* **3**(7), 497-516.
- Armstrong RB & Phelps RO (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* **171**, 259-272.
- Desaulniers P, Lavoie P-A & Gardiner PF (1998). Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at neuromuscular junctions of adult rat skeletal muscle. *NeuroReport* **9**, 3549-3552.
- Desaulniers P, Lavoie P-A & Gardiner PF (2001). Habitual exercise enhances neuromuscular transmission efficacy of rat soleus muscle *in situ*. *J Appl Physiol* **90**, 1041-1048.
- Desaulniers P, Lavoie P-A & Gardiner PF (2002). Incomplete recovery of endplate potential amplitude while intermittently activating rat soleus neuromuscular junctions *in situ*. *Muscle & Nerve* **26**(6), 810-816.
- Deschenes MR, Maresh CM, Crivello JF, Armstrong LE, Kraemer WJ, & Covault J (1993). The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology. *J Neurocytol* **22**, 603-615.

Deschenes MR, Judelson DA, Kraemer WJ, Meskaitis VJ, Volek JS, Nindl BC, Harman FS & Deaver DR (2000). Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. *Muscle & Nerve* **23**, 1576-1581.

Dorlochter M, Irintchev A, Brinkers M & Wernig A (1991). Effects of enhanced activity on synaptic transmission in mouse extensor digitorum longus muscle. *J Physiol Lond* **436**, 283-292.

Edwards C (1979). The effects of innervation on the properties of acetylcholine receptors in muscle. *Neurosci* **4**, 565-584.

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

Fertuck HC & Salpeter MM (1974). Localization of acetylcholine receptor by ¹²⁵I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(4),1376-1378.

Gertler RA, & Robbins N (1978). Differences in neuromuscular transmission in red and white muscle. *Br Res* **142**, 160-164.

Gisiger V, Bélisle M, & Gardiner PF (1994). Acetylcholinesterase adaptation to voluntary wheel running is proportional to the volume of activity in fast, but not slow, rat hindlimb muscles. *Eur J Neurosci* **6**,673-680.

Hennig R & Lomo T (1984). Firing pattern of motor units in normal rats. *Nature* **214**, 297-299.

Jasmin BJ, Gardiner PF & Gisiger V (1991). Muscle acetylcholinesterase adapts to compensatory overload by a general increase in its molecular forms. *J Appl Physiol* **70**(6), 2485-2489.

Karunanithi S, Marin L, Wong K & Atwood HL (2002). Quantal size and variation determined by vesicle size in normal and mutant *Drosophila* glutamatergic synapses. *J Neurosci* **22**(23), 10267-10276.

Kang C-M, Lavoie P-A, & Gardiner PF (1995). Chronic exercise increases SNAP-25 abundance in fast-transported proteins of rat motoneurons. *NeuroReport* **6**, 549-553.

Katz B, & Thesleff S (1957). On the factors which determine the amplitude of the "miniature end-plate potential". *J Physiol Lond* **137**, 264-278.

Land BR, Salpeter EE & Salpeter MM (1980). Acetylcholine receptor site density affects the rising phase of miniature endplate currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(6), 3736-3740.

Lavoie, P-A, Collier B & Tenenhouse A (1977). Role of skeletal muscle activity in the control of acetylcholine sensitivity. *Exp. Neurol* **54**, 148-171.

Li J & Schwarz TL (1999). Genetic evidence for an equilibrium between docked and undocked vesicles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 299-306.

McLachlan, EM & Martin AR (1981). Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol Lond* **311**, 307-324.

Moyer M & van Lunteren E (1999). Effect of phasic activation on endplate potential in rat diaphragm. *J Neurophysiol* **82**, 3030-3040.

Moyer M & van Lunteren E (2001). Effect of temperature on endplate potential rundown and recovery in rat diaphragm *J Neurophysiol* **85**, 2070-2075.

Prakash YS, Zhan WZ, Miyata H & Sieck GC (1995a). Adaptations of diaphragm neuromuscular junction following inactivity. *Acta Anat* **154**, 147-161.

Prakash YS, Smithson KG & Sieck GC (1995b). Growth-related alterations in motor endplates of type-identified diaphragm muscle fibres. *J Neurocyt* **24**, 225-235.

Reid B, Slater CR, & Bewick GS (1999). Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *J Neurosci* **19**(7): 2511-2521.

Sveistrup H, Chan RY & Jasmin BJ (1995). Chronic enhancement of neuromuscular activity increases acetylcholinesterase gene expression in skeletal muscle. *Am J Physiol* **269**(4 Pt 1), C856-62.

Tomas J, Santafé M, Lanuza MA, & Fenoll-Brunet MR (1997). Physiological activity-dependent ultrastructural plasticity in normal adult rat neuromuscular junctions. *Biol Cell* **89**, 19-28.

Waerhaug O, Dahl HA & Kardel K (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.

Williams PE & Goldspink G (1981). Connective tissue changes in surgically overloaded muscle. *Cell Tissue Res* **221**(2), 465-70.

Wood SJ & Slater CR (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.

Zengel JE & Sosa MA (1994). Changes in MEPP frequency during depression of evoked release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol Lond* **477.2**, 267-277.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant to P.F. Gardiner from the Natural Science and Engineering Council of Canada.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Epp amplitude rundown during continuous trains of activation in the control (o) and overloaded (●) conditions. The degree of Epp amplitude rundown in response to 10s of continuous activation of the sciatic nerve. Epp amplitudes are normalized to the first Epp in the train. The overload procedure significantly attenuated percentage Epp amplitude rundown at all 3 frequencies (25Hz (A); 50Hz (B); 75Hz (C)). The number of trains included in this analysis were, for the control and overloaded groups respectively; 30 and 30 (25Hz), 26 and 26 (50Hz), 23 and 25 (75Hz).

Figure 2. Epp amplitude rundown during intermittent trains of activation in the control (o) and overloaded (●) conditions. The degree of Epp amplitude rundown in response to twenty-five 400ms trains repeated every second. Epp amplitudes are normalized to the first Epp in the train. The overload procedure significantly attenuated the decrease of Epp amplitude at all 3 frequencies (25Hz (A); 50Hz (B); 75Hz (C)). The number of data sets included in this analysis were, for the control and overloaded groups respectively; 25 and 24 (25Hz), 24 and 24 (50Hz), 21 and 22 (75Hz).

Figure 3. Electrophysiological recordings of Epps during intermittent activation. Representative examples of Epp amplitude rundown and recovery in the control (A) and overloaded (B) conditions. Shown are the first and last (25th) train of the stimulation protocol, which consisted of 400ms trains repeated every second for 25 seconds. The traces show the combined effect of overload on Epp amplitude, and on the kinetics of Epp amplitude rundown and recovery. Pulses are evoked at 25Hz. Calibration bar is 3mV and 40ms.

Figure 4. Percent Epp amplitude recovery during intermittent activation in the control (o) and overloaded (●) conditions. See results for definition of “Percent Recovery”.

*Significantly different from control group at same frequency of activation.

+Significantly different from percent recovery at 25Hz and 50Hz.

TABLE 1***EPP and MEPP characteristics at control and overloaded rat soleus NMJs.***

	RMP (mV)	MEPP rise time (ms)	MEPP amplitude (μ V)	MEPP frequency (Hz)	MEPP rise time (ms)	EPP amplitude (mV)	QC Corrected
Control	-65.08 \pm 7.02	800 \pm 145	272 \pm 45	2.2 \pm 1.6	702 \pm 136	18.59 \pm 7.52	91.9 \pm 26.8
Overload	-65.42 \pm 7.31	792 \pm 140	318 \pm 66	4.1 \pm 2.0	772 \pm 199	22.15 \pm 7.18	98.2 \pm 29.7
	n.s.	n.s.	$P < 0.01$	$P < 0.01$	n.s.	$P < 0.01$	n.s.

Data are expressed as means \pm SD. Bottom row denotes statistically significant differences between group means (n.s. = not significant). Control n , 37 NMJs and 7 animals; Active n , 35 NMJs and 7 animals.

FIGURE 1

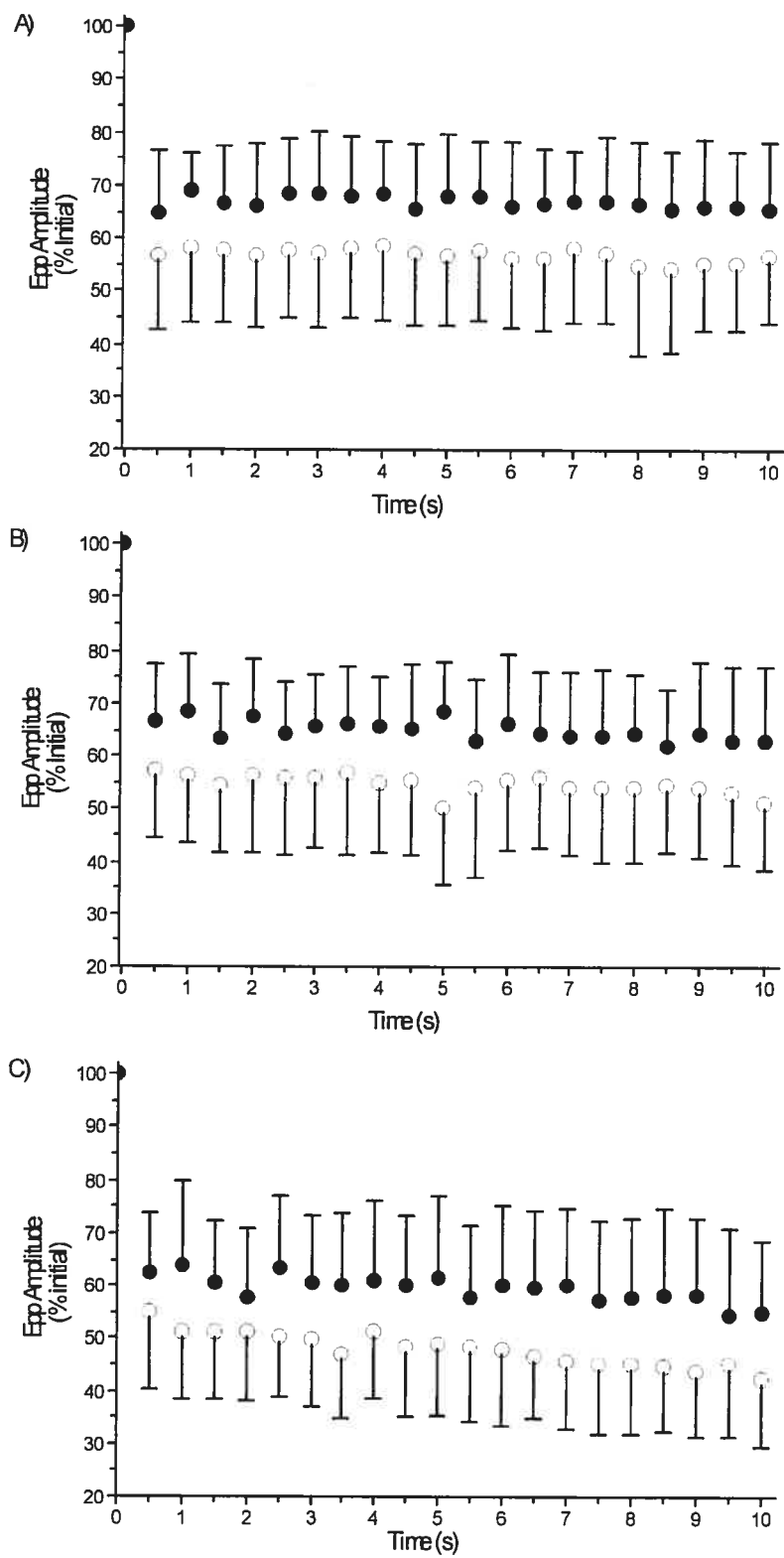


FIGURE 2

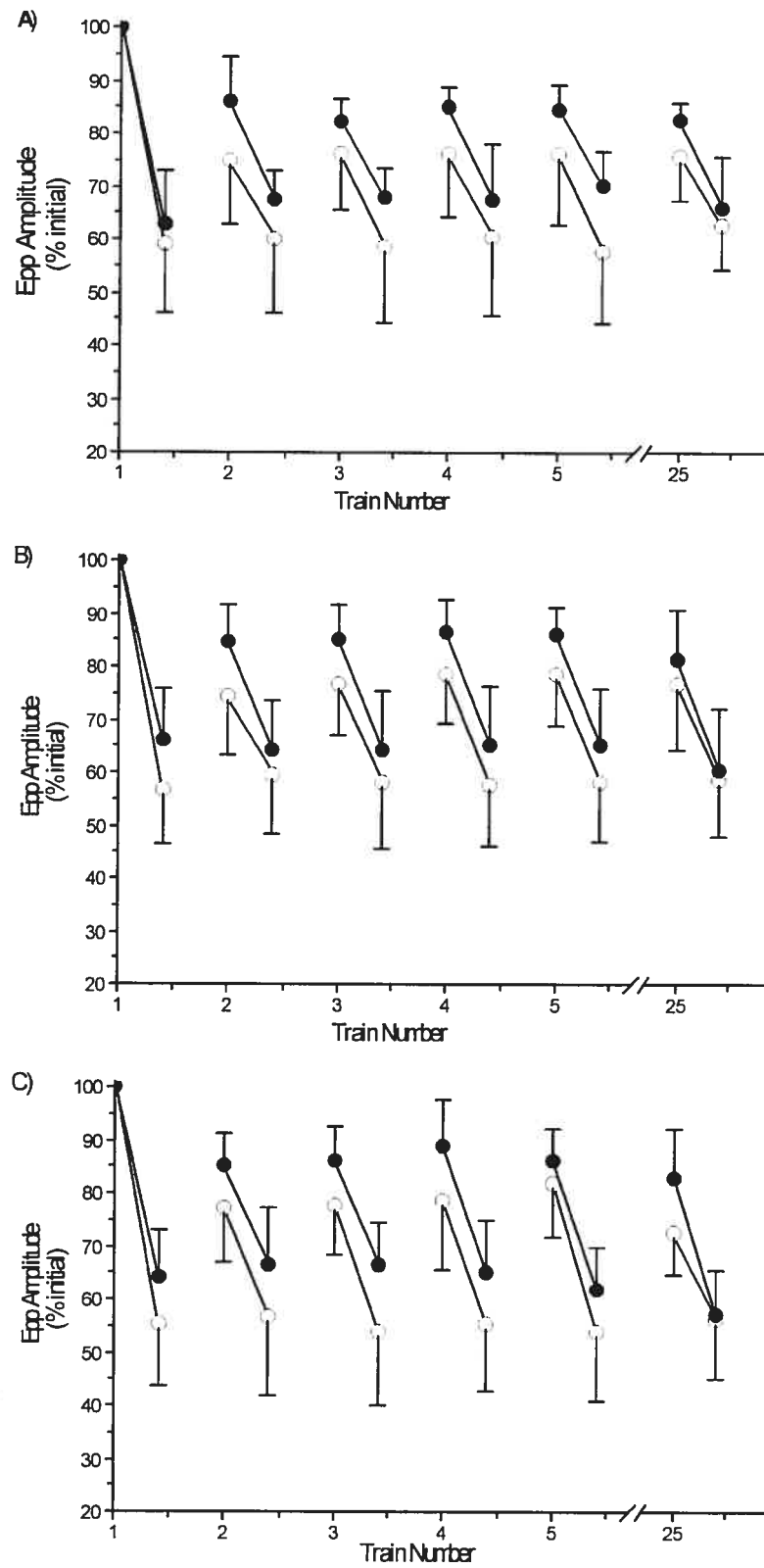


FIGURE 3

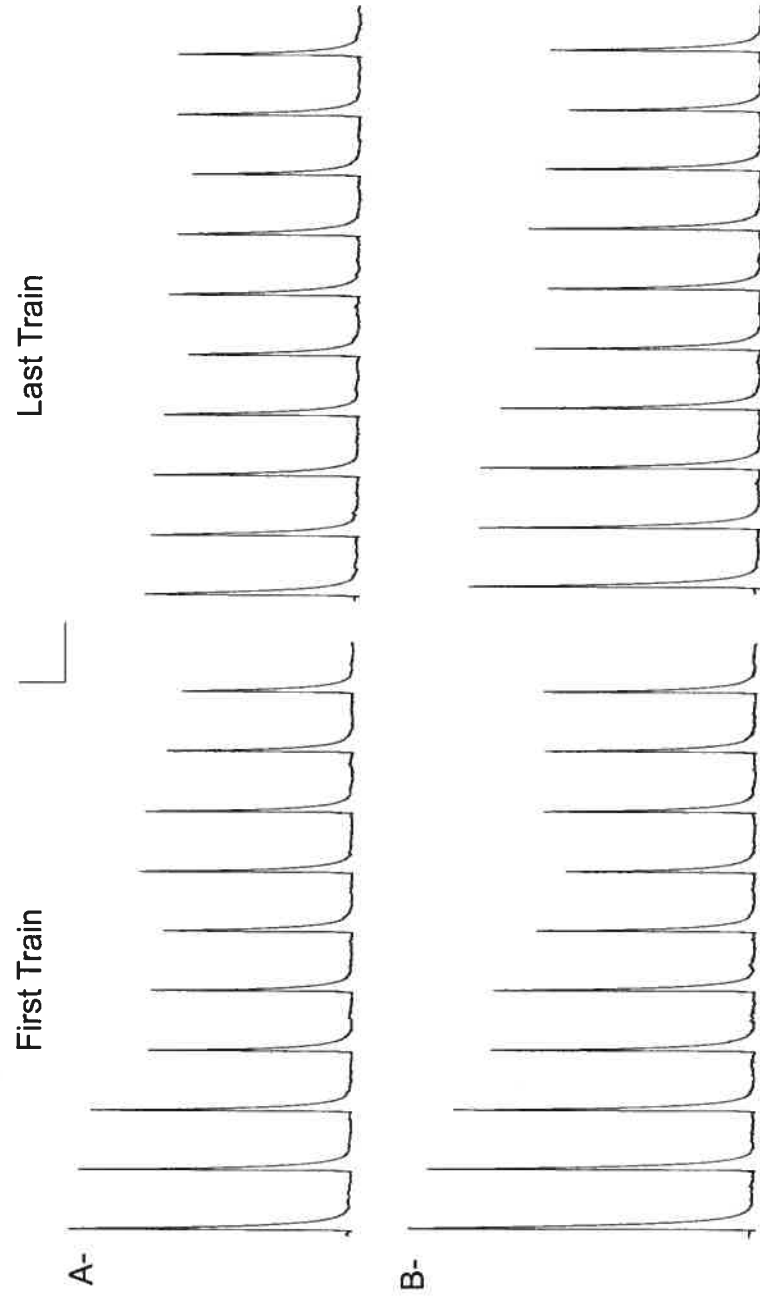
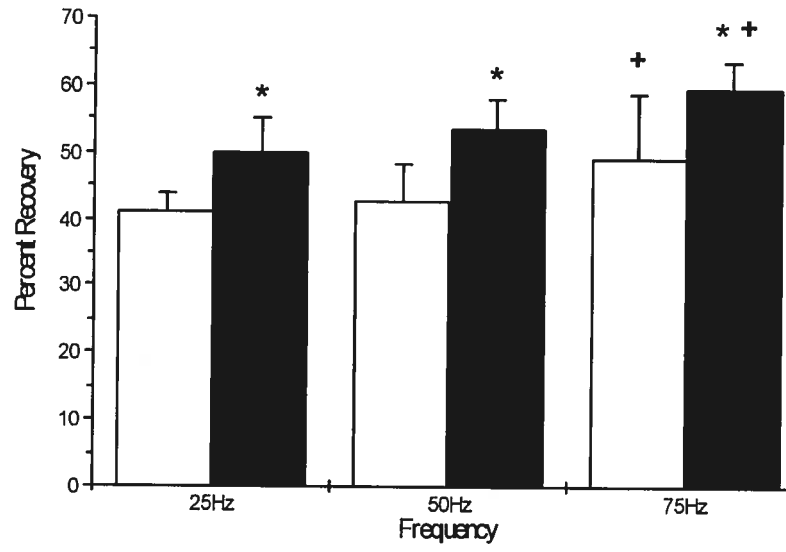


FIGURE 4



CHAPITRE VII
DISCUSSION

L'objectif principal de cette thèse était de contribuer à l'avancement des connaissances scientifiques caractérisant les effets de l'activité physique à la JNM chez le rat. Une première contribution a été réalisée en effectuant une évaluation quantitative de l'expression d'AChRs suite à un programme d'entraînement en endurance. Subséquemment, une série d'études impliquant des enregistrements électrophysiologiques *In Situ* ont permis de caractériser l'efficacité et la plasticité de la TNM du muscle soléaire chez le rat.

Le tableau 3 résume les adaptations qui ont été observées lors de ces études. Les résultats indiquent que l'accroissement du niveau d'activité physique induit plusieurs adaptations à la JNM. La première étude démontre que l'entraînement en endurance augmente la quantité d'AChRs aux plaques motrices de muscles de composition myofibrillaire diverse. Les résultats des études subséquentes (articles #2 et #4) indiquent que l'activité physique améliore l'efficacité de la TNM du muscle soléaire, et que le type d'activité effectué semble moduler le mécanisme par lequel s'effectuent les adaptations. Les résultats de l'article #3, dont le but était de caractériser l'efficacité de la TNM d'un muscle sédentaire (i.e., non-entraîné) lors de trains d'activation intermittents, indiquent que la TNM du muscle soléaire chez le rat se rétablit significativement, quoique de manière incomplète, de la \downarrow PdP qui survient lors de l'activation neuromusculaire répétitive.

4.1- Effet de l'activité physique sur l'amplitude des PdPmini et la quantité d'AChRs

Ensemble, les résultats des articles #1 et #2 permettent d'élucider l'effet de l'entraînement en endurance sur l'expression et la dispersion d'AChRs aux plaques motrices chez le rat. Les deux études ont utilisé une méthode d'entraînement identique, de durée semblable. Dans l'étude #1, il a été énoncé que l'augmentation de la quantité d'AChRs aux plaques motrices (20%) pourrait, soit indiquer une augmentation de la densité d'AChRs parmi une aire de dispersion fixe, soit une densité fixe d'AChRs

TABLEAU 3.

Sommaire des adaptations documentées lors des études effectuées dans le cadre de cette thèse .

	Quantité d'AChR	Amplitude PdPmini	Frequence PdPmini	Amplitude PdP	CQ	↓PdP (Cont)	↓PdP (Int)	Récup. du PdP
Article #1	↑ 20%	-	-	-	-	-	-	-
Article #2	-	n.s.	↑ 71%	↑ 22%	↑ 31%	↑ 7% -10%	-	-
Article #4	-	↑ 17%	↑ 86%	↑ 19%	n.s.	↑ 9% - 13%	↑ 5%	↑ 10%

Les valeurs indiquent le pourcentage d'amélioration documenté aux JNMs de rats actifs versus controle.

L'article #3 n'inclut aucune donnée concernant la capacité adaptative de la JNM. Le CQ est corrigé pour l'effet de la sommation non-linéaire. " - " = pas de telle mesure dans cette étude. " n.s." = pas d'effet statistiquement significatif.

parmi une plus grande aire de dispersion. En considérant les résultats d'études qui indiquent que l'activité physique augmente l'aire de la plaque motrice de ~25% (Deschenes 1993, Tomas 1997), il semble que la densité d'AChRs ne change pas suite à un entraînement en endurance. Cette affirmation est de plus supportée par les résultats de l'étude #2, qui indiquent que l'amplitude des PdPmini n'est pas affectée de façon significative par l'entraînement en endurance. En effet, si le protocole d'entraînement avait augmenté la densité d'AChRs à la plaque motrice, il y aurait eu une augmentation de la réponse post-synaptique à un quantum d'ACh (Katz 1957b).

Au contraire, les résultats de l'étude #4 indiquent que l'accroissement de l'activité physique via un stimulus hypertrophique augmente l'amplitude du PdPmini. Bien que cela puisse insinuer que le stimulus hypertrophique augmente la densité d'AChRs à la JNM du muscle soléaire, il est aussi possible que cet effet puisse provenir d'une variation de la taille des vésicules d'ACh et/ou de la concentration intra-vésiculaire d'ACh, puisque certaines études ont suggéré que la plaque motrice est saturée d'AChR en condition sédentaire (Edwards 1979, Land 1980). Il n'existe actuellement aucune

étude pouvant directement confirmer s'il est possible d'altérer, soit la densité d'AChR, la taille vésiculaire pré-synaptique, ou la concentration intra-vésiculaire d'ACh à la JNM du mammifère.

4.2- Effet de l'activité physique sur la fréquence des PdPmini

Les résultats de l'étude 2 indiquent que l'activité physique augmente la fréquence des PdPmini de 71 %. Cette valeur est semblable aux résultats préalablement publiés qui montrent que l'entraînement en endurance augmente significativement la fréquence des PdPmini à la plaque motrice du muscle soléaire chez le rat âgé (Alshuaib 1990). Les PdPmini sont générés à partir de vésicules d'ACh individuelles spontanément libérées de zones actives (Sellin 1996). Losavio *et al.* (1997) ont démontré que les CCSV de type N et L régulent la sécrétion quantique spontanée puisque l'application d'antagoniste¹ de ces canaux réduit fortement la fréquence des PdPmini. Ces CCSV sont étroitement liés aux protéines du complexe SNARE parmi les zones actives. Puisque l'entraînement en endurance augmente la région occupée par les composantes pré- et post-synaptique de la JNM (Section 2.5.3), il est concevable que l'activité physique régulière augmente la fréquence des PdPmini au moyen d'une plus grande région sous laquelle la sécrétion quantique spontanée pourrait se produire. Les données de l'article #4, dans lequel la fréquence des PdPmini a augmenté de 86 % chez le groupe actif, suggèrent que l'ampleur ainsi que la direction de cette adaptation se produit similairement peu importe le type d'activité effectué. Cette notion est soutenue par les données qui indiquent que l'entraînement en force augmente l'aire de la JNM du muscle soléaire chez le rat par une magnitude comparable à celle induite au moyen d'un programme d'entraînement en endurance (Deschenes 2000).

4.3- Effet de l'activité physique sur le PdPmini « géant »

Le PdPmini géant est défini comme un PdPmini ayant une amplitude ou un temps de montée d'au moins deux à trois fois la valeur moyenne du PdPmini « normal ».

¹ Les antagonistes employés dans cette étude étaient le nifedipine et l' ω -conotoxine.

Leur fréquence est faible (typiquement $\sim 1/\text{min}$) et chez la souris leur occurrence n'est détectable chez environ 50 % des JNMs du muscle diaphragme (Sellin 1996). Il a été suggéré que les PdPmini géants proviennent de l'exocytose vésiculaire d'ACh à partir d'endosomes parmi la terminaison nerveuse. Ce type de sécrétion se produit à l'extérieur des zones actives et sa fréquence augmente sous certaines conditions, telle la paralysie (Gundersen 1990). Malgré ce lien potentiel entre la fréquence du PdPmini géant et le niveau d'activité neuromusculaire, les résultats de l'article #2 indiquent que les caractéristiques du PdPmini géant demeurent inaltérées par un programme d'entraînement en endurance. Aucun PdPmini géant n'a été détecté lors de l'analyse des données acquises des expériences de l'article #4. Il semble donc probable que les PdPmini géants ne sont pas affectés par un accroissement du niveau d'activité neuromusculaire, tel qu'implémenté lors de ces études.

4.4- Effet de l'activité physique sur le CQ et l'amplitude du PdP au muscle soléaire

Curieusement, quoique la direction et l'ampleur de l'augmentation de l'amplitude du PdP dans les articles #2 et #4 soient comparables (22 % et 19 % respectivement), le mécanisme par lequel s'effectue ce changement semble être différent. Les résultats de l'article #2 indiquent que l'entraînement en endurance n'a pas d'effet significatif sur l'amplitude du PdPmini. Conséquemment, l'augmentation de l'amplitude du PdP est fonction d'un plus grand nombre de vésicules d'ACh libérées par impulsion nerveuse (\uparrow CQ). Au contraire, les résultats de l'article #4 indiquent que l'augmentation de l'amplitude du PdP suite au stimulus hypertrophique est entièrement attribuable à un mécanisme qui augmente l'amplitude du PdPmini. Deschenes *et al.* (1993) ont constaté que certains paramètres morphologiques à la JNM s'adaptent en fonction de l'intensité de l'exercice. Il est ainsi possible que le type d'activité physique dans le cadre des expériences de l'article #4 ait augmenté le niveau d'activité neuromusculaire à un tel point qu'un seuil ait été atteint qui aurait induit un changement dans l'amplitude du PdPmini, et que ce seuil ne soit pas atteint par des séances d'entraînement en endurance. Par contre, ce scénario semble improbable puisque l'effet fonctionnel est le même, soit une augmentation de l'amplitude du PdP d'environ 20% et donc une amélioration de

l'efficacité de la TNM. Il est donc probable que les différentes origines de ces adaptations reflètent une dichotomie dans la façon dont ces formes d'activités sont perçues par le système neuromusculaire.

4.5- Effet de l'activité physique sur le CQ et l'amplitude du PdP de muscles rapides et lents

Dorlochter *et al.* (1991) ont constaté que l'entraînement en endurance a un impact significatif sur l'efficacité de la TNM du muscle EDL chez la souris, puisque l'activité physique a augmenté le CQ de 30 %. Les résultats de l'article #2 indiquent que l'efficacité de la TNM est améliorée à la JNM du muscle soléaire chez le rat entraîné en endurance. Spécifiquement, l'entraînement a augmenté l'amplitude du PdP de 22 % et le CQ de 31 % chez le groupe actif. Il semble donc que l'entraînement en endurance améliore ce paramètre électrophysiologique à la JNM, indépendamment du type de fibre musculaire innervé.

Argaw *et al.* (2004) ont récemment mis en évidence que l'accroissement de l'activité neuromusculaire, sous forme d'une surcharge compensatoire + course en cage volontaire augmente l'amplitude du PdP et le CQ de 56% et 100 % respectivement, et diminue l'amplitude du PdPmini à la JNM du muscle plantaire chez le rat. Les données de l'article #4 où l'activité neuromusculaire a été augmentée par un protocole identique, indiquent que ce stimulus augmente l'amplitude du PdP de 19 %, n'a aucun impact significatif sur le CQ et augmente l'amplitude PdPmini à la JNM du muscle soléaire chez le rat. Même si l'effet ultime documenté lors de ces études s'avère être une amélioration de l'efficacité de la TNM, une telle divergence parmi ces muscles suggère que cette forme d'activité physique déclenche différents mécanismes d'adaptation aux JNMs de fibres musculaires rapides et lentes.

4.6- Effet de l'activité physique sur l'amplitude du PdP lors de trains d'activation continus

La \downarrow PdP en réponse aux trains d'activation continus est un attribut bien connu de la JNM et est un moyen par lequel peut se produire l'échec de la TNM lors d'efforts soutenus (Section 2.3). Tel que préalablement cité, dans la seule étude s'intéressant aux effets de l'entraînement en endurance sur l'efficacité de la TNM, Dorlochter *et al.* (1991) ont démontré que l'activité physique atténue la \downarrow PdP à la JNM du muscle EDL chez la souris. Spécifiquement, ils ont constaté que l'amplitude du PdP à la fin d'un train d'activation est 28 % plus élevée chez le groupe entraîné. Similairement, les résultats des études #2 et #4 indiquent un certain degré d'amélioration à cet égard, puisque l'activité physique a atténué la \downarrow PdP de ~10 % lors de trains d'activation continus à la JNM du muscle soléaire chez le rat. Bien qu'il existe un certain écart entre l'effet documenté au muscle EDL et celui observé au muscle soléaire, nous pouvons tout de même convenir que la direction de cet effet est comparable aux JNMs de fibres musculaires rapides et lentes.

Au contraire, Argaw *et al.* (2004) ont constaté que le stimulus de surcharge + course à pied, tel qu'implémenté lors de l'étude #4 de cette thèse, exacerbe la \downarrow PdP lors de trains d'activation continus à la JNM du muscle plantaire chez le rat, ce qui suggère encore une fois que l'activité hypertrophique affecte différemment les JNMs de fibres musculaires rapides et lentes.

4.7- Effet de l'activité physique sur l'amplitude PdP en réponse aux trains intermittents

Par le passé, les chercheurs voulant étudier l'efficacité de la TNM lors de l'activation neuromusculaire ont typiquement employé des protocoles d'activation continus. Moyer *et al.* (1999) ont récemment démontré, à la JNM du muscle diaphragme chez le rat, que l'activation intermittente des nerfs moteurs permet à l'amplitude du PdP de se rétablir entre chaque train. Leurs résultats démontrent que la récupération de l'amplitude du PdP est environ 100 % pour une brève période, suite à laquelle la magnitude de cette récupération est réduite à environ 80% de l'amplitude initiale. Les résultats d'article #3 indiquent que l'amplitude du PdP se rétablit significativement à la JMN du muscle soléaire chez le rat lorsque le nerf moteur est activé de façon

intermittente, mais que l'ampleur de cette récupération est cependant incomplète, n'excédant jamais ~80% de l'amplitude initiale.

Il se peut que ces différences puissent être attribuées aux types de fibres musculaires desquels proviennent les données. Quoique l'activité neuromusculaire quotidienne du diaphragme et du soléaire soit similairement élevée, leur composition myofibrillaire est différente. La composition myofibrillaire du diaphragme est ~50 % type 1, ~30 type 2a, et ~20 % type 2b (Kumagai 2001) et parmi ce muscle, les fibres rapides possèdent un plus grand calibre que les fibres lentes (Delp 1996). Il est donc possible qu'une majorité des données acquises aux JNMs du muscle diaphragme aient été obtenue de fibres musculaire rapides. Si tel est le cas, il se peut que les caractéristiques de récupération de l'amplitude du PdP lors des trains d'activation intermittents soient dépendants du type de fibre musculaire étudié chez le rat sédentaire. Conséquemment, la récupération de l'amplitude du PdP pourrait s'ajouter à la liste des propriétés de la JNM qui varient en fonction de la typologie des fibres musculaires. Cette dépendance au type de fibre pourrait alors se rajouter aux autres aspects de la JNM qui démontrent une certaine forme d'association au type de fibre musculaire innervé, tels que notés à la section 2.5.2. Les résultats de l'article #4 indiquent que l'activité physique via un protocole qui provoque l'hypertrophie musculaire améliore la récupération de l'amplitude du PdP lors des périodes de repos entre les trains intermittents. Ceci indique que l'amélioration de l'efficacité de la TNM en réponse à un accroissement du niveau d'activité physique se manifeste même lorsque le patron d'activation du nerf moteur ressemble à son patron d'activation lors de tâches motrices quotidiennes (Hennig 1985, Eken 1998, Gorassini 2000).

4.8- Est-ce que les adaptations suivent une certaine direction?

La section 2.5.3 décrit comment certains paramètres servant à décrire les JNM du muscle EDL semblent exhiber des caractéristiques de JNMs lentes en réponse à un programme d'entraînement en endurance (↑ aire de la plaque motrice, atténuation de la ↓ PdP), alors que d'autres paramètres ne suivent pas cette direction (↑ CQ). Il est

néanmoins probable que la JNM du muscle EDL ayant participé à ce type d'activité soit plus apte à libérer l'ACh pour des périodes d'activation prolongées. A cet égard, elles ressemblent donc aux JNMs du muscle soléaire, qui en situation sédentaire sont certes en mesure de maintenir l'exocytose vésiculaire pour des périodes relativement prolongées (Section 2.5.2).

Les résultats de l'étude #2 indiquent que l'entraînement en endurance atténue la \downarrow PdP lors de trains d'activation continus à la JNM du muscle soléaire. Par contre, les résultats de cette étude indiquent aussi que l'activité régulière augmente le CQ, un paramètre normalement plus élevé aux JNMs de fibres musculaires rapides. Ainsi, les deux principaux paramètres électrophysiologiques utilisés afin d'évaluer l'efficacité de la TNM (i.e, la \downarrow PdP et le CQ) changent dans la même direction peu importe si les adaptations sont incitées aux JNMs du muscle soléaire ou du muscle EDL (Dorlochter 1991). Ces adaptations sont en accord avec les données de l'article #1, ainsi que plusieurs autres études qui indiquent que l'entraînement en endurance affecte similairement les JNMs de fibres musculaires rapides et lentes (Section 2.5.3.1).

4.9- Les observations principales

D'après l'analyse fournie dans les sections précédentes, nous pouvons tirer certaines conclusions.

- 1) L'entraînement en endurance provoque des adaptations comparables aux fibres musculaires rapides et lentes, mais la direction des changements ne semble pas suivre une transition strictement rapide à lent.
- 2) Le degré d'amélioration de l'efficacité de la transmission synaptique à la JNM du muscle soléaire est similaire peu importe le type d'activité effectuée, mais les mécanismes par lesquels s'effectuent ces améliorations semblent être distincts.

- 3) L'exercice physique qui mène à l'hypertrophie musculaire provoque une amélioration de l'efficacité de la transmission synaptique à la JNM de fibres musculaires rapides et lentes, mais les mécanismes par lesquels s'effectuent ces améliorations semblent être distincts.

Même si l'ensemble de ces résultats indiquent que l'activité physique améliore l'efficacité de la TNM, il semble que l'entraînement en endurance provoque des changements uniformes à la JNM, tandis que l'activité physique qui mène à l'hypertrophie musculaire provoque des adaptations hétérogènes. Cette diversité est aussi mise en évidence lorsqu'on considère la disparité des adaptations physiologiques documentées aux JNMs de fibres rapides suite à un entraînement en endurance (Dorlochter 1991) et suite à un stimulus hypertrophique (Argaw 2004).

4.10- Effets de l'activité physique sur la population vésiculaire

L'inactivité neuromusculaire (la paralysie) augmente aussi le CQ, tant aux JNMs de fibres musculaires rapides que lentes (Robbins 1971, Snider 1979). Cependant, Robbins *et al.* (1971) ont démontré qu'en une telle situation, l'élément pré-synaptique libère une plus grande fraction de sa population vésiculaire totale, puisque les terminaisons nerveuses n'acquièrent aucun accroissement compensatoire de leur population vésiculaire. Il est donc logique de postuler que les effets documentés lors des études électrophysiologiques incluses dans cette thèse doivent être accompagnés par un accroissement de la population totale de vésicules pré-synaptiques afin d'éviter l'exacerbation de l'échec de la TNM. En effet, il serait irraisonnable d'envisager une JNM entraînée, pouvant systématiquement libérer plus d'ACh par impulsion que sa contrepartie sédentaire, sans s'être munie d'une plus grande population de vésicules d'ACh en réserve. Une approche combinant des méthodes optiques aux enregistrements électrophysiologiques permettrait d'évaluer cette possibilité. Aucune donnée concernant cet aspect n'est actuellement disponible.

4.11- Mécanismes d'adaptation

Ces changements peuvent être initiés et/ou soutenus par l'augmentation du transport protéinique axonal qui se produit dans le nerf sciatique de rats entraînés en endurance (Jasmin 88, Kang 95) et plus particulièrement par l'abondance accrue du SNAP 25 parmi le matériel transporté (Kang 1995). Le SNAP25 est une protéine de la zone active qui est impliquée dans la fusion des vésicules synaptiques (Section 2.2). De plus, il a été constaté que certains facteurs neurotrophiques ayant des effets modulateurs sur la structure et la fonction de la JNM, comme par exemple le CGRP (Gharakhanlou 1999) et le GDNF (Wehrwein 2002), sont plus abondants dans les nerfs et muscles de rats entraînés en endurance. Par contre, il n'est pas connu si certains autres facteurs neurotrophiques tels le BDNF ou le NT-4, qui améliorent l'efficacité de la TNM chez le rat (Mantilla 2004), subissent des changements significatifs suite à un entraînement en endurance.

Puisque l'activité physique qui provoque une hypertrophie musculaire augmente l'amplitude du PdPmini (Article #4) et que cette augmentation est possiblement médiée par une augmentation de la densité d'AChRs à la plaque motrice, il se peut que cette adaptation soit spécifiquement médiée par l'effet de facteurs neurotrophiques qui affectent l'expression et l'agrégation d'AChRs à la JNM chez le rat (Section 2.4.2). Il n'existe actuellement aucune étude portant sur les mécanismes par lesquels peuvent s'effectuer ces adaptations.

4.12- Un survol de la JNM entraînée en endurance

Les résultats obtenus lors de certaines études effectuées dans le cadre de cette thèse nous permettent de mieux comprendre la façon dont l'entraînement en endurance affecte la JNM de fibres musculaires rapides et lentes. En considérant l'ensemble des études qui ont documenté des changements positifs aux JNMs de ces types de fibres, il est possible de mettre en évidence les principales adaptations qui surviennent lors de la

transformation de la JNM en réponse à l'entraînement en endurance. Les paramètres qui démontrent des changements semblables aux JNMs de fibres rapides et lentes sont :

- ↑ de l'amplitude du PdP (Article #2, Dorlochter 1991)
- ↑ du CQ (Article #2, Dorlochter 1991)
- Atténuation de la ↓PdP (Article #2, Dorlochter 1991)
- ↑ de l'aire de la terminaison nerveuse (Deschenes 1993, Tomas 1989)
- ↑ de l'aire de la plaque motrice (Deschenes 1993, Waerhaug 1992)
- ↑ de la quantité d'AChRs à la plaque motrice (Article #1)
- ↑ de la fréquence des PdPmini (Article #2, Alshuaib 1990)

CHAPITRE VIII
CONCLUSION

Les résultats des études effectuées dans le cadre de cette thèse indiquent que différentes formes d'activité physique induisent des adaptations structurales et fonctionnelles à la JNM chez le rat. Les mesures électrophysiologiques suggèrent que la JNM du muscle soléaire d'un rat ayant subi une période d'activité neuromusculaire accrue est plus apte à maintenir la libération d'ACh au-dessus du seuil d'activation des CSSV du sarcolemme musculaire. Bien que l'impact potentiel de ces adaptations sur l'avènement de la fatigue neuromusculaire soit incertain, il est fort probable que l'augmentation de l'amplitude du PdP, ainsi que l'amélioration des caractéristiques de la diminution et de la récupération de l'amplitude du PdP lors de trains d'activation, servent à repousser l'échec de la TNM. Ces changements peuvent être considérés comme étant des moyens importants par lesquels l'activité neuromusculaire régulière augmente la capacité de soutenir un effort physique.

BIBLIOGRAPHIE

Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubcic V, Hood DA. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol*. **2003**; 88(1):99-107.

Aigner S, Pette D. Fast-to-slow transition in myosin heavy chain expression of rabbit muscle fibres induced by chronic low-frequency stimulation. *Symp Soc Exp Biol*. **1992**; 46:311-7.

Aldrich TK, Shander A, Chaudhry I, Nagashima H. Fatigue of isolated rat diaphragm: role of impaired neuromuscular transmission. *J Appl Physiol*. **1986**; 61(3):1077-83.

Alshuaib WB, Fahim MA. Effect of exercise on physiological age-related change at mouse neuromuscular junctions. *Neurobiol Aging*. **1990**; 11(5):555-561.

Andonian MH, Fahim MA. Endurance exercise alters the morphology of fast- and slow-twitch rat neuromuscular junctions. *Int J Sports Med*. **1988**; 9:218-223.

Argaw A, Desaulniers P, Gardiner PF. Enhanced neuromuscular transmission efficacy in overloaded rat plantaris muscle. *Muscle & Nerve*. **2004**; 29(1):97-103.

Armstrong RB, Phelps RO. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* **1984**; 171:259-272.

Augustine GJ, Burns ME, DeBello WM, Hilfiker S, Morgan JR, Schweizer FE, Tokumaru H, Umayahara K. Proteins involved in synaptic vesicle trafficking. *J Physiol*. **1999**; 520 Pt 1:33-41.

Baldwin KM, Winder WW, Holloszy JO. Adaptation of actomyosin ATPase in different types of muscle to endurance exercise. *Am J Physiol*. **1975**; 229(2):422-6.

Banks F, Miriti M, Brodwick MS. On the time course of surgically induced compensatory muscle hypertrophication of the rat plantaris muscle. *Comp Biochem Physiol.* **1991**; 98(1):55-60.

Bauerfiend R, Galli T, DeCamilli P. Molecular mechanisms in synaptic vesicle recycling. *J Neurocytol.* **1996**; 25:701-715.

Bennett MR. The concept of a calcium sensor in transmitter release. *Prog Neurobiol.* **1999**; 59(3):243-77.

Bigland-Ritchie B, Jones DA, Woods JJ. Excitation frequency and muscle fatigue: electrical responses during human voluntary and stimulated contractions. *Exp Neurol.* **1979**; 64(2):414-27.

Bigland-Ritchie B, Kukulka CG, Lippold OC, Woods JJ. The absence of neuromuscular transmission failure in sustained maximal voluntary contractions. *J Physiol.* **1982**; 330:265-78.

Bigland-Ritchie B, Furbush F, Woods JJ. Fatigue of intermittent submaximal voluntary contractions: central and peripheral factors. *J Appl Physiol.* **1986**; 61(2):421-9.

Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev.* **1991**; 71(2):541-85.

Brenner HR. How the motoneuron regulates acetylcholine receptor channel function in muscle. *NIPS.* **1991**; 6:281-286.

Buffelli M, Pasino E, Cangiano A. In vivo acetylcholine receptor expression induced by calcitonin gene-related peptide in rat soleus muscle. *Neuroscience.* **2001**; 104(2):561-7.

Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J Physiol.* **1960a**; 150:417-39.

Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb. *J Physiol.* **1960b**; 150:399-416.

Burelle Y, Fillipi C, Peronnet F, Leverve X. Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2000**; 278(1):E35-42.

Burelle Y, Wambolt RB, Grist M, Parsons HL, Chow JC, Antler C, Bonen A, Keller A, Dunaway GA, Popov KM, Hochachka PW, Allard MF. Regular exercise is associated with a protective metabolic phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2004**; 287(3):H1055-63.

Changeux JP. Functional organisation of the nicotinic ACHR. *CR Acad Sci Paris.* **1992**; 314, Serie 3, Suppl.9:89-94.

Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM, Zeikus RD, Kerr L, Yoshikami D, Moczydlowski E. Conus Geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem.* **1985**; 260(16): 9280-9288.

Dale HH, Feldberg W, Vogt M. Release of acetylcholine at voluntary nerve endings. *J Physiol.* **1936**; 86, pp.353-380.

Davies DA, Smith ME. ACTH (4-10) increases quantal content at the mouse neuromuscular junction. *Brain Res.* **1994**; 637(1-2):328-30.

del Castillo J, Katz B. Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol.* **1954**; 124(3):560-73.

Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol.* **1996**; 80(1):261-70.

Deschenes MR, Maresh CM, Crivello JF, Armstrong LE, Kraemer WJ, and Covault J. The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology. *J Neurocytol.* **1993**; 22: 603-615.

Deschenes MR, Judelson DA, Kraemer WJ, Meskaitis VJ, Volek JS, Nindl BC, Harman FS, Deaver DR. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. *Muscle & Nerve.* **2000**; 23(10):1576-81.

Donovan CM, Sumida KD. Training improves glucose homeostasis in rats during exercise via glucose production. *Am J Physiol.* **1990**; 258, pp.R770-R77

Dorlochter M, Irintchev A, Brinkers M, Wernig A. Effects of enhanced activity on synaptic transmission in mouse extensor digitorum longus muscle. *J Physiol.* **1991**; 436:283-292.

Drachman DB, Witzke F. Trophic regulation of acetylcholine sensitivity of muscle: effect of electrical stimulation. *Science.* **1972** May 5;176(34):514-6.

Duclert A, Changeux JP. Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiol Rev.* **1995**; 75(2):339-68.

Edwards C. The effects of innervation on the properties of acetylcholine receptors in muscle. *Neuroscience.* **1979**; 4(5):565-84.

Edwards JP, Hatton PA, Little RA, Pennington RA, Wareham AC. Increased quantal release of acetylcholine at the neuromuscular junction following scald injury in the rat. *Muscle & Nerve.* **1999**; 22(12):1660-6.

- Eken T. Spontaneous electromyographic activity in adult rat soleus muscle. *J Neurophysiol.* **1998**; 80:365-376.
- Fahim MA. Endurance exercise modulates neuromuscular junction of C57BL/6NNia aging mice. *J Appl Physiol.* **1997**; 83(1):59-66.
- Falls DL, Harris DA, Johnson FA, Morgan MM, Corfas G, Fischbach GD. Mr 42,000 ARIA: a protein that may regulate the accumulation of acetylcholine receptors at developing chick neuromuscular junctions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **1990**; 55:397-406.
- Fatt P, Katz B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol.* **1952**; 117(1):109-28.
- Fletcher GL, Hew CL, Davies PL. Antifreeze proteins of teleost fish. *Ann Rev of Physiol.* **2001**; 63:359-390.
- Florendo JA, Reger JF, Law PK. Electrophysiologic differences between mouse extensor digitorum longus and soleus. *Exp Neurol.* **1983**; 82(2):404-12.
- Fournier M, Alula M, Sieck GC. Neuromuscular transmission failure during postnatal development. *Neurosci Lett.* **1991**; 125(1):34-6.
- Fuglevand AJ, Zackowski KM, Huey KA, Enoka RM. Impairment of neuromuscular propagation during human fatiguing contractions at submaximal forces. *J Physiol.* **1993**; 460:549-72.
- Gaesser GA. Influence of endurance training and catecholamines on exercise VO₂ response. *Med Sci Sports Exerc.* **1994**; 26(11):1341-6.

Garber AJ, Karl IE, Kipnis DM. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. *J Biol Chem.* **1976**; 251: 826-835.

Gardiner PF, Montanaro G, Simpson DR, Edgerton VR. Effects of glucocorticoid treatment and food restriction on rat hindlimb muscles. *Am J Physiol.* **1980**; 238:E124-E130.

Geppert M, Sudhof TC. RAB3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu Rev Neurosci.* **1998**; 21:75-95.

Gertler RA, Robbins N. Differences in neuromuscular transmission in red and white muscle. *Brain Res.* **1978**; 142:160-164.

Gharakhanlou R, Chadan S, and Gardiner PF. 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.

Gilmour BP, Goldman D, Chahine KG, Gardner PD. Electrical activity suppresses nicotinic acetylcholine receptor gamma subunit promoter activity. *Dev Biol.* **1995**; 168(2):416-28.

Gisiger V, Stephens HR. Asymmetric and globular forms of AChE in slow and fast muscles of 129/ReJ normal and dystrophic mice. *J Neurochem.* **1983**; 41(4):919-29.

Gisiger V, Bélisle M, Gardiner PF. Acetylcholinesterase adaptation to voluntary wheel running is proportional to the volume of activity in fast, but not slow, rat hindlimb muscles. *Eur J Neurosci.* **1994**; 6:673-680.

Glavinovic MI. Voltage clamping of unparalysed cut rat diaphragm for study of transmitter release. *J Physiol.* **1979**; 290(2):467-80.

Goda Y. SNAREs and regulated vesicle exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**; 94(3):769-72.

Gorassini M, Eken T, Bennett DJ, Kiehn O, Hultborn H. Activity of hindlimb motor units during locomotion in the conscious rat. *J Neurophysiol*. **2000**; 83:2001-2011.

Green HJ, Klug GA, Reichmann H, Seedorf U, Wiehrer W, Pette D. Exercise-induced fibre type transitions with regard to myosin, parvalbumin, and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat. *Pflugers Arch*. **1984**; 400(4):432-8.

Grob D. Muscular disease. *Bull N Y Acad Med*. **1961**; 37:809-34.

Gundersen K. Spontaneous activity at long-term silenced synapses in rat muscle. *J Physiol*. **1990**; 430:399-418.

Hearn GR, Wainio WW. Succinic dehydrogenase activity of the heart and skeletal muscle of exercised rats. *Am J Physiol*. **1956**; 185(2):348-50.

Hennig R, Lomo T. Firing pattern of motor units in normal rats. *Nature*. **1985**; 214: 297-299.

Herscovich S, Gershon D. Effects of aging and physical training on the neuromuscular junction of the mouse. *Gerontology*. **1987**; 33(1):7-13.

Hoch W. Formation of the neuromuscular junction. Agrin and its unusual receptors. *Eur J Biochem*. **1999**; 265(1):1-10.

Hochachka PW, Somero GN. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. New York: Oxford University Press, **2002**.

Hogan PG, Marshall JM, Hall ZW. Muscle activity decreases rate of degradation of alpha-bungarotoxin bound to extrajunctional acetylcholine receptors.

Nature. 1976; 261(5558):328-30.

Holloszy JO. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1967; 242(9):2278-82.

Hong SJ, Chang CC. Use of geographutoxin II (mu-conotoxin) for the study of neuromuscular transmission in mouse. *Br J Pharmacol*. 1989; 97:934-940.

Hua SY, Charlton MP. Activity-dependent changes in partial VAMP complexes during neurotransmitter release. *Nat Neurosci*. 1999; 2(12):1078-83.

Jahn R, Sudhof TC. Synaptic vesicles and exocytosis. *Annu Rev Neurosci*. 1994; 17:219-46.

Jasmin BJ, Lavoie PA, Gardiner PF. Fast axonal transport of labeled proteins in motoneurons of exercise-trained rats. *Am J Physiol*. 1988; 255(6 Pt 1):C731-6.

Jasmin BJ, Gisiger V. Regulation by exercise of the pool of G4 acetylcholinesterase characterizing fast muscles: Opposite effect of running training in antagonist muscles. *J Neurosci*. 1990; 10(5):1444-1454.

Jasmin BJ, Gardiner PF, Gisiger V. Muscle acetylcholinesterase adapts to compensatory overload by a general increase in its molecular forms. *J Appl Physiol*. 1991; 70(6):2485-9.

Johannes L, Galli T. Exocytosis: SNAREs drum up! *Eur J Neurosci*. 1998; 10(2):415-22.

- Johnson BD, Sieck GC. Differential susceptibility of diaphragm muscle fibers to neuromuscular transmission failure. *J Appl Physiol.* **1993**; 75(1):341-8.
- Kang CM, Lavoie PA, Gardiner PF. Chronic exercise increases SNAP-25 abundance in fast-transported proteins of rat motoneurons. *NeuroReport* **1995**; 6: 549-553.
- Karlin A. Explorations of the nicotinic ACHR. *The Harvey Lectures.* **1991**; 85:71-107.
- Katz B, Thesleff S. A study of the desensitisation produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* **1957a**; 138:63-80.
- Katz B., and S. Thesleff. On the factors which determine the amplitude of the "miniature end-plate potential". *J Physiol.* **1957b**; 137: 264-278.
- Katz B. *Nerve, Muscle, and Synapse.* New York: McGraw-Hill, **1966**.
- Katz B. Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond. The Fenn Lecture. *J Neurocytol.* **1996**; 25(12):677-86.
- Kelly SS. The effect of age on neuromuscular transmission. *J Physiol.* **1978**; 274: 51-62.
- Kidokoro Y. Roles of SNARE proteins and synaptotagmin I in synaptic transmission: studies at the *Drosophila* neuromuscular synapse. *Neurosignals.* **2003**; 12(1):13-30.
- Kuei JH, Shadmehr R, Sieck GC. Relative contribution of neurotransmission failure to diaphragm fatigue. *J Appl Physiol.* **1990**; 68(1):174-80.
- Kugelberg E, Lindegren B. Transmission and contraction fatigue of rat motor units in relation to succinate dehydrogenase activity of motor unit fibres. *J Physiol.* **1979**; 288:285-300.

- Kumagai M, Kondo T, Ohta Y, Ishihara T. Size and composition changes in diaphragmatic fibers in rats exposed to chronic hypercapnia. *Chest*. **2001**; 119(2):565-71.
- Land BR, Salpeter EE, Salpeter MM. Acetylcholine receptor site density affects the rising phase of miniature endplate currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1980**; 77(6):3736-40.
- Laufer R, Changeux JP. Activity dependent regulation of gene expression in muscle and neuronal cells. *Mol Neurobiol*. **1989**; 3:1-53.
- Lavoie PA, Collier B, Tenenhouse A. Role of skeletal muscle activity in the control of acetylcholine sensitivity. *Exp. Neurol*. **1977**; 54:148-171.
- Linden DC, Fambrough DM. Biosynthesis and degradation of acetylcholine receptors in rat skeletal muscles. Effects of electrical stimulation. *Neuroscience*. **1979**; 4(4):527-38.
- Littleton JT, Bellen HJ. Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a calcium-dependent manner. *Trends Neurosci*. **1995**; 18(4):177-83.
- Lomo T. What controls the position, number, size, and distribution of neuromuscular junctions on rat muscle fibers? *J Neurocytol*. **2003**; 32(5-8):835-48.
- Losavio A, Muchnik S. Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am J Physiol*. **1997**; 273(6 Pt 1):C1835-41.
- Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem*. **2003**; 10(2):86-98.

Mantilla CB, Zhan WZ, Sieck GC. Neurotrophins improve neuromuscular transmission in the adult rat diaphragm. *Muscle & Nerve*. **2004**; 29(3):381-6.

Matthews G. Neurotransmitter release. *Annu Rev Neurosci*. **1996**; 19:219-33.

McKenzie DK, Bigland-Ritchie B, Gorman RB, Gandevia SC. Central and peripheral fatigue of human diaphragm and limb muscles assessed by twitch interpolation. *J Physiol*. **1992**; 454:643-56.

Meier T, Wallace BG. Formation of the neuromuscular junction: molecules and mechanisms. *Bioessays*. **1998**; 20(10):819-29.

Merton PA. Voluntary strength and fatigue. *J Physiol*. **1954**;123(3):553-64.

Moyer M, van Lunteren E. Effect of phasic activation on endplate potential in rat diaphragm *J Neurophysiol*. **1999**; 82:3030-3040.

Moyer M, van Lunteren E. Effect of temperature on endplate potential rundown and recovery in rat diaphragm *J Neurophysiol*. **2001**; 85:2070-2075.

Naess K, Storm-Mathisen A. Fatigue of sustained tetanic contractions. *Acta Physiol Scand*. **1955**; 34(4):351-66.

New HV, Mudge AW. Calcitonin gene related peptide regulates AChR synthesis. *Nature*. **1986**; 323:809-811.

Nieto JL, Diaz-Laviada I, Guillen A, Haro A. Effect of endurance physical training on rat liver adenylyl cyclase system. *Cell Signal*. **1996**; 8(4):317-22.

Ogata T. Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. *Arch Histol Cytol*. **1988**; 51(5):385-424.

Pagala MK, Namba T, Grob D. Failure of neuromuscular transmission and contractility during muscle fatigue. *Muscle & Nerve*. **1984**; 7(6):454-64.

Pette D, Staron RS. The molecular diversity of mammalian muscle fibers. *NIPS* **1993**; 8 :153-157.

Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech*. **2000**; 50(6):500-9.

Pette D. Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol*. **2001**; 90(3):1119-24.

Prakash YS, Zhan WZ, Miyata H, Sieck GC. Adaptations of diaphragm neuromuscular junction following inactivity. *Acta Anat*. **1995a**; 154:147-161.

Prakash YS, Smithson KG, Sieck GC. Growth-related alterations in motor endplates of type-identified diaphragm muscle fibres. *J Neurocyt*. **1995b**; 24:225-235.

Prakash YS, Miyata H, Zhan WZ, Sieck GC. Inactivity-induced remodeling of neuromuscular junctions in rat diaphragmatic muscle. *Muscle & Nerve*. **1999**; 22(3):307-19.

Prior C, Dempster J, and Marshall IG. Electrophysiological analysis of transmission at the skeletal neuromuscular junction. *J Pharmacol Toxicol Methods*. **1993**; 30(1):1-17.

Reid B, Slater CR, Bewick GS. Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *J Neurosci*. **1999**; 19(7):2511-2521.

Robbins N, Fischbach GD. Effect of chronic disuse of rat soleus neuromuscular junctions on presynaptic function. *J Neurophysiol*. **1971**; 34(4):570-8.

Ruff RL. Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. *Ann N Y Acad Sci.* **2003**; 998:1-10.

Schiavo G, Rossetto O, Montecucco C. Clostridial neurotoxins as tools to investigate the molecular events of neurotransmitter release. *Semin Cell Biol.* **1994**; 5(4):221-9.

Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature.* **1992**; 359(6398):832-5.

Sellin LC, Molgo J, Tornquist K, Hansson B, Thesleff S. On the possible origin of giant or slow-rising miniature end-plate potentials at the neuromuscular junction. *Pflugers Arch.* **1996**; 431(3):325-34.

Shainberg A, Burstein M. Decrease of acetylcholine receptor synthesis in muscle cultures by electrical stimulation. *Nature.* **1976**; 264(5584):368-9.

Sheng ZH, Westenbroek RE, Catterall WA. Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery. *J Bioenerg Biomembr.* **1998**; 30(4):335-45.

Si J, Tanowitz M, Won S, Mei L. Regulation by ARIA/neuregulin of acetylcholine receptor gene transcription at the neuromuscular junction. *Life Sci.* **1998**; 62(17-18):1497-502.

Sieck GC, Prakash YS. Fatigue at the neuromuscular junction. Branch point vs. presynaptic vs postsynaptic mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* **1995**; 384:83-100.

Snider WD, Harris GL. A physiological correlate of disuse-induced sprouting at the neuromuscular junction. *Nature.* **1979**; 281(5726):69-71.

Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. **1993**; 362(6418): 318-323.

Sollner T, Rothman JE. Neurotransmission: harnessing fusion machinery at the synapse. *Trends Neurosci*. **1994**; 17(8):344-8.

Sollner TH. Regulated exocytosis and SNARE function. *Mol Membr Biol*. **2003**; 20(3):209-20.

Sosa MA, Zengel JE. Use of mu-conotoxin GIIIA for the study of synaptic transmission at the frog neuromuscular junction. *Neurosci Lett*. **1993** 23; 157(2):235-8.

Stebbins CL, Schultz E, Smith RT, Smith EL. Effects of chronic exercise during aging on muscle and end-plate morphology in rats. *J Appl Physiol*. **1985**; 58(1):45-51.

Stephens JA, Taylor A. Fatigue of maintained voluntary muscle contraction in man. *J Physiol*. **1972**; 220(1):1-18.

Storey K.B. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, **2004**.

Sveistrup H, Chan RY, Jasmin BJ. Chronic enhancement of neuromuscular activity increases acetylcholinesterase gene expression in skeletal muscle. *Am J Physiol*. **1995**; 269(4 Pt 1):C856-62.

Telfer ES, Kelsall JP. Adaptation of some large North American mammals for survival in snow. *Ecology* **1984**; 65(6):1828-1834.

Tomas J, Santafé M, Lanuza MA, Fenoll-Brunet M.R. Physiological activity-dependent ultrastructural plasticity in normal adult rat neuromuscular junctions. *Biol. Cell* **1997**; 89: 19-28.

Tonge DA. Chronic effects of botulinum toxin on neuromuscular transmission and sensitivity to acetylcholine in slow and fast skeletal muscle of the mouse. *J Physiol.* **1974**; 241(1):127-39.

Trontelj JV, Mihelin M, Khuraibet A. Safety margin at single neuromuscular junctions. *Muscle & Nerve.* **2002**; Suppl 11:S21-7.

Uchida S, Takami K, Kobayashi H, Hashimoto K, Matsumoto N. Functions of a co-transmitter, calcitonin gene-related peptide, on the neuromuscular junction. *Adv Exp Med Biol.* **1991**; 287:39-50.

van Lunteren E, Moyer M. Effects of DAP on diaphragm force and fatigue, including fatigue due to neurotransmission failure. *J Appl Physiol.* **1996**; 81(5):2214-20.

von Gersdorff H, Matthews G. Electrophysiology of synaptic vesicle cycling. *Annu Rev Physiol.* **1999**; 61:725-52.

Waerhaug O, Dahl HA, Kardel K. Different effects of physical training on the morphology of motor nerve terminals in the rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Anat Embryol.* **1992**; 186: 125-128.

Wahrman JP, Winand R, Rieu M. Plasticity of skeletal myosin in endurance-trained rats (I). A quantitative study. *Eur J Appl Physiol.* **2001**; 84(5):367-72.

Wallace BG. Agrin-induced specialisations contain cytoplasmic, membrane, and extra-cellular matrix-associated components of the post-synaptic apparatus. *J Neurosci.* **1989**; 9(4):1294-1302.

Wehrwein EA, Roskelley EM, Spitsbergen JM. GDNF is regulated in an activity-dependent manner in rat skeletal muscle. *Muscle & Nerve*. **2002**; 26(2):206-11.

Wilson DF, Cardaman RC. Age-associated changes in neuromuscular transmission in the rat. *Am J Physiol*. **1984**; 247: C288-C292.

Wood SJ, Slater CR. The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles. *J Physiol*. **1997**; 500.1: 165-176.

Wood SJ, Slater CR. Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog in Neurobiol*. **2001**; 64 393-429.

Zengel JE, Sosa MA. Changes in Mepp frequency during depression of evoked release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*. **1994**; 477.2: 267-277.

ANNEXE A

LES ÉVÉNEMENTS HISTORIQUES

Ce qui suit est une collection de déclarations et de faits historiques reliés à la physiologie de l'exercice, à l'électrophysiologie, et à la neurophysiologie que l'auteur croient être intéressants et pertinents dans le présent contexte. Ces citations proviennent d'une multitude d'articles, de livres, et de sites internet. Les événements postérieurs à ~1950 sont limités puisqu'ils sont inclus dans la revue de littérature.

Déclarations Antiques

1. Imhotep (2980 avant J-C.)

Le docteur égyptien écrit un document considéré être le premier document médical dans l'histoire de l'humanité. Le mot « cerveau » est mentionné 7 fois dans le papyrus. Par contre, il n'y a aucun emploi du mot « nerf ».

2. Hippocrates (460-377 avant J-C)

Le médecin grec et « père de la médecine » écrit :

“si nous pouvions donner à chaque individu la quantité juste de nourriture et d'exercice, pas trop peu et pas trop non plus, nous aurions trouvé la voie la plus sûre à la santé”.

3. A. Cornelius Celsus (25 avant J-C – 50)

Le docteur et encyclopédiste romain écrit :

“prenez l'exercice : tandis que l'inaction affaiblit le corps, le travail le renforce; le premier provoque la vieillesse prématurée, le dernier prolonge la jeunesse”.

Moments Historiques

1772 - John Walsh accomplit des expériences sur la torpille électrique.

1791 - Luigi Galvani publie ses travaux sur la stimulation électrique des nerfs de la grenouille.

- 1791 - Alessandro Volta démontre que des métaux dans une solution de sel provoquent la contraction musculaire.
- 1823 - Marie-Jean-Pierre de Flourens déclare que le cervelet régule l'activité motrice.
- 1849 - Hermann von Helmholtz mesure la vitesse d'impulsion des nerfs chez la grenouille.
- 1852 - Albert von Kolliker observe que les nerfs moteurs proviennent de neurones dans la partie antérieure de la moelle épinière.
- 1853 - George Meissner décrit les terminaisons nerveuses qui seront plus tard connues sous le nom de "Corpuscules de Meissner".
- 1868 - Julius Bernstein décrit la progression temporelle d'un potentiel d'action et propose l'hypothèse membranaire.
- 1875 - Richard Caton est le premier à noter l'activité électrique du cerveau.
- 1878 - Claude Bernard décrit l'action bloquante du curare à la JNM.
- 1889 - Santiago Ramon y Cajal soutient que les neurones sont des cellules indépendantes.
- 1890 - Wilhelm Ostwald découvre la théorie membranaire de la conduction nerveuse.
- 1891 - Wilhelm von Waldeyer introduit le terme «neurone».
- 1896 - Rudolph Albert von Kolliker introduit le terme «axone».
- 1897 - Charles Scott Sherrington introduit le terme «synapse».
- 1906 - Camillo Golgi, Santiago Ramon y Cajal partagent le Prix Nobel pour leurs travaux sur la structure du système nerveux.
- 1907 - John N. Langley introduit le concept de molécules réceptrices.
- 1908 - Victor Horsley et R.H. Clarke conçoivent l'instrument stéréotaxique.
- 1914 - Henry H. Dale isole l'acétylcholine.
- 1922 - Archibald V. Hill et Otto Meyerhof partagent le Prix Nobel pour avoir fait la distinction entre le métabolisme aérobie et anaérobie.
- 1932 - Edgar Douglas Adrian et Charles S. Sherrington partagent le Prix Nobel pour leurs travaux décrivant la fonction des neurones.
- 1933 - Ralph Waldo Gerard décrit les premiers potentiels neuronaux évoqués expérimentalement.

- 1936 - Henry H. Dale et Otto Loewi partagent le Prix Nobel pour leurs travaux sur la transmission chimique des neurones.
- 1937 - J.Z. Young suggère que l'axone géant du calmar peut être utilisé afin de mieux comprendre le fonctionnement du neurone.
- 1942 - Stephen Kuffler développe la préparation neuromusculaire *In Vitro*.
- 1942 - Harold Griffith et Enid Johnson utilisent le curare durant l'anesthésie chez l'humain.
- 1944 - Joseph Erlanger et Herbert Spencer Gasser partagent le Prix Nobel pour leurs travaux sur la fonction de fibres nerveuses individuelles.
- 1949 - Kenneth Cole développe la méthode « voltage clamp ».
- 1952 - A.L. Hodgkin et A.F. Huxley décrivent les résultats des premières expériences « voltage clamp ».
- 1962 - Francis Harry Compton Crick, James Dewey Watson, Maurice Hugh et Frederick Wilkins partagent le Prix Nobel pour leurs découvertes des structures des acides nucléiques.
- 1963 - John Carew Eccles, Alan Lloyd Hodgkin et Andrew Fielding Huxley partagent le Prix Nobel pour le travail sur les mécanismes de la membrane cellulaire du neurone.
- 1970 - Bernard Katz, Ulf von Euler, et Julius Axelrod partagent le Prix Nobel pour leur travaux sur les mécanismes d'entreposage et libération de neurotransmetteur.
- 1991 - Erwin Neher et Bert Sackmann partagent le Prix Nobel pour leur enregistrements électrophysiologiques de récepteurs individuels.
- 2000 - Arvid Carlsson, Paul Greengard et Eric Kandel partagent le Prix Nobel pour leurs travaux sur la transduction de signaux dans le système nerveux.