

Université de Montréal

Étude des Mécanismes d'Action du Monoxyde d'Azote
Impliqués dans la Dépression Synaptique
à la Jonction Neuromusculaire

Par

Sébastien Thomas

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph. D) en sciences neurologiques

Octobre, 2005

©, Sébastien Thomas, 2005



W

4

U58

2005

v. 189

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 :

Étude des mécanismes d'action du monoxyde d'azote
impliqués dans la dépression synaptique
à la jonction neuromusculaire

Présentée par :

Sébastien Thomas

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Vincent F. Castellucci - Président-rapporteur

Richard Robitaille - Directeur de recherche

Louis-Éric Trudeau - Membre du jury

Clark A Lindgren - Examineur externe

Vincent F. Castellucci - Représentant du doyen de la FES

Résumé

La plasticité synaptique est une caractéristique primordiale du système nerveux qui permet aux organismes vivants de s'adapter aux différents stimuli de leur environnement, en modifiant le rendement de leurs synapses, lieu d'échange d'information entre neurones. La plasticité synaptique est donc un sujet d'intérêt en science neurologique qui a été passablement étudiée dans les systèmes nerveux central et périphériques. Dans le système nerveux périphérique, la jonction neuromusculaire définit la synapse entre les motoneurones et les fibres musculaires. La jonction neuromusculaire est une synapse sujette à de nombreuses formes de plasticité synaptique dont la dépression synaptique causée par l'adénosine et la dépression synaptique induite à haute fréquence de stimulation. Bien que ces phénomènes aient été décrits il y a de nombreuses années, nous en savons peu sur les mécanismes moléculaires qui seraient en cause. Dans cette thèse, nous montrons que la dépression synaptique induite par l'adénosine ne serait pas causée par des modifications dans les niveaux calciques dans les terminaisons nerveuses. Ensuite, nous montrons que le monoxyde d'azote (NO) synthétisé à la jonction neuromusculaire est une molécule impliquée dans la dépression synaptique induite à haute fréquence de stimulation, de

même qu'un modulateur endogène important de la transmission synaptique. Finalement, nos données suggèrent que la participation du NO dans la dépression synaptique serait le fruit d'une inhibition de l'endocytose, un mécanisme de recyclage vésiculaire pouvant déterminer la disponibilité des neurotransmetteurs. Dans le dernier chapitre de cette thèse, des données préliminaires seront brièvement présentées appuyant un modèle proposant l'implication des cellules de Schwann pérисynaptiques dans la modulation nitrinergique de la dépression synaptique à la jonction neuromusculaire.

Mots-clés

Adénosine

Cellules de Schwann pérисynaptiques

Dépression synaptique

Endocytose

Exocytose

Jonction neuromusculaire

Monoxide d'azote

Transmission synaptique

Vésicules synaptiques

Abstract

Synaptic plasticity is perhaps the foremost important feature of the nervous system that gives living organisms the ability to adapt to their environment's stimuli, by modifying the yield of synapses, specialized structures of neurons for information transfer. Therefore synaptic plasticity shares an important part of the neuroscience research field. In the peripheral nervous system, the synapse between the motoneurons and the muscle fibers is termed the neuromuscular junction. Numerous forms of synaptic plasticity occur at the neuromuscular junction such as adenosine- and frequency-induced synaptic depressions. Even if these phenomena have been described many years ago, little is known about the molecular mechanisms on which they rely. In this thesis, it will be shown that adenosine-induced depression is not caused by changes in calcium levels in nerve terminals. It will also be shown that endogenously synthesized nitric oxide (NO) is implicated in frequency-induced depression as well as in the regulation of transmitter release. Finally, we have data that suggest that the implication of NO in synaptic depression may be the result of an inhibition of endocytosis, a vesicular recycling mechanism that can determine neurotransmitter availability. In the last chapter of this thesis, preliminary data will be briefly presented

in support of a model where perisynaptic Schwann cells are implicated in the nitrinergic modulation of synaptic depression at the neuromuscular junction.

Keywords

Adenosine

Endocytosis

Exocytosis

Neuromuscular junction

Nitric Oxide

Perisynaptic Schwann cells

Synaptic depression

Synaptic transmission

Synaptic vesicles

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	V
Table des matières.....	VII
Liste des figures.....	XII
Liste des sigles et abréviations.....	XIII
Dédicace.....	XV
Remerciements.....	XVI
Avant-propos.....	XVII

CHAPITRE PREMIER - INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. La plasticité synaptique.....	2
2. La jonction neuromusculaire: un modèle pour étudier la plasticité à court terme.....	5
2.1. La jonction neuromusculaire du muscle <i>cutaneus pectoris</i> de la grenouille <i>Rana pipiens</i>	6
2.2. La terminaison nerveuse.....	11
2.2.1. Structure.....	11
2.2.1.1. Zones actives.....	11
2.2.2. Populations vésiculaires.....	14
2.2.2.1. Vésicules à cœur dense.....	14
2.2.2.2. Vésicules claires.....	15
2.2.3. Fonction de la terminaison nerveuse, rôle du calcium.....	17
2.2.4. Cycle des vésicules synaptiques.....	18
2.2.4.1. Exocytose.....	20
2.2.4.2. Endocytose et recyclage des vésicules synaptiques.....	29
2.2.4.3. Les marqueurs vésiculaires comme outils pour étudier la biologie des vésicules synaptiques.....	36
2.3. La fibre musculaire.....	42
2.3.1. Récepteurs post-synaptiques.....	44
2.3.1.1. Récepteurs cholinergiques nicotiniques.....	44
2.3.1.2. Récepteurs purinergiques et autres récepteurs.....	45
2.3.2. Électrophysiologie de la fibre musculaire.....	47
2.4. La cellule gliale.....	48
2.4.1. Rôle trophique et développemental des CSPs à la jonction neuromusculaire.....	49
2.4.2. Les CSPs impliquées dans un partenariat synaptique à la jonction neuromusculaire.....	50

2.5. Phénomènes de plasticité synaptique à court terme à la JNM	51
2.5.1. Facilitation homosynaptique	53
2.5.2. Autres phénomènes de potentialisation	55
2.5.3. Dépression dépendante de l'adénosine.....	56
2.5.4. Dépression synaptique dépendante de la fréquence..	58
3. L'adénosine	61
3.1. Synthèse de l'adénosine et de ses dérivés.....	62
3.2. Récepteurs purinergiques	63
3.2.1. Récepteurs P ₁	64
3.2.1.1. Le récepteur A ₁	64
3.2.1.2. Les récepteurs A ₂	65
3.2.1.3. Le récepteur A ₃	65
3.2.2. Récepteurs P ₂	66
3.2.2.1. Récepteurs P _{2x}	67
3.2.2.2. Récepteurs P _{2y}	68
4. Le monoxyde d'azote.....	69
4.1. Synthèse du NO.....	70
4.1.1. Les différentes isoformes de NOS.....	72
4.1.1.1. Les isoformes constitutives : la eNOS.....	73
4.1.1.2. Les isoformes constitutives : la nNOS	73
4.1.1.3. L'isoforme inductible : iNOS.....	75
4.2. Mécanismes d'action du NO.....	76
4.2.1. Activation de la guanylate cyclase	76
4.2.2. Modifications post-traductionnelles de protéines....	77
4.3. Le NO à la JNM	79
4.3.1. Localisation des NOS à la JNM	79
4.3.2. Effets du NO à la JNM	82
4.3.2.1. Rôle du NO dans la formation des synapses à la JNM immature.....	82
4.3.2.2. Effets du NO à la JNM mature	82
5. But de l'étude.....	85

CHAPITRE DEUXIÈME - CORPS DE LA THÈSE (I)

6. Introduction	88
7. Discussion.....	124
7.1. Effets de l'adénosine sur les niveaux calciques de base des terminaisons nerveuses.....	124
7.2. Effets de l'adénosine sur les réponses calciques des terminaisons nerveuses.....	125

7.3. Effets de l'adénosine sur les réponses calciques obtenues lors de l'induction de la dépression dépendante de la fréquence de stimulation	126
---	-----

CHAPITRE TROISIÈME - CORPS DE LA THÈSE (II)

8. Introduction	129
9. Discussion.....	178
9.1. Mécanismes d'action et caractérisation des effets du NO... ..	178
9.2. Production endogène de NO à la JNM.....	180
9.3. Implication du NO dans diverses formes de plasticité synaptique.....	180

CHAPITRE QUATRIÈME - CORPS DE LA THÈSE (III)

10. Introduction	185
11. Discussion.....	218
11.1. Inhibition sélective du recyclage vésiculaire rapide par le NO	218
11.2. La participation du NO dans la dépression	219

CHAPITRE CINQUIÈME - DISCUSSION GÉNÉRALE

12. Le NO est un modulateur endogène important à la JNM.	222
12.1. Résumé des effets synaptiques du NO.....	223
12.1.1. Caractéristiques des effets du NO et de l'adénosine sur la transmission synaptique et interactions potentielles entre leurs mécanismes d'action respectifs	224
12.1.1.1. Similitude des effets du NO et de l'adénosine	224
12.1.1.2. Interactions moléculaires potentielles des mécanismes d'action du NO et de l'adénosine	225
12.1.2. Diversité des mécanismes d'action du NO	227
12.1.2.1. Effets dépendants des tissus observés.....	227
12.1.2.2. Effets dépendants de l'activité synaptique	231
12.1.2.3. Effets dépendants de la concentration ?.....	232
12.1.3. La dépression synaptique et l'hypothèse du modèle de déplétion	234
12.1.4. L'inhibition de l'endocytose rapide durant la dépression.....	235
12.1.5. Protéines proposées comme cible du NO.....	236
12.1.5.1. Importance des résidus cystéines	236

12.1.5.2. Protéines endocytotiques pouvant médier les effets du NO	237
12.1.6. Résumé des effets synaptiques du NO à la JNM.	239
12.2. Raison d'être du NO à la JNM	242
12.2.1. Effets de la perte de NOS à la JNM	242
12.2.1.1. Souris nNOS $\alpha^{\Delta/\Delta}$	243
12.2.1.2. Souris mdx	244
12.2.2. Effets métaboliques du NO	245
12.2.2.1. Régulation de l'apport sanguin	245
12.2.2.2. Régulation du métabolisme des sucres	246
12.2.3. Rôle du NO à la JNM	246
12.3. Les sources de production endogène de NO à la JNM	249
12.3.1. Rôle pour la localisation subcellulaire ?	249
12.3.1.1. Rayon de diffusion du NO vs la dimension de la JNM	250
12.3.2. La fibre musculaire	251
12.3.2.1. Études de la distribution de la NOS musculaire	251
12.3.2.2. Mécanisme d'activation de nNOS musculaires par le glutamate	255
12.3.3. La nNOS des CSPs	260
12.3.3.1. Étude de la distribution de la nNOS à la JNM d'amphibien	260
12.3.3.2. La synapto-physiologie des CSP et la production de NO	261
12.3.4. Les diaminofluorescines, des marqueurs fluorescents utilisés pour visualiser la production de NO	263
12.3.4.1. Observations préliminaires réalisées à l'aide des DAFs	264
12.3.5. Modèle proposé	269
13. CONCLUSION GÉNÉRALE	273
14. Références bibliographiques	275
15. Annexe	321

Liste des tableaux

Tableau 1. Tableau comparatif des caractéristiques physico-chimiques des différents marqueurs de la famille du FM 1-43.....	41
---	----

Liste des figures

Figure 1. La grenouille <i>Rana pipiens</i> et le muscle <i>cutaneus pectoris</i>	8
Figure 2. La jonction neuromusculaire de grenouille	10
Figure 3. Distribution symétrique des vésicules synaptiques, des canaux calciques et des récepteurs nicotiniques à la jonction neuromusculaire du <i>cutaneus pectoris</i>	13
Figure 4. Les étapes de l'exocytose.....	22
Figure 5. Mécanismes d'endocytose et de recyclage des vésicules synaptiques.	31
Figure 6. Illustration des méthodes afin d'utiliser les marqueurs FM pour évaluer l'activité vésiculaire	38
Figure 7. Schémas de la structure moléculaire de certains marqueurs de la famille du FM 1-43.	40
Figure 8. Facilitation homosynaptique	54
Figure 9. Dépression synaptique dépendante de la fréquence	59
Figure 10. Schémas structuraux des différentes isoformes de NOS et de la réductase du cytochrome P-450 (CPR).....	71
Figure 11. Schéma de la réaction enzymatique de la NOS.	71
Figure 12. Schéma récapitulatif des divers effets synaptiques du NO.	241
Figure 13. Modèle intégrant les effets synaptiques et métaboliques du NO.....	248
Figure 14. Production de NO d'une CSP visualisée à l'aide du DAF-FM.....	267
Figure 15. Modèle de travail intégrant les mécanismes susceptibles de réguler la synthèse du NO à la JNM.	272

Liste des sigles et abréviations

ACh :	AcétylCholine
AChR :	Récepteur cholinergique
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ADP :	Adénosine DiPhosphate
ATP :	Adénosine TriPhosphate
Ca ²⁺ :	Calcium
CaM kinase :	Protéine kinase dépendante à la Calmoduline\Ca ²⁺
CGRP :	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CPR :	Réductase du Cytochrome P-450
CREB :	<i>Cyclic AMP Responsive Element Binding protein</i>
CSP :	Cellule de Schwann Périssynaptique
EDRF :	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>
FAD :	Flavine Adénine Dinucléotide
FMN :	Flavine MonoNucléotide
GMPc :	Guanosine MonoPhosphate cyclique
IMP :	Inositol MonoPhosphate
JNM :	Jonction NeuroMusculaire
LDCV :	Vésicule à cœur dense (<i>Large Dense-Core Vesicle</i>)
LTD :	Dépression à long terme (<i>Long-Term Depression</i>)

LTP :	Potentialisation à long terme <i>(Long-Term Potentiation)</i>
mAChR :	Récepteur cholinergique muscarinique
NADPH :	NicotinAmide Dinucléotide Phosphate
NEM :	N-ÉthylMaléimide
NO :	Monoxide d'azote
NOS :	NO-Synthase
NSF :	<i>NEM-Sensitive Fusion protein</i>
PKA :	Kinase dépendante à l'AMPc
PKC :	Protéine Kinase C
PPM :	Potentiel de Plaque Motrice
PPMm :	Potentiel de Plaque Motrice miniature
RP :	Vésicules de réserve (<i>Reserve Pool</i>)
RRP :	Vésicules à libération immédiate <i>(Readily-releasable Pool)</i>
SNAP :	<i>Soluble NSF-Attachment Protein</i> Ou S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamine (donneur de NO)
SNARE :	<i>Soluble NSF-Attachment Protein REceptor</i>
VAMP :	<i>Vesicular Associated Membrane Protein</i> (synaptobrévine)

Dédicace

*À mon grand-père Rolland Thomas,
Un homme d'une grande qualité.*

*Avec tout mon respect,
Toute mon affection.*

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de recherche, le Dr Richard Robitaille, pour avoir su regarder plus loin que les résultats scolaires et de m'avoir donné la chance de poursuivre des études de haut niveau au sein de son laboratoire. Je tiens à souligner son soutien moral aussi bien que financier tout au long de ma formation.

Je dois aussi remercier les membres de mon comité de parrainage, les Drs Jean-Claude Lacaille et Vincent Castellucci, pour leurs suggestions et commentaires utiles à l'avancement de mon projet de recherche et pour leur intérêt sincère à l'aboutissement de ma formation.

Finalement, je tiens à remercier mes proches de leur soutien inconditionnel dans cette longue odyssée que ce soit lors des congrès où ils se massaient dans les rangées du fond ou lors de nos discussions durant lesquelles ils ont écouté, avec patience, mes tentatives de vulgarisation scientifiques.

Mon dernier remerciement va à ma fiancée, Déborah, pour m'avoir offert ma première couverture bleue. C'est grâce à toi que je me retrouve au fil d'arrivée...

Avant-propos

Les synapses sont des structures neuronales spécialisées dans le transfert d'informations sensorielles ou de commandes motrices du système nerveux. Selon les rythmes imposés aux synapses, celles-ci peuvent augmenter ou réduire leur efficacité, phénomène que l'on appelle plasticité synaptique. C'est cette plasticité qui serait à l'origine des phénomènes d'adaptation, d'apprentissage ou encore de la mémoire. La plasticité synaptique est donc un thème important en sciences neurologiques.

La majorité des phénomènes de plasticité synaptique ont été d'abord observés au sein du système nerveux périphérique en tirant profit de la simplicité structurelle des circuits et grâce à la facilité avec laquelle les composants synaptiques peuvent être isolés. Outre l'axone géant du calmar, la jonction neuromusculaire est certainement la préparation qui a été la plus étudiée. La dépression synaptique est le phénomène de plasticité le plus important à la jonction neuromusculaire dans des conditions physiologiques. On distingue deux types de dépression synaptiques : la première est induite par une activité neuronale à faible fréquence et se développe lentement; la seconde est induite par une

activité neuronale à haute fréquence et se développe rapidement. Bien que ces deux phénomènes aient été étudiés depuis plusieurs années, nous en savons peu sur les mécanismes moléculaires qui seraient en cause.

Le but de cette thèse était donc d'approfondir nos connaissances sur les molécules et mécanismes cellulaires impliqués dans la dépression synaptique à la jonction neuromusculaire.

Cette thèse est divisée en cinq chapitres. Le premier chapitre servira d'introduction du modèle animal utilisé et des différents concepts qui seront abordés dans les chapitres suivants. L'importance de la plasticité synaptique dans la physiologie nerveuse sera d'abord discutée pour ensuite faire place à l'introduction de la JNM et des formes de plasticité synaptiques que l'on y retrouve. Une section présentera les mécanismes impliqués dans la relâche de neurotransmetteurs (exocytose) ainsi que les différentes formes de recyclage des vésicules synaptiques (endocytose). Pour clore le premier chapitre introductif, on trouvera une courte synthèse sur deux neuromodulateurs-clef : l'adénosine et le monoxyde d'azote (NO).

Les deuxième, troisième et quatrième chapitres formeront le corps de la thèse. On y trouvera les résultats de ce projet de recherche sous

forme d'articles scientifiques. Dans le deuxième chapitre, il sera montré que l'adénosine n'affecte pas les niveaux calciques intracellulaires dans les terminaisons nerveuses. Cette forme de dépression serait donc bel et bien indépendante au calcium. Dans le troisième chapitre, il sera montré que le NO réduit la relâche de neurotransmetteurs par des mécanismes dépendants du GMPc et ce, sans modifier l'entrée de calcium dans les terminaisons nerveuses. On verra aussi que le NO peut moduler la dépression synaptique induite par l'adénosine et qu'il est impliqué dans la dépression synaptique induite à haute fréquence. Dans le quatrième chapitre, nous verrons que le NO pourrait participer à la dépression synaptique en inhibant le recyclage rapide des vésicules synaptiques.

Enfin, dans le cinquième chapitre, l'importance des résultats sera discutée et un modèle de travail sur la modulation nitriergique de la dépression synaptique sera proposé à partir des données publiées tout en prenant aussi en considération certains résultats préliminaires non publiés. On retrouvera aussi, en annexe, un article de revue, auquel j'ai participé en tant que coauteur, traitant des interactions entre les synapses et les cellules gliales.

Bonne lecture !

CHAPITRE PREMIER

—

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

Le système nerveux a pour fonction d'intégrer des informations sensorielles ou cognitives et de produire une réponse motrice ou hormonale appropriée. Ces réponses appropriées ont été conditionnées par plusieurs milliers d'années d'évolution, mais sont aussi grandement influencées par l'apprentissage. L'apprentissage, sous toutes ses formes, est le résultat d'une caractéristique importante du système nerveux : sa plasticité. Cette plasticité permet au système nerveux de modifier ses réponses selon le contexte, les échecs et les erreurs passés... La plasticité se présente sous forme de plasticité neuronale ou synaptique (Wang et al., 1997). La plasticité neuronale se traduit par des modifications structurelles des réseaux neuronaux comme la formation ou l'élimination de synapses (Trachtenberg et al., 2002) ou encore par neurogenèse, la formation et la migration de neurones à partir de cellules souches (Kempermann, 2002; Nottebohm, 2002). La plasticité synaptique intervient au niveau moléculaire, aux synapses, en augmentant ou en diminuant le rendement de celles-ci.

La synapse, l'endroit privilégié des échanges d'information dans le système nerveux, est donc sujette à des modifications moléculaires de son efficacité. La potentialisation synaptique englobe tous les phénomènes responsables d'une efficacité synaptique augmentée alors que la dépression synaptique englobe les phénomènes qui réduisent le rendement des synapses. Certaines formes de plasticité synaptique peuvent durer plusieurs heures, voire des jours, comme la potentialisation à long terme (LTP, Brown et al., 1988) et la dépression à long terme (LTD, Ito and Kano, 1982). Ces importants phénomènes sont considérés comme étant les substrats physiologiques de la mémoire (Lynch, 2004) et de l'apprentissage moteur (Ito, 1986).

Par contre, plusieurs formes de plasticité synaptique modulent la neurotransmission durant un laps de temps relativement court (de millisecondes à quelques minutes, Zucker and Regehr, 2002). La plasticité synaptique à court terme est un facteur très important dans l'intégration synaptique des signaux neuronaux et ce, particulièrement dans les systèmes sensoriels (Burrone and Lagnado, 2000; Fortune and Rose, 2001).

Dans cette thèse, le modèle que nous avons utilisé pour étudier les formes de dépression synaptique est celui de la jonction neuromusculaire. La neurotransmission à cette synapse a été passablement étudiée et les caractéristiques des phénomènes de plasticité synaptique que l'on y retrouve sont bien connues (Hort-Legrand and Metral, 1982; Silberberg et al., 1986; Zucker, 1989). La structure anatomique et les composants cellulaires de cette synapse entre le système nerveux et les muscles squelettiques sont présentés dans la section suivante.

2. LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE : UN MODÈLE POUR ÉTUDIER LA PLASTICITÉ À COURT TERME

La jonction neuromusculaire (JNM) est un modèle idéal pour étudier la plasticité synaptique à court terme. Tout d'abord, la JNM est sujette à pratiquement toutes les formes de plasticité à court terme, tant au niveau des phénomènes de potentialisation que des phénomènes de dépression (Hort-Legrand and Metral, 1982; Silberberg et al., 1986; Zucker, 1989, 1999; Zucker and Regehr, 2002). De plus, ce modèle a pour autre avantage d'avoir un lourd passé : les principaux phénomènes de plasticité à court terme y ont été observés il y a déjà plusieurs décennies et leur étude y est bien avancée (Eccles et al., 1941; Ruzzier and Scuka, 1979; Zucker and Regehr, 2002).

La JNM est, en outre, un modèle facile d'accès et d'utilisation. Il est très facile d'en isoler les composants synaptiques sans les endommager. Bien que la fibre musculaire ne soit pas un élément neuronal, cette cellule post-synaptique est, au même titre que les

neurones, une cellule excitable. L'observation des variations de voltage membranaire des fibres musculaires permet de mesurer l'intégration du signal neuronal qu'elles reçoivent.

2.1. La jonction neuromusculaire du muscle *cutaneus pectoris* de la grenouille *Rana pipiens*

Le modèle animal utilisé dans les travaux présentés ici est la grenouille léopard (*Rana pipiens*, Figure 1). L'utilisation de ce modèle présente de nombreux avantages. Tout d'abord, les expériences peuvent être menées à la température de la pièce et les tissus ne nécessitent pas de solutions physiologiques oxygénées. En outre, les fonctions vitales d'une grenouille décérébrée et déméduillée peuvent être maintenues pour plus de 24 heures. Les tissus de cet animal peuvent donc être utilisés bien après sa dissection. Ces caractéristiques ont permis le marquage par un indicateur calcique des terminaisons nerveuses par transport axonal, une technique de marquage qui requiert plusieurs heures (technique utilisée dans les deuxième et troisième chapitres). En résumé, les tissus de cet animal sont donc très robustes et se prêtent bien aux manipulations expérimentales.

Le muscle utilisé dans le cadre de cette thèse était le *cutaneus pectoris*. Le *cutaneus pectoris* est, comme son nom l'indique, un muscle pectoral sous-cutané. Ce muscle, facile d'accès, est assez mince (3 à 4 fibres musculaires d'épaisseur), plutôt translucide et peu irrigué. Il peut donc être facilement utilisé en microscopie photonique. Selon certaines sources, ce muscle participerait à l'adduction de l'humérus (ScienceWorks inc., http://209.35.124.140/dissect/teacher_materials/glossary/frog_glossary.html). Par contre, son point d'insertion à la peau sous la mâchoire inférieure ainsi que son point d'attachement au sternum et aux muscles abdominaux indiquent plutôt qu'il pourrait favoriser l'abaissement de la mâchoire inférieure lors de la projection de la langue et de la capture de proies (Nishikawa, 1999). Quelle que soit sa fonction exacte, il s'agit d'un muscle à contraction rapide et à innervation phasique (Grinnell and Herrera, 1980).

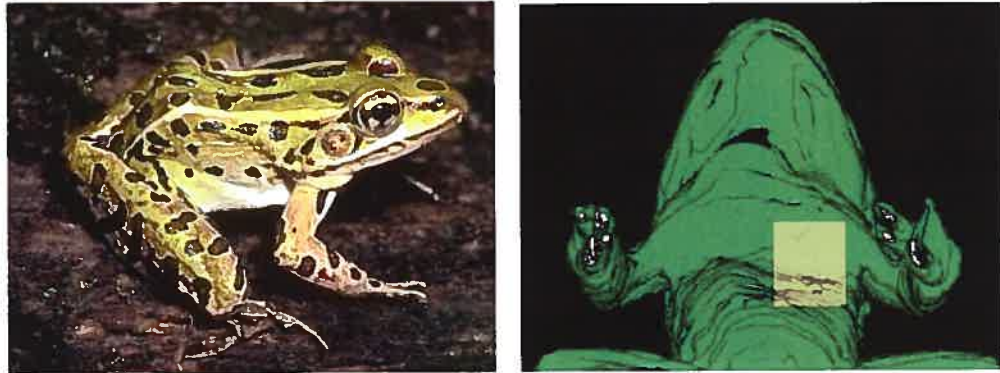


Figure 1. La grenouille *Rana pipiens* et le muscle *cutaneus pectoris*.

À gauche : photographie d'une grenouille léopard (*Rana pipiens*). © James Harding, tiré de http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/resources/james_harding/pcd3912_113.jpg/view.html.

À droite : Vue de l'abdomen de la grenouille. L'image a été obtenue à l'aide du Virtual Frog Dissection Kit, © Lawrence Berkeley National Laboratory, 1994 http://www-itg.lbl.gov/cgi-bin/vfrog_script. L'endroit où est situé le muscle *cutaneus pectoris* est représenté par la région jaune clair (le muscle gauche est ici identifié).

La jonction neuromusculaire de ce muscle consiste en une structure fine et allongée dont on peut distinguer les 3 éléments cellulaires : la terminaison nerveuse, la fibre musculaire et les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs, Figure 2).

La terminaison nerveuse est la structure dans laquelle les neurotransmetteurs sont synthétisés et stockés à l'intérieur de vésicules synaptiques. La terminaison nerveuse participe à l'établissement des synapses, véritables contacts chimiques, à intervalles réguliers le long de la fibre musculaire. La fibre musculaire, quant à elle, possède les récepteurs nécessaires pour détecter l'activité nerveuse. La CSP est une cellule de Schwann qui, sans former de myéline, recouvre intimement la terminaison nerveuse. Les travaux du Dr Robitaille et de ses collaborateurs laissent entrevoir un rôle déterminant pour ces cellules dans la modulation de la transmission synaptique à la JNM (Auld et al., 2003; Auld and Robitaille, 2003a, b).

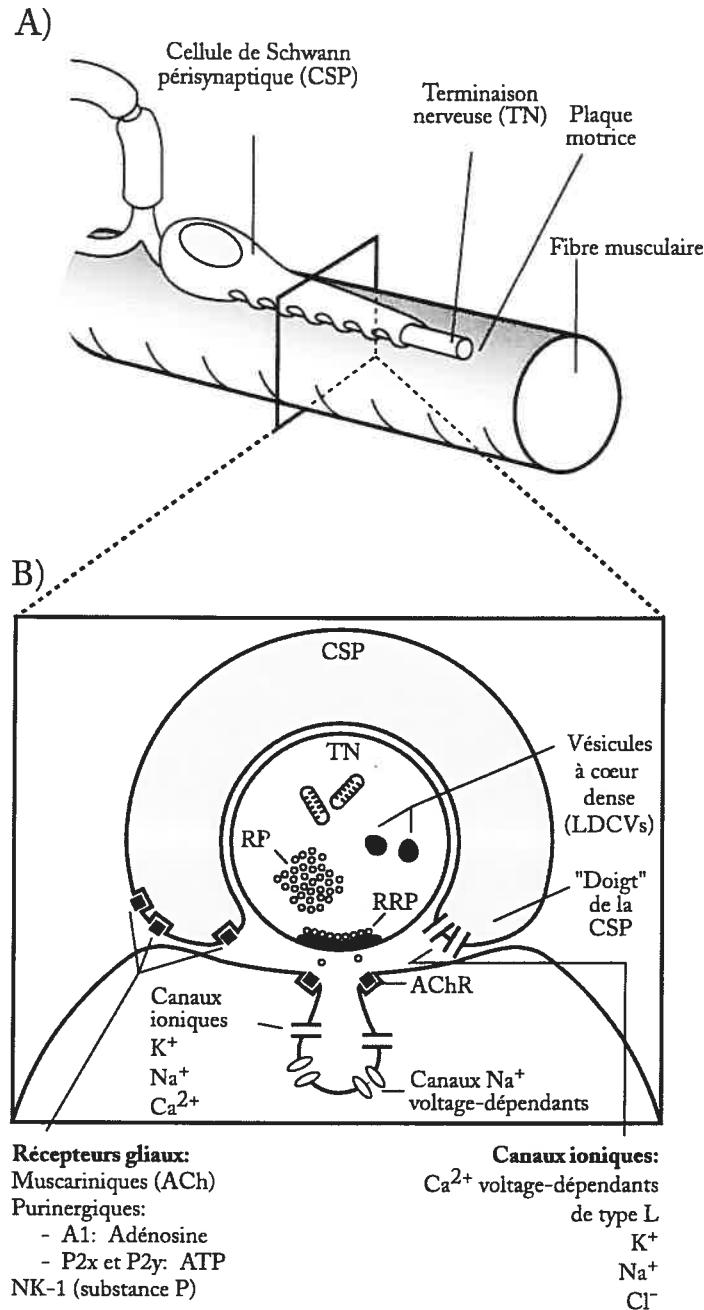


Figure 2. La jonction neuromusculaire de grenouille

A) Représentation schématique des éléments cellulaires de la jonction neuromusculaire d'amphibien. La terminaison nerveuse (TN) est une fine et longue structure, intimement recouverte par des cellules de Schwann périssynaptiques (CSP). La plaque motrice est la spécialisation postsynaptique de la fibre musculaire.

B) Vue en coupe transverse des éléments cellulaires de la jonction neuromusculaire. Remarquez les "doigts" de la CSP qui sont à proximité du site de relâche de neurotransmetteurs.

Figure adaptée à partir de Auld and Robitaille (2003a).

2.2. La terminaison nerveuse

2.2.1. STRUCTURE

La terminaison nerveuse d'amphibien est une structure axonale longue et fine, spécialisée dans la relâche de neurotransmetteurs, établissant ainsi un contact chimique avec la fibre musculaire. On y retrouve de nombreuses mitochondries afin de répondre aux importants besoins énergétiques occasionnés par la synthèse, le stockage et la relâche de neurotransmetteurs (Nicholls, 2003).

2.2.1.1. *Zones actives*

La terminaison nerveuse est ponctuée de régions surspécialisées appelées zones actives. Elles sont régulièrement espacées à intervalle de 1 μm (Betz et al., 1992a) le long de la terminaison nerveuse. Tous les éléments nécessaires à la relâche de neurotransmetteurs y sont concentrés. Tout d'abord, les canaux calciques dépendants du voltage impliqués dans la relâche de neurotransmetteur y sont concentrés (Robitaille et al., 1990; Cohen et al., 1991). C'est aussi le lieu

d'ancrage et de stockage des vésicules synaptiques (Betz et al., 1992a). Lorsque l'on observe la distribution de tous ces éléments présynaptiques (Figure 3), on remarque qu'ils sont distribués de façon symétrique avec la distribution des récepteurs nicotiniques musculaires.

A)



B)

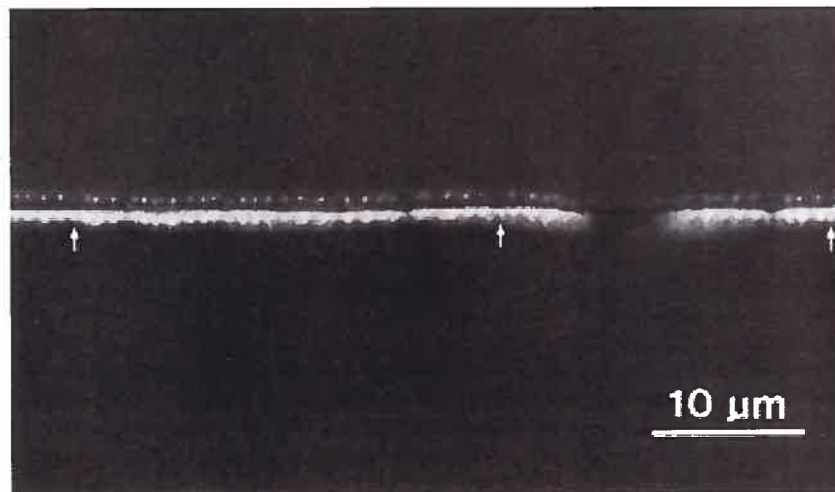


Figure 3. Distribution symétrique des vésicules synaptiques, des canaux calciques et des récepteurs nicotiniques à la jonction neuromusculaire du *cutaneus pectoris*.

A) Les vésicules synaptiques sont concentrées aux zones actives, en face des récepteurs nicotiniques musculaires. Dans cette illustration, les récepteurs nicotiniques ont été marqués en rouge et les vésicules synaptiques en vert. L'image du centre est obtenue par superposition des deux marquages fluorescents. Remarquez la nature ponctuée des deux marquages et le haut degré de co-localisation. Tiré de Betz et al. (1992a).

© 1992 by the Society for Neuroscience

B) Les canaux calciques présynaptiques sont concentrés aux zones actives, en face des récepteurs nicotiniques musculaires. Vue de côté de la jonction neuromusculaire. Les canaux calciques présynaptiques ont été marqués à l'aide de ω -conotoxine fluorescente (en haut) et les récepteurs nicotiniques musculaires à l'aide de α -bungarotoxine fluorescente (en bas). Remarquez qu'à seulement trois endroits, le marquage postsynaptique n'avaient pas de marquage présynaptique correspondant (flèches). Tiré de Cohen et al. (1991). © 1991 by the Society for Neuroscience.

2.2.2. POPULATIONS VÉSICULAIRES

2.2.2.1. *Vésicules à cœur dense*

Il existe deux populations de vésicules synaptiques à la JNM. Une première population est composée de vésicules dont le centre apparaît foncé en microscopie électronique et qui sont présentes surtout en périphérie de la zone active (Pecot-Dechavassine and Brouard, 1997). Ces " vésicules à cœur dense " (LDCVs pour *large dense-core vesicles*) sont de grande taille (100 nm de diamètre) mais sont peu nombreuses et ne représentent qu'environ 1 % de la population totale des vésicules (Lynch, 1980).

Les vésicules à cœur dense contiennent des peptides. À la jonction neuromusculaire du *cutaneus pectoris*, ces vésicules contiennent de la substance P (Matteoli et al., 1990) et du CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide, Matteoli et al., 1988). La substance P a des effets potentialisateurs sur la transmission nerveuse à la JNM en augmentant le nombre de quanta relâchés (Akasu, 1986). La substance P est aussi un important modulateur des interactions entre la terminaison nerveuse et les CSPs (Bourque and Robitaille, 1998).

Le CGRP est un facteur trophique important lors de la maturation de la jonction neuromusculaire qui module la sensibilité des récepteurs nicotiniques musculaires (Lu and Fu, 1995). De plus, le CGRP participerait à la régulation de l'expression des cholinestérasas aux JNM matures (Fernandez and Hodges-Savola, 1996).

2.2.2.2. *Vésicules claires*

La seconde population de vésicules est formée de petites vésicules qui apparaissent claires en microscopie électronique et qui ont un diamètre d'environ 50 nm. Ces vésicules synaptiques peuvent ensuite être divisées en deux groupes. Un groupe est composé de vésicules ancrées à la membrane présynaptique et juxtaposées aux canaux calciques. Ces vésicules forment le groupe de vésicules à libération immédiate (RRP pour *Readily-Releasable Pool*). Ce groupe représente environ 20 % des vésicules claires. Ces vésicules sont ancrées à la membrane par des interactions protéiniques spécifiques (voir 2.2.4 Cycle des vésicules synaptiques).

Un peu plus en retrait de la membrane se retrouvent les vésicules synaptiques de réserve (RP pour *Reserve Pool*), qui peuvent être mobilisées au besoin, en cas d'épuisement du RRP. Les vésicules du RP sont retenues par un réseau de filaments d'actine et de synapsine I (Valtorta et al., 1988). Lorsque la synapsine I est phosphorylée, le réseau qui retient les vésicules du RP serait relâché (Valtorta et al., 1988; Llinas et al., 1991), permettant ainsi la migration de ces vésicules vers les sites de relâche de neurotransmetteur. La kinase dépendante du Ca^{2+} /Calmoduline II (CaM kinase II) est l'enzyme responsable de la phosphorylation de la synapsine I à la synapse géante du calmar (Llinas et al., 1991) alors qu'à la jonction neuromusculaire de grenouille, ce serait la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA, Valtorta et al., 1988).

Le neurotransmetteur présent dans les vésicules claires est l'acétylcholine (ACh, Katz and Miledi, 1965a). Par contre, on y retrouve également de l'adénosine triphosphate (ATP) dans un rapport 1:3 avec l'ACh (Wagner et al., 1978). L'ATP, relâchée en même temps que l'ACh, serait responsable d'une forme de dépression synaptique (voir 2.5.3 Dépression dépendante de l'adénosine, Ribeiro and Dominguez, 1978; Redman and Silinsky, 1994).

2.2.3. FONCTION DE LA TERMINAISON NERVEUSE, RÔLE DU CALCIUM

Maintenant que nous avons vu la structure et les éléments de la terminaison nerveuse, nous allons maintenant s'attarder à sa fonction, soit la traduction des influx nerveux en sécrétion de neurotransmetteurs. Dans cette traduction électrochimique, le calcium joue un rôle primordial. L'introduction de chélateurs calciques dans les terminaisons nerveuses (Adler et al., 1991), la réduction de la concentration calcique extracellulaire (Katz and Miledi, 1965b), de même que l'antagonisme des canaux calciques dépendants du voltage (Protti and Uchitel, 1993; Katz et al., 1995) réduisent ou abolissent la transmission synaptique à la JNM. La transmission synaptique est donc, dans des conditions physiologiques, dépendante de l'activation des canaux calciques. Ceux-ci sont activés lorsque les potentiels d'action envahissent et dépolarisent la membrane de la terminaison nerveuse. Nous avons vu précédemment que ces canaux étaient situés de façon stratégique aux zones actives, tout près des vésicules synaptiques (Figure 3). La structure de la terminaison constitue donc un exemple frappant d'un couplage optimal entre la structure et la fonction cellulaire. Pour témoigner de cette grande

efficacité d'organisation cellulaire, la JNM du *cutaneus pectoris* établit des synapses extrêmement efficaces avec des facteurs de sécurité élevés en raison de ses nombreuses zones actives et à sa grande population de vésicules synaptiques (Grinnell and Herrera, 1980; Banner and Herrera, 1986; Adams, 1989).

La relâche de neurotransmetteurs survient donc suite à l'entrée de calcium dans les terminaisons nerveuses. Les neurotransmetteurs sont relâchés dans la fente synaptique lorsque les vésicules synaptiques fusionnent avec la membrane plasmique neuronale par un mécanisme appelé exocytose. Nous verrons dans la section qui suit les différents mécanismes proposés pour décrire l'exocytose ainsi qu'une description des différents modes de recyclage vésiculaire.

2.2.4. CYCLE DES VÉSICULES SYNAPTIQUES

Le célèbre chimiste Antoine Laurent Lavoisier (1743-1794) a postulé que, dans l'Univers, « Rien ne se perd, rien ne se crée ». Ce postulat s'applique bien à la biologie des vésicules synaptiques qui figure au centre d'un cercle bien circonscrit, fermé : exocytose - endocytose - remplissage en neurotransmetteurs - exocytose. Les vésicules

synaptiques font l'objet d'un recyclage méticuleux qui a pour fonction, entre autres, de s'assurer qu'aucun excès de membrane ne vienne mettre en péril la structure et la fonction de la zone active (Poodry and Edgar, 1979). Ce recyclage est aussi important pour l'approvisionnement et le maintien des stocks vésiculaires, en particulier à la JNM où le rythme de neurotransmission est habituellement élevé (Kawasaki et al., 2000).

Les différentes phases de la biologie des vésicules synaptiques sont si interdépendantes qu'il est difficile de les présenter de façon isolée. En effet, la localisation subcellulaire ou la provenance des vésicules synaptiques influencera les mécanismes par lesquels elles subiront l'exocytose. Par la suite, les mécanismes d'exocytose vont dicter la manière avec laquelle les vésicules subiront l'endocytose et, finalement, les mécanismes endocytotiques vont déterminer la vitesse avec laquelle les vésicules synaptiques pourront être de nouveau disponible en plus de déterminer vers quel groupe vésiculaire elles seront dirigées. Les sections suivantes vous présenteront d'abord les différentes étapes de l'exocytose pour ensuite vous présenter les divers mécanismes d'endocytose et de recyclage vésiculaire présents aux synapses.

2.2.4.1. *Exocytose*

Dans les terminaisons nerveuses, les neurotransmetteurs sont concentrés dans les vésicules synaptiques et sont libérés dans la fente synaptique par un mécanisme appelé exocytose. L'exocytose consiste en une série d'interactions protéiniques spécifiques qui permet à la vésicule synaptique de fusionner avec la membrane de la zone active, d'exposer sa lumière vésiculaire au milieu extracellulaire, permettant ainsi la diffusion des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. L'exocytose est un mécanisme se décomposant en 3 étapes distinctes (Figure 4): l'arrimage des vésicules, la formation d'un pore de fusion et la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane de la terminaison nerveuse.

Dans le cas des vésicules du RP, les vésicules doivent d'abord migrer vers la membrane plasmique avant d'entreprendre l'exocytose. En effet, celles-ci doivent d'abord être libérées de leurs liens avec le cytosquelette, tel que décrit dans la section " 2.2.2.2 Vésicules claires ". L'étape première de la migration vésiculaire implique donc la phosphorylation de la synapsine par la PKA. Mais une fois libérées, les vésicules migrent-elles de façon désordonnée ? Par mouvement Brownien ? Et dans quelle direction ? Le trafic migratoire vésiculaire

serait guidé par de petites protéines G comme la protéine Rab-3A qui accompagnent les vésicules jusqu'à leur site d'arrimage (Geppert et al., 1994; Johannes et al., 1998). La sensibilité au Ca^{2+} de ces protéines leur permet d'effectuer un recrutement vésiculaire moduler par l'activité synaptique (Burns et al., 1998). Enfin, les vésicules synaptiques sont prêtes à être arrimées lorsqu'elles arrivent à proximité de la zone active où sont concentrés les canaux calciques (Robitaille et al., 1990).

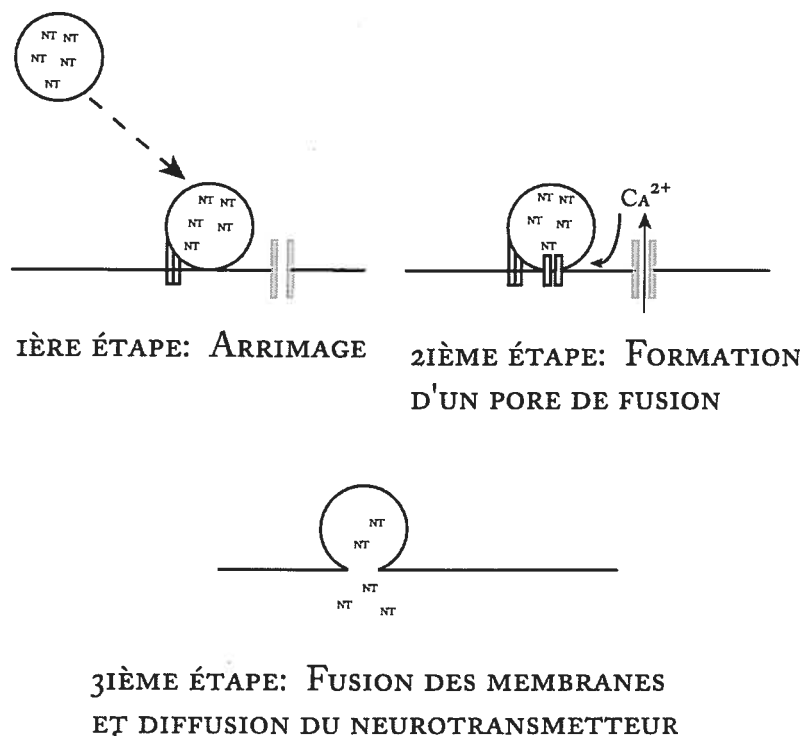


Figure 4. Les étapes de l'exocytose.

1^{re} étape : L'arrimage. Les vésicules synaptiques migrent vers la membrane et s'attachent à celle-ci via des interactions protéiniques. Pour les vésicules du RRP, cette étape est déjà complétée.

2^e étape : La formation d'un pore de fusion. L'entrée de Ca^{2+} entraîne la formation d'un pore de fusion, une sorte de canal protéinique qui va permettre aux membranes de fusionner et/ou de laisser le neurotransmetteur diffuser dans la fente synaptique.

3^e étape : L'ouverture ou la dilatation du pore de fusion expose la lumière des vésicules synaptiques. Les neurotransmetteurs (NT) sont alors libres de diffuser dans la fente synaptique.

La découverte et la terminologie des protéines impliquées dans les différentes phases de l'exocytose fait suite à des études sur le transport vésiculaire du Golgi. Il a été montré que le N-éthylmaléimide (NEM), un réactif sulfhydryle, empêchait les vésicules du Golgi de fusionner avec les citernes de ce système (Balch et al., 1984). Grâce à cet agent, une protéine a pu être isolée et purifiée : la NSF (*NEM-Sensitive Fusion protein*), une protéine cytoplasmique soluble à activité ATPase (Young et al., 1988). Une fois cette protéine isolée, de nombreuses protéines cytoplasmiques se liant à celle-ci ont été identifiées. Ces protéines additionnelles ont été nommées SNAP (*Soluble NSF-Attachment Protein*) et celles-ci interagissent avec des récepteurs membranaires nommés SNARE (*Soluble NSF-Attachment protein REceptors*). Voyons maintenant l'implication de ces différentes protéines dans l'exocytose.

L'arrimage vésiculaire est la première étape de l'exocytose. Elle consiste à la formation d'un complexe composé de protéines cytoplasmiques (NSF, SNAPs) ainsi que des protéines vésiculaires et membranaires (Pevsner et al., 1994), nommées respectivement v-SNARE and t-SNARE. L'hydrolyse d'ATP par la NSF est absolument nécessaire à l'amorce de l'arrimage (Banerjee et al., 1996). Du côté de la vésicule synaptique, au moins deux v-SNARE sont impliquées dans la phase d'arrimage : la synaptobrevine ou VAMP (Chapman et al., 1994)

et la synaptotagmine (Petrenko et al., 1991). Ces protéines vésiculaires vont interagir avec leurs " récepteurs " t-SNARE, présents à la membrane plasmique de la terminaison nerveuse. La synaptobrevine forme un complexe protéinique en se liant à deux protéines membranaires, la protéine SNAP-25 et la syntaxine (Chapman et al., 1994; McMahon and Sudhof, 1995). La synaptotagmine, qui a la capacité de fixer le calcium et les phospholipides (Elferink et al., 1993), se lie elle aussi à la syntaxine (Chapman et al., 1995).

Ces complexes protéiniques d'arrimage sont physiquement liés aux canaux calciques (Sheng et al., 1998) afin d'optimiser la relâche de neurotransmetteur qui nécessite une très haute concentration de Ca^{2+} (concept des microdomaines, Bennett et al., 2000). De nombreuses interactions entre les complexes protéiniques d'arrimage et les canaux calciques ont lieu. Par exemple, il a été montré que l'arrimage de vésicules facilite l'activation des canaux calciques (Zhong et al., 1999), de même que la présence de syntaxine était nécessaire afin de permettre aux récepteurs couplés aux protéines G de moduler l'activité des canaux calciques (Stanley and Mirotnik, 1997).

La deuxième étape de l'exocytose implique la formation d'un pore de fusion. Le concept du pore de fusion est venu répondre aux problèmes conceptuels liés à la fusion des membranes plasmiques et vésiculaires. Un pore formé de protéines transmembranaires pourrait faciliter la fusion des membranes biologiques qui ont un cœur hydrophobe difficile à dissocier.

L'hypothèse conceptuelle du pore de fusion est tirée d'observations électrophysiologiques effectuées auprès de cellules non-neuronales comme les cellules chromaffines de la médullosurrénale (Zhou et al., 1996) ou les mastocytes (Breckenridge and Almers, 1987a, b). Ces cellules possèdent des granules de sécrétion qui, dans le cas des souris mutantes *beige*, peuvent atteindre 5 μm de diamètre (Breckenridge and Almers, 1987a, b) ! Lors de l'exocytose de ces vésicules, une quantité non négligeable de membranes est ajoutée à la membrane plasmique. Cet ajout de membrane crée des changements de capacitance qui peuvent être détectés en électrophysiologie. Les enregistrements électrophysiologiques sur de telles cellules ont permis de mettre en évidence la présence d'un courant précédant d'environ 100 ms les changements de capacitance. La conductance du pore de fusion oscille autour de 250 pS, l'équivalent de la conductance d'une jonction GAP.

La composition et la structure du pore de fusion sont cependant incertaines (Lindau and Almers, 1995). Bien que l'existence d'hémicanaux sur la membrane plasmique de même que sur les vésicules synaptiques ait été suggérée pour expliquer la formation des pores de fusion (Kandel and Siegelbaum, 2000), de telles structures n'ont pas été observées. La synaptophysine est une protéine vésiculaire qui pourrait faire partie du pore de fusion. En effet, cette protéine a la capacité de former des canaux d'une conductance similaire au pore de fusion (Gincel and Shoshan-Barmatz, 2002). Alternativement, le pore de fusion formé de la synaptophysine pourrait être agrémenté d'une sous-unité de la V-ATPase (V0) et de la synaptobrevine (Galli et al., 1996).

Finalement, il a été aussi proposé que le pore de fusion était composé des protéines impliquées dans l'arrimage des vésicules. Dans ce modèle alternatif, les protéines d'arrimage opèrent une force tangentielle favorisant l'évagination et, éventuellement, la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique (Mochida, 2000). Cette hypothèse est appuyée par la démonstration que les complexes protéiniques d'arrimage étaient en mesure, à eux seuls, de former des pores de fusion sur des membranes plasmiques purifiées (Cho et al., 2002).

Au niveau de la dernière étape de l'exocytose, la fusion des membranes, un véritable débat existe. Deux modèles s'affrontent : l'exocytose de type *kiss-and-run* et le modèle classique de fusion complète des membranes (Figure 5). Dans le modèle d'exocytose de type *kiss-and-run* (Fesce et al., 1994), la vésicule synaptique ne s'approche de la membrane que pour former le pore de fusion. Une fois le neurotransmetteur diffusé par ce canal, la vésicule synaptique se détache immédiatement. Ce modèle a l'avantage conceptuel de fournir un mécanisme d'exocytose par lequel l'intégrité des membranes vésiculaires, leur contenu protéinique ainsi que la stœchiométrie des différentes protéines sont préservés. Ce modèle a aussi comme avantage de fournir un mécanisme ultra-rapide qui est compatible avec le taux de décharge élevé des neurones.

Ce modèle est tiré d'observations électrophysiologiques combinant la détection de la résistance (capacitance) membranaire et l'ampérométrie. L'ampérométrie est une technique qui permet de détecter la relâche de neurotransmetteurs de façon directe. Une électrode de carbone fortement dépolarisée est amenée tout près de la membrane plasmique. Lorsque les neurotransmetteurs frappent l'électrode, ils sont oxydés, créant un courant proportionnel à la relâche de neurotransmetteurs (Marcenac and Gonon, 1985). Il a été observé

que la relâche de neurotransmetteurs avait lieu durant des changements de capacitance rapides et transitoires, encore une fois chez les mastocytes de souris mutantes (Alvarez de Toledo et al., 1993; Neher, 1993) de même que chez les cellules chromaffines (Ales et al., 1999).

L'exocytose de type *kiss-and-run* n'est toutefois pas un mécanisme exclusif aux cellules non-neuronales. En utilisant des marqueurs vésiculaires fluorescents réversibles (voir section 2.2.4.3), il a été montré, dans les cultures de neurones hippocampiques (Klingauf et al., 1998; Stevens and Williams, 2000) et à la jonction neuromusculaire (Henkel and Betz, 1995), que l'exocytose des vésicules synaptiques pouvait avoir lieu par un mécanisme de type *kiss-and-run*.

Dans le mécanisme d'exocytose classique (Figure 5, Heuser and Reese, 1973), la vésicule synaptique fusionne complètement avec la membrane plasmique. La membrane vésiculaire diffuse alors dans la membrane plasmique fluide en périphérie de la zone active avant d'être capturée par les mécanismes d'endocytose. La façon dont la composition spécifique des membranes vésiculaires est conservée demeure encore un mystère.

Les différents mécanismes d'exocytose proposés ne sont pas du tout exclusifs. Il y a de plus en plus d'études montrant que plusieurs mécanismes d'exocytose coexistent au sein d'une même synapse. La prépondérance d'un mécanisme versus un autre est contrôlée par de multiples facteurs. Par exemple, il a été montré qu'une concentration calcique intracellulaire élevée favorisait l'exocytose de type *kiss-and-run* dans les cellules chromaffines (Ales et al., 1999). Finalement, la proportion de vésicules synaptiques subissant une exocytose de type *kiss-and-run* serait proportionnelle à l'intensité de la stimulation imposée aux terminaisons nerveuses (Stevens and Williams, 2000).

2.2.4.2. *Endocytose et recyclage des vésicules synaptiques*

Une fois l'exocytose complétée, les vésicules synaptiques sont dirigées vers les divers mécanismes de recyclage où elles sont retirées de la membrane plasmique par endocytose pour ensuite être remplies à nouveau de neurotransmetteurs pour finalement retourner dans les pools vésiculaires (RRP ou RP selon le cas). Les différents mécanismes de recyclage des vésicules synaptiques peuvent être différenciés par leur

cinétique ainsi que par les structures cytoplasmiques intermédiaires qui leur sont attachées (Figure 5). Dans les paragraphes qui suivent, les différents mécanismes seront présentés et cette section se terminera par une présentation de la machinerie protéinique impliquée dans l'endocytose.

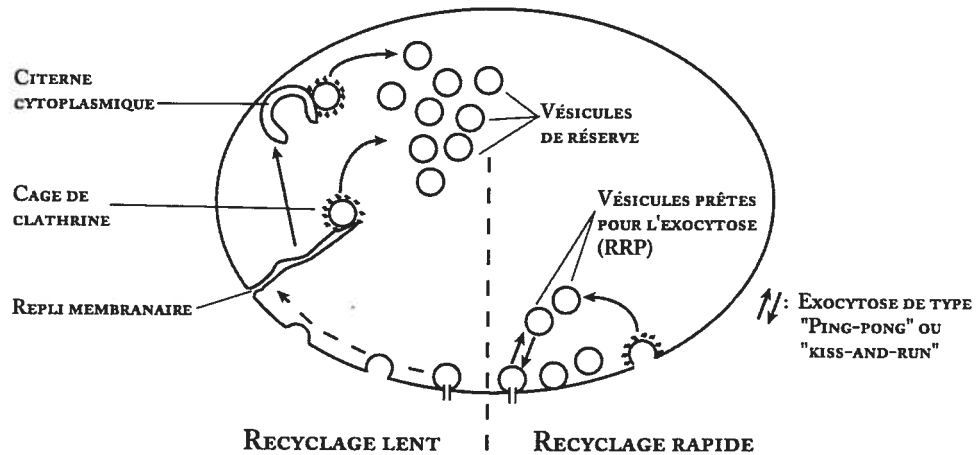


Figure 5. Mécanismes d'endocytose et de recyclage des vésicules synaptiques. Représentation schématique des mécanismes de recyclage des vésicules synaptiques. Le recyclage des vésicules synaptiques peut s'effectuer par des mécanismes lents, rapides ou encore ultra-rapides (de type *kiss-and-run*). Adapté à partir de Richards et al. (2000).

À gauche : recyclage lent. Les mécanismes de recyclage lents impliquent la formation de replis membranaires et de citernes cytoplasmiques. Les vésicules synaptiques sont reformées suite au recrutement de clathrine. Les mécanismes de recyclage lents sont responsables de l'approvisionnement du groupe vésiculaire de réserve.

À droite : recyclage rapide. Le recyclage rapide implique une endocytose de type *kiss-and-run* de façon clathrine-indépendante ou encore par une forme rapide d'endocytose dépendante à la clathrine mais qui ne nécessite pas d'intermédiaire cytoplasmique. Les mécanismes de recyclage rapides sont couplés au recyclage du groupe des vésicules à libération immédiate (RRP).

Il faut environ 10 à 20 minutes pour recycler une vésicule synaptique par la forme de recyclage lente (Richards et al., 2000). Le recyclage lent implique d'abord la formation de longs replis membranaires qui servent de tampon membranaire, permettant l'accumulation de membrane sans porter atteinte à la structure de la zone active. Environ dix minutes après une période intense d'exocytose, ces longs replis se détachent de la membrane pour former des citernes cytoplasmiques. Ces citernes, de forme très distinctive (elles ressemblent à de véritables fers à cheval), vont ensuite donner naissance par bourgeonnement à de nouvelles vésicules environ cinq minutes plus tard. Le recyclage lent est associé de façon fonctionnelle avec le recyclage du groupe vésiculaire de réserve (Richards et al., 2000; Richards et al., 2003).

Le recyclage vésiculaire rapide est responsable de l'approvisionnement vésiculaire du groupe de vésicules à libération immédiate (Richards et al., 2000; Richards et al., 2003). Cette forme de recyclage nécessite moins de deux minutes et ne requiert pas d'intermédiaires cytoplasmiques.

Bien que l'étude des protéines impliquées dans l'exocytose ait joui d'une grande attention, ce n'est que récemment que les mécanismes cellulaires de l'endocytose ont été étudiés. Au-delà des différentes cinétiques d'endocytose que l'on retrouve, on note aussi une grande variété de mécanismes d'endocytose. De cette diversité, on recoupe l'implication de deux protéines qui jouent un rôle majeur dans l'endocytose : la clathrine et la dynamine.

La clathrine est un ensemble protéique structurel, formé de chaînes lourdes et légères, qui est présent sous forme de triskèle dans le cytoplasme (Ungewickell and Branton, 1981). La clathrine a la propriété de se polymériser de façon à former une véritable cage sphérique que l'on appelle le manteau de clathrine. Cette cage protéinique appliquerait une force sur les membranes vésiculaires, permettant leur invagination cellulaire. La structure polyhédrique des cages de clathrine déterminerait la dimension des vésicules synaptiques (Ye and Lafer, 1995). Le recrutement de la clathrine se produit par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme l'AP-2, l'AP-50, l'AP-180 et l'epsine (Thurieu et al., 1988; Matsui and Kirchhausen, 1990; Lindner and Ungewickell, 1991; Yao et al., 2003). Ces protéines adaptatrices seraient responsables de la reconnaissance des constituants des

vésiculaires synaptiques assurant ainsi une endocytose qui préserverait leur intégrité. Dans le cas de l'exocytose de type *kiss-and-run*, nul besoin de la clathrine et des protéines adaptatrices puisque la vésicule synaptique ne se déforme pas et que sa composition membranaire est inchangée.

La dynamine est une protéine à activité GTPase qui intervient dans la phase finale de l'endocytose, lorsque le manteau de clathrine a modelé la vésicule synaptique mais qu'elle est encore attachée à la membrane plasmique (McClure and Robinson, 1996). Ces vésicules, sur le point de quitter la membrane plasmique, forment ce que l'on appelle les structures oméga (Ω , Koenig et al., 1998). Les molécules de dynamine s'enroulent en spirale au niveau du cou des structures oméga et fournissent l'énergie nécessaire à la fission de la vésicule synaptique. Le rôle crucial de la dynamine dans l'endocytose est bien illustré par l'étude des drosophiles mutantes *shibire* (Poodry and Edgar, 1979). Chez ces mutants, l'inhibition de la dynamine est modulée de façon réversible par la température. L'inhibition de la dynamine crée rapidement une fatigue musculaire (Kawasaki et al., 2000) suivie d'une paralysie complète. L'observation, en microscopie électronique, des jonctions neuromusculaires des mouches *shibire* révèle une abondance de figures

oméga à la membrane plasmique et la quasi-disparition des populations vésiculaires.

Plusieurs autres protéines seraient impliquées dans l'endocytose. La plupart des protéines impliquées dans la machinerie endocytotique interagissent par le biais de régions SH3. Parmi celles-ci on remarque l'amphiphysine, une protéine qui s'attache à l'AP-2 et qui recrute la clathrine et la dynamine (Wigge and McMahon, 1998; Slepnev et al., 2000). La synaptojanine est une autre protéine capable de se lier à la dynamine et qui est déphosphorylée lors d'activité synaptique (McPherson et al., 1994). Elle se lie en outre à l'endophiline et à l'amphiphysine (Micheva et al., 1997). D'autres protéines sont responsables de la disponibilité des différents composants de la machinerie protéinique endocytotique comme l'endophiline et l'intersectine (Yamabhai et al., 1998; Schuske et al., 2003; Song and Zinsmaier, 2003; Verstreken et al., 2003).

L'étude de l'endocytose en est à ses balbutiements et on commence à peine à brosser le tableau des interactions protéiniques responsables de l'endocytose. Bien que plusieurs protéines aient été identifiées, leur action précise dans le mécanisme d'endocytose est, pour la plupart, inconnue. Pour compliquer le tout, des formes d'endocytose

indépendante de la clathrine (Palfrey and Artalejo, 1998; Shi et al., 1998; Daly et al., 2000) et de la dynamine (Vickery and von Zastrow, 1999) ont été observées. Il faudra donc un certain temps avant d'apprécier la diversité des mécanismes d'endocytose et de pouvoir proposer un modèle mécanistique de l'endocytose.

2.2.4.3. Les marqueurs vésiculaires comme outils pour étudier la biologie des vésicules synaptiques

L'avènement de molécules fluorescentes capables de marquer des vésicules synaptiques *in situ*, via l'activité neuronale a permis d'approfondir nos connaissances sur la dynamique des vésicules synaptiques dans les terminaisons nerveuses (Betz and Bewick, 1992; Betz et al., 1992b; Betz et al., 1992a; Betz and Bewick, 1993). Les marqueurs de la famille du FM1-43 (marqueurs FM) sont aujourd'hui les plus utilisés et ont été développés à la jonction neuromusculaire d'amphibien (précisément le muscle utilisé dans cette thèse, Betz et al., 1996).

Les marqueurs FM sont des molécules amphiphiles, leur partie hydrophobe leur permettant de se lier aux membranes et leur partie hydrophile les empêchant de traverser ses mêmes membranes. Leur fluorescence de base est relativement faible mais augmente de façon significative (100 x) lorsque la molécule est attachée aux phospholipides. Ils peuvent être utilisés pour évaluer les activités endo- et exocytotiques (Figure 6).

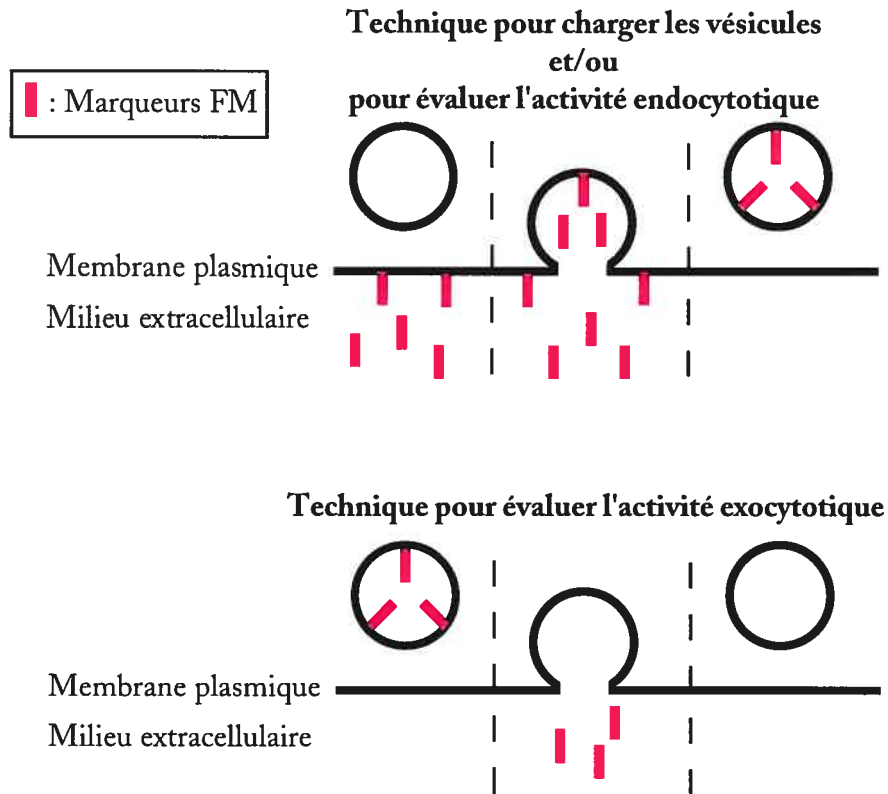


Figure 6. Illustration des méthodes afin d'utiliser les marqueurs FM pour évaluer l'activité vésiculaire.

Haut : Pour charger les vésicules ou pour mesurer l'activité endocytotique, les terminaisons nerveuses sont mises en présence des marqueurs FM (Gauche). Lors d'une stimulation nerveuse, la membrane interne des vésicules est exposée aux marqueurs lors de l'exocytose (Centre). Les marqueurs sont emprisonnés dans les vésicules lors de leur endocytose (Droite). Un lavage de la préparation élimine le marquage non-spécifique des membranes plasmiques.

Bas : Pour évaluer l'activité exocytotique, les vésicules sont préalablement chargées (Gauche). Lors de la stimulation nerveuse en absence de marqueur dans le milieu extracellulaire, les marqueurs vésiculaires diffusent dans la fente synaptique lors de l'exocytose (Centre). La vésicule ainsi déchargée (Droite), une perte de fluorescence des terminaisons nerveuses est observée.

Le premier membre de cette famille de marqueur à avoir été utilisé avec succès est le FM1-43. De nombreux analogues de cette molécule ont été synthétisés, ayant des caractéristiques chimiques distinctes (Betz et al., 1996). Le FM1-43, FM2-10 et le FM4-64 sont les trois marqueurs principaux de cette famille. Ces 3 analogues varient dans leur taille, poids moléculaire, leur spectre de fluorescence et leur affinité membranaire (Figure 7 et Tableau 1).

À la jonction neuromusculaire (Richards et al., 2000) ainsi que dans le système nerveux central (Klingauf et al., 1998), les différents mécanismes d'exocytose et d'endocytose ont pu être étudiés de façon spécifique en tirant parti des différentes propriétés des marqueurs FM. Par exemple, la plus grande hydrosolubilité du FM2-10 a permis de mettre en évidence une exocytose de type kiss-and-run dans les neurones hippocampiques en culture (Klingauf et al., 1998). Dans le cas de la JNM d'amphibien, il semble que ce soit la petite taille du FM2-10 qui lui confère une spécificité de marquage pour le recyclage lent (Richards et al., 2000).

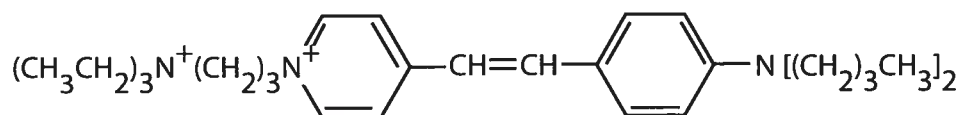
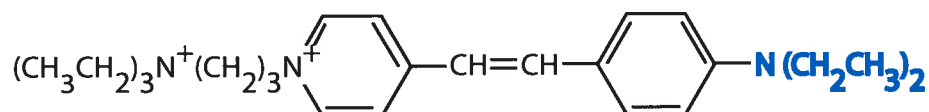
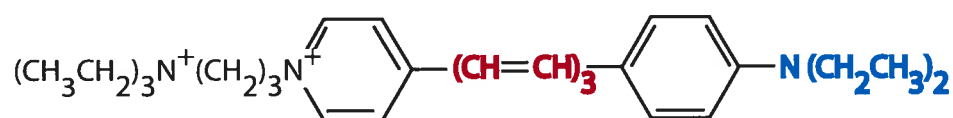
FM 1-43**FM 2-10****FM 4-64**

Figure 7. Schémas de la structure moléculaire de certains marqueurs de la famille du FM 1-43.

Les marqueurs FM possèdent une tête polaire, hydrophile (partie gauche avec les atomes d'azote chargé), un noyau de double liens qui leur confère leurs propriétés spectrales et, enfin, une queue responsable de l'attachement aux membranes. La partie invariable des molécules apparaît ici en noir. La queue du FM 2-10 possède moins de chaînes de carbone que le FM 1-43 (la modification est illustrée en bleu) ce qui rend cette molécule plus soluble. Le FM 4-64 possède un noyau de carbone à double lien qui est beaucoup plus long, ce qui lui confère sa plus grande hydrophobicité et son spectre de fluorescence différent.

Marqueur	Poids moléculaire	Affinité membranaire et/ou hydrophobicité	Spectre de fluorescence	
			Absorbtion/Émission	
FM1-43	611,55	++	502	625
FM2-10	555,44	+	502	625
FM4-64	607,51	+++	560	767

Tableau 1. Tableau comparatif des caractéristiques physico-chimiques des différents marqueurs de la famille du FM 1-43.

Le FM 2-10 a un spectre de fluorescence identique au FM 1-43 mais possède beaucoup moins d'affinité membranaire. Ces deux marqueurs peuvent être utilisés en fluorescence de type fluoresceine. Le FM 4-64 est le marqueur qui a plus d'affinité pour les membranes et doit être utilisé en fluorescence de type rhodamine.

2.3. La fibre musculaire

La terminaison nerveuse est le composant de la synapse transmettant de l'information. Comme dans tout processus de communication, il doit exister à la synapse des éléments capables de capter et de comprendre l'information qui y est transigée. Les neurones forment des spécialisations post-synaptiques leur permettant de capter les informations neuronales et ces spécialisations se retrouvent surtout au niveau du corps cellulaire et des dendrites.

La fibre musculaire, bien que n'étant pas un élément neuronal, est une cellule excitable aux caractéristiques électrophysiologiques assez proches des neurones. En effet, la fibre musculaire a des capacités d'intégration similaire à l'axe somato-dendritique des neurones : les potentiels synaptiques subliminaires y subissent des sommations spatiales et temporelles. La fibre musculaire a aussi tous les composants cellulaires permettant la génération et la propagation des potentiels d'action. Ses canaux sodiques dépendants du voltage sont toutefois légèrement différents et peuvent être bloqués de façon spécifique par les μ -conotoxines PIIIA, GIIIA et GIIIB (Cruz et al., 1985; Cruz et al., 1989; Shon et al., 1998).

La fibre musculaire forme, tout comme les cellules neuronales, une spécialisation post-synaptique : la plaque motrice. La formation de la plaque motrice résulte d'un processus de maturation déclenché par le contact des terminaisons nerveuses avec les myotubules. L'agrine, une molécule sécrétée par les terminaisons nerveuses, joue un rôle déterminant dans ce processus en causant l'agglomération des récepteurs nicotiques et des noyaux cellulaires musculaires (Ruegg and Bixby, 1998). La plaque motrice continue ensuite sa différenciation en formant un élargissement cytoplasmique caractérisé par de nombreux replis membranaires. Les récepteurs nicotiques sont alors concentrés aux crêtes de ces replis, en face des zones actives (comme nous l'avons vu à la Figure 3). Afin de propager efficacement les courants générés par les récepteurs nicotiques, des canaux sodiques dépendants du voltage sont distribués à l'intérieur des replis de la plaque motrice. Finalement, la fibre musculaire sécrète des composants de la matrice extracellulaire comme l'acétylcholinestérase, l'enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine (Michel et al., 1994).

2.3.I. RÉCEPTEURS POST-SYNAPTIQUES

Les fibres musculaires possèdent plusieurs récepteurs pharmacologiques qui leur permettent de détecter l'activité nerveuse. Leur récepteur principal est, bien sûr, le récepteur cholinergique nicotinique. Par contre, on peut aussi retrouver d'autres récepteurs qui ne régulent pas moins la physiologie de la JNM. Ces récepteurs seront brièvement décrits dans les sous-sections suivantes.

2.3.I.I. Récepteurs cholinergiques nicotiniques

Ces récepteurs sont des canaux ioniques perméables aux cations qui sont activés par la liaison de 2 molécules d'acétylcholine (ACh). Durant le développement, les récepteurs nicotiniques sont formés de cinq sous-unités protéiniques (2 sous-unités α , β , γ et δ). Une fois la synapse consolidée, la sous-unité γ est progressivement remplacée par une sous-unités ϵ (Witzemann et al., 1989). La forme mature de ce récepteur présente une plus grande conductance et un temps d'ouverture un peu plus court (Brehm and Henderson, 1988; Leonard et al., 1988).

Les récepteurs nicotiniques sont bloqués de façon réversible et compétitive par la d-tubocurarine (Almon and Appel, 1976) et de façon irréversible et non-compétitive par l' α -bungarotoxine (Dryden et al., 1974). Ces bloqueurs cholinergiques préviennent les contractions musculaires qui sont nuisibles aux enregistrements électrophysiologiques et photoniques et ont été utilisés dans la plupart des expériences figurant dans cette thèse.

2.3.1.2. Récepteurs purinergiques et autres récepteurs

La fibre musculaire possède en outre des récepteurs purinergiques (pour une description plus détaillée de ces récepteurs voir la section 3.2 Récepteurs purinergiques). Des récepteurs purinergiques à l'adénosine A_1 , A_{2A} et A_{2B} ont été identifiés dans les muscles squelettiques du rat (Lynge et al., 2003). L'activation du récepteur A_{2B} entraîne une élévation cytoplasmique d'AMPC et la phosphorylation de CREBs (Cyclic AMP Responsive Elements Binding proteins, Lynge et al., 2003). Ces récepteurs seraient donc impliqués dans la régulation de

l'expression des gènes des fibres musculaires. La fibre musculaire affiche aussi les récepteurs purinergiques à l'ATP P_{2x} (Ryten et al., 2001) et P_{2y} (Tsim et al., 2003). Ces récepteurs sont impliqués dans les phénomènes de maturation de la JNM et contrôlent aussi l'expression des récepteurs nicotiniques.

En terminant, des récepteurs glutamatergiques de type NMDA ont été identifiés sur des fibres musculaires à la JNM du rat (Malomouzh et al., 2003) de même que des récepteurs glutamatergiques métabotropiques de la famille mGLUR1 sur les fibres musculaires de la JNM de grenouille, sur le muscle utilisé dans cette thèse (Pinard et al., 2003). Un système de transmission glutamatergique pourrait être impliqué dans diverses formes de plasticité synaptique à la JNM et il a été suggéré que le NO pourrait agir en tant que messager second de ce système (Pinard et al., 2002). Cette possibilité sera approfondie dans la discussion finale de cette thèse.

2.3.2. ÉLECTROPHYSIOLOGIE DE LA FIBRE MUSCULAIRE

Comme nous l'avons vu à la section 2.3.1.1, les récepteurs cholinergiques nicotiques sont les principaux récepteurs des fibres musculaires. L'ouverture de ces récepteurs-canaux permet le passage de cations de part et d'autre de la membrane plasmique. Le courant net généré par l'ouverture de ces canaux est un courant dépolarisant détectable à l'aide de techniques d'électrophysiologie. Les dépolarisations musculaires résultant d'une stimulation nerveuse sont nommées potentiels de plaque motrice (PPMs). On peut aussi observer, à la JNM au repos, de faibles dépolarisations spontanées des fibres musculaires : ce sont les PPM miniatures (PPMm, 500 μ V, Katz and Miledi, 1967). En réduisant de façon considérable la probabilité de relâche de neurotransmetteurs, il a été observé que l'amplitude des PPMs diminue progressivement pour atteindre la taille des PPMm (del Castillo and Katz, 1954). En observant la distribution de fréquence de l'amplitude des PPMs, Katz et collaborateurs ont aussi noté que des pics de distribution apparaissaient à des valeurs multiples de l'amplitude des PPMm. Ces observations ont fait naître la théorie de transmission synaptique quantique selon laquelle les PPMs sont composés de

l'addition de PPMm et que ceux-ci sont le résultat de l'exocytose d'une vésicule synaptique (del Castillo and Katz, 1954).

2.4. La cellule gliale

Les cellules gliales ont longtemps été considérées comme des cellules de soutien permettant la conduction saltatoire, nourrissant les neurones et “ nettoyant ” la fente synaptique. La cellule gliale présente à la jonction neuromusculaire est la cellule de Schwann perisynaptique (CSP). Contrairement aux cellules de Schwann qui entourent les axones du système nerveux périphérique, les CSPs ne forment pas de gaine de myéline. Elles recouvrent la terminaison nerveuse et projettent des doigts cytoplasmiques qui apparaissent entre les zones actives (Heuser and Reese, 1973).

2.4.1. RÔLE TROPHIQUE ET DÉVELOPPEMENTAL DES CSPs À LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

Lors de la formation embryonnaire de la jonction neuromusculaire, les cellules de Schwann migrent vers les synapses après que celles-ci aient été formées. Elles n'ont pas un rôle déterminant à jouer dans les premiers établissements des jonctions neuromusculaires. Par contre, elles jouent un rôle important dans le maintien et la ré-innervation de la jonction neuromusculaire mature. En effet, lors de dénervations, les CSPs lancent des projections cytoplasmiques de façon plus ou moins désorganisée en périphérie des plaques motrices (Reynolds and Woolf, 1992). Lors de dénervation partielle, de véritables ponts sont formés par les CSPs entre les jonctions innervées et dénervées (Love and Thompson, 1999). Des bourgeonnements neuronaux naissent des jonctions innervées et sont guidés vers les plaques dénervées par ces ponts gliaux (Love and Thompson, 1999). De plus, suite à une dénervation, les CSPs se mettent à exprimer de façon rapide diverses protéines favorisant la ré-innervation comme la protéine GAP-43 (Woolf et al., 1992). L'expression de gènes par les CSPs est régulée par la relâche de neurotransmetteurs de façon active à la JNM d'amphibien (Georgiou et al., 1994).

2.4.2. LES CSPs IMPLIQUÉES DANS UN PARTENARIAT SYNAPTIQUE À LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

Le rôle des CSPs à la jonction neuromusculaire ne se limite pas qu'à favoriser la ré-innervation. Plusieurs caractéristiques des CSPs laissent croire qu'elles pourraient être impliquées dans la modulation de la transmission synaptique et dans des phénomènes de plasticité à court terme. Tout d'abord, elles possèdent une grande variété de récepteurs aux neurotransmetteurs : récepteurs muscariniques (Robitaille et al., 1997), purinergiques (Robitaille, 1995) et peptidergiques (Bourque and Robitaille, 1998). Elles ont donc la capacité de détecter la relâche des neurotransmetteurs et des peptides de la jonction neuromusculaire. De plus, les CSPs répondent à la relâche de neurotransmetteur (Jahromi et al., 1992), de même qu'à l'activation de ses divers récepteurs, par une élévation de leur concentration calcique intracellulaire.

Les CSPs pourraient-elles, en retour, moduler la transmission synaptique ? Dans une série d'expériences méticuleusement préparées, il a été montré de façon convaincante que l'activation des protéines G dans les CSPs cause une baisse dans la relâche de neurotransmetteurs et que

l'inhibition de ces protéines diminue l'amplitude de la dépression synaptique à la JNM (Robitaille, 1998). Les molécules effectrices par lesquelles les CSPs pourraient moduler la transmission et la dépression synaptiques ne sont pas encore connues. L'hypothèse selon laquelle le NO serait une de ces molécules sera brièvement discutée dans le dernier chapitre de cette thèse.

2.5. Phénomènes de plasticité synaptique à court terme à la JNM

La JNM est sujette à plusieurs formes de plasticité synaptiques à court terme qui sont contrôlées par de multiples facteurs dont l'intervalle de stimulation, la fréquence et la durée de stimulation (Zucker and Regehr, 2002). Durant les épisodes de plasticité synaptique, des phénomènes de potentialisation et de dépression synaptiques coexistent (Dittman et al., 2000; Zucker and Regehr, 2002). Les PPMs sont alors des réponses composites, façonnées par l'addition des différents phénomènes plastiques. La contribution individuelle de chacun de ces phénomènes peut être mis en lumière en manipulant les conditions expérimentales. Par exemple, on peut observer des phénomènes de potentialisation à la JNM (comme la potentialisation et l'augmentation)

lorsque l'on réduit la probabilité de relâche de neurotransmetteur (en réduisant la concentration calcique extracellulaire).

Par contre, les phénomènes de dépression synaptique prédominent à la JNM puisque c'est une synapse très forte, avec un taux de relâche de neurotransmetteurs et un facteur de sécurité élevés (Grinnell and Herrera, 1980). En effet, lorsque le niveau de relâche de neurotransmetteur est élevé, la dépression synaptique prédomine lors d'activité synaptique intense (Hort-Legrand and Metral, 1982). Étant donné que l'activité musculaire est souvent recrutée par des volées de potentiels d'action à haute fréquence, la dépression synaptique est donc certainement la forme de plasticité la plus récurrente dans des conditions physiologiques.

Une brève description de la facilitation homosynaptique et une description des phénomènes de dépression se retrouvent dans les sous-sections suivantes.

2.5.1. FACILITATION HOMOSYNAPTIQUE

La facilitation homosynaptique est une forme de plasticité à court terme qui survient lorsque des stimuli se succèdent à intervalle rapproché (- de 600 ms). On observe alors que, pour une même stimulation, l'amplitude des PPMs est augmentée (Figure 8).

Le niveau de facilitation est maximal lorsque les stimuli se succèdent de façon quasi-immédiate et diminue graduellement lorsque l'intervalle de stimulation est augmenté (Figure 8). L'amplitude de ce phénomène suit une courbe exponentielle d'une constante de temps d'environ 100 ms (Zucker and Regehr, 2002) mais on retrouve aussi des synapses montrant une facilitation suivant une courbe à deux exponentielles. Ce phénomène d'origine présynaptique (Fisher et al., 1997) résulte d'une plus grande relâche de neurotransmetteur et serait causé par une accumulation de calcium dans les terminaisons nerveuses (hypothèse du calcium résiduel, Zucker, 1993; Chen and Regehr, 1999).

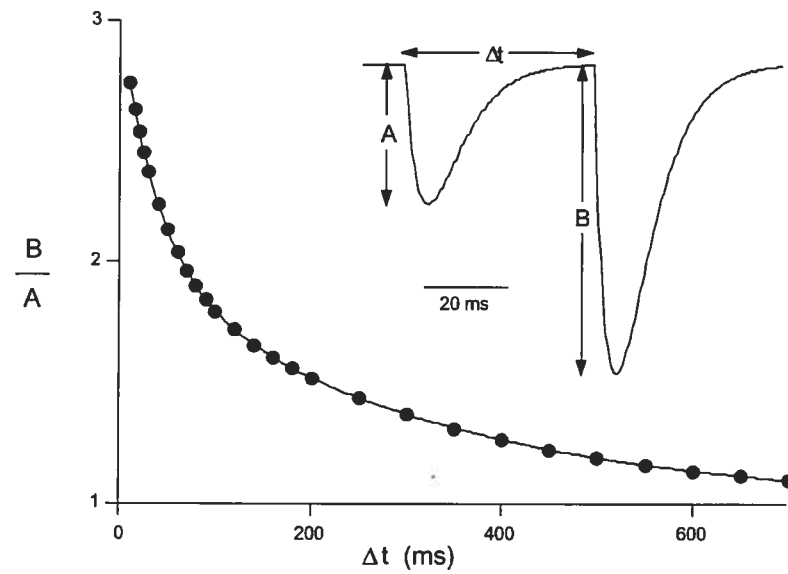


Figure 8. Facilitation homosynaptique

Niveau de facilitation homosynaptique (amplitude du courant B/amplitude du courant A) en fonction de l'intervalle de stimulation utilisé (Δt).

Insertion : Facilitation homosynaptique de courants synaptiques pour un intervalle de stimulation de 20 ms. Notez la différence en amplitude des courants A et B malgré le fait que l'intensité de stimulation est la même. Tiré de Zucker and Regehr (2002) avec la permission de *Annual Review of Physiology*, Volume 64 © 2002 by *Annual Reviews*.

2.5.2. AUTRES PHÉNOMÈNES DE POTENTIALISATION

Il existe d'autres phénomènes de potentialisation à la JNM comme la potentialisation à court terme, l'augmentation et la potentialisation post-tétanique. Ces phénomènes sont tous attribués à une augmentation de la relâche de neurotransmetteurs (d'origine présynaptiques, Fisher et al., 1997). La potentialisation à court terme et l'augmentation surviennent lorsque la stimulation nerveuse est prolongée (plusieurs secondes, minutes) à fréquence élevée (>5 Hz). Ces phénomènes sont caractérisés par une augmentation graduelle de l'amplitude des PPMs. Ces phénomènes sont abordés ici brièvement puisque la dépression est le résultat prépondérant à la JNM lors de stimulation nerveuse intense. Ces phénomènes peuvent toutefois être révélés et étudiés lorsque la relâche de neurotransmetteur est réduite de façon expérimentale (en réduisant la concentration calcique extracellulaire, par exemple). La potentialisation post-tétanique survient, comme son nom l'indique, suite à une stimulation nerveuse tétanique. Une fois le tetanus imposé terminé, on remarque une augmentation de l'amplitude des PPMs, un phénomène qui peut durer plusieurs minutes.

2.5.3. DÉPRESSION DÉPENDANTE DE L'ADÉNOSINE

La dépression dépendante de l'adénosine est une forme de plasticité synaptique quasi-universelle dans le système nerveux, en particulier au niveau des synapses adrénrgiques et cholinergiques (Ribeiro, 1995; Brundage and Dunwiddie, 1997; Dunwiddie and Masino, 2001). Dans cette forme de dépression synaptique, le métabolisme de l'ATP joue un rôle majeur. En effet, dans les terminaisons nerveuses des neurones cholinergiques ou adrénrgiques, l'ATP est un co-transmetteur présent dans les vésicules synaptiques, aux côtés des neurotransmetteurs classiques. Lors de l'exocytose, l'ATP relâchée dans la fente synaptique est rapidement dégradée par des ectonucléotidases en adénosine diphosphate (ADP) et en adénosine (White, 1984). La dégradation de l'ATP est donc la source principale d'adénosine dans la fente synaptique. Cette dépendance à la dégradation d'un co-transmetteur inscrit la dépression dépendante de l'adénosine dans une boucle de rétroaction très intéressante puisqu'elle est alors étroitement liée à la quantité de neurotransmetteurs libérés.

À la JNM, la dépression dépendante de l'adénosine se développe lentement (plusieurs minutes) lorsque la préparation est stimulée à 0,5

ou 1 Hz (Redman and Silinsky, 1994). Il y a été montré que cette forme de plasticité synaptique était d'origine présynaptique, associée à une baisse dans la quantité de neurotransmetteurs libérés, via un mécanisme qui affecterait la probabilité de relâche de neurotransmetteur (Ribeiro and Dominguez, 1978; Silinsky, 1984). En outre, il a été montré que cette forme de dépression était dépendante de l'activation d'un récepteur A_1 (Redman and Silinsky, 1994). Toutefois, aucune étude n'a fait état de la distribution cellulaire de ce récepteur à la JNM. Il est intéressant de noter que la seule démonstration de l'activation de récepteurs A_1 fonctionnels à la JNM indique que ceux-ci se situeraient au niveau des CSPs (Robitaille, 1995). Étant donné que les CSPs peuvent moduler la transmission et la plasticité synaptiques (Robitaille, 1998), il serait opportun de vérifier l'hypothèse selon laquelle les CSPs seraient impliqués dans la dépression dépendante de l'adénosine à la JNM.

Dans l'article qui figure dans le deuxième chapitre, nous montrerons que la dépression induite par l'adénosine ne résulte pas d'une réduction de l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses (Robitaille et al., 1999). Nous verrons ensuite, dans l'article du troisième chapitre, que les effets du NO et de l'adénosine sur la transmission synaptique ont une grande similitude : les effets dépresseurs du NO étant aussi indépendants des niveaux calciques des terminaisons nerveuses. La

possibilité d'une participation commune de ces deux molécules dans la dépression synaptique sera abordée lors de la discussion générale à la fin de cette thèse.

2.5.4. DÉPRESSION SYNAPTIQUE DÉPENDANTE DE LA FRÉQUENCE

La dépression synaptique dépendante de la fréquence a été décrite il y a plus de soixante ans (Eccles et al., 1941). Cette forme de dépression est réversible et apparaît lorsque l'on impose un rythme de stimulation élevé à la JNM (>10 Hz). On note alors une diminution rapide de l'amplitude des PPMs (Figure 9). Cette forme de plasticité synaptique prédomine au niveau de plusieurs synapses et ce, particulièrement à la jonction neuromusculaire (Betz, 1970; Ruzzier and Scuka, 1979).

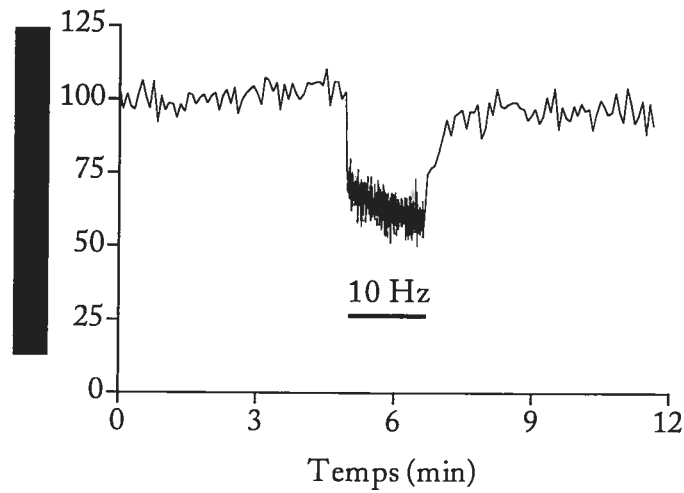


Figure 9. Dépression synaptique dépendante de la fréquence

Décours temporel de l'amplitude des PPMs avant, durant et après l'induction de la dépression synaptique dépendante de la fréquence (10 Hz, 80s). Notez la diminution rapide de l'amplitude des PPMs dès le début de la stimulation à 10 Hz. Ce phénomène de plasticité est réversible et l'amplitude des PPMs retourne graduellement à des niveaux contrôles une fois la stimulation terminée.

© Sébastien Thomas et Richard Robitaille, figure non-publiée.

Malgré sa grande prévalence, les mécanismes moléculaires précis responsables de la dépression ne sont pas connus. Pour tenter de percer le mystère de ce phénomène, plusieurs études ont effectué des modélisations moléculaires et statistiques (Betz, 1970; Sarrazin, 1983; Weis et al., 1999). Ces études ont à la fois suggéré que la dépression était le résultat d'une baisse dans la probabilité de relâche (Wu and Borst, 1999), d'une diminution de l'entrée de calcium (King et al., 2001) ou encore d'une diminution du contenu quantique (Glavinovic, 1987, 1995). Par contre, l'hypothèse d'une baisse dans l'entrée de Ca^{2+} doit être écartée en ce qui concerne la JNM d'amphibien (Robitaille and Charlton, 1992).

Un modèle intéressant pour expliquer la dépression synaptique dépendante de la fréquence est le modèle de déplétion (depletion model), un modèle qui suggère que la dépression synaptique est le résultat d'une baisse dans la disponibilité de neurotransmetteurs (Betz, 1970). Étant donné que les neurotransmetteurs sont concentrés dans les vésicules synaptiques, la disponibilité de celles-ci pourrait donc constituer un facteur déterminant pour la dépression synaptique (Moser and Beutner, 2000). Cette idée est soutenue par le fait que la récupération suite à la dépression est étroitement liée à l'activité endocytotique (Wu and Betz, 1998).

3. L'ADÉNOSINE

L'adénosine est un ribonucléoside dont la base est l'adénine. On la retrouve donc au sein des chaînes d'ADN et d'ARN. En plus d'être un composant de la structure de l'ADN, l'adénosine est aussi une molécule de signalisation impliquée dans de nombreux phénomènes physiologiques comme le contrôle du débit sanguin (Phillis, 1989) et le rythme cardiaque (Ledent et al., 1997). Dans le système nerveux central, l'adénosine cause généralement une inhibition de la relâche de neurotransmetteurs (Ribeiro, 1995; Brundage and Dunwiddie, 1997; Dunwiddie and Masino, 2001). Elle est, en outre, impliquée dans les phénomènes neuronaux du contrôle du cycle éveil/sommeil (Porkka-Heiskanen, 1999; Porkka-Heiskanen et al., 2002) ou la perception de la douleur (Ledent et al., 1997).

Les dérivés phosphatés de l'adénosine ont de nombreuses fonctions cellulaires régulatrices : l'AMPc est un messager second cellulaire important impliqué dans de nombreuses voies de signalisation, l'ADP fait partie de résidus ajoutés aux protéines (e.g. ADP-ribosylation) et l'ATP est la monnaie d'échange énergétique universelle, qui peut aussi agir en tant que neurotransmetteur.

Les effets de l'adénosine à la jonction neuromusculaire ayant déjà été présentés (2.5.3 Dépression dépendante de l'adénosine), cette section se consacrera à la description de la synthèse de l'adénosine et ses dérivés phosphatés et des récepteurs purinergiques activés par ces substances.

3.1. Synthèse de l'adénosine et de ses dérivés

Dans les différents métabolismes cellulaires, l'adénosine, l'AMP et l'ATP peuvent provenir de trois sources respectives. Pour ce qui est de l'adénosine, elle est synthétisée *de novo* à partir du catabolisme de la méthionine (Horton et al., 1994). Les deux principaux nucléotides de purines et les deux messagers seconds les plus importants (l'AMP et le GMP) se forment, quant à eux, à partir d'un nucléotide commun : l'inositol monophosphate (IMP; Horton et al., 1994). La principale source d'ATP est bien entendu les différents cycles énergétiques comme le cycle du citrate (cycle de Krebs), la glycolyse, la glycogénolyse, l'oxydation des acides gras, etc....(Horton et al., 1994).

En outre, les dérivés purinergiques font l'objet d'un important recyclage et de nombreuses réactions chimiques existent afin de convertir

les différents dérivés d'adénosine (adénosine, AMP, ADP et ATP) faisant intervenir des phosphatases ou phosphorylases (Horton et al., 1994; Latini and Pedata, 2001). Comme il a été mentionné dans la section 2.5.3, les ecto-nucléotidases sont responsables de la concentration des divers dérivés purinergiques dans la fente synaptique (Latini and Pedata, 2001; Matsuoka and Ohkubo, 2004).

Dans la section suivante, nous verrons les différents récepteurs purinergiques de même que les différents mécanismes cellulaires qui suivent leur activation.

3.2. Récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques peuvent être divisés en deux classes : les récepteurs P_1 (ou, comme nous le verrons plus loin de type A), activés par l'adénosine et les récepteurs P_2 , activés par l'ATP. Ces récepteurs de même que leur mécanisme de couplage sont décrits dans les sous-sections suivantes.

3.2.I. RÉCEPTEURS P_1

Les récepteurs de la classe P_1 appartiennent tous à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G et sont activés par l'adénosine. La nomenclature des récepteurs P_1 a été modifiée suite à la découverte de la grande diversité des récepteurs activés par l'adénosine (Fredholm et al., 2001). À ce jour, un total de quatre récepteurs activés par l'adénosine ont été identifiés (Fredholm et al., 2001). Ce sont les récepteurs A_1 , A_{2A} , A_{2B} et A_3 .

3.2.I.I. *Le récepteur A_1*

Le récepteur A_1 se retrouve dans le système nerveux central (Swanson et al., 1995; Saura et al., 1996), concentré dans l'hippocampe, le cortex cérébral et le cervelet. Comme nous l'avons vu plus tôt (section 2.5.3), c'est ce récepteur qui est présent à la JNM et qui est impliqué dans la dépression synaptique dépendante de l'adénosine (Silinsky, 1984; Redman and Silinsky, 1994). Ce récepteur est couplé à une protéine $G_{i/o}$ qui cause une diminution des niveaux d'AMPc cellulaire. Il a été relié à l'activation de canaux potassiques (Trussell and Jackson, 1985) de même qu'à l'inhibition de canaux calciques (MacDonald et al., 1986).

3.2.1.2. *Les récepteurs A_2*

Les récepteurs A_2 sont couplés à une protéine G_s qui entraîne une élévation des niveaux d'AMPc cellulaire. Les récepteurs A_{2A} et A_{2B} diffèrent, entre autres, par leur distribution tissulaire. Le récepteur A_{2A} se retrouve au niveau de la rate, le thymus et au niveau des neurones GABAergiques des noyaux putamen ou caudés. Le récepteur A_{2B} se retrouve surtout au niveau de la vessie et du colon. Par contre, nous avons vu qu'un récepteur A_{2B} est présent au niveau des fibres musculaires de la JNM, impliqué dans un processus de maturation (voir 2.3.1.2 Récepteurs purinergiques et autres récepteurs, Lynge et al., 2003).

3.2.1.3. *Le récepteur A_3*

Tout comme le récepteur A_1 , le récepteur A_3 est couplé à une protéine $G_{i/o}$. Ce récepteur se retrouve surtout au niveau des testicules et chez les mastocytes où son activation entraîne la dégranulation des mastocytes (Ramkumar et al., 1993; Fozard et al., 1996). Il n'est exprimé que très faiblement dans le SNC (Dixon et al., 1996), mais

pourrait être impliqué dans la modulation des récepteurs mGLUR (Macek et al., 1998).

3.2.2. RÉCEPTEURS P_2

Les récepteurs P_2 sont des récepteurs activés par l'ATP. Ils forment une famille de récepteurs extrêmement diversifiés (17 récepteurs identifiés à ce jour). Ils sont divisés en deux groupes : les récepteurs P_{2x} et les récepteurs P_{2y} . Les caractéristiques principales de ces deux groupes de récepteurs sont présentées de façon succincte dans les sous-sections suivantes.

Les récepteurs P_2 sont d'importants rouages de la synaptophysologie de la JNM. En effet, la composante purinergique des réponses calciques observées dans les CSP lors de stimulations nerveuses (Jahromi et al., 1992) sont le fruit de l'activation de ces récepteurs (Robitaille, 1995).

3.2.2.1. Récepteurs P_{2x}

Les récepteurs P_{2x} sont des récepteurs-canaux activés par l'ATP. Ces récepteurs sont formés de trimères ou d'hexamères d'une même sous-unité. Il existe au moins sept sous-unités de récepteurs P_{2x} qui ont donné leur nom aux différents récepteurs (récepteurs P_{2x1} à P_{2x7}). De plus, des hétéro-multimères ont été observés, formés de sous-unités P_{2x2}/P_{2x3} (Radford et al., 1997), P_{2x4}/P_{2x6} (Le et al., 1998) et P_{2x1}/P_{2x5} (Torres et al., 1998). Cette grande diversité de canaux et d'assemblage de sous-unités permet une variabilité très fine des propriétés des canaux P_{2x} (e.g. : désensibilisation, conductance, perméabilité/sélectivité ionique). Ces récepteurs-canaux sont perméables aux cations et plus particulièrement au Ca^{2+} et sont responsables des réponses synaptiques purinergiques rapides. Il est à noter qu'une composante de la réponse calcique des CSP suite à une stimulation nerveuse à la JNM est causée par l'activation d'un récepteur de type P_{2x} (Robitaille, 1995).

3.2.2.2. Récepteurs P_{2y}

Les récepteurs P_{2y} sont, à l'instar des récepteurs P1, des récepteurs couplés à des protéines G. À ce jour, dix différents récepteurs ont été clonés, ce qui laisse encore une grande fenêtre de possibilité pour l'ATP afin de moduler les événements synaptiques. Étant donné leur mécanisme d'action, ces récepteurs sont impliqués dans des changements à long terme. Les récepteurs P_{2y} ont été reliés à une augmentation de divers courants tels les courants calciques (Filippov et al., 2000; Kulick and von Kugelgen, 2002; Borvendeg et al., 2003) et les courants NMDA (Luthardt et al., 2003). Un récepteur de type P_{2y} participe aussi à la réponse calcique des PSC lors de stimulation nerveuse à la JNM (Robitaille, 1995).

4. LE MONOXIDE D'AZOTE

Le NO est présent sous forme de gaz dans les systèmes biologiques ce qui en fait un messager diffusible, capable de traverser les membranes biologiques. Le NO est une molécule plutôt instable qui est rapidement réduite en nitrites et nitrates, ce qui lui confère une durée de vie très limitée (environ 5 secondes, Miyata et al., 1969; Marletta et al., 1988). Cette courte durée de vie limite son rayon d'action à environ 200 μm (Keitoku et al., 1988).

Le NO est un important modulateur de la transmission synaptique dans le système nerveux (Bredt and Snyder, 1992; Brenman and Bredt, 1997). Le NO est tantôt considéré comme un neurotransmetteur (Koh and Jacklet, 1999), tantôt comme un messager neuronal pérисynaptique (Bredt and Snyder, 1992). Dans l'hippocampe, le NO synthétisé par les neurones post-synaptiques établit une communication rétrograde qui est impliquée dans l'établissement de la LTP (Haley et al., 1992; Malen and Chapman, 1997; Wilson et al., 1997). Au niveau du cervelet, le NO a toute l'allure d'un neurotransmetteur alors qu'il participe de façon antérograde à l'induction de la LTD (Lev-Ram et al., 1995; Lev-Ram et al., 1997; Calabresi et al., 1999).

4.1. Synthèse du NO

La NO-synthase (NOS) est l'enzyme responsable de la synthèse du NO. La structure de cette enzyme possède une grande homologie avec la réductase du cytochrome P-450 (Figure 10 et Bredt et al., 1991). La NOS produit, à partir de l'arginine, du NO et de la citrulline (Figure 11). La citrulline est produite de façon stœchiométrique avec le NO et a souvent été utilisée pour localiser la production de son compagnon de synthèse instable (Gammie et al., 2000; Kumar et al., 2001). La formation de NO est une activité enzymatique de réduction et nécessite l'aide de nombreux co-facteurs donneurs d'électrons comme le FMN, FAD et le NADPH.

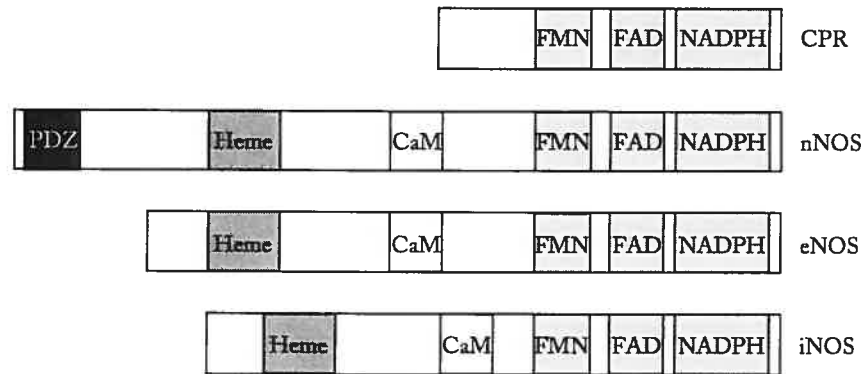


Figure 10. Schémas structuraux des différentes isoformes de NOS et de la réductase du cytochrome P-450 (CPR).

Le côté N-terminal des différentes enzymes est présenté à gauche. Notez la ressemblance de la partie catalytique du CPR avec la partie C-terminale des différentes NOS. L'isoforme neuronale est la plus grande, possédant une portion unique (PDZ) responsable des interactions de cette isoforme avec les protéines structurales neuronales. Adapté de Bredt and Snyder (1992) et de Brenman and Bredt (1997). Sites de liaisons : CaM : calmoduline, FMN : flavine adénine mononucléotide, FAD : flavine adénine dinucléotide, NADPH : Nicotinamide dinucléotide phosphate.

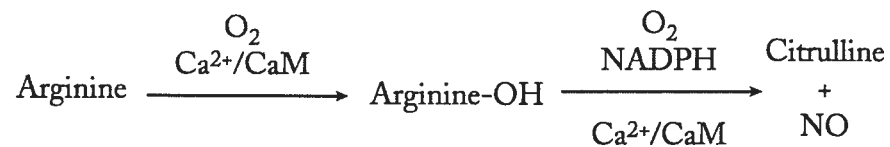


Figure 11. Schéma de la réaction enzymatique de la NOS.

Le substrat enzymatique est l'acide aminé arginine et les produits de la réaction sont le NO et la citrulline.

L'activité enzymatique de la NOS est régulée via de nombreux sites de phosphorylation (PKA, PKC et CaM kinase, Bredt et al., 1992). Cette pluralité de sites pourrait permettre une régulation fine de la production de NO par les différents systèmes de second messagers (AMPc et Ca^{2+} , Bredt et al., 1992). Par exemple, la phosphorylation de la NOS par la PKC entraîne une chute de plus de 70 % de son activité enzymatique (Bredt et al., 1992).

4.1.1. LES DIFFÉRENTES ISOFORMES DE NOS

Il existe 3 isoformes de NO-synthase (Figure 10). Les NOS endothéliales et neuronales sont des isoformes constitutives. On les détermine ainsi puisque leur protéine est exprimée de façon tonique dans le cytoplasme. De plus, l'activité enzymatique de ces deux enzymes requiert la présence de calcium. La troisième isoforme, la NOS immunologique, est une isoforme dont l'expression protéinique est régulée par des facteurs immunologiques. Cette enzyme n'est donc exprimée que de façon ponctuelle, en réponse à des facteurs environnementaux. Les différentes isoformes sont présentées avec plus de détails dans les sous-sections suivantes.

4.1.1.1. *Les isoformes constitutives : la eNOS*

La eNOS est l'isoforme endothéliale. Comme son nom l'indique, cette enzyme se retrouve concentrée dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Le NO produit par les cellules endothéliales est le fameux EDRF (*Endothelial-Derived Relaxing Factor*) qui, en diffusant jusqu'aux cellules musculaires lisses, provoque une relaxation de celles-ci (Griffith et al., 1984; Palmer et al., 1987). L'activité enzymatique de la eNOS est donc capitale dans la physiologie vasculaire. La distribution de cette isoforme ne se limite pas qu'aux cellules endothéliales, indiquant qu'elle pourrait être impliquée dans davantage de phénomènes physiologiques. En effet, la eNOS se retrouve chez les neurones hippocampiques (Dinerman et al., 1994) de même que chez les astrocytes (Wiencken and Casagrande, 1999) et son activité enzymatique a été impliquée dans des phénomènes purement neuronaux comme la LTP (Wilson et al., 1997).

4.1.1.2. *Les isoformes constitutives : la nNOS*

La nNOS est l'isoforme neuronale. Elle est, bien sûr, abondante dans le système nerveux mais se retrouve aussi dans d'autres tissus dont

les tissus musculaires squelettiques (Yang et al., 1997). La nNOS est l'isoforme la plus imposante et est la seule à posséder une région propre à des interactions protéines-protéines de type PDZ. La nNOS se lie aux protéines PSD-93 (Brenman et al., 1996a) et PSD-95 (Brenman et al., 1996b), des protéines post-synaptiques d'ancrage qui ciblent l'expression de protéines à la membrane post-synaptique. Par exemple, la PSD-95 augmente l'efficacité de la voie de signalisation du NO en ciblant la nNOS aux côtés des récepteurs NMDA, récepteurs-canaux perméables aux ions calciques (Brenman and Bredt, 1997).

Il a été récemment découvert que la nNOS faisait l'objet d'épissage alternatif, la nNOS α étant la forme initialement clonée et la plus répandue. À ce jour, quatre formes d'épissage alternatif de la NOS ont été observées (nNOS δ , ϵ et μ , Eliasson et al., 1997; Wang et al., 1999; Putzke et al., 2000). L'épissage alternatif de la nNOS affecte à la fois sa localisation subcellulaire, sa localisation anatomique et son activité enzymatique. Au niveau de la localisation subcellulaire, les formes d'épissage alternatif β et γ ne possèdent pas de région PDZ et se retrouvent dans le cytoplasme plutôt que liées à la membrane plasmique (Eliasson et al., 1997). De plus, la nNOS γ jouit d'une distribution anatomique assez restreinte, confinée au bulbe olfactif et au cervelet

(Putzke et al., 2000). Au niveau de leur activité enzymatique, la nNOS β possède une activité enzymatique comparable à la nNOS α alors que la nNOS γ ne possède qu'une très faible activité enzymatique, à peine détectable par immunohistochimie (Eliasson et al., 1997). L'isoforme nNOS μ est spécifique à la jonction neuromusculaire et sera présentée plus loin (4.3.1 Localisation des NOS à la JNM).

4.1.1.3. *L'isoforme inducible : iNOS*

La iNOS est une enzyme dont le niveau d'expression est régulé au niveau transcriptionnel par les interleukines et autres agents immunogènes (Busse and Mulsch, 1990; Hauschildt et al., 1990; Eizirik et al., 1992; Okuda et al., 1997). La grande majorité des cellules ont la possibilité d'exprimer la iNOS. La iNOS est la seule isoforme capable de produire du NO de façon Ca²⁺-indépendante (Hauschildt et al., 1990). Dans la réponse immunitaire, le NO produit, en quantité importante par la iNOS, a des effets hautement toxiques en s'associant aux radicaux libres des cellules cibles, formant des peroxinitrites (ONOO⁻) qui causeront des dommages cellulaires. Bien qu'initialement identifiée comme unique, plusieurs variantes de cette enzyme existent. Par exemple, la séquence de la iNOS du neutrophile

diffère de celle présente dans les macrophages (Yui et al., 1991a; Yui et al., 1991b). Tout comme la nNOS, la iNOS présente donc elle aussi des variantes qui, tout en ne différant pas grandement en efficacité catalytique, permettent la régulation de cette enzyme de façon adaptée selon les cellules dans lesquelles elle est exprimée.

4.2. Mécanismes d'action du NO

4.2.I. ACTIVATION DE LA GUANYLATE CYCLASE

Le mécanisme d'action du NO le plus répandu et le plus connu est l'activation d'une guanylate cyclase de type soluble (Schmidt et al., 1993). Le NO active cette enzyme en se fixant à son groupe hème. Dans cette voie de signalisation, les effets du NO sont donc ensuite médiés par le GMPc, un important second messenger. Plusieurs branches de signalisations peuvent être empruntées par le GMPc. Par exemple, le GMPc pourra activer des protéines kinases dépendantes du GMPc (Smolenski et al., 1998) et entraîner la phosphorylation de certaines protéines. La phosphorylation est un moyen important pour activer ou inhiber l'activité enzymatique d'une protéine ou pour perturber ces

interactions protéines-protéines. Le GMPc peut aussi directement activer des conductances ioniques (Kaupp, 1991). En effet, il existe de nombreux canaux qui sont sous le contrôle des nucléotides cycliques. L'activation de telles conductances pourrait influencer l'excitabilité neuronale. Finalement, le GMPc pourrait moduler d'autres voies de signalisation comme celle dépendante de l'AMPc en activant des phosphodiéstérases (Doerner and Alger, 1988; MacFarland et al., 1991). Ces phosphodiéstérases peuvent faire chuter de façon dramatique les niveaux d'AMPc et peuvent ainsi réguler une voie de signalisation complète.

4.2.2. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE PROTÉINES

Les autres mécanismes d'action du NO résultent de modifications post-transcriptionnelles de protéines. Ces modifications post-transcriptionnelles résultent de trois mécanismes principaux : la nitrosylation, l'ADP-ribosylation et la conjugaison en acides gras.

Le NO est une molécule très réactive qui peut s'attacher directement à certaines protéines sur leurs résidus thiol, tyrosine ou

cystéine. C'est le mécanisme de nitrosylation (Stamler, 1994). La nitrosylation d'une protéine pourrait empêcher l'établissement d'interactions protéines-protéines.

Le NO peut aussi activer des mono(ADP)-ribosyltransférases, des enzymes qui ajoutent des résidus ADP sur certains acides aminés (surtout la cystéine) (Duman et al., 1991). Dans le système nerveux, les principales cibles d'ADP-ribosylation sont des protéines G (Duman et al., 1991). Dans l'hippocampe, il a été montré que l'implication du NO dans la LTP pourrait être expliquée par de tels changements post-transcriptionnels (Duman et al., 1993).

Une troisième modification post-transcriptionnelle régulée par le NO est la conjugaison de protéines à des acides gras, le plus souvent des palmitates (Hess et al., 1993; Adam et al., 1999). La palmitoylation de certaines protéines est essentielle à leur fonction. C'est notamment le cas des récepteurs β adrénergiques et de certaines protéines G (Adam et al., 1999). Il a été suggéré que le NO puisse diminuer la palmitoylation de protéines en inhibant les enzymes responsables de ces modifications post-transcriptionnelles ou par un mécanisme indirect, découlant d'une nitrosylation (Adam et al., 1999). Par contre, il a été montré récemment chez le rat qu'une diminution des niveaux d'ATP serait à l'origine des

effets du NO sur la palmitoylation de protéines myéliniques (Bizzozero et al., 2001).

4.3. Le NO à la JNM

Après avoir brossé un tableau sommaire des NOS et des mécanismes d'action du NO, la section qui suit se concentrera sur la distribution de la NOS à la jonction neuromusculaire ainsi que sur les effets du NO à cette synapse.

4.3.i. LOCALISATION DES NOS À LA JNM

La distribution de la NOS à la jonction neuromusculaire a fait l'objet de plusieurs études (Kusner and Kaminski, 1996; Chao et al., 1997; Yang et al., 1997; Descarries et al., 1998; Ribera et al., 1998). Outre la présence de eNOS dans les vaisseaux sanguins irriguant nerfs et muscles, l'isoforme neuronale est prédominante à cette synapse. Dans les fibres musculaires de souris, on note une forte concentration de la nNOS au niveau des plaques motrices et aussi au niveau des fuseaux neuromusculaires (Chao et al., 1997). La jonction neuromusculaire

affiche une nNOS qui lui est spécifique : la nNOS- μ (Silvagno et al., 1996; Laine and de Montellano, 1998; Lin et al., 1998). Cette sous-isoforme est allongée de 34 acides aminés tout juste devant la partie catalytique C-terminale. Cependant, l'efficacité enzymatique de la nNOS μ ne diffère pas de l'isoforme nNOS α (Silvagno et al., 1996). Par contre, il a été observé que la nNOS μ utilisait deux fois moins de NADPH pour mener à bien sa production de NO (Laine and de Montellano, 1998). De plus, la nNOS μ possède une demi-vie cytoplasmique quatre fois plus longue que la nNOS α (50 min vs 12 min, Laine and de Montellano, 1998).

La nNOS μ est concentrée à la plaque motrice par sa liaison au complexe dystrophique via une protéine adaptatrice nommée α -syntrophine (Brenman et al., 1995; Miyagoe-Suzuki and Takeda, 2001). Le complexe dystrophique est une structure associant une foule de protéines à la dystrophine, une protéine structurale importante pour la physiologie musculaire (Brown, 1997). L'attachement de la NOS à ce complexe semble être un facteur important régulant la demi-vie de cette protéine puisque la NOS est complètement absente des fibres musculaires dans le cas des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker (Brenman et al., 1995; Chao et al., 1996).

On retrouve une NOS de type neuronale à la JNM d'amphibien (Descarries et al., 1998; Ribera et al., 1998). Dans leur étude comparative menée aux JNMs de rat, de l'organe électrique de la torpille ainsi que de grenouille, Ribera et al. signalent que la nNOS est concentrée au niveau des terminaisons nerveuses et des plaques motrices musculaires (Ribera et al., 1998). Des travaux menés dans notre laboratoire indiquent que la nNOS serait plutôt concentrée dans les CSPs et que son expression était régulée par l'activité synaptique (Descarries et al., 1998). De nombreuses variables peuvent expliquer cette différence de résultats. Tout d'abord Ribera et al. ont effectué leur étude sur une espèce de grenouille et sur un muscle différent (*Rana temporaria*, muscles des jambes). De plus, ils ont eu beaucoup de difficulté à obtenir des marquages immunologiques lors de la fixation des tissus (Ribera et al., 1998). Finalement, leur anticorps a été dressé contre une NOS de lapin et son affinité pour les tissus de grenouille n'a pas été testée par un western blot.

4.3.2. EFFETS DU NO À LA JNM

4.3.2.1. Rôle du NO dans la formation des synapses à la JNM immature

À la jonction neuromusculaire immature, le NO joue un rôle crucial dans la formation des synapses. Il est un agent qui favorise la fusion des myocytes afin qu'ils forment les premiers myotubes ou fibres musculaires (Lee et al., 1994). Le NO peut par contre brutalement inhiber l'avancement des cônes de croissance (Hess et al., 1993). Une fois le contact établi entre les axones et les fibres musculaires, le NO participe à l'élimination " Hebbienne " des synapses, en réduisant la relâche de neurotransmetteurs au niveau des synapses qui montrent une asynchronicité entre les éléments pré- et postsynaptiques (Wang et al., 1995).

4.3.2.2. Effets du NO à la JNM mature

À la jonction neuromusculaire mature, le NO joue un rôle métabolique important. Il a été montré que le NO était un facteur

trophique qui augmentait l'incorporation de sucres dans les fibres musculaires et qui favorisait la glycolyse (Young et al., 1997). De plus, le NO produit lors d'exercice musculaire participerait à la régulation de l'apport sanguin musculaire (Bredt, 1998).

À la JNM du rat, le NO cause une relaxation des muscles squelettiques et diminue la force contractile développée par ceux-ci (Kobzik et al., 1994). Cet effet serait causé par des mécanismes à la fois dépendants et indépendants du GMPc (Kobzik et al., 1994). Toutefois, les mécanismes et sites d'action du NO responsables de cet effet ne sont pas connus. Il est peu probable que les effets relaxants du NO sur les muscles squelettiques soient le résultat d'une élévation de GMPc musculaire puisque le GMPc augmente la force de contraction musculaire (Mancinelli et al., 1983).

Plutôt que de moduler la physiologie musculaire, le NO pourrait moduler la transmission synaptique à la JNM. En effet, l'utilisation de substances libérant du NO a montré que le NO avait des effets sur la transmission synaptique (Lindgren and Laird, 1994). L'administration de donneur de NO a réduit d'environ 50 % l'amplitude des PPMs. Une analyse quantique a montré que ces effets étaient présynaptiques (Lindgren and Laird, 1994). Lors d'une expérience faisant appel à

l'hémoglobine, une protéine liant le NO, Lindgren et Laird ont observé une légère augmentation des PPMs, suggérant l'existence d'une régulation de la transmission synaptique par une production endogène de NO.

5. BUT DE L'ÉTUDE

La dépression synaptique est le phénomène de plasticité synaptique le plus important à la jonction neuromusculaire. On observe deux types de dépression synaptique à la jonction neuromusculaire : la dépression induite par l'adénosine et la dépression induite par la fréquence de stimulation.

La dépression induite par l'adénosine a été étudiée à la jonction neuromusculaire et impliquerait un récepteur purinergique de type A_1 . Les terminaisons nerveuses de la jonction neuromusculaire possèdent des canaux calciques pouvant être modulés par ce récepteur. Un des buts de cette étude était donc de vérifier les effets de l'adénosine sur les variations calciques des terminaisons nerveuses.

La dépression induite par la fréquence de stimulation est une autre forme de dépression synaptique à la jonction neuromusculaire. Ce phénomène, observé depuis des décennies, a fait l'objet de nombreuses expérimentations et d'études de modélisation. Cette forme de dépression a été attribuée à des changements dans la probabilité de relâche, dans la quantité de neurotransmetteurs disponibles ou même d'une combinaison

de ces deux facteurs. Malgré l'utilité des modèles à décrire les différentes données observées, ces modèles ne fournissent pas de mécanismes moléculaires ou cellulaires pour expliquer cet important phénomène de plasticité. Dans cette optique, le NO est apparu comme une molécule potentielle qui pourrait participer dans cette forme de dépression. Tout d'abord, le NO est un neuromodulateur très important dans le système nerveux central. Ensuite, l'enzyme de synthèse du NO était présente à la jonction neuromusculaire, aux abords de la synapse.

Pourtant les effets, les mécanismes d'action et finalement les conséquences d'une production endogène de NO à la JNM étaient totalement inconnus. Finalement, l'implication du NO dans les phénomènes de plasticité à court terme qu'affiche la jonction neuromusculaire était aussi inconnue.

Un autre but de cette étude était donc de mettre en évidence une production endogène de NO à la JNM, de caractériser ses effets et de déterminer ses mécanismes d'action. Finalement, cette étude avait pour but de mettre en évidence l'implication du NO dans les phénomènes de plasticité synaptiques à court terme de la JNM, en portant une attention particulière à la dépression synaptique.

CHAPITRE DEUXIÈME

—
EFFECTS OF ADENOSINE ON Ca^{2+} ENTRY
IN THE NERVE TERMINAL

OF THE FROG NEUROMUSCULAR JUNCTION

Richard Robitaille, Sébastien Thomas, and Milton P. Charlton

Article publié dans :

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Vol.77 : 707-714, 1999

© NRC Canada, 1999

6. INTRODUCTION

Dans le système nerveux central, l'adénosine est un important neuromodulateur de la transmission synaptique (Dunwiddie and Masino, 2001). Son action inhibitrice dans la dépression synaptique résulte de l'inhibition des courants calciques générés par des canaux calciques de type N ou L (Filippov et al., 2000; Kulick and von Kugelgen, 2002). À la jonction neuromusculaire, l'adénosine cause aussi une dépression synaptique et des canaux calciques de type N sont présents au niveau des terminaisons nerveuses (Robitaille et al., 1990). L'action inhibitrice de l'adénosine sur la relâche de neurotransmetteurs pourrait donc résulter d'une baisse dans l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses. Pourtant, certaines études suggèrent que la dépression synaptique induite par l'adénosine à la jonction neuromusculaire serait indépendante de changements calciques (Redman and Silinsky, 1994).

Le but de cette étude était donc de déterminer les effets de l'adénosine sur l'entrée et la gestion du Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuse de la jonction neuromusculaire. Pour ce faire, les concentrations calciques des terminaisons nerveuses ont été estimées à l'aide d'indicateurs calciques fluorescents en microscopie confocale.

Dans cette étude nous montrons que la dépression synaptique, que ce soit celle induite par l'adénosine ou par la fréquence de stimulation, se manifeste de façon indépendante au Ca^{2+} à la jonction neuromusculaire.

L'article qui suit a été écrit par mon directeur de recherche, le Dr Richard Robitaille et contient des données qui ont été accumulées, en partie, alors que celui-ci travaillait dans le laboratoire du Dr Milton P Charlton. Ma contribution à cet article s'est limitée à fournir les données de la figure 1D et à avoir mesuré la fluorescence de base des terminaisons nerveuses lors d'une chélation de calcium extracellulaire prolongée. Ces données permettaient de confirmer la sensibilité de l'équipement expérimental qui a été utilisé.

EFFECTS OF ADENOSINE ON CA^{2+} ENTRY
IN THE NERVE TERMINAL
OF THE FROG NEUROMUSCULAR JUNCTION

Richard Robitaille, Sébastien Thomas, and Milton P. Charlton

R. Robitaille and S. Thomas: Département de physiologie,
Centre de recherche en sciences neurologiques, Université de
Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montréal,
QC H3C 3J7, Canada.

M.P. Charlton: Department of Physiology, MRC Group on
Nerve Cells and Synapses, University of Toronto, Toronto,
ON M5S 1A8, Canada.

Acknowledgements:

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRC) to R.R. and M.P.C. and by a FCAR (Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (Québec)) team grant to R.R. and an NCE (Networks of Centres of Excellence) grant to M.P.C. R.R. was an MRC and FRSQ (Fonds de la recherche en santé du Québec) scholar and an Alfred P. Sloan fellow. S.T. was supported by an MRC studentship. The authors thank Ms. Isabel Jutras for help in the preparation of the figures.

ABSTRACT

This study aimed to test whether nerve-evoked and adenosine-induced synaptic depression are due to reduction in Ca^{2+} entry in nerve terminals of the frog neuromuscular junction. Nerve terminals were loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator fluo 3 (fluo 3-AM) or loaded with dextran-coupled Ca^{2+} green-1 transported from the cut end of the nerve. Adenosine (10–50 μM) did not change the resting level of Ca^{2+} in the presynaptic terminal, whereas it induced large Ca^{2+} responses in perisynaptic Schwann cells, indicating that adenosine was active and might have induced changes in the level of Ca^{2+} in the nerve terminal. Ca^{2+} responses in nerve terminals could be induced by nerve stimulation (0.5 or 100 Hz for 100 ms) over several hours. In the presence of adenosine (10 μM), the size and duration of the nerve-evoked Ca^{2+} responses were unchanged. When extracellular Ca^{2+} concentration was lowered to produce the same reduction in transmitter release as the application of adenosine, Ca^{2+} responses induced by nerve stimulations were reduced by 40%. This indicates that changes in Ca^{2+} responsible for the decrease in release should have been detected if the mechanism of adenosine depression involved partial block of Ca^{2+} influx. Ca^{2+} responses evoked by prolonged high frequency trains of stimuli (50 Hz for 10 or 30 s), which caused profound depression of transmitter release, were sustained during the whole duration of the stimulation, and adenosine had no effect on these responses. These data indicate that neither adenosine induced synaptic depression nor stimulation-induced synaptic depression are caused by reductions in Ca^{2+} entry into the presynaptic terminal in the frog neuromuscular junction.

Key words: adenosine, Ca^{2+} , nerve terminal, transmitter release, synaptic depression.

Modulation of transmitter release is an important phenomenon at synapses of the central and peripheral nervous systems (Wu and Saggau 1997). One mechanism by which this is achieved involves the activation of presynaptic receptors for various neurotransmitters and neuromodulators. Among others, the adenosine-induced depression of transmitter release at synapses of central and peripheral nervous systems is well established.

In the central nervous system, adenosine has been shown to reduce the release of transmitters by reducing N-type and L-type Ca^{2+} currents (Mynlieff and Beam 1994; Umemiya and Berger 1994; Wu and Saggau 1994; Mei et al. 1996). The modulation of Ca^{2+} currents by adenosine involves a pertussis toxin (PTX) sensitive GTP-binding protein (G-protein) (Scholz and Miller 1992; Mynlieff and Beam 1994; Mei et al. 1996).

Adenosine also causes depression of transmitter release in the peripheral nervous system. One system in which such an effect is well characterized is the mammalian and amphibian neuromuscular junction (nmj) (Ginsborg and Hirst 1971; Silinsky 1975, 1980; Branisteanu et al. 1989; Barry 1990; Meriney and Grinnell 1991). It was reported that adenosine reduces spontaneous and evoked transmitter release by activating a presynaptic A1 receptor (Sanger Redman and Silinsky 1993; Redman and Silinsky 1994) and that the effects require the activation of a PTX-sensitive G-protein and the production of cAMP (Ginsborg and Hirst 1971; Silinsky 1984; Silinsky et al. 1989; Hirsh et al. 1990; Robitaille et al. 1997). Redman and Silinsky (1994) showed that presynaptic depression observed at a low rate of transmitter release is caused by the activation of A1 adenosine receptor at the nmj.

However, although there are many similarities between the action of adenosine at central synapses and at nmj's, there is a discrepancy as to whether adenosine modulates Ca^{2+} channels at the nmj. Indeed, Silinsky and Solsona (1992) reported that Ca^{2+} currents recorded using loose patch or perineural recordings were unaffected by adenosine. In addition, there is indirect evidence that adenosine does not affect the intracellular levels of Ca^{2+} at the nmj; increasing intracellular Ca^{2+} buffering capacity of the nerve terminal with exogenous buffers does not prevent the effects of adenosine (Hunt et al. 1994). These observations suggest that adenosine does not reduce transmitter release by affecting Ca^{2+} channels and Ca^{2+} entry at the frog nmj. This is surprising since Ca^{2+} channels at the frog nmj are believed to be of the N-type (Kerr and Yoshikami 1984; Robitaille et al. 1990, 1993, 1996; Cohen et al. 1991), a type known to be modulated by adenosine. The identity of the channels at the nmj was inferred by the blockade of transmitter release by the toxin ω -conotoxin GVIA.

In the present study we asked whether Ca^{2+} signaling was altered by adenosine. Ca^{2+} transients were imaged in the frog nerve terminal and transmitter release was recorded. We report here that adenosine does not affect transmitter release by reducing the basal level of Ca^{2+} nor does it reduce the entry of Ca^{2+} induced by nerve stimulations. Hence, unlike synapses in the central nervous system, adenosine effects at the nmj must only occur at a step following Ca^{2+} entry in the nerve terminal.

MATERIAL AND METHODS

Experiments were performed on nmj's of cutaneous pectoris muscles of *Rana pipiens* frogs (5 to 7 cm body length; Wards, Saint Catharines, Ont., and Connecticut Valley Biological Supply, Southampton, Mass.). Animals were double pithed, and nerve-muscle preparations were dissected and mounted in a recording chamber filled with Ringer solution (in mM: NaCl, 120; KCl, 2; NaHCO₃, 1; CaCl₂, 1.8; and HEPES, 5.0 or 15.0, pH adjusted to 7.2 with NaOH). This procedure was authorized by the Animal Care Committee of the Université de Montréal and conformed with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Loading nerve terminals of frog nmj's

The presynaptic nerve terminals were loaded using two techniques. First, nerve-muscle preparations were incubated for 15 to 30 min in a cold physiological solution (between 13 and 16°C) containing 10 μM fluo 3-AM (Molecular Probes, Eugene, Oreg.) and 0.02% (w/v) pluronic acid (Molecular Probes) with a final concentration of 1.1% dimethyl sulfoxide. The loading was done under these temperature conditions to prevent the loading of perisynaptic Schwann cells (PSCs) (Jahromi et al. 1992). This allowed us to specifically study the Ca²⁺ responses from the presynaptic nerve terminal without any interference from the PSCs that cover the nerve terminals. This is important since PSCs possess A1 adenosine receptors (Robitaille 1995), which when activated, produce an elevation of intracellular Ca²⁺, thus interfering with the detection of the Ca²⁺ signals from the underlying presynaptic nerve terminals.

Several controls were performed to confirm that PSCs were not loaded using this protocol. First, no PSC somata were observed using this loading protocol (see Fig. 4 of Robitaille and Charlton 1992). Second, none of the agonists known to induce Ca^{2+} responses in PSCs (muscarine, ATP, adenosine) had any effect on the fluorescence level when applied either locally with a micropipette or in the bath. Finally, application of the Ca^{2+} ionophore Br-A23187 did not reveal any changes in the cell body of PSCs.

For the second loading procedure, frogs were double pithed and put into a dissecting dish, and a small cut in the skin covering the innervation of cutaneus pectoris muscle was made. The pectoralis proprius nerve was cut near the ulnar nerve and cleared away up to the blood vessels irrigating the cutaneus pectoris muscle. The cut end of the nerve was then put on a skin flap and rinsed thoroughly with Mg^{2+} Ringer. The nerve was cut again, and crystals of Ca^{2+} green-1 dextran (molecular weight 3000, Molecular Probes) were applied on the cut end of the nerve. The preparation was kept in the dark at room temperature for 12 h. The muscles were then dissected and pinned into a recording chamber.

Imaging changes of Ca^{2+} in presynaptic nerve terminals

Changes in intracellular Ca^{2+} of surface presynaptic nerve terminals were detected using a Bio-Rad 600 confocal microscope equipped with an argon ion laser. The 488-nm line of the laser was attenuated to 1% using neutral density filters, and emitted fluorescence was detected through a low pass filter with cutoff at 515 nm. The endplates were located using standard phase microscopy (Georgiou et al. 1994), and

changes in fluorescence intensity were observed on surface nmj's, using a 40 x water immersion objective (Zeiss; 0.75 NA or Olympus 0.75 NA). When monitoring changes in resting fluorescence of the nerve terminals, averages of five images (256 x 384 pixels) were collected every 20 s. For experiments involving prolonged stimulations of the motor nerve (several seconds), images (128 x 192 pixels) were collected every 645 ms before, during, and after motor nerve stimulations. Images are colour coded so that blue corresponds to low levels of fluorescence and Ca^{2+} concentration and red to a high level.

The fluorescence intensity (F) was averaged over all the branches of the nerve terminals since no differences were observed in the responses between branches of a given nerve terminal. Changes in fluorescence were expressed as $\% \Delta F/F = (F - F_{\text{rest}})/F_{\text{rest}} \times 100$.

The line-scan mode of the confocal was used for faster measurements of changes in intracellular Ca^{2+} . Branches of nmj's were observed at zoom factor 6, and the position for line scanning was determined. Changes in intracellular Ca^{2+} were then monitored over a period of 1024 ms at intervals of 2 ms. The preparations were stimulated at 0.5 Hz for 1 s or by short trains of 10 pulses (100 ms at 100 Hz). At lower frequencies, 6 to 10 consecutive linescan trials were averaged to improve the signal to noise ratio.

In some experiments, 5 mM Mg^{2+} was added to the normal Ringer solution containing extracellular 1.8 mM Ca^{2+} . Also, in other separate experiments, Ca^{2+} ions were replaced by Mg^{2+} ions, and extracellular Ca^{2+} was chelated with EGTA (1–4 mM). The pH of the solution was adjusted to 7.2 with NaOH.

Ca²⁺ imaging of PSCs

Imaging of changes in intracellular Ca²⁺ in PSCs was performed as described before (Jahromi et al. 1992; Georgiou et al. 1994; Robitaille 1995; Robitaille et al. 1996, 1997). Muscles were incubated with membrane permeant fluo 3-AM (Molecular Probes), which when de-esterified and trapped inside the cell, increases fluorescence upon binding to Ca²⁺. Fluo 3-AM (10 µM) solutions were prepared in normal frog Ringer containing a final concentration of 1.1% v/v of dimethyl sulfoxide and 0.02% (w/v) pluronic acid (Molecular Probes). Muscles were incubated for 90 to 120 min at room temperature (18 to 20°C). Heavy metals were partially chelated with tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN, 20 mM) (Molecular Probes) (Arslan et al. 1985) added to perfusion saline.

Averages of five images (256 x 384 pixels) were collected before and 2.5 s after local application of drugs. Colour images are coded so that red corresponds to the maximal pixel intensity (255) and blue to the minimal intensity (0). The fluorescence intensity (F) was averaged over the cell body area of the PSCs at rest (before any agonist application) and at the peak of the Ca²⁺ response.

Stock solution of adenosine (10 mM) was prepared in H₂O and stored at -20°C. For local applications, a micropipette (tip diameter 1 to 2 mm) containing adenosine (20 µM in Ringer solution) was positioned near PSC cell bodies under microscope control and the agonist was ejected by pressure pulses (10 psi (1 psi = 6.895 kPa), pulse duration of 1 s) applied to the micropipette. For every cell used in this study, a similar pressure application of control solution (bath solution containing no

agonist) was initially performed to ensure that no response to mechanical stimulus alone was observed.

Recording of transmitter release

Experiments were performed at room temperature in a physiological solution that contained 4 mg/mL d-tubocurarine chloride added to reduce endplate potentials to subthreshold amplitude. Synaptic transmission was monitored by intracellular recordings in the muscle fiber, using glass microelectrodes filled with 1 M KCl (10–15 M Ω resistance). Transmitter release was evoked by suprathreshold stimulation of the motor nerve at 0.2 Hz. Responses were digitized (10 kHz) with an LM-12 analogue/digital board (Dagan) and acquired using the program Tomahacq design by T.A. Goldthorpe (University of Toronto). In a few experiments in which recordings were performed simultaneously with confocal imaging, synaptic responses were averaged in groups of four by pCLAMP (Axon Instruments, Foster City, Calif.), which was used also to synchronize the acquisition of the line-scan profile by the confocal and the electrophysiological recordings. Transmitter release was assayed by measuring nerve-evoked endplate potentials (EPPs).

RESULTS

Effects of adenosine on resting level of Ca^{2+}

We first tested the possibility that adenosine reduced the resting level of Ca^{2+} since it was shown that adenosine reduced the frequency of the miniature endplate potentials (MEPPs) at the frog nmj possibly by reducing the resting level of Ca^{2+} (Silinsky and Solsona 1992). Presynaptic nerve terminals were loaded by backfilling with Ca^{2+} -green-dextran (MW 3000) and observed with the confocal microscope. Figure 1A illustrates such an nmj at rest (no stimulation) and 15 min after bath application of adenosine (10 μM). No changes in the resting level of fluorescence were observed in the six nmj's studied (Fig. 1B), as the average fluorescence was 29.5 ± 2.4 (pixel intensity) at rest and 29.8 ± 2.8 in the presence of adenosine ($p > 0.05$, paired t-test).

Two control experiments were performed to ensure that changes in resting fluorescence could have been detected with the technique employed. First, changes in resting levels of Ca^{2+} were monitored in the presence of an increased extracellular concentration of K^+ , which should produce an increase in the resting level of fluorescence. As shown in Fig. 1C, application of 30 mM KCl induced an increase in the resting fluorescence by $24 \pm 13\%$ from control, indicating that we were able to detect changes in resting fluorescence. These changes are quite small in comparison with changes of fluorescence induced by a 40-Hz train of stimuli (30 s) (Fig. 1C, stim), indicating that the technique is sensitive enough to detect the changes in the

resting level of fluorescence in the presynaptic terminal. Second, we tested the ability to detect a decrease in resting level of fluorescence by reducing the concentration of extracellular Ca^{2+} so that the electrochemical gradient would be reversed and Ca^{2+} would tend to leave the nerve terminal. This was achieved by using a physiological solution in which Ca^{2+} ions were replaced by 5 mM Mg^{2+} and 1–4 mM EGTA was added. Resting fluorescence was first measured over a period of 5 to 10 min before the Mg^{2+} -EGTA solution was perfused. High frequency stimulations (50 Hz, 30 s) induced a reduction in the resting level, possibly due to the exit of Ca^{2+} ions from the nerve terminal toward the extracellular milieu through the opened Ca^{2+} channels (Fig. 1D) (Erulkar et al. 1978). These observations indicate that changes in resting levels of fluorescence can be observed and that adenosine effects should have been detected.

Adenosine induces Ca^{2+} responses in PSCs

The effectiveness of adenosine to induce changes in Ca^{2+} level was evaluated by testing its ability to induce Ca^{2+} responses in PSCs (Robitaille 1995; Robitaille et al. 1997). After loading PSCs with fluo 3-AM, adenosine was locally applied with a micropipette, and changes in fluorescence were monitored with the confocal microscope. As shown in Fig. 2, the same adenosine solution (10 μM) that failed to change the resting fluorescence in the nerve terminal shown in Fig. 1 induced Ca^{2+} responses in two PSCs when applied locally. This confirms the efficacy of adenosine in inducing changes in intracellular Ca^{2+} . Adenosine induces the release of Ca^{2+} from internal stores at PSCs, stressing the fact that adenosine modulates PSCs at the frog nmj and that this modulation may interfere with the activity of the synapse (Robitaille

1998).

Adenosine effects on nerve-evoked Ca^{2+} entry in presynaptic nerve terminals

The effects of adenosine on Ca^{2+} entry in presynaptic terminals were tested using the line-scan mode of the confocal microscope. A typical experiment is illustrated in Fig. 3, where a line scan of an nmj is shown. Ca^{2+} entry induced by a single action potential evoked by nerve stimulation could be reliably detected for several hours on the same nmj. Hence, we used this approach to evaluate the effects of adenosine on the entry of Ca^{2+} in the presynaptic nerve terminals.

Bath application of adenosine (10 μM) had no effect on Ca^{2+} entry induced by single stimulations (Fig. 4A) or a brief train of stimuli (100 Hz, 100 ms) (Fig. 4B). These results indicate that adenosine did not affect the nerve-evoked entry of Ca^{2+} in the presynaptic nerve terminals and, hence, indicate that the reduction in transmitter release by adenosine is not caused by a reduction in Ca^{2+} entry.

Two series of experiments were performed to confirm that the method was sensitive enough to detect changes in Ca^{2+} entry induced by adenosine. First, the effects of adenosine on transmitter release were mimicked by changes in the extracellular Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations. This should allow us to determine whether a reduction in Ca^{2+} entry that mimics the reduction in transmitter release obtained with adenosine can be detected. As shown in Fig. 5A, reduction in transmitter release by adenosine (10 μM) in normal Ringer was mimicked by adding 5 mM Mg^{2+} to the saline. Hence, one can predict that similar changes in Ca^{2+} entry should be observed whether adenosine or the modified Mg^{2+} Ringer is applied. However, as shown in Fig. 5B, application of

adenosine had no effect on the entry of Ca^{2+} induced by a brief train of stimuli (100 Hz, 100 ms), whereas the modified Mg^{2+} Ringer reduced Ca^{2+} entry by 40%. Similar results were obtained when the experiments were first performed in the presence of the Ringer with added Mg^{2+} (Fig. 5C). These results indicate that a reduction in Ca^{2+} entry that produces a similar reduction in transmitter release as adenosine was detected and reinforce the idea that adenosine does not reduce transmitter release by reducing Ca^{2+} entry.

In the second series of experiments, the effects of adenosine on transmitter release were monitored in parallel with its effect on Ca^{2+} entry and compared with the effects of the modified Mg^{2+} Ringer. The results of an experiment are illustrated in Fig. 5D. The Ca^{2+} response evoked by a single action potential (top row) was not affected by the presence of adenosine (10 μM), but the postsynaptic response was reduced by 60%. On the same nmj, replacing the normal saline solution with the modified Mg^{2+} Ringer induced a reduction in both the entry of Ca^{2+} and in the release of neurotransmitter. Thus, these results indicate that the reduction of transmitter release by adenosine at the frog nmj is not due to a reduction in Ca^{2+} entry.

Synaptic depression is not caused by a reduction in Ca^{2+} entry

We next tested whether a reduction in Ca^{2+} entry is associated with synaptic depression caused by high release rates. Nerve terminals were stimulated using paradigms known to induce synaptic depression, and Ca^{2+} entry induced by such stimulation was monitored using the confocal microscope. As shown in Fig. 6, Ca^{2+} entry induced by prolonged and intense nerve stimulation (50 Hz for 10 or 30 s) was

sustained and persisted throughout the duration of the stimulation period. Moreover, adenosine did not modify Ca^{2+} entry of such prolonged stimulations. Therefore, synaptic depression induced by a prolonged, high release rate is not due to a reduction in Ca^{2+} entry.

DISCUSSION

The present series of experiments indicate that adenosine depression at the frog nmj is not caused by a reduction in the entry of Ca^{2+} evoked by action potentials and that synaptic depression induced by repetitive stimulations is also not accompanied by a reduction in Ca^{2+} entry in the presynaptic nerve terminal.

Adenosine does not modulate Ca^{2+} dynamics of the nerve terminal

Ca^{2+} imaging techniques revealed that neither the resting level of Ca^{2+} nor the entry and the subsequent handling of Ca^{2+} are affected by adenosine. Hence our results allow us to conclude that the reduction in MEPP frequency by adenosine cannot be explained by a reduction in the resting level of Ca^{2+} and that the adenosine-induced depression in the number of quanta of neurotransmitter released by an action potential cannot be accounted for by changes in Ca^{2+} entry. The observations obtained following our direct experiments are in accordance with the indirect analysis of the effects of adenosine on the Ca^{2+} entry and handling at the frog nmj that lead to the conclusion that adenosine did not act directly on the Ca^{2+} channels and the subsequent handling of Ca^{2+} by the nerve terminal (Solsona and Silinsky 1992; Hunt et al. 1994). Thus, the effects of adenosine must occur on a step controlling nerve-evoked release of neurotransmitters that occurs after Ca^{2+} entry.

Differences between CNS and PNS

It is possible that adenosine has different effects in the CNS than in the PNS. For instance, Wu and Saggau (1994) recorded Ca^{2+} transient and field excitatory postsynaptic potentials and showed that adenosine reduced Ca^{2+} entry in presynaptic nerve terminals of hippocampal CA3–CA1 synapses and that adenosine effects were reduced when N-type Ca^{2+} channels were blocked by ω -conotoxin GVIA. Hence, this suggests that adenosine reduced the release of neurotransmitter by blocking the entry of Ca^{2+} in the presynaptic nerve terminal. This observation is further confirmed by patch-clamp recordings of neurons that show that adenosine reduced the size of N-type and L-type Ca^{2+} currents (Scholz and Miller 1992; Umemyia and Berger 1994).

However, indirect measurements of Ca^{2+} currents at synapses in the peripheral nervous system, particularly the frog nmj, showed that the action of adenosine was not targeted at the Ca^{2+} channels of the presynaptic nerve terminal (Silinsky and Solsona 1992). This was inconsistent with the observations of Wu and Saggau (1994) since the Ca^{2+} channels responsible for the release of neurotransmitters by the presynaptic nerve terminal are believed to be of the N-type (Kerr and Yoshikami 1984; Robitaille et al. 1990, 1996; Cohen et al. 1991). The results obtained in the present study provide direct evidence that neither the entry nor the handling of Ca^{2+} triggered by membrane depolarization induced by action potentials nor the resting level of Ca^{2+} were modulated by adenosine at the frog nmj. Therefore, either the action of adenosine is not mediated through the modulation of Ca^{2+} channels, as is concluded from the results of our study, or the actions of adenosine in the PNS and the CNS are different. Most likely, as suggested by Wu and Saggau (1997), there are other mechanisms that

must be involved to explain completely the reduction of transmitter release by adenosine. This is supported by the observation that cAMP and protein kinase A play a role in the action of adenosine at the frog nmj (Hirsh et al. 1990), but cAMP does not seem implicated in the adenosine response in the hippocampus.

Synaptic depression is not caused by a change in Ca^{2+}

Depression at the squid giant synapse is not caused by a reduction in the entry of Ca^{2+} in the presynaptic nerve terminal (Charlton et al. 1982). At the frog nmj, Redman and Silinsky (1994) showed that progressive synaptic depression caused by nerve stimulation at frequencies near 1 to 2 Hz was due to the activation of an adenosine A1 receptor. Since our data strongly suggest that adenosine actions are not mediated by changes in Ca^{2+} entry, it is possible to conclude that synaptic depression that occurs at low frequencies of about 1–2 Hz is also not mediated by changes in Ca^{2+} entry, as suggested by the observation that Ca^{2+} responses elicited at those frequencies were stable over periods of hours. Moreover, our data also allow us to conclude that the depression of neurotransmitter release induced by high frequency trains of stimuli is not caused by a reduction of Ca^{2+} entry during the train. This is consistent with the observations made by Robitaille and Charlton (1992), who showed that depression was not caused by the activation of a Ca^{2+} -gated K^+ conductance, resulting from an additional entry of Ca^{2+} or its maintenance and buildup in the presynaptic nerve terminal.

Origin of the adenosine effects

There is a large body of evidence indicating that adenosine reduces the amount of neurotransmitter released and, thus, that its effects are presynaptic in origin. However, aside from the presynaptic effects of adenosine indicated by quantal analysis, there is no direct evidence such as labeling or direct visualization that would demonstrate the presence of adenosine A1 receptors on the presynaptic nerve terminal. The only direct demonstration of A1 adenosine receptors at the frog nmj has been confirmed on the perisynaptic Schwann cells (PSCs) that cover the nerve terminal (Robitaille 1995). It has been shown that adenosine induces the release of Ca^{2+} from internal stores following the activation of an A1 adenosine receptor. Since PSCs can be modulated by the various neurotransmitters released by the nerve terminal (Georgiou et al. 1994; Robitaille 1995), it is possible that, in response to the activation by secreted adenosine or adenosine produced from secreted ATP, PSCs in return would modulate nerve terminal activity. In that scenario, adenosine produced from the synaptic activity would activate the PSCs, which would then modulate the synapse in return. This would be consistent with the observation of Robitaille (1998), who showed that activation of PSCs by transmitter released during synaptic activity resulted in a strong modulation of synaptic transmission and of synaptic depression.

REFERENCES

- Arslan, P., Di Virgilio, F., Beltrame, M., Tsien, R.Y., and Pozzan, T. 1985. Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. *J. Biol. Chem.* **260**: 2719–2727.
- Barry, S.R. 1990. Adenosine depresses spontaneous transmitter release from frog motor nerve terminals by acting at an A1-like receptor. *Life Sci.* **46**: 1389–1397.
- Branisteanu, D.D., Branisteanu, D.D.D., Civic, A., Brailoiu, E., Serban, D.N., and Haulica, I.D. 1989. Adenosine effects upon quantal transmitter release at the frog neuromuscular junction in the presence of protein kinase C-blocking and -activating agents. *Neurosci. Lett.* **98**: 96–100.
- Cohen, M.W., Jones, O.T., and Angelides, K.J. 1991. Distribution of Ca^{2+} channels on the frog motor nerve terminals revealed by fluorescent ω -conotoxin. *J. Neurosci.* **11**: 1032–1039.
- Erulkar, S.D., Rahamimoff, R., and Rotshenker, S. 1978. Quelling of spontaneous transmitter release by nerve impulses in low extracellular calcium solutions. *J. Physiol.* (London), **278**: 491–500.
- Georgiou, J., Robitaille, R., Trimble, W.S., and Charlton, M.P. 1994. Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron*, **12**: 443–455.

Ginsborg, B.L., and Hirst, G.D.S. 1971. Cyclic AMP, transmitter release and the effect of adenosine on neuromuscular transmission. *Nature New Biol.* **232**: 63–64.

Hirsh, J.K., Silinsky, E.M., and Solsona, C.S. 1990. The role of cyclic AMP and its protein kinase in mediating acetylcholine release and the action of adenosine at the frog motor nerve endings. *Br. J. Pharmacol.* **101**: 311–318.

Hunt, J.M., Redman, R.S., and Silinsky, E.M. 1994. Reduction by intracellular calcium chelation of acetylcholine secretion without occluding the effects of adenosine at frog motor nerve endings. *Br. J. Pharmacol.* **111**: 753–758.

Jahromi, B., Robitaille, R., and Charlton, M.P. 1992. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron*, **8**: 1069–1077.

Kerr, L.M., and Yoshikami, D. 1984. A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature (London)*, **308**: 282–284.

Mei, Y.A., Le Foll, F., Vaudry, H., and Cazin, L. 1996. Adenosine inhibits L- and N-type calcium channels in pituitary melanotrophs. Evidence for the involvement of a G protein in calcium channel gating. *J. Neuroendocrinol.* **8**: 85–91.

Meriney, S.D., and Grinnell, A.D. 1991. Endogenous adenosine modulates stimulation-induced depression at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)*, **443**: 441–455.

Mynlieff, M., and Beam, K.G. 1994. Adenosine acting at an A1 receptor decreases N-type calcium current in mouse motoneurons. *J. Neurosci.* **14**: 3828–3634.

Redman, R.S., and Silinsky, E.M. 1993. A selective adenosine antagonist (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) eliminates both neuromuscular depression and the action of exogenous adenosine by an effect on A1 receptors. *Mol. Pharmacol.* **44**: 835–840.

Redman, R.S., and Silinsky, E.M. 1994. ATP release together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J. Physiol. (London)*, **477**: 117–127.

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

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

Robitaille, R., and Charlton, M.P. 1992. Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* **12**: 297–305.

Robitaille, R., Adler, E.M., and Charlton, M.P. 1990. Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron*, **5**: 773–779.

Robitaille, R., Adler, E.M., and Charlton, M.P. 1993. Calcium channels and calcium-gated potassium channels at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. (Paris)*, **87**: 15–24.

Robitaille, R., Bourque, M.-J., and Vandaele, S. 1996. Localization of L-type Ca^{2+} channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **16**: 148–158.

Robitaille, R., Jahromi, B.S., and Charlton, M.P. 1997. Muscarinic Ca^{2+} responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)*, **504**: 337–347.

Scholz, K.P., and Miller, R.J. 1992. Inhibition of quantal transmitter release in the absence of calcium influx by a G protein linked adenosine receptor at hippocampal synapses. *Neuron*, **8**: 1139–1150.

Silinsky, E.M. 1975. On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol. (London)*, 247: 145–162.

Silinsky, E.M. 1980. Evidence for specific adenosine receptors at cholinergic nerve endings. *Br. J. Pharmacol.* 71: 191–194.

Silinsky, E.M. 1984. On the mechanism by which adenosine receptor activation inhibits the release of acetylcholine from motor nerve endings. *J. Physiol. (London)*, 346: 243–256.

Silinsky, E.M., and Solsona, C.S. 1992. Calcium currents at motor nerve endings: absence of effects of adenosine receptor agonists in the frog. *J. Physiol. (London)*, 457: 315–328.

Silinsky, E.M., Solsona, C., and Hirsh, J.K. 1989. Pertussis toxin prevents the inhibitory effect of adenosine and unmasks adenosine-induced excitation of mammalian motor nerve endings. *Br. J. Pharmacol.* 97: 16–18.

Umemiya, M., and Berger, A.J. 1994. Activation of adenosine A1 and A2 receptors differentially modulates calcium channels and glycinergic synaptic transmission in rat brainstem. *Neuron*, 13: 1439–1446.

Wu, L.-G., and Saggau, P. 1994. Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron*, **12**: 1139–1148.

Wu, L.G., and Saggau, P. 1997. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *TINS (Trends Neurosci.)*, **20**: 204–212.

Figure 1

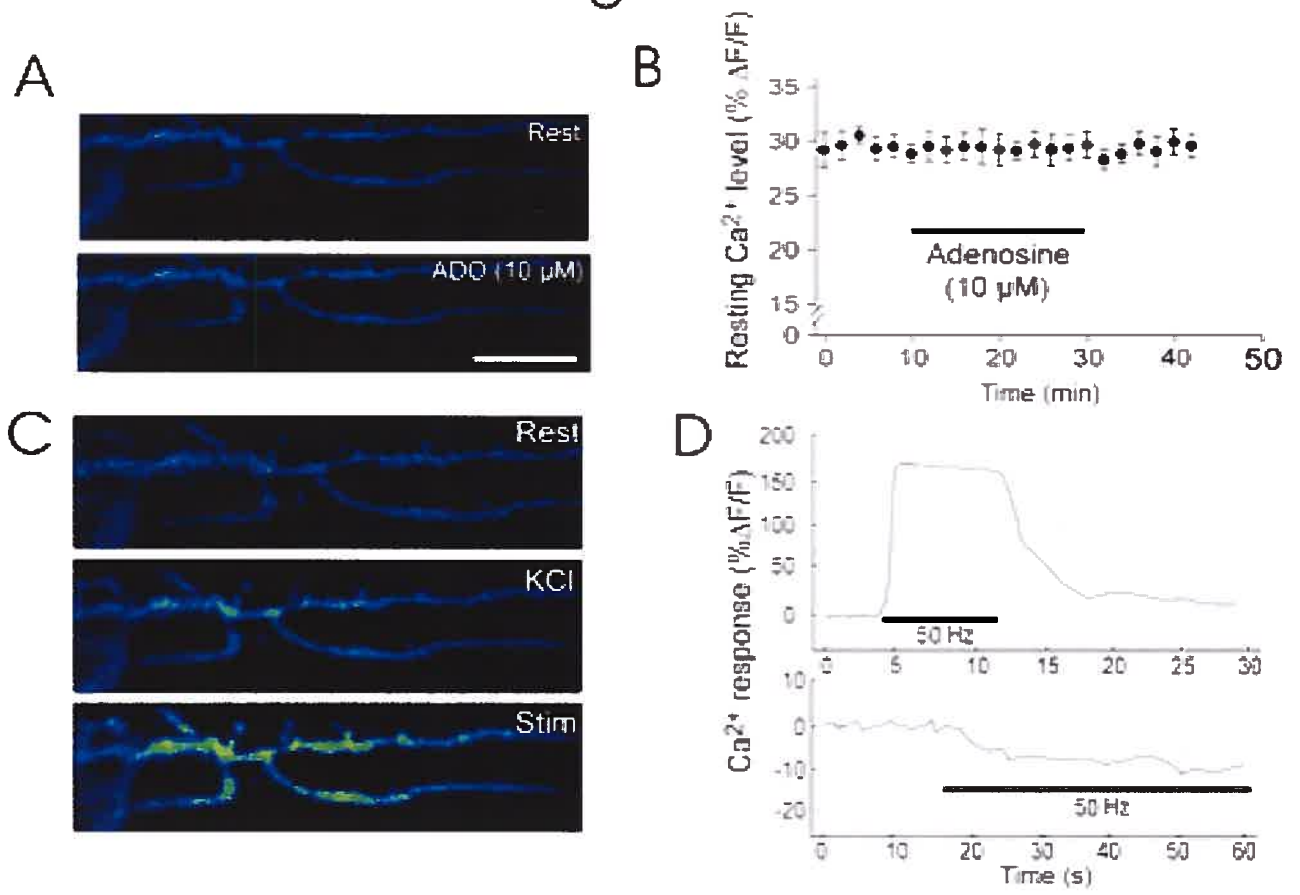


Figure 2

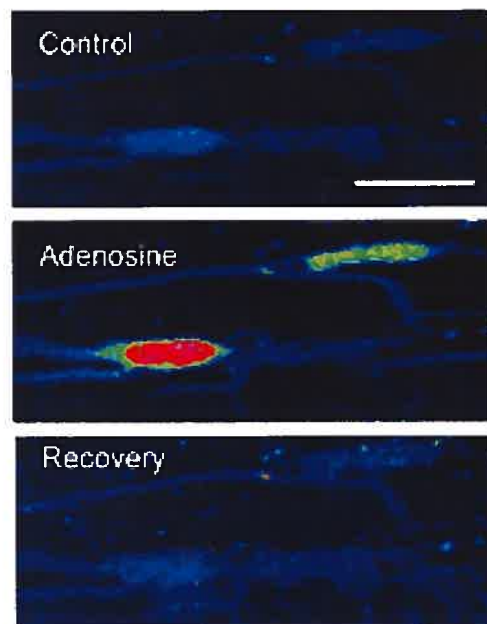


Figure 3

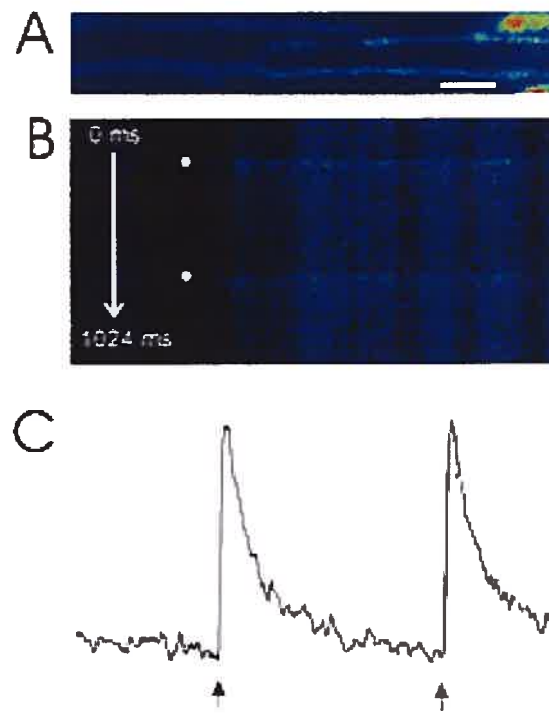


Figure 4

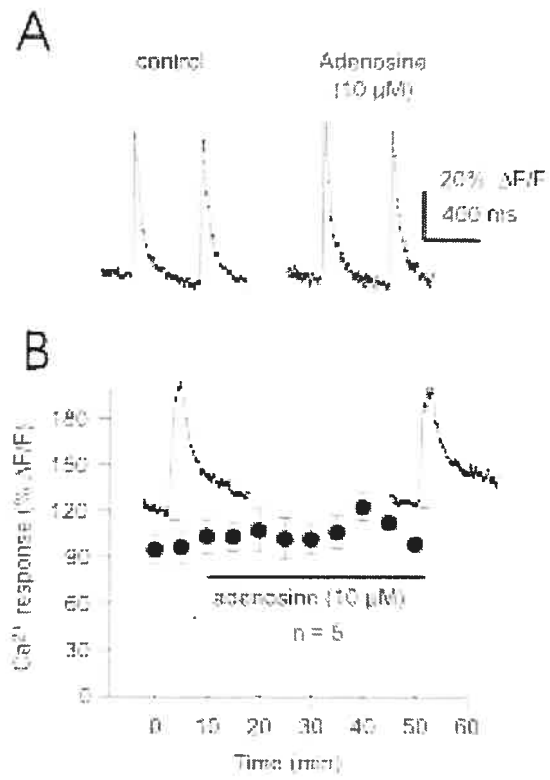


Figure 5

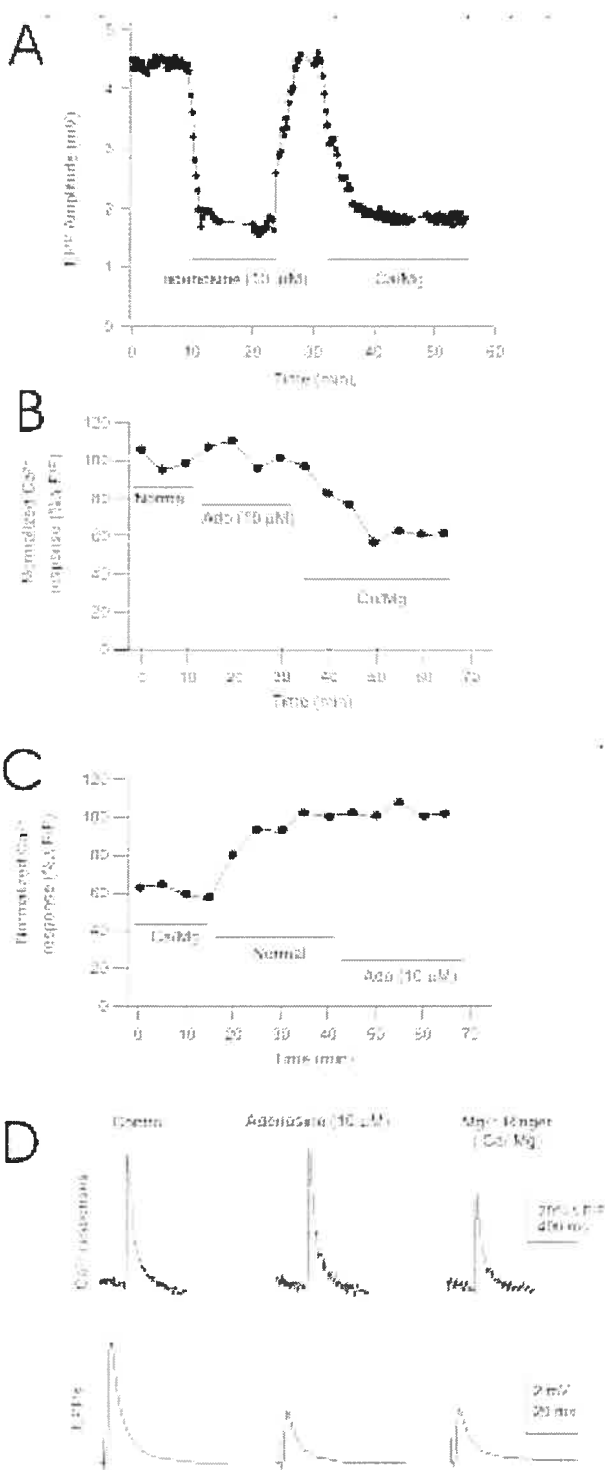


Figure 6

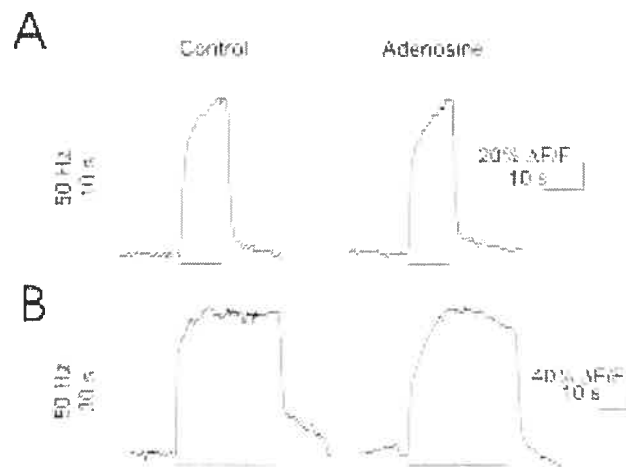


FIGURE LEGENDS

Figure 1: Adenosine does not affect the resting level of Ca^{2+} in the presynaptic nerve terminal.

(A) False color images of a nerve terminal of a frog nmj loaded with Ca^{2+} -green-dextran, using the backfilling technique, before the application of adenosine (Rest) and 10 min after the beginning of the perfusion with adenosine (ADO (10 μM)). Blue reflects a low level of Ca^{2+} and red a high level.

(B) Changes of the resting fluorescence before, during, and after the application of adenosine (10 μM). Each point is the average of six experiments, in which the resting values of fluorescence of the presynaptic nerve terminal were measured at regular intervals of 2 min. No changes in the resting level of Ca^{2+} were observed.

(C) A presynaptic nerve terminal loaded with Ca^{2+} -green-dextran at rest, during high KCl (30 mM) bath application, and at the peak of the Ca^{2+} response evoked by repetitive nerve stimulations at 40 Hz. Same nmj as in Fig. 1A.

(D) Relative changes of fluorescence of the nerve terminal induced by stimulations of the motor nerve (50 Hz) in normal Ringer solution and after 30 min in a Ca^{2+} -free Ringer solution (containing EGTA, 1 mM). Note the decrease of resting fluorescence when extracellular Ca^{2+} concentration is low. Scale bar in Fig. 1A, 10 μm , and in Fig. 1C, 20 μm .

Figure 2: Adenosine-induced Ca^{2+} responses in PSCs.

False color confocal images, where blue indicates low level of Ca^{2+} and red high level.

The figure shows two PSCs before (Control), at the peak of the response induced by

local application of adenosine (10 μM), and during recovery. The adenosine solution used for these experiments was the same as that which had no effect on the nerve terminal. Scale bar, 20 μm .

Figure 3: Detection of Ca^{2+} entry in presynaptic nerve terminal evoked by a single action potential.

(A) False color image of a frog nerve terminal loaded with Ca^{2+} -green-dextran.

(B) A line scan of the lower branch of the nerve terminal shown in Fig. 3A. The top of the image is at time 0, and the end of the image is at time 1024 ms. Each line of the scan represents 2 ms. The motor nerve was stimulated (one pulse) at the time indicated by the white dots.

(C) Average Ca^{2+} responses (% F/F) of 10 line scans similar to the one showed in B. Arrows indicate the time when the motor nerve was stimulated. Scale bar in Fig. 3A, 5 μm .

Figure 4: Adenosine does not reduce Ca^{2+} entry in presynaptic nerve terminals.

(A) Average Ca^{2+} responses of 10 consecutive line scans in absence of adenosine (control) and 15 min after the beginning of adenosine (10 μM) bath perfusion. The motor nerve was stimulated with two pulses at intervals of 500 ms.

(B) Change of fluorescence evoked by a train of 10 stimuli (100 Hz, 100 ms at intervals of 2 min), before the addition of adenosine and in the presence of adenosine (10 μM). Average of five experiments. The inserts illustrate Ca^{2+} responses induced by a 100-ms train at 100 Hz (10 pulses; a single line scan) before (left) and 15 min after

the bath application of adenosine (10 μM ; right).

Figure 5: Effects on nerve terminal Ca^{2+} responses of high Mg^{2+} saline that mimics the effects of adenosine on transmitter release.

(A) Changes of EPP amplitude induced by bath application of adenosine (10 μM).

After recovery from adenosine effects, bath application of high Mg^{2+} saline mimicked the effects of adenosine on EPP amplitude.

(B) Ca^{2+} responses in a presynaptic nerve terminal (% F/F) evoked by a train of 100 ms at 100 Hz in normal saline, in presence of adenosine (Ado, 10 μM), and in presence of the high Mg^{2+} saline.

(C) Ca^{2+} responses in a presynaptic nerve terminal (% F/F) evoked by a train of 100 ms at 100 Hz in high Mg^{2+} saline, then in presence of normal saline, and in presence of adenosine (Ado, 10 μM). Different preparation than in Fig. 5B.

(D) Average (10 line scans) of Ca^{2+} responses (% F/F) evoked by stimulations of the motor nerve (2 Hz) in normal saline (control), in presence of adenosine (10 μM), and in the high Mg^{2+} saline (Mg^{2+}). The corresponding EPPs recorded simultaneously with the Ca^{2+} responses are presented. Note that Ca^{2+} responses were reduced by the high Mg^{2+} that mimicked the effects of adenosine on transmitter release.

Figure 6: Synaptic depression is not caused by a reduction in Ca^{2+} entry in the presynaptic nerve terminal of the frog nmj.

(A) Changes in fluorescence (% F/F) in presynaptic nerve terminal evoked by a prolonged motor nerve stimulation (10 s, 50 Hz) before (control) and in presence of

(10 μ M) adenosine.

(B) Changes in fluorescence ($\% F/F$) in presynaptic nerve terminal evoked by a prolonged (30 s, 50 Hz) motor nerve stimulation before (control) and in presence of (10 μ M) adenosine.

7. DISCUSSION

Cette étude avait pour but de déterminer si l'adénosine avait un effet sur l'entrée et/ou sur la gestion du Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses. L'adénosine étant aussi connue pour sa modulation de la dépression synaptique induite par la fréquence de stimulation (Meriney and Grinnell, 1991), nous avons aussi vérifié les effets de celle-ci sur les réponses calciques nerveuses obtenues par des stimulations à haute fréquence.

7.1. Effets de l'adénosine sur les niveaux calciques de base des terminaisons nerveuses

Il a été montré que l'adénosine causait une diminution de la fréquence des PPMms à la jonction neuromusculaire (Ribeiro and Dominguez, 1978). Un des facteurs pouvant contrôler la fréquence des PPMms est la concentration calcique de base dans les terminaisons nerveuses (Erulkar and Rahamimoff, 1978). Les effets de l'adénosine pourraient donc s'expliquer par une diminution de la concentration calcique de base dans les terminaisons nerveuses. Cette hypothèse a été infirmée par nos observations. En effet, les niveaux calciques de base des

terminaisons nerveuses étaient inchangés en présence d'adénosine (Figure 1A et B). L'effet de l'adénosine sur la probabilité de relâche de neurotransmetteurs se manifeste donc par un mécanisme indépendant du Ca^{2+} .

7.2. Effets de l'adénosine sur les réponses calciques des terminaisons nerveuses

Les effets de l'adénosine sur les réponses calciques des terminaisons nerveuses ont été vérifiés en utilisant deux protocoles de stimulation. Dans un premier temps, les réponses calciques furent évoquées par une paire de stimuli uniques espacés de 500 ms (Figure 4). En utilisant un mode d'acquisition d'image très rapide (1 ligne de pixel à toutes les 2 ms, Figure 3) nous avons pu regarder en détail la cinétique des réponses calciques des terminaisons nerveuses. Nous avons observé que l'adénosine n'affectait ni l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses (amplitude maximale des réponses), ni son extrusion cytoplasmique (intégrale et décours temporel des réponses).

Dans un deuxième temps, les réponses calciques furent évoquées par un train de dix stimuli (100 Hz, 100 ms). Tout comme avec les

stimulations pairées, nous n'avons pu observé d'effet de l'adénosine sur les réponses calciques. La modulation de la transmission synaptique par l'adénosine semble donc bel et bien faire appel à un mécanisme indépendant du Ca^{2+} .

7.3. Effets de l'adénosine sur les réponses calciques obtenues lors de l'induction de la dépression dépendante de la fréquence de stimulation

L'adénosine étant en mesure de moduler la dépression synaptique induite par la fréquence de stimulation (Meriney and Grinnell, 1991), nous avons observé les effets de l'adénosine sur les réponses calciques obtenues par des stimulations à haute fréquence et prolongées (50 Hz, 10 ou 30 s). Deux conclusions ont pu être tirées de ces expériences.

Tout d'abord, l'absence d'effet de l'adénosine sur les réponses calciques (Figure 6) nous a permis de conclure que les effets de l'adénosine sur la transmission synaptique et sur la dépression synaptique

induite par la fréquence de stimulation sont tout à fait indépendant du Ca^{2+} et ce, peu importe le type de protocole de stimulation utilisé.

Ensuite, ces expériences nous ont permis de reconfirmer que la dépression synaptique induite par la fréquence de stimulation n'impliquait aucun changement dans les niveaux calciques atteints au sein des terminaisons nerveuses (Robitaille and Charlton, 1992). En effet, la dépression synaptique induite par la fréquence de stimulation survient extrêmement rapidement à la jonction neuromusculaire (voir Figure 9 Dépression synaptique dépendante de la fréquence à la page 59), bien avant les plateaux calciques que nous avons observés et qui sont maintenus durant toute la stimulation (Figure 6 de ce manuscrit).

En résumé, cette étude montre que la dépression synaptique induite par l'adénosine et celle induite par la fréquence de stimulation utilisent toutes deux des mécanismes dépresseurs qui n'affectent pas les niveaux calciques des terminaisons nerveuses. Cette mécanistique commune n'est peut être pas étrangère au fait que l'adénosine puisse moduler la dépression synaptique induite par la fréquence de stimulation et nous verrons dans le chapitre suivant que des homologies s'ajouteront au tableau...

CHAPITRE TROISIÈME

—

DIFFERENTIAL FREQUENCY-DEPENDENT
REGULATION OF TRANSMITTER RELEASE BY
ENDOGENOUS NITRIC OXIDE AT THE AMPHIBIAN
NEUROMUSCULAR SYNAPSE

Article publié dans :

The Journal of Neuroscience, vol. 21 no 4:1087–1095,

15 février 2001

© by the Society for Neuroscience, 2001

8. INTRODUCTION

La première étude des effets synaptiques du NO à la JNM montrait que le NO causait une diminution de la relâche de neurotransmetteurs (Lindgren and Laird, 1994), sans toutefois identifier les mécanismes responsables de cette modulation de la transmission synaptique. De plus, malgré la distribution stratégique de la nNOS à la JNM (Descarries et al., 1998), l'existence d'une production endogène de NO n'avait pas été démontrée. La NOS qui serait présente dans les fibres musculaires représente une source de production de NO intéressante. En outre, il est probable que le NO soit produit dans des conditions physiologiques par les CSPs, étant donné que la nNOS de celles-ci est dépendante du Ca^{2+} (Descarries et al., 1998) et qu'elles répondent à l'activité synaptique par une élévation de Ca^{2+} (Jahromi et al., 1992).

Dans cette étude, nous avons donc tenté de mettre en évidence une production endogène de NO. Nous avons aussi examiné les mécanismes d'action du NO modulant la transmission synaptique et caractérisé ses effets sur 3 phénomènes de plasticité à court terme : la facilitation homosynaptique (données non incluses dans l'article), la dépression

synaptique dépendante de la fréquence et la dépression induite par adénosine.

Nous montrons que le NO réduit la relâche de neurotransmetteurs sans influencer l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses. De plus, nous montrons, de façon indirecte, que la production de NO est régulée par l'activité synaptique et, qu'en plus, les mécanismes d'action utilisés par le NO dépendent aussi du niveau d'activité de la synapse. Nous avons observé que le NO augmentait légèrement le niveau de facilitation homosynaptique, à la JNM. Enfin, nous montrons qu'une production endogène de NO est impliquée dans la dépression synaptique dépendante de la fréquence et que le NO module la dépression dépendante de l'adénosine. Cette étude montre l'importance du NO dans la modulation de la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire.

Senior Editor: Gary Westbrook
Cellular/Molecular Neuroscience
Manuscript #JN1577-00

DIFFERENTIAL FREQUENCY-DEPENDENT REGULATION OF
TRANSMITTER RELEASE BY ENDOGENOUS NITRIC OXIDE AT THE
AMPHIBIAN NEUROMUSCULAR SYNAPSE

Sébastien Thomas and Richard Robitaille
Centre de Recherche en Sciences Neurologiques
and
Département de physiologie
Université de Montréal
Montréal, Canada
H3C 3J7

Abbreviated title: Regulation of synaptic efficacy by NO
Number of text pages: 31
Number of figures: 7
Number of tables: 0
Number of words in Abstract, 244; in Introduction, 491; in Discussion, 1499.

Corresponding author: Richard Robitaille
Département de physiologie
P.O. Box 6128, station centre-ville
Montreal, QC
H3C 3J7
Tel: (514) 343-6111, ext. 1946
Fax: (514) 343-2111

Acknowledgments: This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MT14137), by awards from the EJLB Research Foundation and The Alfred P. Sloan Foundation and by a team grant from Fonds pour la Formation de Chercheurs et de l'aide à la Recherche (FCAR) to RR. ST was supported by a studentship from the Medical Research Council of Canada and RR was a Junior II Scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and a MRC scientist.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a potent neuromodulator in central and peripheral nervous systems. At the frog neuromuscular junction (nmj), exogenous application of NO reduces neurotransmitter release and NO synthases (NOS), the enzymes producing NO, are present at this synapse. This work aimed at studying the molecular mechanisms by which NO modulates synaptic efficacy at the nmj using electrophysiological recordings and Ca^{2+} imaging techniques. Bath application of the NO donors S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) and sodium nitroprusside (SNP) decreased endplate potential (EPP) amplitude as well as the frequency of miniature EPPs (MEPP) but not their amplitude. Ca^{2+} responses elicited in presynaptic terminals by single action potentials were unaffected by NO but responses evoked by a short train of stimuli were increased. Tonic endogenous production of NO was observed as suggested by the increase in EPP amplitude by bath application of the NO scavenger hemoglobin and the neuronal NOS inhibitor 3-bromo 7-Nitroindazole sodium salt (3Br7NiNa). A soluble guanylate cyclase inhibitor, 6-anilino-5,8-quinolinedione (LY-83583), increased EPP amplitude and occluded the effects of the NO donor, suggesting that NO acts via a cGMP-dependent mechanism. High frequency-induced depression was reduced in the presence of the NO scavenger but not by LY-83583. However, adenosine-induced depression was significantly reduced following bath perfusion of SNAP and in the presence of LY-83583. Our results indicate that NO regulates transmitter release and adenosine-induced depression via a cGMP-dependent mechanism that occurs after Ca^{2+} entry and that high-

frequency induced synaptic depression is regulated by NO in a cGMP-independent manner.

Key words: nitric oxide; guanylate cyclase; adenosine; transmitter release; synaptic depression; calcium; perisynaptic Schwann cells

Neurotransmitter release is a highly organized and regulated process that provides a large degree of plasticity and adaptability (Illes, 1986; Wu and Saggau, 1997). It is modulated by a large number of second messengers each acting on specific elements involved in the transmitter release machinery. A very important second messenger known to regulate neurotransmitter release is nitric oxide (NO; Brenman and Brecht, 1997).

NO is membrane permeable and various forms of its synthesizing enzyme, the NO synthase (NOS), are found in neuronal and non-neuronal cells (Schmidt and Walter, 1994). In addition, most NOS are activity-dependent due to their Ca^{2+} -dependency (Brecht and Snyder, 1992). In the central nervous system, there is evidence suggesting that NO might be implicated in synaptic plasticity phenomena such as long term potentiation and depression where it is thought to act as a retrograde messenger from postsynaptic neurons modulating surrounding presynaptic terminals (Izumi and Zorumski, 1997; Lev-Ram et al., 1997; Malen and Chapman, 1997; Calabresi et al., 1999). The major mechanism of action of NO is the activation of a soluble guanylate cyclase that in turn produces cGMP, causing a potentiation of protein kinase G (PKG; Schmidt et al., 1993). Alternatively, NO has been shown to mediate post-translational modifications of proteins such as ADP-ribosylation (Duman et al., 1993), fatty acylation (Hess et al., 1993) and S-nitrosylation (Lipton et al., 1993). These modifications may prevent normal interactions between proteins involved in the synaptic vesicle-presynaptic membrane specific interactions occurring during exocytosis (Meffert et al., 1994, 1996).

There is also compelling evidence in support of the possibility that NO is an important modulator of synaptic transmission at the neuromuscular junction (nmj). First, exogenously applied NO reduces neurotransmitter release in immature (Wang et al., 1995) and mature (Lindgren and Laird, 1994) frog nmjs. Second, NO reduces the sensitivity to neurotransmitters of perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the frog nmj (Descarries et al., 1998). Third, NOS are found in skeletal muscle fibers (Okuda et al., 1997; Silvagno et al., 1996) where they are concentrated at the muscle endplate (Kusner and Kaminski, 1996). In addition, a form of neuronal NOS has also been found in PSCs (Descarries et al., 1998).

Although NO appears as a potent regulator of synaptic transmission at the mature nmj, there is no evidence yet as to whether endogenous NO is involved in the regulation of synaptic transmission and little is known about the molecular mechanisms regulated by NO at the nmj. Thus, this work aimed at determining the mechanism of action of NO in its regulation of synaptic transmission and to test its involvement in high frequency- and adenosine-induced depressions at the amphibian nmj.

Here, we report that there is a tonic production of NO at the frog nmj and that it reduces transmitter release via a cGMP-dependent and Ca^{2+} -independent mechanism. We also present evidence that endogenous NO partially regulates adenosine-induced depression by a cGMP-dependent mechanism and high frequency-induced depression by a cGMP-independent mechanism.

MATERIAL AND METHODS

Experiments were performed on nmjs of cutaneus pectoris muscles of *Rana Pipiens* frogs. Frogs were double pithed and muscles with their innervation were dissected and put into a recording chamber with the bottom filled with SylGard silicon elastomer (Dow Corning). Unless stated otherwise, all experiments were performed using normal frog Ringer solutions (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM NaHCO₃ and 15 mM HEPES). The pH was adjusted to 7.20 with NaOH (5N). All experiments were carried at room temperature (21-23 °C).

Ca²⁺ imaging of nerve terminals

Frogs were double pithed and were partially submerged with a 5 mM MgCl₂ Ringer solution (no Ca²⁺ added) in a dissection dish. A small cut was made in the skin near the shoulder and the pectoralis proprius nerve was cleared from the surrounding connective tissue, keeping the blood vessels intact. The nerve was then cut and rinsed with the Mg²⁺ Ringer solution to prevent the cut end of the axons from collapsing. The nerve was then put on the animal skin and crystals of Ca²⁺-green-1 Dextran (M.W. 3000, Molecular Probes), a fluorescent Ca²⁺ indicator, were put next to the cut end of the nerve. The loading was performed in obscurity at room temperature for about 10 h to allow the indicator to be transported to the nerve terminals. We have shown that overnight treatments such as this one do not affect synaptic transmission and synapse-glia interactions (Jahromi et al., 1992; Robitaille et al., 1997, 1999).

A BioRad MRC 600 confocal microscope mounted on an Olympus BH2 upright microscope was used to collect images. The 488 nm excitation line of an Argon ion laser was attenuated to 1% of maximal intensity using neutral density filters and emitted fluorescence was filtered with a long-pass filter at 515 nm. A water-immersion lens was used (Olympus 40x, 0.75 NA).

Two types of experiments were performed. First, for single pulses and for short trains of stimulation (100 Hz, 100 ms) the line scan mode of the confocal microscope was used to monitor changes in fluorescence with a greater temporal resolution as previously reported (Robitaille et al., 1999). The line scan mode permits successive readings at 2 ms interval of a single line (0.22 μm thick) which was manually positioned over the center of a nerve terminal branch observed at zoom factor 4. Files of series of 512 lines were collected and analyzed off line. Second, for longer stimulations (100 Hz, 7s), images (192 x 128 pixels) of nerve terminals were collected at intervals of 645 ms. Fluorescence emitted by the nerve terminals was measured and changes in fluorescence were expressed as:

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

All experiments were carried out using suprathreshold stimulation and muscle contractions were blocked using α -bungarotoxin (1.12 μM , Calbiochem), an irreversible antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (Dryden et al., 1974). Only one nerve terminal was monitored for each preparation.

Electrophysiology

The release of neurotransmitter was evoked by stimulating the motor nerve with single stimuli at a frequency of 0.2 Hz. Muscle contractions were blocked using d-tubocurarine chloride (4.87 μ M, Sigma), a competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (Almon and Appel, 1976). Intracellular recordings of endplate potentials (EPP) were performed using glass microelectrodes (10-15 M Ω) filled with KCl (2-3 M). Experiments were carried on muscle fibers with membrane potential more negative than -70 mV and were discarded when it depolarised by more than 10 mV. For analysis of spontaneous activity, recordings were performed in normal Ringer solution without d-tubocurarine chloride. In a few experiments where both EPPs and miniature EPPs (MEPP) were recorded during the same experiment, muscle contractions were prevented using a low-[Ca²⁺] Ringer solution (0.54 mM CaCl₂ and 3.5 mM MgCl₂). Similar results were obtained in both ionic conditions. Synaptic responses were recorded using an amplifier from Warner Instruments Corporation (gain of 10x) and then further amplified (100x) and filtered by a low pass 4-pole Bessel filter at 2 KHz (Warner Instruments Corporation). Data were acquired using a Digidata 1200 board controlled by the software Tomahacq (created by Mr. T.A. Goldthrope, University of Toronto) that was used for data acquisition and analysis. Only one muscle fiber was monitored on each preparation.

Drugs

Stock solutions of S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP, Calbiochem), of 6-anilino-5,8-quinolinedione (LY-83583, Calbiochem) and of 3-bromo 7-

Nitroindazole sodium salt (3Br7NiNa, Calbiochem) were prepared in DMSO (Sigma) at 50 mM, 40 mM and 250 mM respectively. SNAP and 3Br7NiNa solutions were kept in the dark. Additional dilutions of SNAP (50-100 μ M), LY-83583 (40 μ M) and of 3Br7NiNa (100 μ M) in physiological solutions were prepared just before use.

Stock solutions of adenosine (RBI), of 8-bromo-cGMP salt (8Br-cGMP, Calbiochem) and of sodium nitroprusside (SNP, Calbiochem) were diluted in water at 10 mM, 10 mM and 50 mM respectively. Additional dilutions of adenosine (10 μ M), 8-Br-cGMP (100 μ M) and of SNP (50 μ M) were made in physiological solutions just before use. Physiological solutions containing hemoglobin (30 μ M) were prepared the day of the experiments.

Drugs were applied continuously with bath perfusion (2 ml/min) at room temperature.

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm SEM. In most experiments, two sets of data obtained from the same nmj were compared using a Student's paired *t* test. Otherwise, Student's *t* test was used to compare 2 sets of data obtained from different nmjs and an analysis of variance (ANOVA) was used when 3 sets were compared.

RESULTS

The mechanisms of action of NO at the frog nmj were first investigated using electrophysiological and Ca^{2+} imaging techniques. The involvement of endogenous NO in the production of synaptic depression induced by high frequency stimulation and adenosine was then determined.

Exogenous NO reduces transmitter release

It was previously reported that sodium nitroprusside (SNP), an NO donor, reduced neurotransmitter release at the frog nmj (Lindgren and Laird, 1994). Here we show that SNAP, another NO donor (Ignarro et al., 1981; Southam and Garthwaite, 1991), produced similar effects. Indeed, bath application of SNAP (50 μM) decreased EPP amplitude by $36 \pm 3\%$ (Figure 1A) (3.7 ± 1.0 mV in control vs. 2.3 ± 0.6 mV in SNAP; $p < 0.01$ Student's one-tail paired t test, $n=10$). The effects began after 5 min of perfusion with SNAP and were complete in 20 min. When tested, no reversal of the effects of the NO donor was detected for up to 90 min after its removal from the perfusion (data not shown).

To determine whether the effects of NO were pre- or postsynaptic, MEPP frequency and amplitude were measured in control and after 30 min exposure to SNAP. Changes in MEPP frequency would be an indication of presynaptic changes in the probability of neurotransmitter release whereas a change in MEPP amplitude and/or time course would indicate postsynaptic changes. In the presence of SNAP (100 μM), MEPP frequency was reduced by $39 \pm 7\%$ (5.27 ± 2.48 Hz in control vs. 3.32 ± 1.81 Hz in SNAP; $p < 0.05$ Student's one-tail paired t test, $n=5$) whereas MEPP

amplitude did not change significantly ($567 \pm 124 \mu\text{V}$ in control vs. $667 \pm 161 \mu\text{V}$ in SNAP; $p > 0.05$ Student's two-tail paired t test, $n=4$) (Figure 1B). The reduction in MEPP frequency combined with the lack of effect on MEPP amplitude is consistent with presynaptic effects of NO. Thus, the reduction in EPP amplitude by NO was due to a decrease in the probability of transmitter release.

The reduction in MEPP frequency is somewhat surprising since Lindgren and Laird (1994) reported that SNP had no effect on MEPP frequency at frog sartorius nmjs. This difference could be explained by the different nature of the NO donors used or by the different properties of the two synapses. This was tested by monitoring the effects of SNP on the cutaneous pectoris nmj. Similarly to SNAP, not only SNP ($50 \mu\text{M}$) reduced EPP amplitude by $60 \pm 12\%$ ($6.8 \pm 1.0 \text{ mV}$ in control vs. $2.5 \pm 0.5 \text{ mV}$ in SNP; $p < 0.05$ Student's one-tail paired t test, $n=3$) but also reduced mEPP frequency by $44 \pm 14\%$ ($4.09 \pm 0.54 \text{ Hz}$ in control vs. $2.38 \pm 0.65 \text{ Hz}$ in SNP; $p < 0.05$ Student's one-tail paired t test, $n=4$) and did not change mEPP amplitude ($456 \pm 63 \mu\text{V}$ in control vs. $487 \pm 83 \mu\text{V}$ in SNP; $p > 0.05$ Student's two-tail paired t test, $n=4$). The fact that both NO donors had the same effects at the cutaneous pectoris nmj but somewhat different at the sartorius nmj (Lindgren and Laird, 1994) indicates that NO effects may vary according to the properties of the synapses.

Is endogenous NO produced in a tonic way?

To test whether NO was tonically produced at the frog nmj, synaptic transmission was monitored in the presence of hemoglobin, an NO scavenger (Murad et al., 1978). If there were a tonic production of NO at this synapse, the presence of an

NO scavenger should cause an increase in EPP amplitude. As shown in Figure 2A, bath application of hemoglobin (30 μM) caused a $28 \pm 6\%$ increase in EPP amplitude which raised from 5.2 ± 0.6 mV (control) to 6.7 ± 0.8 mV (hemoglobin; $p < 0.01$ Student's one-tail paired t test, $n=5$).

This result suggests that there was a tonic production of NO at the frog nmj maintaining the synapse in a depressed state. If this were the case, blocking NO synthase activity should also increase transmitter release. This was tested by perfusing the neuronal NO synthase inhibitor 3Br7NiNa (Chapman et al., 1995) while monitoring its effects on EPP amplitude. As shown in Figure 2B, bath application of a small concentration of 3Br7NiNa (100 μM ; Wegener et al., 2000) increased EPP amplitude by $47 \pm 18\%$ (4.5 ± 0.7 mV in control vs. 6.5 ± 1.0 mV in 3Br7NiNa; $p < 0.05$ Student's one-tail paired t test, $n=5$). When tested, hemoglobin (30 μM) had no additional effect when perfused after 3Br7NiNa effects were complete (data not shown). These results indicate that there was a tonic production of NO at the frog nmj.

Is NO affecting Ca^{2+} entry in nerve terminals?

Knowing that neurotransmitter release is closely regulated by the intracellular Ca^{2+} concentration in nerve terminals (Katz and Miledi, 1967; Adler et al., 1991; Zucker, 1993), we tested whether NO could modulate the Ca^{2+} concentration in nerve terminals, either by reducing Ca^{2+} entry triggered by action potentials and/or by affecting the resting level of Ca^{2+} in nerve terminals. Ca^{2+} -green-1 Dextran was backfilled into nerve terminals and changes in fluorescence of living terminals were

monitored using confocal microscopy. Figure 3A(top) illustrates a confocal image of nerve terminal branches loaded with Ca²⁺-green-1 Dextran seen in grayscale and Figure 3A (bottom) shows a Ca²⁺ response induced by a brief train of stimuli (100 Hz/100 ms) obtained using the line scan mode.

The effects of NO on Ca²⁺ responses evoked by single pulses were first monitored. As shown in Figure 3B, Ca²⁺ responses were unchanged in the presence of SNAP (100 μM, 30 min exposure). The average maxima of Ca²⁺ responses were $13.5 \pm 1\% \Delta F/F$ in control and $13.5 \pm 1\% \Delta F/F$ in the presence of NO ($p > 0.05$ Student's one-tail paired t test, $n=4$). The area under curve of Ca²⁺ responses were also unchanged by SNAP ($1867 \pm 768 \% \Delta F/F^*ms$ in control vs. $2053 \pm 803 \% \Delta F/F^*ms$ in SNAP; $p > 0.05$ Student's one-tail paired t test, $n=4$) indicating that NO did not change the duration of Ca²⁺ responses evoked by single action potentials in nerve terminals. Therefore, the effects of NO on EPP amplitude cannot be explained by a reduction of Ca²⁺ entry that would change the global level of Ca²⁺ in nerve terminals.

We next tested the effects of NO on Ca²⁺ entry during train of stimuli at high frequency (100 Hz, 100 ms). Surprisingly, the amplitude of Ca²⁺ responses was significantly higher in the presence of the NO donor (SNAP 50 μM, 30 min exposure) than in control where the average maximum relative change in fluorescence was $160 \pm 22 \% \Delta F/F$ in control and $184 \pm 27 \% \Delta F/F$ in the presence of SNAP (Figure 3C) ($p < 0.05$ Student's one-tail t test, $n=8$).

Hence, instead of reducing Ca^{2+} responses that would explain NO-induced reduction in transmitter release, NO caused an increase in Ca^{2+} responses that would predict an elevation in neurotransmitter release. A reduction in Ca^{2+} entry should have been detected since we have reported large reduction in amplitude of Ca^{2+} responses in ionic conditions identical to those required to mimic the reduction in transmitter release observed with the NO donors (see Figure 5 in Robitaille et al., 1999).

We then tested whether more prolonged stimulation would reveal a more pronounced effect of NO on the Ca^{2+} responses. However, with stimulations at 100 Hz for 7 sec, there was no increase in the amplitude of Ca^{2+} responses in the presence of SNAP (50 μM) (Figure 3D) (213 ± 23 % $\Delta\text{F}/\text{F}$ in control vs. 222 ± 17 % $\Delta\text{F}/\text{F}$ in SNAP; $p > 0.05$ Student's one-tail t test, $n=10$). Also, the area under curve of Ca^{2+} responses evoked by this type of stimulation with SNAP were not significantly different from control (5220 ± 579 % $\Delta\text{F}/\text{F} \cdot \text{ms}$ in control vs. 6633 ± 657 % $\Delta\text{F}/\text{F} \cdot \text{ms}$ in SNAP; $p > 0.05$ Student's one-tail t test, $n=10$). As a whole, these results indicate that NO effects on transmitter release cannot be explained by a global reduction in Ca^{2+} entry in the nerve terminal.

Is NO affecting the resting level of Ca^{2+} in nerve terminals?

We wondered whether NO would decrease the resting Ca^{2+} concentration in nerve terminals since MEPP frequency is sensitive to the resting level of Ca^{2+} in nerve terminals (Erulkar and Rahamimoff, 1978) and since MEPP frequency was reduced in the presence of NO. We monitored the resting fluorescence of living nerve terminals in 11 experiments in control and during bath application of SNAP (50-100 μM).

There was no change in the fluorescence of nerve terminals in the presence of the NO donor as the baseline fluorescence was 29 ± 5 pixel values in control and 31 ± 6 after 30 minutes of perfusion with SNAP (50-100 μM) ($p > 0.05$ Student's one-tail paired t test, $n=11$). It is unlikely that the lack of effect was due to a lack of sensitivity since we reported, in similar conditions, small significant reduction in resting levels of Ca^{2+} as a consequence of a reduced Ca^{2+} gradient created by chelating extracellular Ca^{2+} with EGTA (Robitaille et al., 1999). Therefore, the effects of the NO donors on MEPP frequency cannot be explained by a reduction in the level of resting Ca^{2+} of nerve terminals. However, because only bulk Ca^{2+} was monitored, local differences in Ca^{2+} concentration near active zones cannot be ruled out.

Do guanylate cyclase/cGMP-dependent mechanisms modulate transmitter release?

The main mode of action of NO that has been reported is the activation of a soluble guanylate cyclase and the production of cGMP (Schmidt et al., 1993). First, we wondered whether a functional cGMP pathway was present and whether its activation could mimic the effects of NO. We monitored the effects of 8-Br-cGMP, a cell permeable cGMP analog (Meyer and Miller, 1974), on synaptic transmission. Similar to SNAP, 8-Br-cGMP (100 μM) decreased EPP amplitude by $26 \pm 4\%$ (Figure 4A; 4.80 ± 0.77 mV in control vs. 3.63 ± 0.25 mV in 8-Br-cGMP; $p < 0.01$ Student's one-tail paired t test, $n=6$).

The presumed target of NO being a soluble guanylate cyclase, we used LY-83583, an inhibitor of that enzyme (Mülsch et al., 1988) and monitored its effects on

synaptic transmission. As shown in Figure 4B, bath application of LY-83583 (40 μ M) increased EPP amplitude by $44 \pm 9 \%$ (4.34 ± 0.75 mV in control vs. 5.76 ± 0.84 mV in LY-83583; $p < 0.001$ Student's one-tail paired t test, $n=14$). As shown in Figure 4C, the effects of LY-83583 were presynaptic since MEPP frequency increased from 3.83 ± 0.79 Hz in control up to 7.26 ± 1.71 Hz in the presence LY-83583 (40 μ M, $p < 0.01$ Student's one-tail paired t test, $n=6$) while MEPP amplitude did not change (771 ± 164 μ V in control vs. 736 ± 127 μ V in LY-83583; $p > 0.05$ Student's one-tail paired t test, $n=6$).

These results indicate that there is a guanylate cyclase/cGMP pathway effective at the frog nmj. Similarly to NO, activating that pathway reduced transmitter release while blocking it increased transmitter release similarly to the blockade of NOS activity with 3Br7NiNa. Also, these results strongly suggest that there is a tonic activity of that pathway at the frog nmj.

Is NO activating guanylate cyclase/cGMP-dependent pathways?

If the effects of NO on transmitter release were mediated by the activation of a soluble guanylate cyclase, the presence of LY-83583 should occlude the effects of SNAP. LY-83583 (40 μ M) was first perfused for 30 min to reach a stable and maximal effect on EPP amplitude and SNAP (100 μ M) was then perfused along with LY-83583 (40 μ M). As shown in Figure 4D, the presence of LY-83583 prevented the effects of SNAP where EPP amplitude was reduced only by $4 \pm 3 \%$ (4.12 ± 0.46 mV in LY-83583 vs. 3.95 ± 0.44 mV in LY-83583 and SNAP, $p > 0.05$

Student's one-tail paired t test, $n=6$). Therefore, these results indicate that a guanylate cyclase/cGMP pathway mediated the effects of NO on EPP amplitude.

Does NO affect high frequency-induced depression?

Since exogenous application of NO caused a depression of synaptic transmission and since NO is endogenously produced at the frog nmj, we wondered whether NO would be involved in the depression induced by high frequency (>10 Hz) stimulation of the motor nerve (Meriney and Grinnell, 1991; Robitaille, 1998).

We first tested the effects of the NO chelator hemoglobin on high frequency-induced depression. If NO was indeed implicated in that form of depression, the amount of synaptic depression would be reduced in the presence of the NO scavenger. As shown in Figure 5A,B the presence of hemoglobin (30 μ M) in the perfusion reduced the amount of depression from 63 ± 6 % (control) down to 49 ± 9 % ($p < 0.05$ Student's one-tail paired t test, $n=6$). Therefore, these results suggest the existence of an endogenous NO production that modulates the high frequency-induced depression at the frog nmj.

Because the guanylate cyclase inhibitor mimicked the effects of the NO scavenger, one would expect that it should have similar effects on synaptic depression than the NO scavenger. To test whether the modulation of high frequency-induced depression by NO was mediated through a cGMP-dependent mechanism, we tested the effects of LY-83583 on this form of depression. The presence of LY-83583 in the perfusion should mimic the effects of hemoglobin if NO was modulating this synaptic depression via the activation of a soluble guanylate cyclase. However, as shown in

Figure 5C, D there was no reduction in the amount of depression in the presence of LY-83583. In fact, the amount of depression was significantly higher in all experiments where it increased from $40 \pm 11\%$ in control up to $52 \pm 12\%$ in the presence of LY-83583 ($40 \mu\text{M}$) ($p < 0.01$ Student's one-tail paired t test, $n=5$). This increase in depression may be attributed to a larger level of transmitter release produced by the guanylate cyclase inhibitor. Indeed, depression is known to be more pronounced when the level of transmitter release is high (Zucker, 1989) where an increase of 30% in transmitter release results in an increase in depression by about 15% (Papas and Robitaille, personal communication). Hence, these results indicate that high-frequency depression is modulated by NO via a guanylate cyclase-independent mechanism.

Is NO implicated in adenosine-induced depression?

Another form of synaptic depression at the nmj is mediated by adenosine (Silinsky, 1984) which develops slowly at moderate rates of stimulation (~ 2 Hz; Redman and Silinsky, 1994). Interestingly, similarly to NO-induced depression of transmitter release, it was recently shown that the adenosine-dependent depression does not affect Ca^{2+} entry or resting $[\text{Ca}^{2+}]$ in the nerve terminal (Robitaille et al., 1999). Moreover, adenosine was also shown to regulate the level of depression elicited by high frequency stimulation (Meriney and Grinnell, 1991) and there is evidence that adenosine stimulate NO production in endothelial cells (Li et al., 1995).

The level of synaptic depression induced by adenosine was first determined. In control experiments where adenosine ($10 \mu\text{M}$) was applied alone without any other treatment, a reduction of $53 \pm 3\%$ in transmitter release was observed (5.77 ± 0.79 mV

in control vs. 2.78 ± 0.45 mV in adenosine; $p < 0.001$ Student's one-tail paired t test, $n=10$). This is consistent with values previously reported in the literature (Silinsky, 1984; Redman and Silinsky, 1994; Robitaille et al., 1999). If NO-dependent mechanisms were involved in the adenosine-induced depression, their activation would occlude the effects of subsequent application of adenosine on transmitter release. As shown in Figure 6A, bath application of adenosine ($10 \mu\text{M}$) following a 30 min perfusion with the NO donor SNAP ($50 \mu\text{M}$) still significantly reduced transmitter release ($p < 0.01$ Student's one-tail paired t test, $n=6$) where EPP amplitude was reduced by $42 \pm 4\%$ (2.13 ± 0.49 mV in control vs. 1.20 ± 0.29 mV in adenosine). However, the adenosine-induced depression after bath application of SNAP was significantly smaller than the one observed when adenosine was applied alone ($p < 0.05$, Anova, One way analysis of Variance; Figure 6C) suggesting that part of the adenosine-induced depression was occluded by the presence of the NO donor.

We next investigated whether guanylate cyclase-dependent mechanisms regulate adenosine-induced depression. This was tested by monitoring the effects of adenosine following bath application of LY-83583 ($40 \mu\text{M}$). As shown in Figure 6B, adenosine significantly reduced EPP amplitude in the presence of LY-83583 by $42 \pm 2\%$ (6.37 ± 1.73 mV in control vs. 3.63 ± 0.95 mV in adenosine and LY-83583; $p < 0.05$ Student's one-tail paired t test, $n=4$). However, this reduction in transmitter release was significantly smaller in the presence of the guanylate cyclase inhibitor than when adenosine was applied alone ($p < 0.05$, Anova, One way analysis of Variance; Figure 6C). These results suggest that adenosine-dependent depression was partially regulated by NO via guanylate cyclase-dependent mechanisms.

DISCUSSION

Here we report that NO reduces the amount of neurotransmitter released via a cGMP-dependent pathway and that a tonic production of NO occurs at this synapse. This regulation cannot be accounted by a global reduction in Ca^{2+} entry in nerve terminals. High frequency-induced depression is partially modulated by NO possibly via cGMP-independent mechanisms while adenosine-induced depression is also modulated by NO but via cGMP-dependent mechanisms. Hence, NO is an important endogenous regulator of synaptic efficacy at the adult amphibian nmj.

NO reduces synaptic efficacy at the amphibian synapse

The reduction in synaptic transmission by NO was consequent to a reduction in neurotransmitter release since the NO donors SNAP and SNP reduced EPP amplitude and MEPP frequency without affecting MEPP amplitude and time course. This is consistent with the data on cultured immature frog nmj (Wang et al., 1995). However, Lindgren and Laird (1994) reported that SNP reduced transmitter release without affecting MEPP frequency at a mature nmjs of the sartorius muscle. An interesting explanation for the difference between their results and those reported here might be related to the properties of the nmjs where the nmjs of the sartorius muscle are weaker (i.e. release less neurotransmitter per nerve terminal) than those of the cutaneous pectoris (Grinnell and Herrera, 1980).

Our results strongly suggest that the effects observed in our study are related to NO-dependent mechanisms. Indeed, different NO donors produced identical effects on the same preparation, suggesting that the effects were not due to other by-products

produced by the different donors. In addition, drugs that prevented NO effects or the activation of the target of NO (i.e. NO scavenger, NOS inhibitor and the soluble guanylate cyclase inhibitor) increased transmitter release. Finally, the effects of hemoglobin were occluded by the action of the NOS inhibitor while inhibition of the guanylate cyclase prevented NO-induced depression during SNAP application.

Lindgren and Laird (1994) showed that a brief exposure to SNP depressed synaptic transmission for as long as 60 min. We also observed long-lasting effects on synaptic transmission even after SNAP removal from the perfusion. This persistent effect of NO is not consistent with our finding that hemoglobin, 3Br7NiNa and LY-83583 increased EPP amplitude nor with the fact that hemoglobin also increased EPP amplitude in the sartorius nmj (Lindgren and Laird, 1994). Interestingly, in cultured nmjs (Wang et al., 1995), the long lasting NO effects are induced after exposure to a period of 20 min suggesting that a concentration and/or duration range of NO exposures is required to produce the prolonged effects. Also, it is likely that the release of endogenous NO differs from bath with NO donors in terms of concentration and duration.

NO regulation of Ca^{2+} entry in nerve terminals

The NO donor did not affect Ca^{2+} responses evoked by single action potentials but increased the responses induced by brief trains of stimuli, suggesting that NO modulates a frequency-dependent Ca^{2+} mechanism. Potential targets of NO might be the sarcoplasmic Ca^{2+} /ATPase pump which is known to be S-nitrosylated by NO (Ishii et al., 1998) and the IP3 receptor known to be phosphorylated by PKGs (Haug et al.,

1999). Neurotransmitter release at the frog nmj is controlled by these two Ca^{2+} regulatory mechanisms (Castonguay and Robitaille, 2000). Also, there is evidence that NO facilitates N type Ca^{2+} channel activation via a cGMP/PKG pathway (Hirooka et al., 2000), channels clustered at active zones of the frog nmj, regulating transmitter release (Robitaille et al., 1990; Cohen et al., 1991). Regardless of the mechanisms regulating Ca^{2+} entry, NO reduction of transmitter release at the amphibian nmj cannot be explained by a reduction in Ca^{2+} entry, suggesting that a regulation occurs after that step (Gray et al., 1999). Our results further suggest that the reduction in transmitter release by NO at higher frequency of stimulation is underestimated owing to the potentiation of Ca^{2+} entry by NO in those conditions.

Guanylate cyclase-dependent and independent NO regulation of transmitter release

The activation of a soluble guanylate cyclase leading to the production of cGMP appears to be the main mechanism by which NO modulates transmitter release during low activity. This mechanism also appears to be involved in the regulation of transmitter release at the immature nmj (Wang et al., 1995). At the frog nmj, NO-induced production of cGMP could activate cGMP-dependent protein kinase (PKG). This possibility is supported by the evidence that PKG is present together with NOS at the rat nmj (Chao et al., 1997) and that there is a PKG-dependent regulation of transmitter release at a number of synapses (Gray et al., 1999; Yawo, 1999) including the frog nmj (Branisteanu et al., 1988).

NO regulation of high frequency- and adenosine-induced synaptic depression

Our results indicate that depression of transmitter release induced by repetitive stimulation at high frequency is modulated by NO as suggested by the reduction in the amount of depression in the presence of the NO scavenger. This is the first direct evidence that the production and release of NO, as shown by the partial occlusion with an NO scavenger, is directly involved in the modulation of synaptic depression at the nmj.

Since transmitter release is similarly sensitive to the NO scavenger and the guanylate cyclase inhibitor, the effect of the latter on synaptic depression should have been also similar. However, the guanylate cyclase inhibitor did not reduce depression but rather increased it. Hence, this suggests that the NO-regulation of synaptic depression occurs in a guanylate cyclase-independent manner. The increase in depression may be due to the fact that depression is proportionally larger to an increase in transmitter release (Zucker, 1989; Pappas and Robitaille, unpublished observations). However, a guanylate cyclase regulation of depression, unrelated to NO, cannot be ruled out. Consistent with the hypothesis that synaptic depression is due to a reduced availability of the vesicular pool (Zucker, 1989), NO could induce post-translational changes of synaptic proteins involved in the SNAP/SNARE complex (Meffert et al., 1994, 1996), leading to a regulation of the exocytosis-endocytosis cycle.

Unlike high frequency-induced depression, adenosine-induced depression appears modulated by NO in a guanylate cyclase-dependent manner as suggested by the partial occlusion of adenosine effects by an NO donor and the guanylate cyclase inhibitor. Interestingly, Hirsh et al. (1990) reported that the adenosine depression was

only partially occluded by the presence of cAMP analogues. Hence, one possibility might be that part of the effects of adenosine is mediated by an NO-dependent activation of the guanylate cyclase/cGMP cascade. Alternatively, NO may regulate adenosine-induced depression by acting on the cAMP-dependent system perhaps via the action of cGMP on phosphodiesterase activity (Doerner et al., 1988).

Hence, our results suggest that there are two NO-dependent functional mechanisms at the frog nmj, each acting within a certain frequency range: the regulation of NO at low level of transmitter release appears to occur via guanylate cyclase-dependent mechanisms whereas NO regulation at higher level of transmitter release appears to occur via cGMP-independent mechanisms. Interestingly, both PKG(cGMP)-dependent and independent NO regulation of glutamate release have been reported for rat hippocampal nerve terminals where the former is associated with low level of NO production and the latter with high level of NO (Sequeira et al., 1999).

Model of NO regulation of synaptic efficacy at the nmj

Our results indicate the presence of guanylate cyclase-dependent and independent regulation of transmitter release in a frequency-dependent manner and the use of the NO chelator hemoglobin and the NOS inhibitor 3Br7NiNa indicates that NO is produced tonically. In addition, there is evidence that an NOS is located in the muscle fiber, concentrated at the endplate region (Brenman et al., 1995) and in PSCs, glial cells at the nmj (Descarries et al., 1998). The muscular NO appears critical for the consolidation of the synapse (Wang et al., 1995). Based on this knowledge, we

propose the following model of NO modulation of synaptic efficacy at the nmj where the tonic production of NO would originate from the muscle fibers to serve as a feedback signal for synapse maintenance (Figure 7A). The tonic NO production would also reduce the sensitivity of PSCs to neurotransmitters since NO application reduced the Ca^{2+} responses elicited in PSCs by transmitter substances (Descarries et al., 1998). In addition, this tonic production of NO by the muscle fibers would modulate transmitter release at low level of activity. It is unlikely, in our experimental conditions, that muscle fibers produced NO in an activity-dependent manner since muscle activity was quite low owing to the partial block of postsynaptic receptors whereas the PSCs were fully activated since they are unaffected by nicotinic antagonists (Jahromi et al., 1992; Robitaille et al., 1997). Hence, although a tonic glial NO production cannot be ruled out, we propose that the activity-induced, Ca^{2+} -dependent NO production originates from the PSCs (Figure 7B) since their intracellular Ca^{2+} elevation is frequency-dependent (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995; Bourque and Robitaille, 1998). That rise in Ca^{2+} would then activate neuronal NOS present in PSCs. This glial NO production could mediate the PSCs modulation of synaptic depression at the amphibian nmj (Robitaille, 1998; Castonguay et al., 2000).

REFERENCES

Adler EM, Augustine GJ, Duffy SN, Charlton MP (1991) Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* 11(6): 1496-1507.

Almon RR, Appel SH (1976) Cholinergic sites in skeletal muscle II. Interaction of an agonist and two antagonists with the acetylcholine site. *Biochem* 15(17): 3667-3671.

Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 512: 197-209.

Branisteanu DD, Popescu LM, Branisteanu DD, Haulica ID (1988) Cyclic GMP and protein kinase G inhibit the quantal transmitter release induced by protein kinase C. *Brain Res* 464: 263-266.

Bredt DS, Snyder SH (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8: 3-11.

Brenman JE, Bredt DS (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol* 7: 374-378.

Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bretz DS (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82: 743-752.

Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Sancosario G, Morello M, Giorgi M, Pisani A, Bernardi G (1999) A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J Neurosci* 19(7): 2489-2499.

Castonguay A, Levesque S, Robitaille R (2000) Dynamic contributions of glial cells to synaptic function. *Prog Brain Res* in press

Castonguay A, Robitaille R (2000) Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. Submitted to *J Neurosci*

Chao DS, Silvagno F, Xia H, Cornwell TL, Lincoln TM, Bretz DS (1997) Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neurosci* 76(3): 665-672.

Chapman V, Buritova J, Honore P, Besson JM (1995) 7-Nitro-indazole, a selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase reduces formalin evoked c-Fos expression in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *Brain Res* 697(1-2):258-261

Cohen MW, Jones OT, Angelides KJ (1991) Distribution of Ca²⁺ channels on the frog nerve terminals revealed by fluorescent α -conotoxin. *J Neurosci* 11: 1032-1039.

Descarries LM, Cai S, Robitaille R (1998) Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J Neurocytol* 27(11): 829-840.

Doerner D, Alger BE (1988) Cyclic GMP depresses hippocampal Ca²⁺ current through a mechanism independent of cGMP-dependent protein kinase. *Neuron* 1: 693-699.

Dryden WF, Harvey AL, Marshall IG (1974) Pharmacological studies on the bungarotoxins. *Eur J Pharmacol* 26: 256-267.

Duman RS, Terwilliger RZ, Nestler EJ (1993) Alterations in nitric oxide-stimulated endogenous ADP-ribosylation associated with long-term potentiation in rat hippocampus. *J Neurochem* 61: 1542-1545.

Erulkar SD, Rahamimoff R (1978) The role of calcium ions in tetanic and post-tetanic increase of miniature end-plate potential frequency. *J Physiol* 278: 501-511.

Gray DB, Polo-Parada L, Pilar GR, Eang P, Metzger RR, Klann E, Meriney SD (1999) A nitric oxide/cyclic GMP-dependent protein kinase pathway alters transmitter release and inhibition by somatostatin at a site downstream of calcium entry. *J Neurochem* 72: 1981-1990.

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

Haug LS, Jensen V, Hvalby O, Walaas SI, Ostvold AC (1999) Phosphorylation of the Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J Biol Chem* 274: 7467-7473.

Hess DT, Patterson SI, Smith DS, Skene JHP (1993) Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* 366: 562-565.

Hirooka K, Kourennyi DE, Barnes S (2000) Calcium channel activation facilitated by nitric oxide in retinal ganglion cells. *J Neurophysiol* 83: 198-206.

Hirsh JK, Silinsky EM, Solsona CS (1990) The role of cyclic AMP and its protein kinase in mediating acetylcholine release and the action of adenosine at frog motor nerve endings. *Br J Pharmacol* 101: 311-318.

Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA (1981) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 218: 739-749.

Illes P (1986) Mechanisms of receptor-mediated modulation of transmitter release in noradrenergic, cholinergic and sensory neurones. *Neurosci* 17(4): 909-928.

Ishii T, Sunami O, Saitoh N, Nishio H, Takeuchi T, Hata F (1998) Inhibition of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by nitric oxide. *FEBS letters* 440: 218-222.

Izumi Y, Zorumski CF (1997) Involvement of nitric oxide in low glucose-mediated inhibition of hippocampal long-term potentiation. *Synapse* 25: 258-262.

Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8: 1069-1077.

Katz B, Miledi R (1967) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J Physiol* 192: 407-436.

Kusner LL, Kaminski HJ (1996) Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res* 730: 238-242.

Lev-Ram V, Jiang T, Wood J, Lawrence DS, Tsien RY (1997) Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and Ca²⁺ in the induction of cerebellar long-term depression. *Neuron* 18: 1025-1038.

Li J-M, Fenton RA, Cutler BS, Dobson JGJr (1995) Adenosine enhances nitric oxide production by vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 269: C519-C523.

Lindgren CA, Laird MV (1994) Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *NeuroReport* 5: 2205-2208.

Lipton SA, Choi Y-B, Pan Z-H, Lei SZ, Chen H-SV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632.

Malen PL, Chapman PF (1997) Nitric oxide facilitates long-term potentiation, but not long-term depression. *J Neurosci* 17(7): 2645-2651.

Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H (1996) Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking/fusion reactions. *Neuron* 16: 1229-1236.

Meffert MK, Premack BA, Schulman H (1994) Nitric oxide stimulates Ca²⁺-independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12: 1235-1244.

Meriney SD, Grinnell AD (1991) Endogenous adenosine modulates stimulation-induced depression at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 443: 441-455.

Meyer RB Jr, Miller JP (1974) Analogs of cyclic AMP and cyclic GMP: general methods of synthesis and the relationship of structure to enzymatic activity. *Life Sci* 14: 1019-1040.

Mülsch A, Busse R, Liebau S, Förstermann U (1988) LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. *J Pharmacol Exp Therap* 247: 283-288.

Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H (1978) Guanylate cyclase: Activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9: 145-158.

Okuda S, Kanda F, Kawahara Y, Chihara K (1997) Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in L6 rat skeletal muscle cells. *Am J Physiol* 272: C35-C40.

Redman RS, Silinsky EM (1994) ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at the frog nerve endings. *J Physiol* 477: 117-127.

Robitaille R, Adler EM, Charlton MP (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5: 773-779.

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

Robitaille (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 15(11): 7121-7131.

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

Robitaille R, Thomas S, Charlton MP (1999) Effects of adenosine on Ca²⁺ entry in the nerve terminal of the frog neuromuscular junction. *Can J Physiol Pharmacol* 77(9): 707-714.

Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178: 153-175.

Schmidt HH, Walter U (1994) NO at work. *Cell* 78: 919-925.

Sequeira SM, Carvalho AP, Carvalho CM (1999) Both protein kinase G dependent and independent mechanisms are involved in the modulation of glutamate release by nitric oxide in rat hippocampal nerve terminals. *Neurosci Letters* 261: 29-32.

Silinsky EM (1984) On the mechanism by which adenosine receptor activation inhibits the release of acetylcholine from motor nerve endings. *J Physiol* 346: 243-256.

Silvagno F, Xia H, Bredt DS (1996) Neuronal nitric oxide synthase⁺, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 271: 11201-11208.

Southam E, Garthwaite J (1991) Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices. *Neurosci Letters* 130: 107-111.

Wang T, Xie Z, Lu B (1995) Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature* 374: 262-266.

Wegener G, Volke V, Rosenberg R (2000) Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *Br J Pharmacol* 130(3):575-580.

Wu LG, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *TINS* 20: 204-212.

Yawo H (1999) Involvement of cGMP-dependent protein kinase in adrenergic potentiation of transmitter release from the Calyx-type presynaptic terminal. *J Neurosci* 19(13): 5293-5300.

Zucker R (1989) Short term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12: 13-32.

Zucker RS (1993) Calcium and transmitter release. *J Physiol (Paris)* 87: 25-36.

Figure 1

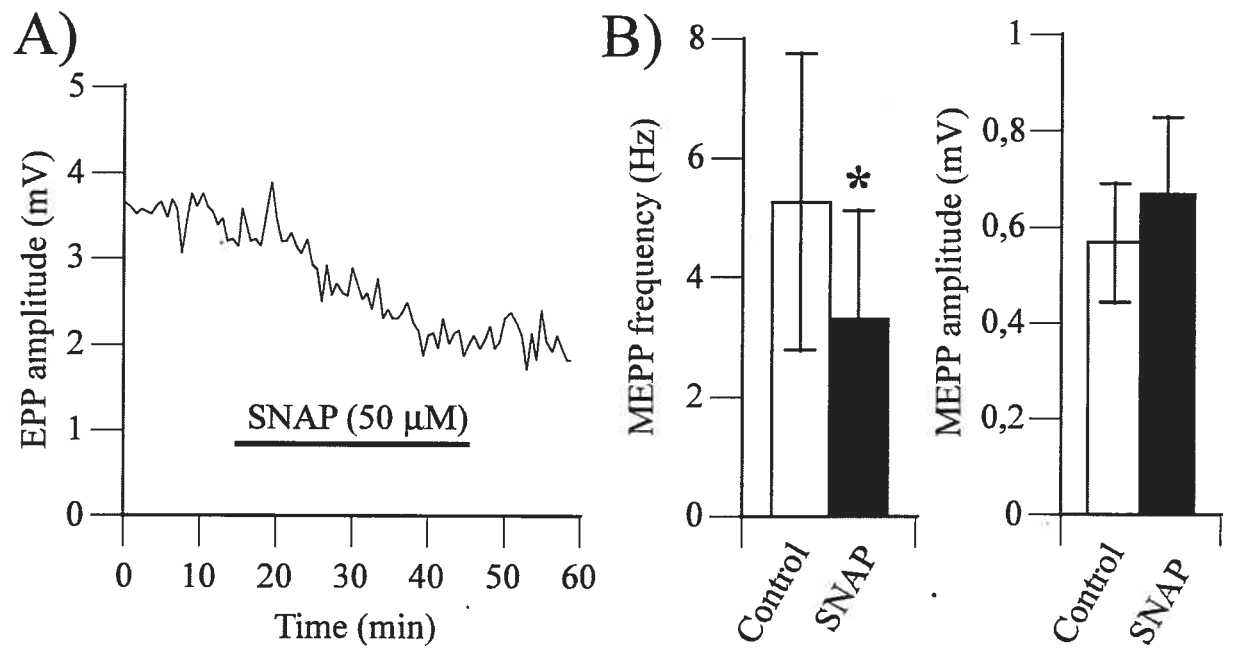


Figure 2

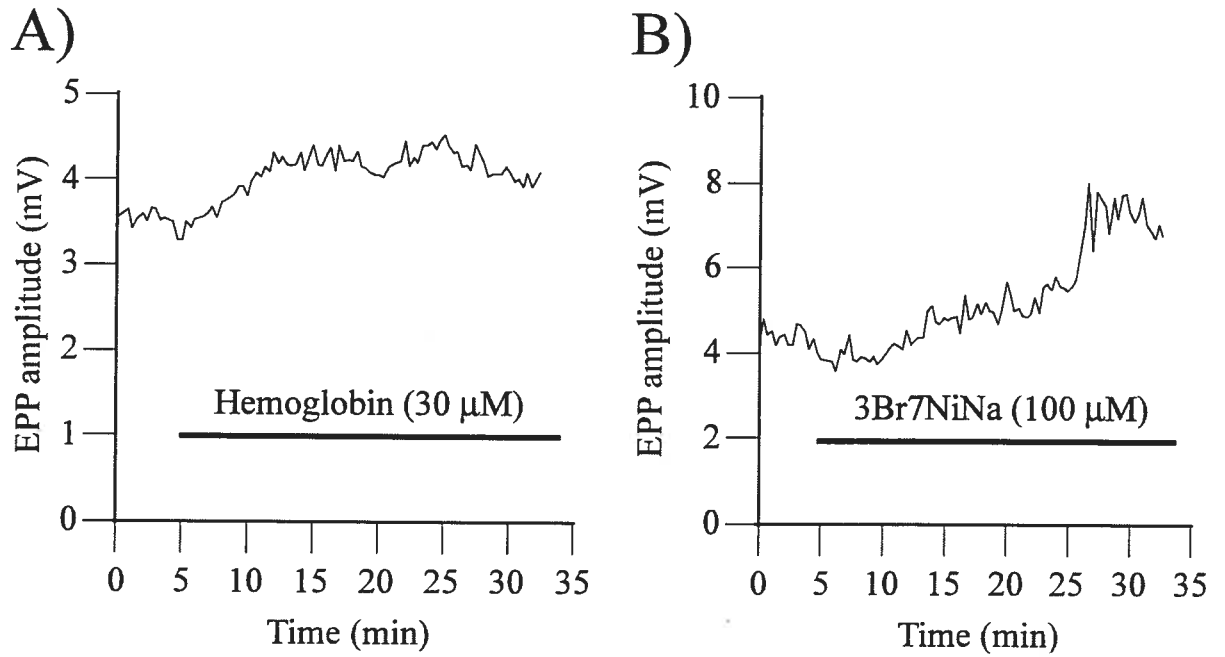


Figure 3

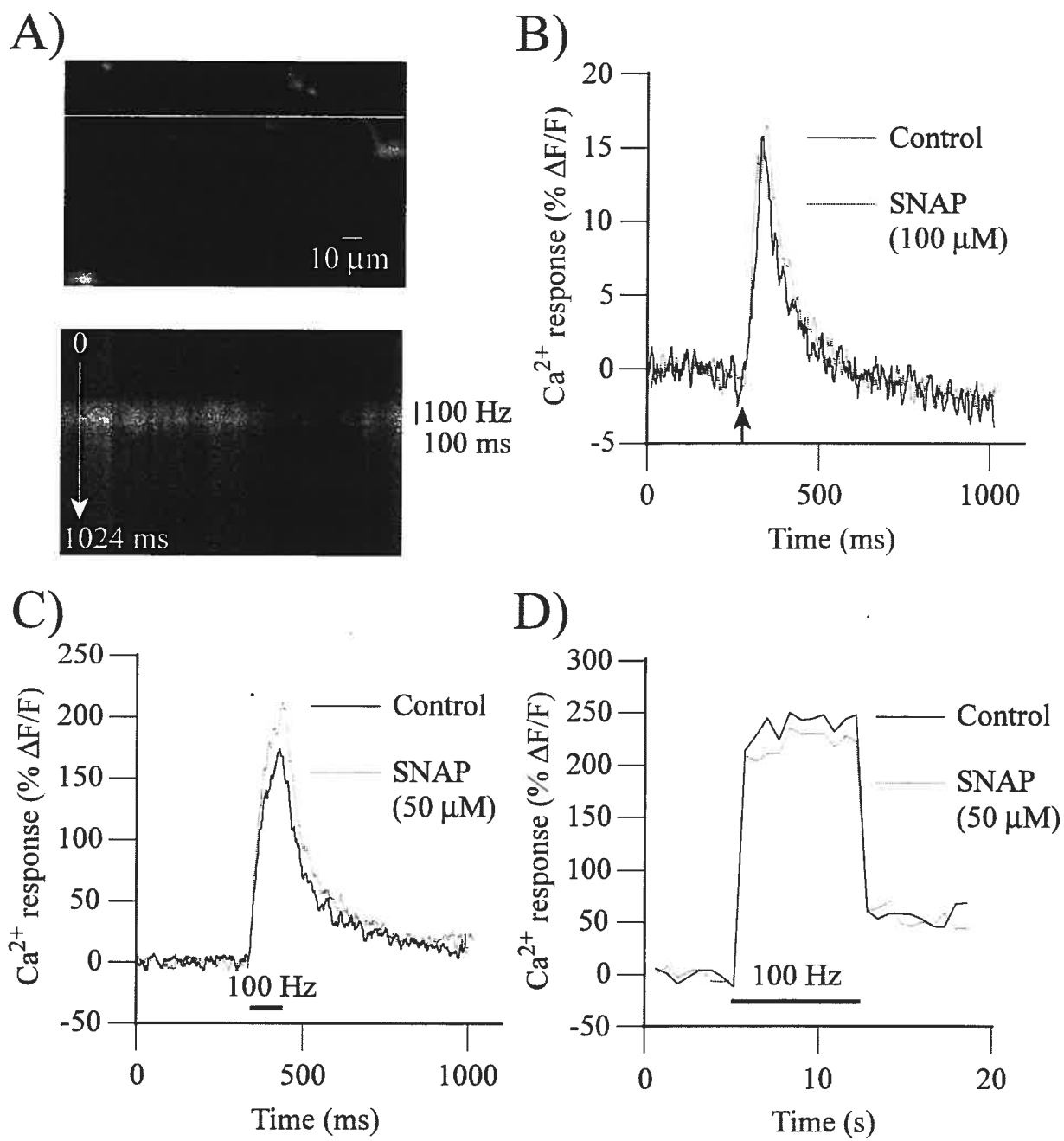


Figure 4

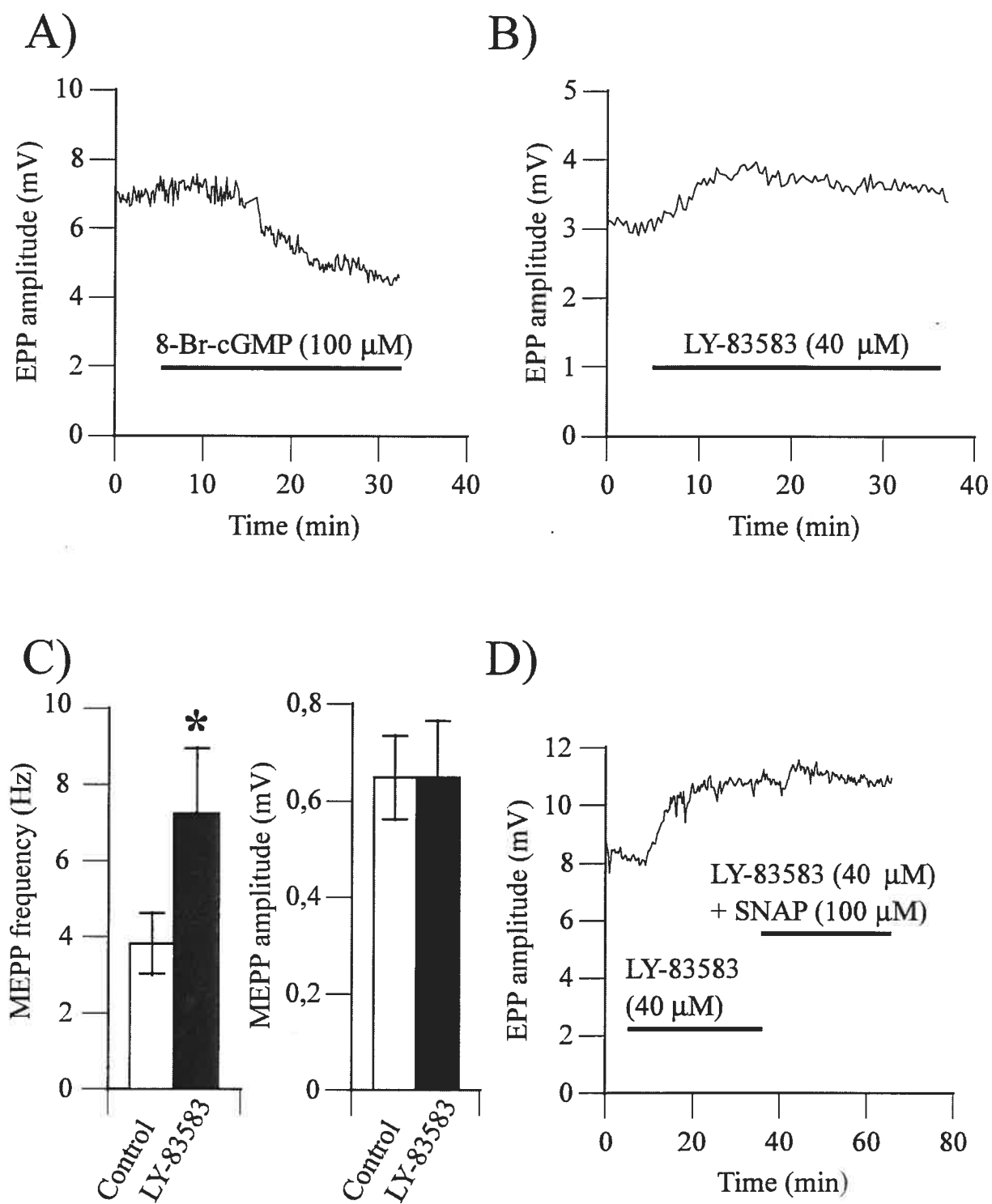


Figure 5

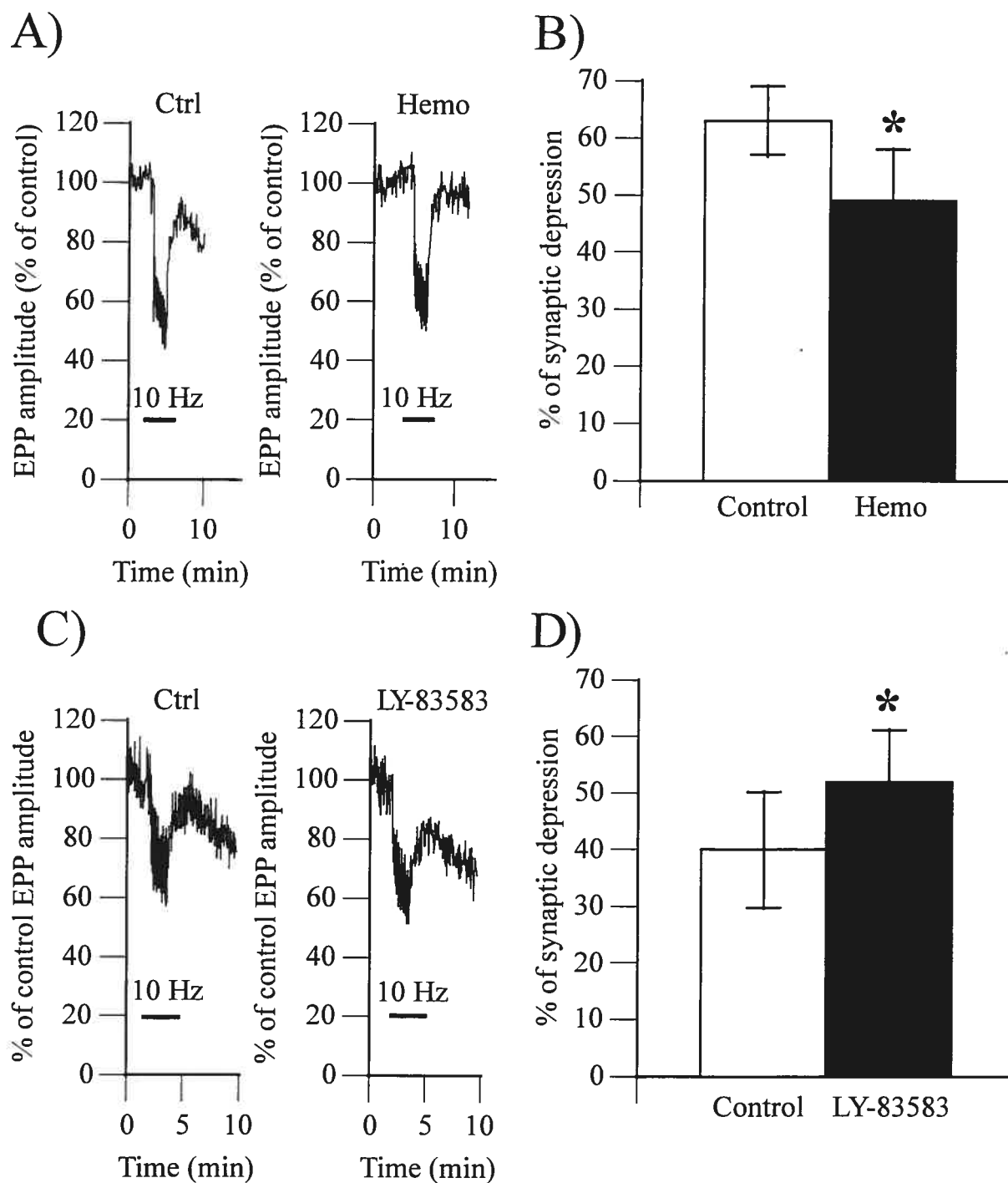


Figure 6

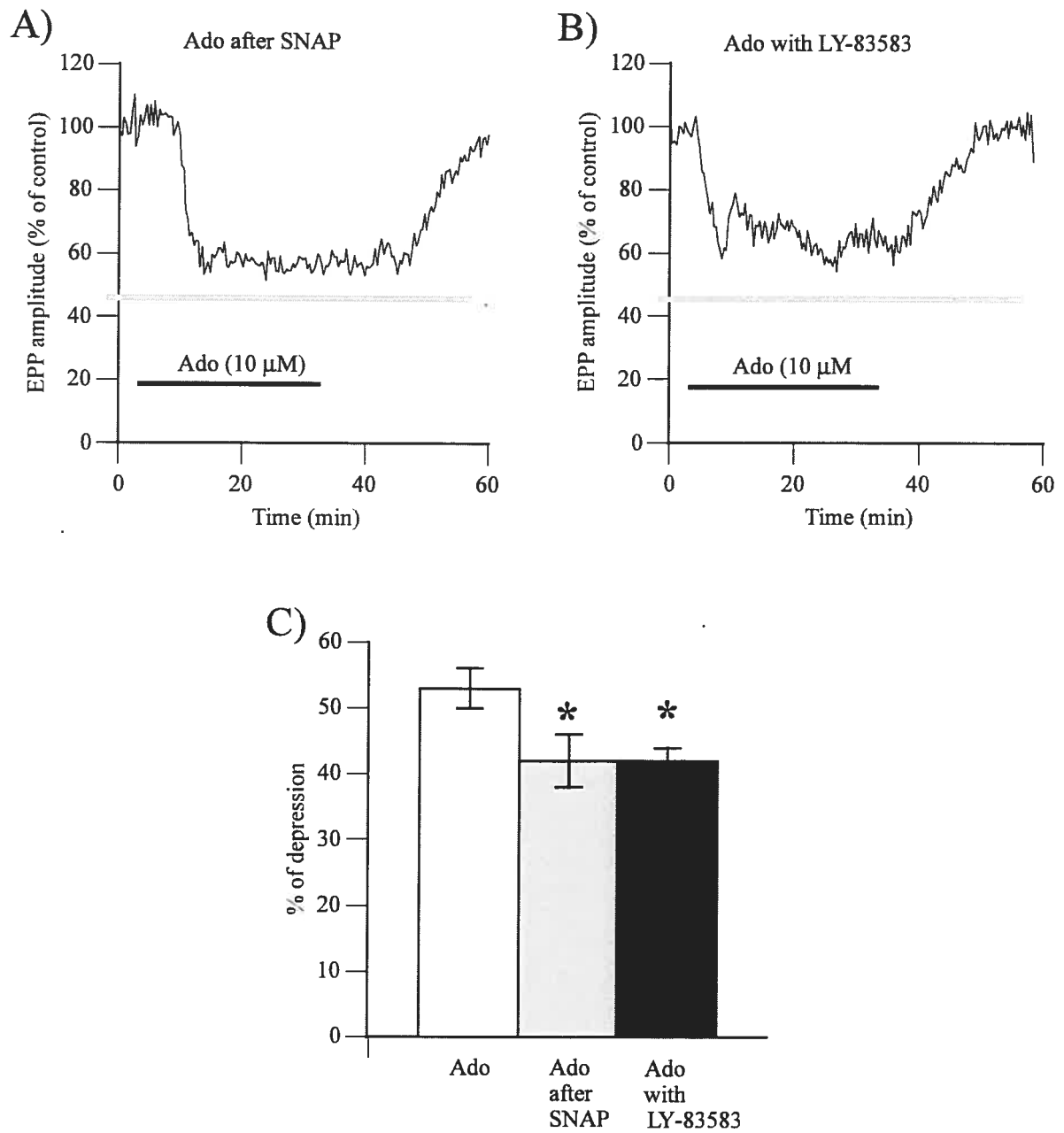


FIGURE LEGENDS

Figure 1. NO reduces neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction.

A) Time course of changes in EPP amplitude (mV) before, during and after bath application of SNAP (50 μ M). The bar represents the period of exposure to SNAP. The effects of SNAP started after 5 min and were complete by 20 min. There was no recovery, even after removal of SNAP from the perfusion. Similar results were obtained in 9 experiments. B) Left, histogram of the mean \pm S.E.M. (n=4) of MEPP frequency in control (open bar) and after a 30min exposure to SNAP (filled bar). Right, histogram of the mean \pm S.E.M. of MEPP amplitude in control (open bar) and after a 30 min exposure to SNAP (filled bar). Note that SNAP significantly reduced MEPP frequency while it had no effect on MEPP amplitude (*: $p > 0.05$ Student's one-tail paired t test).

Figure 2. Inhibition of NOS and NO chelation potentiates synaptic transmission.

A) Changes in EPP amplitude before and during bath application of the NO scavenger, hemoglobin (30 μ M). The bar represents the period of exposure to hemoglobin. Note that EPP amplitude increased in the presence of hemoglobin. Similar results were obtained in 5 experiments. B) Changes in EPP amplitude before and during bath application of the neuronal NOS inhibitor, 3-Br7-NiNa (100 μ M). EPP amplitude was increased in the presence of the NOS inhibitor. Similar results were obtained in 5 experiments.

Figure 3. Effects of NO on stimulation-evoked Ca^{2+} responses in nerve terminals.

Ca^{2+} responses obtained using the line scan mode of the confocal microscope and monitored over a nerve terminal backfilled with Ca^{2+} -green-1 Dextran. A) Top: Grayscale confocal image of a branch of nerve terminal loaded with Ca^{2+} -green-1 Dextran. The white line indicates the position of the line used to perform the line scan measurements. Bottom: grayscale image of the changes in fluorescence elicited by a brief train of stimuli (100 Hz 100 ms) observed using the line scan mode of the confocal. The top of the image is time 0 ms, the bottom is time 1024 ms (512 lines at 2 ms interval). Note the elevation in fluorescence induced by the stimulation (bar). B) Time course of Ca^{2+} responses evoked by a single action potential in control (solid line) and after a 30 min exposure to SNAP (100 μM) (dotted line). Arrow indicates the time of stimulation of the motor nerve. The peak and the duration of Ca^{2+} responses were unchanged in 4 experiments. C) Time course of Ca^{2+} responses evoked by stimulation of the motor nerve (100 Hz, 100 ms) in control (solid line) and after a 30 min exposure to SNAP (50 μM) (dotted line). Bar indicates the period of nerve stimulation. NO significantly raised the amplitude of Ca^{2+} responses in 10 experiments. D) Time course of Ca^{2+} responses evoked by prolonged stimulation of the motor nerve (100 Hz, 7 s) in control (solid line) and after a 30 min exposure to SNAP (50 μM) (dotted line). Bar indicates the period of nerve stimulation. In 10 experiments, Ca^{2+} responses were unchanged in the presence of SNAP. Bar in A, 10 μm .

Figure 4. NO activates the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent pathway.

A) Changes in EPP amplitude before and during bath application of 8-Br-cGMP (100 μ M), a cell-permeable cGMP analog. The bar represents the period of exposure to the cGMP analog. Similar results were obtained in 6 experiments. B) Changes of EPP amplitude before and during bath application of LY-83583 (40 μ M), a soluble guanylate cyclase antagonist. Note the rise in EPP amplitude in the presence of the soluble guanylate cyclase antagonist. Similar results were obtained in 14 experiments. C) Left, histogram of the mean \pm S.E.M of MEPP frequency in control (open bar) and after a 30 min exposure to LY-83583 (filled bar). Right, histogram of the mean \pm S.E.M of MEPP amplitude in control (open bar) and after a 30 min exposure to LY-83583 (filled bar). In 6 experiments, LY-83583 raised MEPP frequency and had no effects on MEPP amplitude. D) Changes of EPP amplitude in control and during bath application of LY-83583 and LY-83583 simultaneously with SNAP. The bars represent exposure to the different drugs. In 6 experiments, LY-83583 (40 μ M) increased EPP amplitude and subsequent application of SNAP (100 μ M) had no effect.

Figure 5. Regulation of frequency-induced synaptic depression by endogenous NO.

A) Changes in EPP amplitude expressed as percentage of control before, during and after high frequency stimulation (10 Hz) of the motor nerve in absence (Control) and 30 min after bath perfusion of hemoglobin (30 μ M, Hemo). Similar results were obtained in 6 experiments. B) Histogram showing the average amount of depression in control (63 \pm 6 %, open bar) and with hemoglobin (49 \pm 9 %, filled bar). In 6

experiments, hemoglobin significantly reduced the proportion of synaptic depression (*: $p < 0.05$ Student's one-tail paired t test). C) Changes of EPP amplitude expressed as percentage of control before, during and after high frequency stimulation (10 Hz) of the motor nerve in absence (Control) and 30 min after bath perfusion of LY-83583 (40 μ M, LY-83583). Similar results were obtained in 5 experiments. D) Histogram showing the average amount of depression in control (40 ± 11 %, open bar) and with LY-83583 (52 ± 12 %, filled bar). In 5 experiments, LY-83583 significantly raised the proportion of synaptic depression (*: $p < 0.05$ Student's one-tail paired t test).

Figure 6. Involvement of NO in adenosine-induced depression.

Changes in EPP amplitude expressed as percentage of control amplitude before, during and after bath perfusion with adenosine (10 μ M) following an application of SNAP (50 μ M) for 30 min. The gray band represents the mean ± 1 SEM obtained when adenosine was applied alone, with no prior treatment. Similar results were obtained in 6 experiments. B) Changes in EPP amplitude expressed as percentage of control amplitude before, during and after bath perfusion of adenosine (10 μ M) together with LY-83583 (40 μ M) following an application of LY-83583 for 30 min. The gray band represents the mean ± 1 SEM obtained when adenosine was applied alone, with no prior treatment. C) Histogram showing the average of adenosine-induced depression expressed as a percentage of control EPP amplitude and obtained in the 3 conditions tested. The amount of adenosine (ado) depression was significantly reduced when the NO-dependent mechanisms were activated (ado after SNAP) or when the cGMP-dependent cascade was blocked (ado with LY-83583) (*: $p < 0.05$ ANOVA test).

Figure 7. Model of differential frequency-dependent regulation of transmitter release by NO

Diagram of a cross section of a frog nmj depicting a PSC covering the nerve terminal facing a muscle fiber. A) Model of the tonic action of NO at the amphibian nmj where we propose that the tonic production of NO originates from the muscle fibers. This NO modulates transmitter release via a cGMP-dependent pathway while it may keep the sensitivity of PSCs for various neurotransmitters in a reduced state. The adenosine-induced depression is also regulated by the cGMP-dependent pathway which is consistent with the fact that this form of depression occurs during low level of transmitter release. B) Proposed model of the activity-dependent production of NO by the PSCs. This would occur as a consequence of the activation of the PSCs during prolonged and repetitive stimulations that would trigger the release of Ca^{2+} from internal stores and the activation of the neuronal type of NOS present in PSCs. This NO would then be modulating the release of neurotransmitter in a cGMP-independent fashion, perhaps via direct protein modification that would alter the availability of the synaptic vesicles for exocytosis or endocytosis. Abbr: PSC: perisynaptic Schwann cells, Ado: adenosine, GC: guanylate cyclase, NOS: NO synthase, nt: nerve terminal, mf: muscle fiber.

9. DISCUSSION

L'article précédent avait pour but de répondre à trois grandes questions. Quels sont les mécanismes d'action du NO à la JNM? Est-il synthétisé de façon endogène à la JNM ? Participe-t-il dans les phénomènes de plasticité synaptiques que l'on rencontre à la JNM ?

9.1. Mécanismes d'action et caractérisation des effets du NO

Tout d'abord, nous avons profité de cette étude pour caractériser les effets du NO sur la transmission synaptique. Tout comme à la JNM immature (Wang et al., 1995) et à la JNM du *sartorius* (Lindgren and Laird, 1994), nous avons montré que le NO causait une diminution de l'amplitude des PPMs. Cette diminution débutait environ 5 minutes après l'application de donneurs de NO et était complète après environ 20 minutes. Nous avons aussi observé que la diminution de l'amplitude des PPMs causée par une exposition de 30 min à un donneur de NO était irréversible. Nous avons ensuite montré que les effets du NO étaient présynaptiques puisqu'il réduisait la fréquence des PPMs sans toutefois changer leur amplitude.

Étant donné que le NO réduisait la relâche de neurotransmetteurs et que celle-ci est étroitement contrôlée par le Ca^{2+} , nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les effets du NO étaient le résultat d'une baisse de l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses. À l'aide d'un indicateur calcique fluorescent, nous avons testé les effets du NO sur l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses avec trois différents protocoles de stimulation (stimulation unique, 100 Hz 100 ms et 100 Hz 7 s). Nous n'avons observé aucune réduction de l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses en présence de NO. Curieusement, en utilisant un paradigme de stimulation de 100 Hz 100 ms, nous avons observé une légère augmentation de l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses.

Les effets du NO sur la transmission synaptique pouvaient être mimés par l'administration d'analogues du GMPc, suggérant que le NO pourrait utiliser cette voie de signalisation pour moduler la transmission synaptique. Cette hypothèse s'est confirmée lorsque les effets du NO étaient bloqués par l'utilisation d'un antagoniste de la guanylate cyclase soluble. Ces observations confirmaient l'hypothèse selon laquelle le NO réduisait la relâche de neurotransmetteurs par le biais de la voie de signalisation du GMPc.

9.2. Production endogène de NO à la JNM

La plupart des études portant sur le rôle du NO reposait sur l'utilisation de substances libérant du NO. Mais dans quelle mesure la production endogène est-elle capable de moduler la transmission synaptique ? La production endogène produit-elle des changements significatifs ? L'utilisation d'hémoglobine, un désactivateur du NO, a permis de répondre à ces questions en mettant en évidence une production endogène et tonique de NO à la JNM. En effet, l'amplitude des PPMs était augmentée de plus de 20 % lorsque la préparation était exposée à l'hémoglobine.

9.3. Implication du NO dans diverses formes de plasticité synaptique

Nous avons ensuite testé l'implication du NO dans diverses formes de plasticité synaptique. La légère augmentation dans l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses laissent croire que le NO pouvait influencer les phénomènes de potentialisation à court terme de la JNM. Pour tester cette hypothèse, nous avons vérifié les effets du NO sur la

facilitation homosynaptique, en utilisant deux stimuli séparés de 10 ms. En appui de cette hypothèse, nous avons observé une hausse significative du niveau de facilitation (PPM_2/PPM_1 : $2,13 \pm 0,15$ en contrôle versus $2,25 \pm 0,12$, $p < 0,05$ test de t de Student unilatéral pairé, $N=5$). L'augmentation dans l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses que nous avons observée lorsque le nerf moteur était stimulé à 100 Hz durant 100 ms pourrait expliquer les effets du NO sur la facilitation homosynaptique.

Finalement, nous avons testé l'implication du NO dans les phénomènes de dépression synaptique. Nous avons observé que l'amplitude de la dépression synaptique dépendante de la fréquence était réduite de 15 % lorsque le NO produit de façon endogène était désactivé par l'hémoglobine. Parce que l'hémoglobine était appliquée durant plus de 30 minutes avant l'induction de la dépression, nous pensons que la production tonique de NO avait été neutralisée par l'hémoglobine et qu'il existe une production phasique de NO, sous le contrôle de l'activité synaptique à la JNM. De plus, le NO participerait à cette forme de plasticité par un mécanisme indépendant du GMPc puisque les résultats obtenus avec l'hémoglobine ne pouvaient être répétés avec un antagoniste de la guanylate cyclase.

Il était important de mener les expériences sur la dépression dépendante à la fréquence de façon pairée. En effet, il existe une grande variabilité dans l'efficacité synaptique selon l'endroit du muscle à partir duquel les expériences sont menées (Robitaille et Tremblay, 1991). De plus, il existe une corrélation positive entre l'efficacité synaptique et le niveau de dépression synaptique atteint (Meriney and Grinnell, 1991; Dittman et al., 2000). Pour contrer ces variabilités, nous avons su tirer profit du fait que le phénomène de dépression synaptique dépendante de la fréquence est parfaitement réversible. Nous pouvons donc conclure que malgré le fait que la valeur moyenne de dépression obtenue en présence d'hémoglobine et de LY-83583 étaient semblables (environ 50 %), il nous fallait tenir compte des valeurs contrôles pour chacune des expériences afin de mesurer l'effet de ces molécules.

Nous avons aussi testé l'implication du NO dans la dépression causée par l'adénosine. Nous avons observé que le NO pourrait être impliqué dans cette forme de dépression par des mécanismes dépendants du GMPc. En effet, la dépression induite par l'adénosine était significativement réduite lorsque la préparation était préalablement exposée au NO. De plus, l'amplitude de la dépression était réduite en présence d'un inhibiteur de la guanylate cyclase. Ces données indiquent

que le NO et/ou l'activité de la guanylate cyclase sont en mesure d'influencer la dépression induite par l'adénosine.

En résumé, cet article montre l'importance des mécanismes dépendants du NO dans les phénomènes de dépression synaptique à la JNM.

CHAPITRE QUATRIÈME

—
NITRINERGIC INHIBITION OF FAST ENDOCYTOSIS
DURING SYNAPTIC DEPRESSION AT THE FROG
NEUROMUSCULAR JUNCTION

Manuscrit à être re-soumis

10. INTRODUCTION

Au chapitre précédent, nous avons vu que le NO était impliqué dans la dépression synaptique dépendante de la fréquence par des mécanismes indépendants du GMPc. Nous avons vu dans le chapitre introductif que les mécanismes d'action du NO indépendants du GMPc résultent de modifications post-transcriptionnelles de protéines. Les travaux de Meffert et al. (1994; 1996) ont inspiré ce deuxième volet de cette thèse. Dans un premier temps, ils ont montré que le NO causait l'exocytose des vésicules synaptiques par un mécanisme indépendant du Ca^{2+} (Meffert et al., 1994). Ensuite, ils ont montré que les effets du NO sur l'exocytose étaient indépendants du GMPc et que les interactions protéiniques du complexe SNAP/SNARE étaient perturbées par le NO. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle les effets du NO sur la dépression synaptique dépendante de la fréquence à la JNM étaient le résultat d'une telle réaction.

Pour visualiser les effets du NO sur la biologie des vésicules synaptiques, nous avons utilisé le FM4-64, un marqueur membranaire. Dans le manuscrit suivant, nous montrons que la participation du NO dans la dépression synaptique pourrait s'expliquer par une inhibition du recyclage rapide des vésicules synaptiques.

NITRINERGIC INHIBITION OF FAST ENDOCYTOSIS
DURING SYNAPTIC DEPRESSION
AT THE FROG NEUROMUSCULAR JUNCTION

Sébastien Thomas and Richard Robitaille
Centre de recherche en Sciences neurologiques
and
Département de physiologie,
Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada
H3C 3J7

Abbreviated title: NO inhibits fast endocytosis at the frog NMJ
Number of figures: 2
Number of pages: 30
Number of tables: 0

Corresponding author: Dr. Richard Robitaille
Département de physiologie
P.O. Box 6128, station centre-ville
Montréal, Québec
Canada H3C 3J7

Acknowledgements: We thank Jean-Claude Lacaille and Vincent Castellucci for their comments and guidance during the course of some of the experiments. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research of Canada (CIHR; Grant MT 14137), the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR; Team Grant 00ER2119) and by awards from the EJLB Research Foundation. S.T. was supported by a CIHR studentship and R.R. was a CIHR investigator.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is implicated in many forms of synaptic plasticity in the nervous system. Furthermore, there is growing evidence that NO modulates exocytosis and endocytosis mechanisms, suggesting that the regulation of synaptic vesicle (SV) recycling may influence synaptic plasticity phenomena. At the neuromuscular junction (NMJ), frequency-induced synaptic depression (depression) is an important plasticity phenomenon that has been attributed to decreases in SV or in neurotransmitter availability. However, little is known about the precise events leading to this form of synaptic plasticity. Knowing that endogenously produced NO is implicated in depression at the NMJ, we tested if NO could affect SV availability during depression through the modulation of SV recycling mechanisms. SVs were labeled with an activity-dependent membrane marker (FM 4-64) and imaged using fluorescent confocal microscopy. We observed that during depression, FM 4-64 specifically labeled a fast, short-lasting endocytotic mechanism that was inhibited by NO. Exocytotic mechanisms were also influenced by NO during depression since FM 4-64 destaining was increased in the presence of NO and since buffering endogenously produced NO with the NO-scavenger hemoglobin reduced FM 4-64 destaining. Our data suggest that NO is an important modulator of SV recycling at the frog NMJ. The nitrinergic inhibition of fast endocytosis provides a regulatory mechanism that may participate in the building of depression at the frog NMJ.

Keywords: Synaptic vesicles, FM 4-64, nitric oxide, endocytosis, exocytosis.

Synaptic plasticity is a key feature of the nervous system (Trojan and Pokorny, 1999). Short-term changes in transmitter release or postsynaptic sensitivity greatly influence the integration of neural information at synapses (Fortune and Rose, 2001; Zucker and Regehr, 2002). A simple model to study short-term synaptic plasticity is the neuromuscular junction (NMJ) where it is possible to monitor neurotransmission at the level of a single, isolated synapse with all synaptic elements preserved and intact. The NMJ displays many short-term plasticity phenomena such as facilitation, post-tetanic potentiation, augmentation and depression (Zucker and Regehr, 2002). While potentiation is often attributed to an accumulation of Ca^{2+} (Zucker, 1999; Castonguay and Robitaille, 2001) little is known about the cellular mechanisms regulating frequency-induced depression (depression). Statistic models have alternatively suggested that depression is caused by a decrease in release probability, in neurotransmitter availability or both (reviewed in Zucker, 1989). The depletion models suggest that neurotransmitter (Betz, 1970) or SV availability (Moser and Beutner, 2000) are determinant factors regulating depression. Therefore, endocytotic activity, controlling SV availability, might play a very important role in the building of depression. This idea is supported by the observation that recovery from depression is dependent on endocytosis kinetics (Wu and Betz, 1998).

Interestingly, in the central nervous system, NO has been found to modulate both exocytosis (Meffert et al., 1994) and endocytosis (Micheva et al., 2003) while, at the frog NMJ, endogenously produced nitric oxide (NO) is implicated in depression (Thomas and Robitaille, 2001). Hence, we investigated the nitrinergic regulation of SV recycling at the frog NMJ during depression.

For this purpose, we imaged synaptic vesicles using FM 4-64, a dye that reversibly stains lipid membranes (Betz and Bewick, 1993). These dyes are taken up in SVs during endocytosis and diffuse out of SVs during exocytosis. Therefore, fluorescence uptake measures endocytotic activity and fluorescence loss measures exocytotic activity. FM dyes have been successfully used for the study of SV recycling kinetics (Betz et al., 1996; Angleson and Betz, 1997; Cochilla et al., 1999). Moreover, the use of FM dyes with different lipid-binding affinities and sizes has revealed the coexistence of different recycling mechanisms at synapses (Klingauf et al., 1998; Richards et al., 2000).

Here we show that FM 4-64 selectively labeled a fast, short-lasting endocytotic process that was inhibited by NO. In addition, FM 4-64 destaining was increased in the presence of NO and reduced in the presence of NO-scavenger hemoglobin, suggesting that exocytotic mechanisms were also modulated by NO. Our data suggest that NO is an important endogenous regulator of SV recycling at the frog NMJ and that the contribution of NO in depression may be the result of its selective inhibition of fast endocytosis.

MATERIAL AND METHODS

Rana pipiens frogs (Connecticut Valley Biological, Southampton, MA) were double-pithed and immersed in normal frog Ringer's solution (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM NaHCO₃ and 15 mM HEPES, pH: 7,20, adjusted with NaOH). The cutaneous pectoris muscle together with its innervation (pectoralis proprius nerve) were then dissected and pinned into a Sylgard (Dow Corning Corporation, Midland, MI) bottom-filled experimental recording chamber. The nerve cut end was suctioned into a custom-made stimulation electrode. All experiments were performed at room temperature (21-23 °C).

Fluorescence imaging

Images were collected using a Bio-RAD (Hercules, CA) MRC 600 microscope mounted on an Olympus (Melville, NY) BX51WI microscope equipped with a 40x 0,80 NA, infinity-corrected water-immersion lens. The argon ion laser beam was attenuated to 3% of maximal intensity using neutral density filters and the 514 nm excitation line was used. Emitted fluorescence was filtered using a 550 nm long-pass filter. Bfocal (T.A Goldthrope, University of Toronto) and ImageJ softwares (1.32j Wayne Rasband, NIH) were used for off-line image analysis.

Criteria for selecting NMJs

When SVs are loaded with FM dyes, regularly spaced 1 µm-wide fluorescent dots ("puncta") appear along the nerve terminals at active zones (Betz et al., 1992). Therefore, NMJ images were not collected or were discarded during analysis when the

staining did not appear punctuated or when the staining looked like a "railroad track" resulting from non-specific loading of nerve terminal membranes. In addition, NMJs were not imaged or analyzed when the overlying perisynaptic Schwann cells (PSCs) were loaded, to avoid any interference in fluorescent measurements.

FM 4-64 loading protocol

To load the nerve terminals and to minimize the activation of PSCs, preparations were stimulated at a low frequency (1 Hz) for 30 min while exposed to FM 4-64 in closed bath. The loading was considered maximal since no additional fluorescence was obtained after that period of time when using the same stimulation paradigm. FM 4-64 background staining was removed by changing 5 times the bath with Ringer solution in which ADVASEP-7 (Cydex, Lenexa, KS, 1 mg/ml), a sulfobutylether β -cyclodextrin, was added (Kay et al., 1999).

Time course of endocytosis

Endocytosis is a complex process that occurs with different kinetics (Richards et al., 2000) and that can be influenced by the stimulation imposed on the synapse (Wu and Betz, 1996). We therefore detailed the time course of endocytosis using FM 4-64 as follow. Preparations were first perfused with normal frog Ringer solution with or without SNAP (50 μ M), an NO donor (Southam and Garthwaite, 1991), for 30 min. Second, NMJs were loaded with FM dyes using 1 min or 30 s exposures at different times following stimulation onset (delay time). After exposure, preparations were washed to remove non-specific loading and images of NMJs were collected (768 x 512

pixels at zoom 4). The time course of endocytosis was obtained by plotting the average pixel value of each NMJ according to their delay time.

Exocytosis

Muscle contractions were blocked with α -bungarotoxin, an irreversible blocker of nicotinic receptors (Dryden et al., 1974). FM 4-64-loaded preparations were perfused with normal frog Ringer solution with or without SNAP (50 μ M) or NO scavenger hemoglobin (Toothill, 1967; Murad et al., 1978) for 30 min. During exocytosis, FM dye molecules get free in the synaptic cleft, causing a loss of fluorescence from the nerve terminals. Therefore, destaining was used to evaluate exocytotic activity. Destaining was performed during the induction of depression (10 Hz 80 s motor nerve stimulation). For each muscle, 1 NMJ was imaged (192 x 128 pixels at zoom 4) at every 0,645 s to follow the destaining time course. All other NMJs analyzed were imaged (768 x 512 pixels at zoom 4) before and after stimulation (from 3 to 6 NMJs per muscle). Fluorescence changes were expressed as:

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

Drugs and reagents

NaCl was purchased from Fisher Chemicals (Fairlawn, NJ) and KCl, NaHCO₃, HEPES, CaCl₂, MgCl₂ and DMSO from Sigma (St-Louis, MO). Stock solutions of S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP, Calbiochem, La Jolla, CA) were prepared in DMSO at 50 mM and stored at 4°C. Stock solutions of FM 4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR) were prepared in DMSO at 4mM and 2 mM

respectively and stored at 4°C. Additional dilutions into physiological solutions of SNAP (50 μM), FM 4-64 (4 μM) were made just before use. Hemoglobin (Sigma) was added to physiological solutions just before use at 30 μM .

RESULTS

Using FM 4-64 as a synaptic vesicle (SV) marker, we investigated the effects of NO on (SV) recycling in our attempt to elucidate mechanisms responsible for its participation in synaptic depression at the frog NMJ.

Does NO reduce FM 4-64 uptake during depression?

Because neurotransmitter availability (Betz, 1970) as well as synaptic vesicle availability (Wu and Betz, 1998; Moser and Beutner, 2000) may be important factors contributing to depression and since NO can modulate endocytosis (Micheva et al., 2003), we first examined the effects of NO on endocytosis time course.

NMJ's were exposed to FM 4-64 for 1 min at different time relative to nerve stimulation onset (delay time) to measure the time course of endocytotic activity. We first examined FM 4-64 uptake during and after the induction of depression over a 6 min time frame. Six different loading exposures were used to detail endocytotic activity at 1 min resolution (Fig. 1A). As shown in Figure 1B, approximately 90 % of all FM 4-64 endocytosis occurred during motor nerve stimulation both in control and in preparations treated with SNAP, an NO donor (Southam and Garthwaite, 1991).

Data were best fitted with one-phase exponential decay curves ($y = F_{\max} e^{-kx}$), where F_{\max} is the maximal fluorescence value and k is the exponential decay rate. We found that NO had two effects on FM 4-64 endocytosis. First, NO significantly reduced the endocytotic activity in NMJ's. Indeed, for the first two points (Figure 1B, 0 and 1 min delay times), fluorescence uptake was significantly reduced in the presence of NO ($p < 0,05$ Student's one-tailed t test for both loadings) as also indicated by the

difference in the fitted maximal fluorescence uptake (F_{\max} : $60,74 \pm 0,65$ in control versus $50,69 \pm 0,18$ in SNAP, $p < 0,0001$ Student's two-tailed t test). Second, NO significantly altered endocytosis kinetics since the half-life ($0,69/k$) of FM 4-64 endocytosis, the period where most endocytosis occurs, was reduced by about 50 % in the presence of SNAP (37 s in control versus 19 s in SNAP, $p < 0,0001$ Student's two-tailed t test).

Since FM 4-64 endocytosis duration was very short ($\approx 1,5$ min), we detailed the first 2 min after stimulation onset using 30 s FM 4-64 exposures at different times after the beginning of stimulation. Fluorescence uptake was reduced in the presence of NO throughout the entire motor nerve stimulation. Indeed, maximal fluorescence uptake at exposure delay times 0 and 30 s were both significantly smaller in the presence of the NO donor than in control (0-30 s time frame: $47,66 \pm 3,29$ N=5 n=60 in control vs $32,6 \pm 3,249$ N=4 n=44 with SNAP, $p < 0,001$ Student's one-tailed t test; 30-60 s time frame; $34,30 \pm 5,202$ N=4 n=32 in control vs $21,38 \pm 3,78$ N=4 n=44 with SNAP $p < 0,05$ Student's one-tailed t test).

Hence, our data indicate that FM 4-64 specifically labeled a fast and short lasting endocytotic process occurring during the induction of depression. Fast endocytosis is believed to be responsible for the replenishment of the readily-releasable pool (RRP) of SVs at the NMJ (Richards et al., 2000; Richards et al., 2003). Also, we found that the effects of NO on fast endocytosis are not temporally restricted but rather results from an overall inhibition of endocytotic mechanisms. As a whole, our data indicate that NO is an important modulator of fast endocytosis at the NMJ since

not only it inhibited the maximal activity of this mechanism but it also reduced its duration.

NO modulates exocytosis during depression

Endocytotic and exocytotic mechanisms are part of a finite vesicular loop and are constantly influencing each other (Betz and Angleson, 1998; Betz and Richards, 2000). The amount of SV membrane addition during exocytosis will determine the amount of SV membrane to be retrieved through endocytosis and vice-versa: the amount of SV membrane retrieval during endocytosis will determine the number of SV available for exocytosis. Therefore, the reduction of fast endocytosis by NO could be the result of two different mechanisms: a decrease in exocytosis or an inhibition of endocytosis. To determine how NO regulates SV recycling at the NMJ, we monitored FM 4-64 destaining during depression. If NO decreases exocytosis, a reduction in destaining will be observed. On the other hand, if NO inhibits fast endocytotic mechanisms during depression, this inhibition is likely to impair SV recycling and may increase the need for recruitment of SVs in order to maintain neurotransmission. If this is so, this additional recruitment in SVs should affect the rate and increase the total amount of destaining when monitoring exocytosis with FM dyes. These two hypotheses were tested by monitoring the effects of NO on exocytosis during depression.

Preparations were first loaded with FM 4-64 (1 Hz 30 min motor nerve stimulation and FM 4-64 exposure, Fig. 2A Protocol) and then perfused with Ringer solution alone or with drugs for 30 min. Destaining, caused by a second round of

stimulation in the absence of dye in the bath medium, was used to evaluate exocytosis. In all experiments, images of NMJs were taken before and after stimulation. Additionally, one NMJ per muscle was imaged during the stimulation to follow FM 4-64 destaining kinetics (Fig. 2B,C). In control experiments, 10 Hz 80 s nerve stimulation caused a $37 \pm 1,4$ % fluorescence loss (N=5, n=18, Fig. 5B,D). NMJs treated with SNAP showed a small but significant increase in fluorescence loss during depression ($42 \pm 1,5$ %, $p < 0,0001$ one way ANOVA, $p < 0,05$ Dunnet's post-test, N=4, n=27, Fig 2B,D). These results indicate that NO increases rather than decreases the total amount of fluorescence loss during depression, possibly due to perturbed endocytosis.

At the frog NMJ, it has been proposed that an activity-dependent production of NO occurs during depression (Thomas and Robitaille, 2001). Endogenously produced NO participates in depression by cGMP-independent mechanisms and its effects can be blocked by hemoglobin, an NO scavenger (Toothill, 1967; Thomas and Robitaille, 2001). Therefore, we tested whether chelating NO produced during depression would have effects on destaining. Indeed, interfering with endogenous NO release during depression with hemoglobin (30 μ M) reduced fluorescence loss to $30 \pm 1,4$ % ($p < 0,0001$ one way ANOVA, $p < 0,05$ Dunnet's post-test, N=3, n=9; Fig. 2D). These results indicate that endogenous NO significantly affects SV recycling during depression at the NMJ.

We next examined whether FM 4-64 destaining kinetics were also modulated by NO-dependent mechanisms. For all preparations used, one NMJ was selected and imaged at every 0,645 ms during destaining. Destaining time course for each

experimental condition were averaged and fitted with exponential decay curves ($y = F_{\max} e^{-kx}$, data not shown). Destaining rate was increased in the presence of SNAP ($k: 0,0227 \pm 0,0004$, $N=4$ in SNAP vs $k: 0,0188 \pm 0,0002$, $N=5$ in control) and reduced when endogenous NO was buffered with hemoglobin ($k: 0,0115 \pm 0,0004$, $N=3$). Both SNAP and hemoglobin changes in destaining rate were highly significant ($p < 0,0001$ one way ANOVA, $p < 0,001$ Dunnet's post-test). These results are consistent with the hypothesis that the inhibition of fast endocytosis by NO influence recruitment of SVs during depression at the NMJ.

DISCUSSION

In this study, we investigated the effects of NO on SV recycling during and following synaptic depression at the frog NMJ using FM dyes. We found that NO inhibited a rapid, short-lasting endocytotic process that could be specifically labeled with FM 4-64. We also found that NO increased, and hemoglobin reduced FM 4-64 destaining during depression. Overall, our data suggest that NO is an important modulator of SV recycling at the frog NMJ and that NO-dependent depression at this synapse is likely caused by an inhibition of fast SV recycling mechanisms.

Fast and slow recycling at the NMJ

Endocytotic mechanisms are reported to follow several kinetics: from "ultra-fast" kiss-and-run mechanism (Palfrey and Artalejo, 1998) to fast clathrin-dependent endocytosis (Takei et al., 1996) and finally through a slow pathway involving cisternae intermediates (Richards et al., 2000; Richards et al., 2004). Fast processes were shown to be functionally coupled to RRP recycling whereas slow processes are involved in RP recycling (Richards et al., 2000; Richards et al., 2003; Rizzoli et al., 2003).

The endocytotic mechanism labeled by FM 4-64 in this study had a half-life of about 35 s (Figure 1). This measure is in the range of FM 1-43 uptake dynamics previously reported at the NMJ (half-life: 23 to 57 s using 30 Hz stimulations during 10 and 60 s respectively, see Wu and Betz, 1998). FM 4-64 has been reported to have similar staining properties than FM 1-43 at the NMJ (Richards et al., 2000). Although there is some mixing of SVs from the RRP and the reserve pool (10 to 20 %/h, Henkel et al., 1996b; Richards et al., 2000), and that FM 4-64 distribution was

not verified at the electron microscopy level using photoconversion (Henkel et al., 1996a), it is likely that FM 4-64 labeled synaptic vesicles of the RRP. Indeed, when SVs from the reserve pool are loaded, a 10 to 15 s lag in destaining is seen (Richards et al., 2000), which is not the case in the experiments presented here (Figure 2), where destaining occurs immediately after stimulation onset. In addition, NMJ freshly loaded with FM 4-64 could be destained immediately after loading (data not shown), a criteria defining RRP labeling and fast SV recycling. Finally, for the destaining experiments, the mild tempo of the loading protocol used (1 Hz stimulation) is unlikely to have recruited vesicles from the reserve pool. Therefore, it is likely that FM 4-64 mainly labeled vesicles of the RRP in this study.

Endocytosis and exocytosis are part of a finite loop

The main conclusion of this study is that NO reduced and shortened fast endocytosis during and following the induction of depression. The inhibition of fast endocytosis by NO could jeopardize membrane integrity and function at active zones if SV membranes are not retrieved from the plasma membrane (Delgado et al., 2000). Indeed, an inhibition of fast endocytotic activity, especially during high-frequency firing, is likely to cause SV membrane accumulation at the presynaptic membrane. It would be interesting to study whether other endocytotic mechanisms, e.g. slow SV recycling, would be upregulated to maintain synaptic structure.

Knowing that endogenous and exogenous NO reduce transmitter release at the frog NMJ (Lindgren and Laird, 1994; Thomas and Robitaille, 2001), intuitively, one should have expected exocytosis measurements (FM 4-64 destaining) to be also

reduced since they are directly related to transmitter release. However, our data showed exactly the opposite, that is, that NO increased destaining rather than reducing it.

There are two possible interpretations of these observations. First, NO may have opposite effects on exocytotic and endocytotic mechanisms, the former being potentiated and the latter being reduced. Interestingly and consistent with this hypothesis, we reported in our previous study that NO increased Ca^{2+} entry in nerve terminals during high-frequency activity (Thomas and Robitaille, 2001). Increased intracellular Ca^{2+} levels would drive a greater number of vesicles to fuse with the membrane, causing greater FM destaining. In this scenario, the combination of an increase in exocytosis together with an inhibition of fast endocytosis is likely to cause depletion of SV pools. In agreement with the depletion model, the participation of NO in depression may be the result of a decrease in SV availability leading eventually to a net reduction of transmitter release. However, the effect of hemoglobine on depression (Thomas and Robitaille, 2001) and its effect on FM4-64 destaining presented here are not in agreement with this hypothesis.

Otherwise, NO may have affected exocytosis indirectly through its actions on endocytosis. In this scenario, the inhibition of fast endocytosis by NO during high-frequency activity, when it is needed the most, may increase the need for recruitment of SVs in order to maintain neurotransmission. Since FM 4-64 labeled primarily fast endocytotic mechanisms, it appears likely that the additional FM 4-64 destaining result from recruitment of synaptic vesicles from the RRP as discussed above (Richards et al.,

2000; Richards et al., 2003). Hence, the net increase in FM 4-64 destaining may be caused by compensatory SV recruitment rather than a direct increase of exocytosis.

Putative NO-dependent mechanisms for SV recycling modulation

We previously reported that NO modulates depression at the NMJ via cGMP-independent mechanisms (Thomas and Robitaille, 2001). Nitroergic cGMP-independent mechanisms often implicate redox signaling or post-translational protein modifications such as palmitoylation and nitrosylation (Stamler, 1994). There are numerous proteins involved in exocytosis and endocytosis that could be affected by NO. For example, NO may nitrosylate proteins from the SNAP/SNARE complex and modify important protein-protein interactions implicated in SV recycling (Sudhof, 1995). Also, NO is known to cause Ca^{2+} -independent exocytosis through nitrosylation of VAMP, SNAP-25 and/or syntaxin in synaptosomes (Meffert et al., 1994; Meffert et al., 1996). This is one mechanism that could explain the apparent increase in exocytosis caused by NO.

Alternatively, NO is known to modulate palmitoylation of proteins (Hess et al., 1993; Adam et al., 1999). The vesicular protein synaptotagmin is subject to this form of post-translational modification (Heindel et al., 2003) and is a putative target for NO since it has been reported to play a role in endocytosis (Virmani et al., 2003).

As an additional mechanism, NO is also known to induce changes in cytoplasmic pH levels (Khan, 1995; Vincent et al., 1999) and intracellular acidification is known to inhibit endocytosis (Lindgren et al., 1997; Smith et al., 2002). Therefore,

modulation of pH levels appears as another putative mechanism for the actions of NO on fast endocytosis.

Endogenous NO modulates depression through the inhibition of fast endocytosis at the frog NMJ

In a previous study, we showed that synaptic depression at the NMJ was in part caused by the release of endogenous NO (Thomas and Robitaille, 2001). Hence, our observation on the mechanisms of action of NO provides a first direct evidence of the mechanisms explaining synaptic depression at the amphibian NMJ. Indeed, the inhibition of fast endocytosis and perhaps also the increase in exocytosis during sustained stimulation should decrease SV availability and favor the building of depression (Betz, 1970; Wu and Betz, 1998; Moser and Beutner, 2000). Importantly, the use of hemoglobin as an NO chelator revealed that an endogenous modulation of SV recycling by NO occurs during the induction of depression as indicated by its effects during destaining experiments.

At the frog NMJ, endogenous NO could originate from the muscle fibers or the perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at this synapse. Indeed, NO-synthase, the enzyme producing NO, has been observed in these cellular elements (Descarries et al., 1998; Ribera et al., 1998). PSCs are of particular interest since it has been shown that they modulate synaptic depression (Robitaille, 1998) and that they are activated by transmitter release at levels of activity encountered during synaptic depression (Jahromi et al., 1992). Furthermore, NO synthesized in muscle fibers may also contribute to this phenomenon as suggested by recent observations that the NO-

dependent depression may be mediated by glutamatergic mechanisms via metabotropic receptors located on the membrane at the endplate area (Pinard et al., 2002). Therefore, PSC- and/or muscle-produced NO could modulate depression by inhibiting fast endocytosis as presented in the current work. This suggests that synaptic depression at the amphibian NMJ is under the regulation of non-neuronal cells.

REFERENCES

Adam L, Bouvier M, Jones TL (1999) Nitric oxide modulates beta(2)-adrenergic receptor palmitoylation and signaling. *J Biol Chem* 274:26337-26343.

Angleson JK, Betz WJ (1997) Monitoring secretion in real time: capacitance, amperometry and fluorescence compared. *Trends Neurosci* 20:281-287.

Betz WJ (1970) Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol (Lond)* 206:629-644.

Betz WJ, Bewick GS (1993) Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 460:287-309.

Betz WJ, Angleson JK (1998) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Physiol* 60:347-363.

Betz WJ, Richards DA (2000) What goes out must come in [news]. *Nat Neurosci* 3:636-637.

Betz WJ, Mao F, Bewick GS (1992) Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci* 12:363-375.

Betz WJ, Mao F, Smith CB (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:365-371.

Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential Regulation of Transmitter Release by Presynaptic and Glial Ca^{2+} Internal Stores at the Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* 21:1911-1922.

Cochilla AJ, Angleson JK, Betz WJ (1999) Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annu Rev Neurosci* 22:1-10.

Delgado R, Maureira C, Oliva C, Kidokoro Y, Labarca P (2000) Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a *Drosophila* mutant, *shibire*. *Neuron* 28:941-953.

Descarries LM, Cai S, Robitaille R (1998) Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J Neurocytol* 27:829-840.

Dryden WF, Harvey AL, Marshall IG (1974) Pharmacological studies on the bungarotoxins: separation of the fractions and their neuromuscular activity. *Eur J Pharmacol* 26:256-261.

Fortune ES, Rose GJ (2001) Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends Neurosci* 24:381-385.

Heindel U, Schmidt MF, Veit M (2003) Palmitoylation sites and processing of synaptotagmin I, the putative calcium sensor for neurosecretion. *FEBS Lett* 544:57-62.

Henkel AW, Lubke J, Betz WJ (1996a) FM1-43 dye ultrastructural localization in and release from frog motor nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1918-1923.

Henkel AW, Simpson LL, Ridge RM, Betz WJ (1996b) Synaptic vesicle movements monitored by fluorescence recovery after photobleaching in nerve terminals stained with FM1-43. *J Neurosci* 16:3960-3967.

Hess DT, Patterson SI, Smith DS, Skene JH (1993) Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* 366:562-565.

Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069-1077.

Kay AR, Alfonso A, Alford S, Cline HT, Holgado AM, Sakmann B, Snitsarev VA, Stricker TP, Takahashi M, Wu LG (1999) Imaging synaptic activity in intact brain and slices with FM1-43 in *C. elegans*, lamprey, and rat. *Neuron* 24:809-817.

Khan AU (1995) Quantitative generation of singlet ($1\ \delta\ g$) oxygen from acidified aqueous peroxyxynitrite produced by the reaction of nitric oxide and superoxide anion. *J Biolumin Chemilumin* 10:329-333.

Klingauf J, Kavalali ET, Tsien RW (1998) Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature* 394:581-585.

Lindgren CA, Laird MV (1994) Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *NeuroReport* 5: 2205-2208.

Lindgren CA, Emery DG, Haydon PG (1997) Intracellular acidification reversibly reduces endocytosis at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 17:3074-3084.

Meffert MK, Premack BA, Schulman H (1994) Nitric oxide stimulates Ca^{2+} -independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12:1235-1244.

Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H (1996) Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions. *Neuron* 16:1229-1236.

Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, Smith SJ (2003) Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci* 6:925-932.

Moser T, Beutner D (2000) Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:883-888.

Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H (1978) Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9:145-158.

Palfrey HC, Artalejo CR (1998) Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first step. *Neuroscience* 83:969-989.

Pinard A, Lévesque S, Robitaille R (2002) NO-dependence of glutamate-mediated synaptic depression at the frog neuromuscular junction. *Soc Neurosci Abstr*.

Ribera J, Marsal J, Casanovas A, Hukkanen M, Tarabal O, Esquerda JE (1998) Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release. *J Neurosci Res* 51:90-102.

Richards DA, Guatimosim C, Betz WJ (2000) Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron* 27:551-559.

Richards DA, Rizzoli SO, Betz WJ (2004) Effects of wortmannin and latrunculin A on slow endocytosis at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 557:77-91.

Richards DA, Guatimosim C, Rizzoli SO, Betz WJ (2003) Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 39:529-541.

Rizzoli SO, Richards DA, Betz WJ (2003) Monitoring synaptic vesicle recycling in frog motor nerve terminals with FM dyes. *J Neurocytol* 32:539-549.

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

Smith RM, Baibakov B, Lambert NA, Vogel SS (2002) Low pH inhibits compensatory endocytosis at a step between depolarization and calcium influx. *Traffic* 3:397-406.

Southam E, Garthwaite J (1991) Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices. *Neurosci Lett* 130:107-111.

Stamler JS (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931-936.

Sudhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375:645-653.

Takei K, Mundigl O, Daniell L, De Camilli P (1996) The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol* 133:1237-1250.

Thomas S, Robitaille R (2001) Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21:1087-1095.

Toothill C (1967) The chemistry of the in vivo reaction between haemoglobin and various oxides of nitrogen. *Br J Anaesth* 39:405-412.

Trojan S, Pokorny J (1999) Theoretical aspects of neuroplasticity. *Physiol Res* 48:87-97.

Vincent AM, TenBroeke M, Maiese K (1999) Neuronal intracellular pH directly mediates nitric oxide-induced programmed cell death. *J Neurobiol* 40:171-184.

Virmani T, Han W, Liu X, Sudhof TC, Kavalali ET (2003) Synaptotagmin 7 splice variants differentially regulate synaptic vesicle recycling. *Embo J* 22:5347-5357.

Wu LG, Betz WJ (1996) Nerve activity but not intracellular calcium determines the time course of endocytosis at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 17:769-779.

Wu LG, Betz WJ (1998) Kinetics of synaptic depression and vesicle recycling after tetanic stimulation of frog motor nerve terminals. *Biophys J* 74:3003-3009.

Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12:13-31.

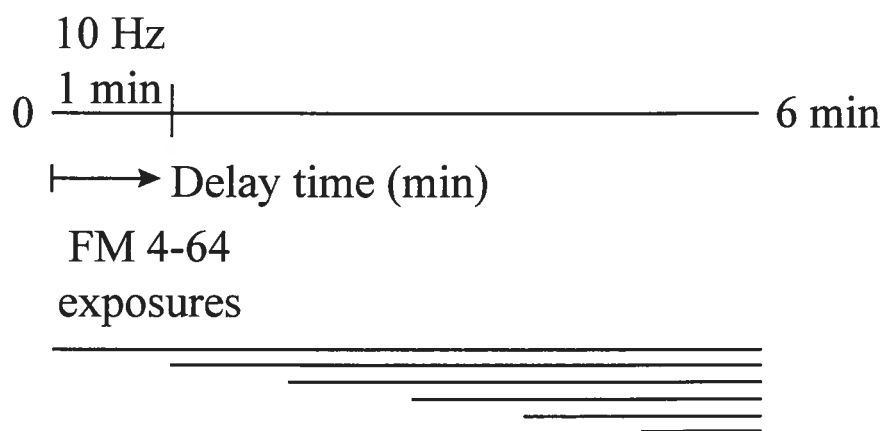
Zucker RS (1999) Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 9:305-313.

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

Figure 1

A)

Protocol



B)

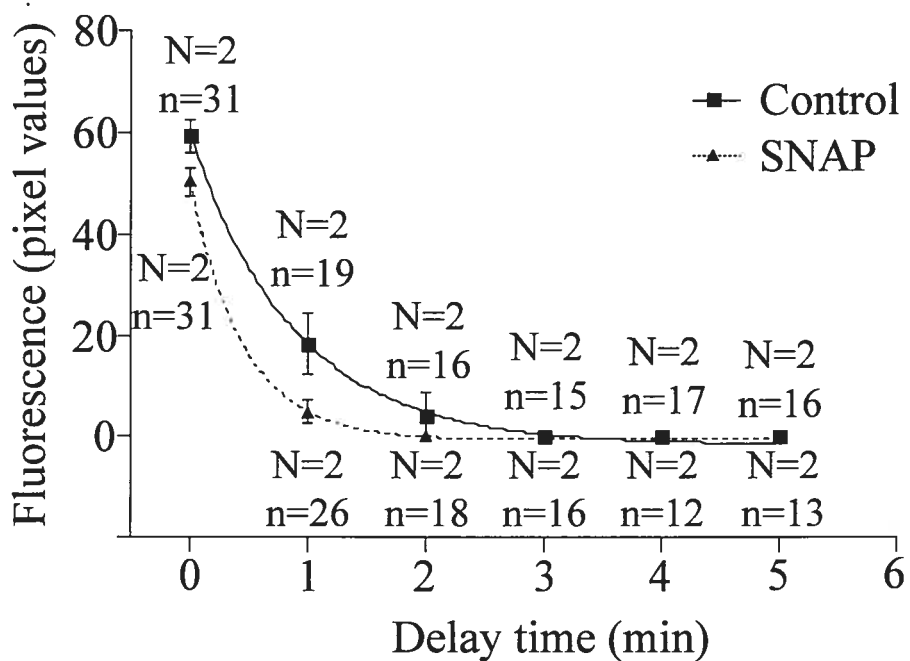
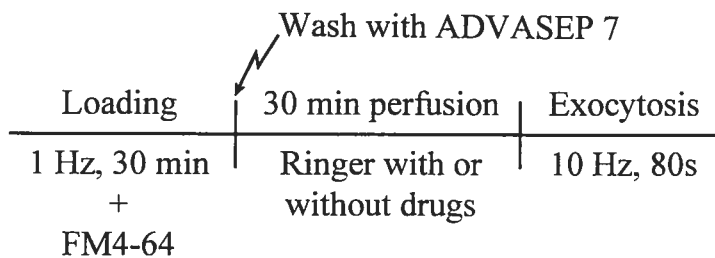
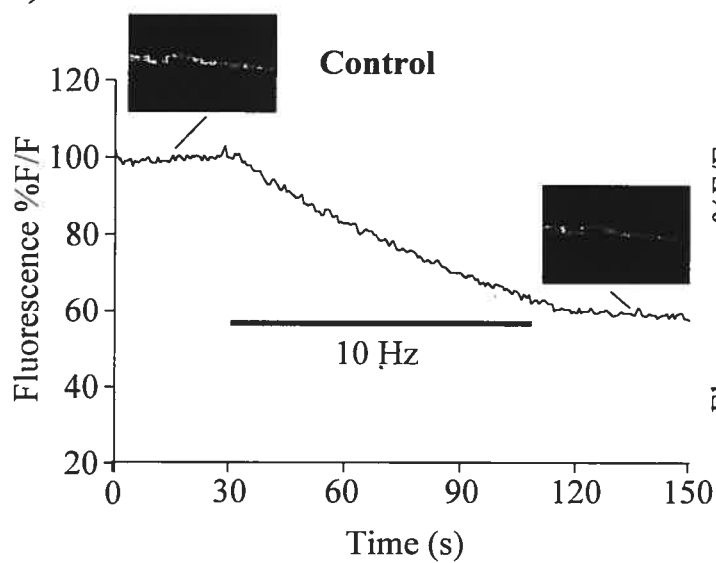


Figure 2

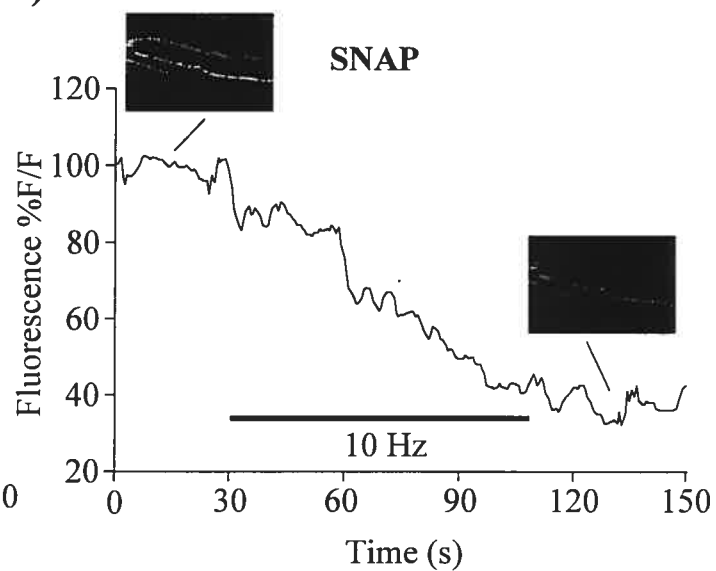
A) Protocol



B)



C)



D)

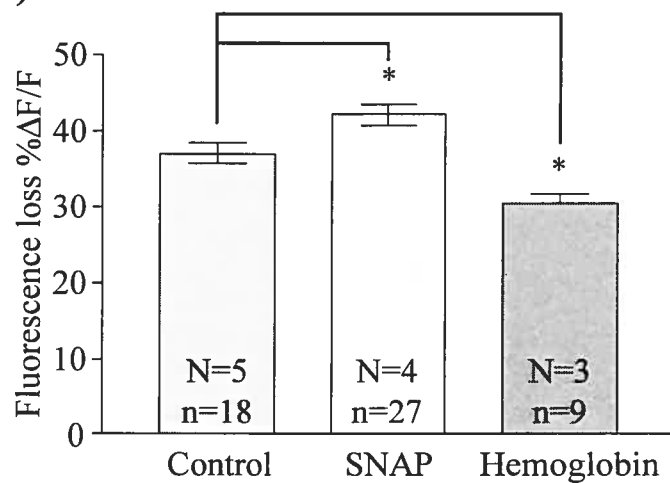


FIGURE LEGENDS

Figure 1. NO inhibits a rapid and short lasting endocytotic mechanism during frequency-induced depression. A) Protocol: endocytotic activity was monitored during 6 min after onset of frequency-induced synaptic depression (10 Hz, 60 s motor nerve stimulation). Each preparation was loaded once with one of the six different FM 4-64 loadings, differing each in delay time and exposure duration by 1 min. B) Time course of FM 4-64 endocytosis in control (squares, solid line) and in the presence of SNAP (50 μ M, triangles, dotted line). Number of muscles (N) and NMJs (n) above the curves represent the control population whereas the ones below the curve represent the SNAP-treated population. Note that most FM 4-64 uptake (\approx 90 %) occurred during stimulation. Control (solid line) and SNAP (dotted line) data were best fitted by one-phase exponential decay curves ($y = F_{\max} e^{-kx}$). Using the decay constant k, the period where most uptake occurred was determined (half-life: $0,69/k$). SNAP reduced FM 4-64 uptake duration by about 50 % (Half-life: 37 s in control, 17 s with SNAP, $p < 0,0001$ Student's two-tailed t test).

Figure 2. NO modulates exocytosis. A) Protocol: NMJs were loaded with FM 4-64 during motor nerve stimulation (1 Hz, 30 min). Background staining of lipid membranes was removed with ADVASEP 7 (1 mg/ml). Preparations were then perfused for 30 min in the presence of control solution or drugs. Destaining was performed during frequency-induced synaptic depression (10 Hz, 80 s). B) Example of NMJ fluorescence time course in a control experiment before, during and after motor nerve stimulation (10 Hz 80 s). Insets show grayscale images of the NMJ analyzed

before and after stimulation. C) Example of NMJ fluorescence time course in the presence of SNAP before, during and after motor nerve stimulation (10 Hz 80 s). Insets show grayscale images of the NMJ analyzed before and after stimulation. D) Bar graph of the percentage of fluorescence loss in control (light gray bar), in the presence of SNAP (50 μ M, open bar) and in the presence of NO-scavenger hemoglobin (30 μ M, dark gray bar). SNAP significantly increased and hemoglobin significantly decreased fluorescence loss caused by the induction of frequency-induced synaptic depression (*: $p < 0,0001$ one-way ANOVA, $p < 0,05$ Dunnett's post-test).

11. DISCUSSION

Cet article avait pour but de vérifier les effets du NO sur le cycle des vésicules synaptiques. À l'aide du FM4-64, nous avons observé une inhibition de l'endocytose par le NO affectant principalement un recyclage vésiculaire de type rapide. Cette inhibition avait des répercussions jusque dans la cinétique de l'exocytose de FM4-64.

11.1. Inhibition sélective du recyclage vésiculaire rapide par le NO

Dans notre étude, nous avons remarqué que le FM4-64 marquait les vésicules synaptiques dans un laps de temps très court. En fait, le mécanisme d'endocytose révélé par ce marqueur était temporellement restreint autour de la période de stimulation nerveuse. Ce marqueur semble donc être capable de mesurer l'activité d'un mécanisme d'endocytose de type rapide de façon spécifique.

Nous avons observé que le NO réduisait à la fois la quantité de FM 4-64 incorporée dans les terminaisons nerveuses et à la fois la durée du recyclage vésiculaire rapide. Cette inhibition de l'endocytose rapide

par le NO survient dans un moment où les terminaisons nerveuses ont le plus cruellement besoin de ce mécanisme. Comme il a été démontré, d'autres mécanismes de recyclage vésiculaires existent (Richards et al., 2000) et il est fort probable que ces mécanismes soient recrutés davantage afin de maintenir l'équilibre membranaire des terminaisons nerveuses. Toutefois, cette éventuelle compensation, par des mécanismes lents (Richards et al., 2000), ne saurait prévenir la rareté vésiculaire momentanée qui se produit durant la dépression.

11.2. La participation du NO dans la dépression

À la lumière de nos données, il nous apparaît que le NO pourrait participer dans l'établissement de la dépression synaptique en créant une rareté vésiculaire. En effet, l'inhibition du recyclage rapide pourrait, en période d'activité intense, favoriser l'épuisement des stocks vésiculaires. Nos données s'inscrivent donc en accord avec le modèle de déplétion selon lequel la disponibilité des neurotransmetteurs est un facteur crucial déterminant le développement de la dépression synaptique.

Parce que le recyclage vésiculaire rapide est important pour le maintien du RRP, parce que cette forme de recyclage est concomitante

avec le développement de la dépression synaptique et parce que la disponibilité des neurotransmetteurs est un facteur important de la dépression, notre étude indique que l'implication du NO dans la dépression synaptique à la JNM serait due à une inhibition de l'endocytose.

CHAPITRE CINQUIÈME

-

DISCUSSION GÉNÉRALE

12. LE NO EST UN MODULATEUR ENDOGENÈNE IMPORTANT À LA JNM

Les résultats présentés dans cette thèse montrent que le NO est un modulateur de la transmission synaptique et du recyclage vésiculaire, impliqué dans des phénomènes de plasticité synaptique à la jonction neuromusculaire, plus particulièrement dans la dépression synaptique dépendante de la fréquence. Dans cette discussion, nous reverrons brièvement les différents effets synaptiques du NO à la JNM et discuterons de l'impact de ceux-ci sur les différents modèles, concepts proposés pour expliquer les phénomènes de plasticité synaptique. Dans la section suivante, je vous proposerai un modèle pour expliquer les diverses fonctions du NO à la JNM et ce, en intégrant les effets métaboliques du NO à cette synapse. Finalement, à la lumière des résultats présentés et de données préliminaires qui seront incluses ici, je vous présenterai un modèle de travail montrant les boucles de régulation de la production de NO des divers composants cellulaires de la JNM.

12.1. Résumé des effets synaptiques du NO

Cette section a donc pour but de discuter des principaux résultats expérimentaux de cette thèse. Nous traiterons très brièvement de la complicité potentielle entre l'adénosine et le NO dans les phénomènes de dépression à la jonction neuromusculaire. Nous verrons aussi comment les mécanismes d'action du NO varient selon les tissus étudiés mais aussi selon l'état des synapses et/ou la concentration atteinte de NO. Nous verrons ensuite que les résultats présentés dans cette thèse supportent la théorie du modèle de déplétion pour expliquer la dépression synaptique mais, qu'en plus, ils proposent enfin un mécanisme par lequel la dépression pourrait se produire. Finalement, un schéma illustrera les principales observations des effets du NO à la JNM d'amphibien (Figure 12).

12.1.1. CARACTÉRISTIQUES DES EFFETS DU NO ET DE
L'ADÉNOSINE SUR LA TRANSMISSION
SYNAPTIQUE ET INTERACTIONS POTENTIELLES
ENTRE LEURS MÉCANISMES D'ACTION
RESPECTIFS

Dans cette section nous reverrons, dans un premier temps, les similitudes entre les effets de l'adénosine et le NO sur la transmission synaptique. Ensuite, la possibilité que ces deux molécules utilisent des mécanismes moléculaires communs ou qu'elles soient en mesure de moduler leurs mécanismes d'action de façon réciproque sera discutée.

*12.1.1.1. Similitude des effets du NO et de
l'adénosine*

Le NO et l'adénosine sont des neuromodulateurs importants dont les effets sont similaires à la jonction neuromusculaire. Tout d'abord les deux molécules causent une dépression synaptique attribuée à une baisse dans la probabilité de relâche de neurotransmetteur (Redman and Silinsky, 1994; Thomas and Robitaille, 2001). Ensuite, nous avons vu

que ces deux molécules modulent la transmission synaptique par un mécanisme n'affectant pas les niveaux calciques des terminaisons nerveuses (Redman and Silinsky, 1994; Robitaille et al., 1999; Thomas and Robitaille, 2001). De plus, l'adénosine est un modulateur de la dépression synaptique induite par la fréquence de stimulation (Meriney and Grinnell, 1991) et l'article présenté dans le troisième chapitre indique clairement que le NO est aussi impliqué dans cette forme de dépression synaptique (Thomas and Robitaille, 2001).

*12.1.1.2. Interactions moléculaires potentielles des
mécanismes d'action du NO et de l'adénosine*

Dans l'article présenté dans le troisième chapitre nous avons effectué quelques expériences afin de déterminer si le NO et l'adénosine avaient des mécanismes d'action communs ou des interactions réciproques entre leurs mécanismes d'action respectifs (Thomas and Robitaille, 2001). Nos données suggèrent que les deux molécules possèdent leur propre voie de signalisation mais qu'il existe des mécanismes permettant à ces voies de se moduler de façon réciproque.

Nous avons remarqué, qu'après une activation des mécanismes d'action dépendants du NO, que la dépression induite par l'adénosine était légèrement réduite (Thomas and Robitaille, 2001). Il en était de même lors de l'utilisation d'un antagoniste de la guanylate cyclase soluble.

L'action de l'adénosine impliquant un récepteur A_1 (Redman and Silinsky, 1994), les mécanismes d'action de l'adénosine sont liés à la voie de signalisation de l'AMPc (Ribeiro and Dominguez, 1978; Silinsky, 1984; Hirsh et al., 1990): Nous avons montré que certains effets du NO sur la transmission synaptique, dont son effet sur la dépression induite par l'adénosine, sont dépendants de l'activation d'une guanylate cyclase. Il apparaît évident que le NO et l'adénosine, bien que leurs effets soient similaires, utilisent des voies de signalisation qui sont classiquement antagonistes. Par exemple, la protéine G_i fut appelée ainsi parce qu'elle causait une baisse dans les niveaux d'AMPc cellulaire avant qu'il soit démontré qu'elle causait, en fait, une élévation des niveaux de GMPc (Lee et al., 1988). Les nucléotides cycliques de ces deux voies de signalisation peuvent activer des phosphodiesterase (Doerner and Alger, 1988; Lee et al., 1988) qui créent une inhibition réciproque de ces voies.

Il est plus que probable que la modulation par le NO de la dépression induite par l'adénosine soit le fruit d'une telle communication entre les voies de l'AMPc et du GMPc.

12.1.2. DIVERSITÉ DES MÉCANISMES D'ACTION DU NO

Les effets et les mécanismes d'action du NO sont sous l'influence de plusieurs variables : les tissus étudiés, l'état de la synapse et, enfin, de la concentration atteinte de NO.

12.1.2.1. Effets dépendants des tissus observés

Le NO est un neuromodulateur à plusieurs visages. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il est tantôt un messager rétrograde, tantôt considéré comme un neurotransmetteur. Les effets synaptiques du NO sont grandement influencés par les espèces étudiées, système étudié et même les synapses étudiées. Par exemple, dans le système nerveux central de l'aplysie, le NO est le neurotransmetteur de la synapse entre le neurone mecanoafférent C2 et la cellule métacérébrale dans le ganglion

cérébral (Koh and Jacklet, 1999). Le NO agit à cette synapse par la formation de GMPc et, pourtant, cette synapse est excitatrice. Curieusement, toujours dans le système nerveux central de l'aplysie, il a été montré que les effets neuromodulateurs du NO sur les synapses cholinergiques dépendaient de la nature (excitatrice ou inhibitrice) de la synapse (Mothet et al., 1996). En effet, les synapses cholinergiques excitatrices étaient modulées à la hausse par des mécanismes dépendants du GMPc alors que les synapses inhibitrices étaient modulées à la baisse par des mécanismes d'ADP-ribosylation (Mothet et al., 1996). Cette diversité se retrouve aussi chez les mammifères alors que le NO est impliqué dans des phénomènes de plasticité synaptique totalement opposés comme la LTD et la LTP (Haley et al., 1992; Calabresi et al., 1999).

Dans le cas du système nerveux périphérique, les effets du NO sont majoritairement inhibiteurs que ce soit au niveau des viscères (Rand and Li, 1995) ou des vaisseaux sanguins (Ignarro et al., 1981), le NO cause une relaxation de la musculature lisse par un mécanisme dépendant du GMPc. Au niveau de la musculature striée ou volontaire, le NO cause aussi une relaxation des fibres musculaires et réduit la tension générée par celles-ci (Kobzik et al., 1994). Nous savons maintenant que les effets du NO sur la musculature striée est le résultat d'une modulation

inhibitrice de la transmission cholinergique que ce soit chez le rat (Malomouzh et al., 2003), l'écrevisse (Aonuma et al., 2000) ou chez la grenouille (Lindgren and Laird, 1994 et les résultats présentés dans cette thèse). Il existe pourtant de légères différences dans les mécanismes d'action du NO à la JNM selon les tissus étudiés. Par exemple, chez le rat, le NO inhibe la relâche non-quantique d'ACh par un mécanisme dépendant du GMPc, ce qui a pour effet d'hyperpolariser les fibres musculaires (Malomouzh et al., 2003). Chez l'écrevisse, les effets du NO ont été décrits mais les mécanismes d'action n'ont toutefois pas encore été élucidés.

Dans cette thèse, nous avons montré que le NO, à un niveau d'activité synaptique faible, agit de façon présynaptique en réduisant la relâche de neurotransmetteurs par un mécanisme dépendant du GMPc. Nous avons montré que le NO n'affectait pas l'amplitude des PPMs mais réduisait d'environ 50 % la fréquence de ceux-ci. Pourtant, la seule autre étude faisant état des effets du NO à la JNM de grenouille avait montré que le NO n'affectait aucun des paramètres des PPMs (Lindgren and Laird, 1994). Cette différence ne peut s'expliquer que par une différence dans le muscle étudié. En effet, l'étude de Lindgren & Laird a été menée à l'aide de la même espèce de grenouille mais en utilisant un muscle et un donneur de NO différent. L'hypothèse d'un

effet dépendant du donneur de NO fut mise de côté lorsque nous avons obtenu les mêmes effets sur les PPMms en utilisant cet autre donneur de NO (Thomas and Robitaille, 2001). La seule variable restante est celle du muscle étudié. Notre étude a porté sur le *cutaneus pectoris*, un muscle « blanc » à contraction rapide et à innervation phasique alors que l'étude de Lindgren & Laird fut conduite à la JNM du *sartorius*, un muscle à contraction lente et à innervation tonique. Ces deux muscles montrent de nombreuses différences métaboliques et synaptiques qui sont reliées à leur fonction physiologique (Grinnell and Herrera, 1980). Il est quand même surprenant qu'une si grande différence d'effet du NO sur la probabilité de relâche de neurotransmetteurs (fréquence des PPMms) existe alors que l'effet final sur la transmission synaptique est, à peu de choses près, identique. Cette différence sera peut être expliquée lorsque l'on connaîtra la ou les cibles des systèmes dépendants du GMPc à ces synapses.

À la lumière de toutes ces variantes mécanistiques influencées par la cellule, le système ou l'organisme étudié, on peut affirmer que la voie de signalisation utilisée par le NO va être déterminée, en grande partie, par les systèmes effecteurs présents dans les cellules qui seront exposées au NO. Il apparaît donc que les systèmes nitrinergiques sont des systèmes grandement adaptés aux différents contextes que l'on retrouve

dans les organismes biologiques. C'est certainement aussi pour cette raison que l'on retrouve une si grande diversité dans la distribution des différentes isoformes de NOS dans les organismes vivants (Salter et al., 1991).

12.1.2.2. Effets dépendants de l'activité synaptique

Les effets du NO peuvent aussi être influencés par l'état des synapses, leur historique d'activation, leurs mécanismes de plasticité en fonction au moment de l'arrivée du NO. Chez l'aplysie, l'effet du NO sur les synapses cholinergiques dépend de l'activité synaptique imposée de façon expérimentale (Mothet et al., 1996). Dans cette thèse, nous avons montré que les effets du NO durant le phénomène de dépression synaptique dépendante de la fréquence sont causés par des mécanismes indépendants du GMPc. Il semble donc que lorsque des mécanismes cellulaires supplémentaires sont recrutés lors de phénomènes de plasticité, de nouvelles cibles du NO, jusqu'alors insoupçonnées, « apparaissent » en quelque sorte et montrent une nouvelle voie de signalisation utilisée par le NO. Ces observations montrent encore l'importance des systèmes effecteurs présents et actifs dans la détermination des mécanismes d'action utilisés par le NO.

12.1.2.3. Effets dépendants de la concentration ?

La concentration de NO peut-elle influencer les mécanismes d'action recrutés par le NO ? Il est vrai que dans le système nerveux central, la concentration de NO atteinte dans les tissus est un facteur important qui va déterminer si le NO aura des effets bénéfiques ou dévastateurs (Dawson et al., 1991b; Lipton et al., 1993). D'ailleurs, la haute concentration de NO générée par les iNOS serait grandement responsable des effets cytotoxiques des macrophages et neutrophiles (Dawson et al., 1991b; Lipton et al., 1993; Schmidt and Walter, 1994).

La haute affinité du NO pour les groupements hèmes pourrait expliquer le fait que la plupart des effets du NO sont dûs à l'activation de la guanylate cyclase de type soluble. Il se pourrait alors que les autres mécanismes d'action soient le résultat d'une saturation de cette voie de signalisation ou même l'absence d'une telle voie. Par exemple, dans des synaptosomes préparés à partir d'hippocampe de rats, le NO réduit la relâche de neurotransmetteur par un mécanisme dépendant du GMPc et de la PKG à basse concentration, alors qu'il agit par des mécanismes

indépendants du GMPc à haute concentration (à partir d'environ 100 μ M, Sequeira et al., 1999).

Est-ce qu'une différence dans la concentration de NO pourrait expliquer ses effets différentiels lors de la transmission synaptique et lors de la dépression synaptique à la JNM ? L'utilisation d'un bloqueur de la NOS ainsi que de l'hémoglobine a pu mettre en évidence une production endogène tonique de NO à la JNM. En outre, les effets de l'hémoglobine sur la dépression synaptique, après que cette production tonique ait été tamponnée durant 30 minutes indique qu'une production phasique, régulée par l'activité synaptique se produit aussi. Cette production phasique entraîne-t-elle une plus grande concentration synaptique de NO ? Serait-ce la raison pour laquelle le NO agit alors par un mécanisme indépendant du GMPc ? Pour tenter de répondre à ces questions, il faudrait mesurer les niveaux de NO de façon directe, en ampérométrie (Schmidt and Mayer, 1998; Berkels et al., 2001; Mizutani, 2002) ou encore par l'utilisation de marqueurs fluorescents du NO (Kojima et al., 1998; Itoh et al., 2000).

12.1.3. LA DÉPRESSION SYNAPTIQUE ET L'HYPOTHÈSE DU MODÈLE DE DÉPLÉTION

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la dépression synaptique dépendante de la fréquence est la forme de plasticité à court terme la plus importante à la JNM. Le modèle le plus accepté pour expliquer la dépression synaptique est le modèle de déplétion. Ce modèle, comme la plupart des autres modèles, est tiré d'une étude statistique d'observations expérimentales. Ce modèle provient de l'application de la loi de Poisson à l'étude de la transmission synaptique. Dans ce modèle mathématique, les PPMs sont le résultat d'une combinaison de deux facteurs statistiques nommés n et p où la variable p est la probabilité de relâche de neurotransmetteurs. De nombreuses variantes du modèle de déplétion existent dans lesquelles la variable n peut représenter le nombre de vésicules synaptiques, le nombre de vésicules à relâche immédiate ou encore le nombre de zones actives (Zucker, 1989). Tous ces modèles s'entendent toutefois sur l'importance d'une baisse dans la valeur de la variable n pour expliquer l'apparition de la dépression synaptique. Mais quelle est la juste représentation de la variable n ? Et qu'est-ce qui cause cette réduction de la variable n ? Les

données de cette thèse fournissent une partie de la réponse, du moins en ce qui a trait à la JNM d'amphibien.

12.1.4. L'INHIBITION DE L'ENDOCYTOSE RAPIDE DURANT LA DÉPRESSION

Les données présentées dans cette thèse proposent un mécanisme par lequel le NO pourrait participer dans la dépression synaptique à la JNM. En effet, nous montrons ici un nouvel effet synaptique du NO : une inhibition de l'endocytose. Cet effet du NO s'inscrit directement dans le modèle de déplétion et pourrait expliquer comment le NO participe à la dépression. En appliquant à la variable n le nombre de vésicules synaptiques disponibles, la participation du NO à la dépression pourrait être expliquée par une baisse de la valeur de n , causée par son inhibition de l'endocytose rapide. L'endocytose rapide est un mécanisme crucial dans le recyclage et l'approvisionnement vésiculaire du RRP. D'ailleurs, la neurotransmission est soutenue presque entièrement par le recyclage vésiculaire et fait très peu appel au RP à moins de 40 Hz à la JNM d'amphibien (Betz and Bewick, 1993). L'important appauvrissement des stocks vésiculaires qui serait causé par le NO pourrait donc expliquer sa participation dans la dépression. Cette étude

vient donc renforcer l'importance de l'endocytose et de la fameuse variable n dans le façonnement des phénomènes de plasticité synaptiques.

12.1.5. PROTÉINES PROPOSÉES COMME CIBLE DU NO

Comme nous l'avons vu précédemment dans l'introduction, les effets indépendants du GMPc du NO résultent principalement de modifications post-transcriptionnelles de protéines. Nous verrons au niveau de quels résidus protéiques de telles modifications sont-elles les plus sujettes à se produire.

12.1.5.1. Importance des résidus cystéine

Rappelons ici les mécanismes indépendants du GMPc du NO : la nitrosylation, l'ADP-ribosylation et la palmitoylation, tous des mécanismes de modifications post-transcriptionnelles de protéines. En étudiant les résidus protéiques touchés par ces mécanismes, on recoupe à plusieurs reprises les résidus cystéine. En effet, la nitrosylation, l'attachement direct du NO à une protéine, se produit au niveau des liaisons thiols (ponts disulfures) entre deux résidus cystéines (Lipton et al., 1993; Stamler, 1994). L'ADP-ribosylation vise aussi les résidus

cystéines (Jacobson et al., 1990; McDonald et al., 1992) de nombreuses protéines dont l'actine (Just et al., 1994) et les protéines G (Tanuma et al., 1988; Kitamura et al., 1990). La palmitoylation ou la conjugaison d'acides gras est une autre modification post-transcriptionnelles modulée par le NO qui a aussi lieu au niveau des résidus cystéine (Heindel et al., 2003). Les résidus cystéine et les ponts disulfures sont présents dans la majorité des protéines, ce qui rend difficile la proposition de cibles protéiques précises pour médier les effets du NO.

12.1.5.2. Protéines endocytotiques pouvant médier les effets du NO

Quelles pourraient être les protéines ciblées par le NO responsables de ses effets sur le recyclage vésiculaire ? Il existe une famille d'enzyme appelée Arf (ADP-ribosylation factor) qui contrôle de façon étroite les divers aspects du cycle des vésicules synaptiques ainsi que du trafic vésiculaire intracellulaire au niveau des endosomes et du Golgi (Lenhard et al., 1994; D'Souza-Schorey et al., 1995; Faundez et al., 1997). De cette famille, l'Arf 1 et 6 sont les plus étudiées et sont impliquées dans toutes les étapes de l'endocytose : la formation de la vésicule, son recyclage et son retour à la membrane (Radhakrishna and

Donaldson, 1997; D'Souza-Schorey et al., 1998; Gu and Gruenberg, 2000; Schafer et al., 2000; Donaldson and Radhakrishna, 2001). Étant donné que le NO peut influencer les niveaux d'ADP-ribosylation de protéines, l'activation de certaines Arf pourrait représenter un mécanisme d'action potentiel pour le NO. Seulement, les Arf ont habituellement un effet facilitateur sur l'endocytose (Krauss et al., 2003) alors que nous avons montré que les effets du NO sur l'endocytose sont inhibiteurs. L'ADP-ribosylation n'apparaît donc pas comme un mécanisme d'action probable pour expliquer les effets du NO que nous avons observé.

Une protéine qui pourrait être touchée par les modifications post-transcriptionnelles causées par le NO est la synaptotagmine. La synaptotagmine est une protéine impliquée dans la formation des puits et manteaux de clathrine dont les ponts disulfures de leur domaine C2 sont nécessaires à sa fonction (von Poser et al., 2000). Le domaine C2 de la synaptotagmine est justement un domaine sujet à la palmitoylation (Heindel et al., 2003). Il a été montré que des mutations du domaine C2 de la synaptotagmine accélèrent les processus d'endocytose rapide (Virmani et al., 2003). Il est donc possible que l'inhibition de l'endocytose rapide par le NO que nous avons observée soit due à la consolidation de la structure du domaine C2 de la synaptotagmine par palmitoylation (Heindel et al., 2003). Il existe deux domaines C2 dans la synaptotagmine (C2a et b), le domaine C2a étant impliqué dans

l'exocytose, liant le Ca^{2+} et les syntaxines, le domaine C2b étant impliqué dans l'endocytose, se liant à l'AP-2. Cette double nature du domaine C2 pourrait expliquer pourquoi le NO est tantôt impliqué dans l'exocytose (Meffert et al., 1994; Meffert et al., 1996), tantôt dans l'endocytose (Micheva et al., 2003). Il est possible que ces deux sous-domaines soient modulés de façon indépendante.

12.1.6. RÉSUMÉ DES EFFETS SYNAPTIQUES DU NO À LA JNM

Il semble maintenant à propos d'effectuer un bref rappel des effets synaptiques du NO à la JNM d'amphibien, en utilisant un schéma (Figure 12) illustrant la diversité et la complexité des effets du NO. Les effets synaptiques du NO peuvent être classifiés selon les mécanismes d'action recrutés et par l'élément cellulaire synaptique ciblé. Au niveau de la terminaison nerveuse, le NO réduit la probabilité de relâche de neurotransmetteurs par un mécanisme dépendant du GMPc. De plus, il régule la disponibilité des vésicules synaptiques en inhibant l'endocytose durant la dépression synaptique par un mécanisme qui serait indépendant du GMPc. Finalement, le NO pourrait aussi réguler la sensibilité des CSP aux différents neurotransmetteurs de la JNM. Cette diversité de

mécanismes et de cellules cibles en fait un neuromodulateur endogène très important pour la JNM.

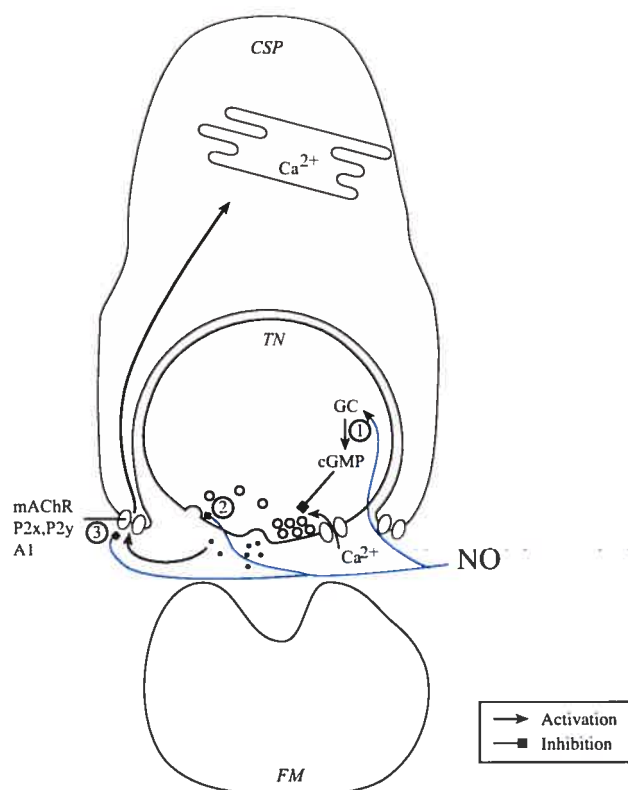


Figure 12. Schéma récapitulatif des divers effets synaptiques du NO.

Le NO a des effets variés sur la synapse neuromotrice d'amphibien. Dans un premier temps (1), le NO active une guanylate cyclase (GC), entraînant une production de GMPc. Cette synthèse de GMPc inhibe la relâche de neurotransmetteur sans modifier l'entrée de Ca²⁺ dans les terminaisons nerveuses, en réduisant la probabilité de relâche (Thomas and Robitaille, 2001). Ensuite, le NO inhibe l'endocytose des vésicules synaptiques durant la dépression, par un mécanisme qui serait GMPc indépendant (2). Finalement (3), il a aussi été montré que le NO pouvait réduire la sensibilité des CSPs aux différents neurotransmetteurs relâchés durant la dépression (Descarries et al., 1998).

Avec cette synthèse en mémoire, nous allons maintenant, dans la section suivante, étendre notre discussion sur d'autres effets du NO à la JNM et je vous proposerai un modèle qui intègre aussi les divers rôles métaboliques du NO à la JNM (Figure 13).

12.2. Raison d'être du NO à la JNM

Outre les effets synaptiques que nous avons rapporté, peut-on dresser un tableau qui intégrerait les différents effets du NO à la JNM et qui pourrait expliquer son rôle à la JNM ? Dans la section qui suit, je vous présenterai ma vision du rôle du NO à la JNM.

12.2.1. EFFETS DE LA PERTE DE NOS À LA JNM

Une des approches pour déterminer le rôle d'une molécule est d'observer la physiologie d'un tissu lorsque cette molécule est inactivée, inexprimée ou carrément effacée du patrimoine génétique d'un modèle animal. On peut observer les effets d'une perte de NOS à la JNM sur deux modèles animaux en particulier : des souris dont le gène de la

nNOS a été éliminé de leur génôme (nNOS $\alpha^{\Delta\Delta}$) ou des souris atteintes d'un syndrome de dystrophie musculaire (souris mdx).

12.2.1.1. Souris nNOS $\alpha^{\Delta\Delta}$

Les souris nNOS $\alpha^{\Delta\Delta}$ diffèrent de leurs congénères de type sauvage par plusieurs traits comportementaux. On note chez elles un tempérament beaucoup plus agressif et des comportements reproducteurs excessifs, inadéquats (Nelson et al., 1995). Du côté moteur, on note aussi une plus grande activité physique chez ces souris (Putzke et al., 2000) mais aussi une perte de coordination qui se manifeste surtout la nuit (Kriegsfeld et al., 1999). Malheureusement, il n'y a que très peu d'étude sur la physiologie nitroergique musculaire de ces souris, les études se concentrant surtout sur l'implication de la NOS dans les fonctions du système nerveux central. Il serait très intéressant de conduire une étude de la transmission synaptique à la JNM sur de tels modèles animaux.

12.2.1.2. *Souris mdx*

Un modèle alternatif pour examiner les effets d'une perte de NOS à la JNM est la souris *mdx*. Cette souris est un modèle murin servant à étudier la dystrophie musculaire. Cette souris affiche les symptômes de la dystrophie musculaire de Duchenne causés par une mutation de la dystrophine, une protéine postsynaptique structurale importante. La dystrophine crée un véritable complexe protéique auquel de nombreuses protéines se lient, la nNOS en faisant partie (Brenman et al., 1995; Brown, 1997). La mutation de la dystrophine empêche l'attachement de la NOS à la membrane postsynaptique musculaire et la NOS cytoplasmique est alors rapidement dégradée (Brenman et al., 1995).

L'utilisation de ce modèle pour étudier la fonction de la NOS est contestable puisque la mutation de la dystrophine entraîne la perte de localisation de nombreuses autres protéines. Il est donc difficile de statuer sur les conséquences directes d'une perte de fonction de la NOS alors que de multiples facteurs sont aussi perturbés.

Néanmoins, la perte de la NOS musculaire de ces souris entraîne une foule de déficits métaboliques qui pourraient grandement contribuer

au développement des pathologies de dystrophies musculaires (Chinet et al., 1994). Les importants effets métaboliques du NO pour la jonction neuromusculaire sont décrits dans la section suivante.

12.2.2. EFFETS MÉTABOLIQUES DU NO

En plus du rôle du NO lors de la formation de la JNM et des effets synaptiques de celui-ci, le NO contrôle aussi de nombreuses fonctions physiologiques destinées à l'équilibre énergétique de la JNM. Il joue, entre autres, un rôle capital dans le contrôle de l'approvisionnement sanguin et dans le métabolisme des sucres des fibres musculaires.

12.2.2.1. Régulation de l'apport sanguin

Un des rôles métaboliques ou énergétiques important du NO est le contrôle de l'apport sanguin musculaire. En effet, le NO est un vasodilatateur bien connu et il a été observé que le NO généré par les fibres musculaires lors de leur activité contractile régulaient leur apport sanguin (Thomas et al., 1998). Cette régulation de l'apport sanguin est

une fonction importante mais peut être absente au niveau des muscles à fibres blanches, qui sont relativement peu irrigués, comme c'est le cas du muscle utilisé dans cette thèse.

12.2.2.2. Régulation du métabolisme des sucres

En plus de son contrôle de l'apport sanguin musculaire, le NO module aussi les réactions biochimiques du cycle des glucides (Young et al., 1997). En effet, le NO augmente la capture des glucides par les fibres musculaires; augmente la glycolyse et favorise le démantèlement du glycogène (Young et al., 1997). Pour revenir brièvement aux modèles animaux dystrophiques, il a été observé que les fibres musculaires des souris mdx affichaient des carences dans leur efficacité à utiliser le glucose et les acides gras (Even et al., 1994). Le NO est donc un régulateur métabolique important pour les fibres musculaires.

12.2.3. RÔLE DU NO À LA JNM

Si l'on fait la synthèse de ses divers effets, on remarque que le NO est une molécule-clef de la JNM qui pourrait réguler l'homéostasie de

cette synapse d'une part en réduisant la relâche de neurotransmetteur, en participant à la dépression synaptique lors d'activité neuromusculaire intense, tout en favorisant la récupération musculaire par une augmentation de son irrigation sanguine et par une facilitation de son utilisation des sucres (Figure 13). Il est intéressant de noter que les bienfaits métaboliques du NO sont justement absents dans les modèles de dystrophies musculaires où le métabolisme énergétique est déficient (Even et al., 1994; Mokhtarian et al., 1996; Mokhtarian and Even, 1996). En terminant, le NO pourrait aussi participer au maintien de l'intégrité structurelle de la plaque motrice en favorisant l'expression de protéines structurales membranaires comme l'utrophine, une protéine ayant une grande homologie fonctionnelle avec la dystrophine (Rafael et al., 1998; Chaubourt et al., 1999; Gramolini et al., 2000; Chaubourt et al., 2002). Pour compléter son rôle « nourricier » favorisant la récupération des fibres musculaires, le NO serait aussi impliqué dans l'activation de cellules satellites qui participent à la régénération musculaire (Anderson, 2000).

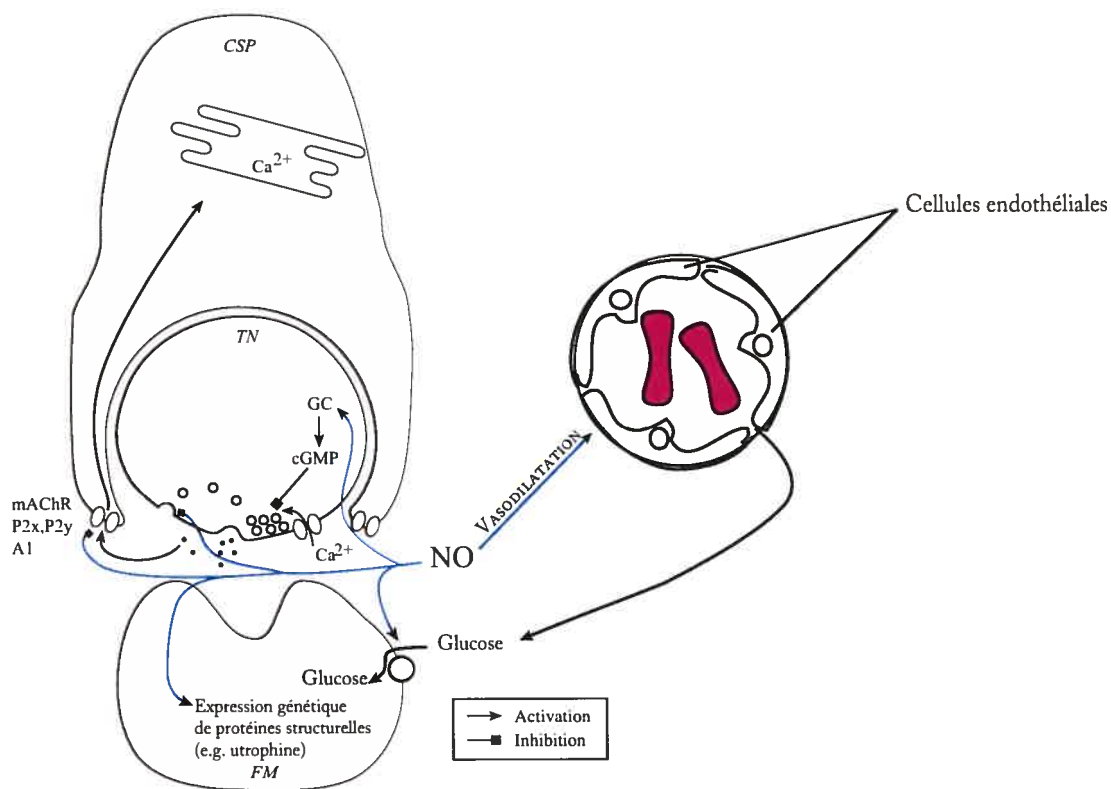


Figure 13. Modèle intégrant les effets synaptiques et métaboliques du NO.

En plus des effets illustrés auparavant (Figure 12), le NO produit par la JNM est capable de réguler l'afflux sanguin musculaire, de stimuler la capture de glucose par les fibres musculaires et, finalement, le NO est un important régulateur de l'expression de protéines structurales musculaires.

12.3. Les sources de production endogène de NO à la JNM

Le NO est donc une molécule-clef et il serait important de connaître les éléments cellulaires de la synapse qui synthétisent ce messager cellulaire, quelles sont les voies de signalisation qui contrôlent cette production de NO et, finalement, de déterminer dans quelles conditions physiologiques le NO est produit à la JNM. Cette dernière partie de la discussion va tenter d'éclairer ces points soulevés en synthétisant les données amassées sur le NO ainsi qu'en considérant des résultats préliminaires prometteurs obtenus récemment à l'aide d'une nouvelle génération de marqueurs fluorescents du NO.

12.3.1. RÔLE POUR LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE ?

Étant donné que le NO est une molécule ayant la propriété de diffuser à travers les membranes biologiques, est-ce que son lieu de synthèse est important dans la détermination de ses effets synaptiques et/ou métaboliques ? La prochaine section va s'intéresser à cette question.

*12.3.1.1. Rayon de diffusion du NO vs la dimension
de la JNM*

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le NO est un messager diffusible ayant une portée d'environ 200 nm (Keitoku et al., 1988). Il est à noter que ce rayon d'action a été déterminé sur des préparations vasculaires et que le réel rayon d'action du NO à la JNM est inconnu. Le rayon d'action du NO est très certainement variable et doit dépendre de la sensibilité des cellules et mécanismes cibles, de même que de la concentration de NO produite par la production endogène de la JNM. Par exemple, le rayon d'action du NO en ce qui a trait à son effet vasodilatateur pourrait être assez grande puisque la musculature lisse des artérioles se situe bien en amont de la synapse.

Nous avons déjà discuté de la possibilité que les effets du NO soient influencés par la concentration de NO atteinte à un temps et un lieu donné (12.1.2.3 Effets dépendants de la concentration ?). À l'instar des microdomaines calciques, il est possible que la localisation de la synthèse du NO joue un rôle dans l'établissement des mécanismes d'action qui vont être responsables des effets du NO.

Dans les sections suivantes, je vous présenterai les boucles de régulation de la production de NO qui ont été proposées pour expliquer les effets du NO à la JNM. Dans un premier temps, nous verrons un modèle de production de NO à partir de NOS musculaire, ayant pour molécule régulatrice le glutamate. Nous verrons ensuite un modèle de production de NO impliquant les CSPs.

12.3.2. LA FIBRE MUSCULAIRE

Avant de présenter le modèle de production de NO par les fibres musculaires, il est opportun de revoir les preuves expérimentales de la présence de NOS dans les fibres musculaires. Nous terminerons par la présentation des mécanismes susceptibles de réguler la synthèse musculaire de NO.

12.3.2.1. Études de la distribution de la NOS musculaire

Bien qu'il y ait eu plusieurs études de localisation de la NOS à la JNM, la plupart de celles-ci ont été conduites aux JNM de rat et de

souris. Seulement deux études se sont intéressées à la distribution de cette enzyme à la JNM de grenouille (Descarries et al., 1998; Ribera et al., 1998). Malheureusement, ces études fournissent très peu d'indication sur la localisation précise de l'enzyme au niveau des fibres musculaires.

Dans l'étude de Ribera et al. (1998), on ne retrouve qu'une courte description de la distribution de la NOS à la JNM de grenouille. À l'aide d'immunohistochimie, on y signale que l'enzyme se retrouve très concentrée dans les fuseaux neuromusculaires (nerfs et fibres) et qu'un marquage de plus faible intensité se retrouve au niveau du sarcolemme, distribué en petit amas, aux plaques motrices (Ribera et al., 1998). Malheureusement, cette description n'est supportée par aucune figure et l'on doit se contenter d'images de la JNM de rat « en tout point semblables » (Ribera et al., 1998). Finalement, l'anticorps utilisé dans cette étude était dressé contre la nNOS de rat et aucun western blot à partir de tissu de grenouille démontre la spécificité de cet anticorps. Cet anticorps aurait pu, par exemple, détecter la eNOS (Descarries et al., 1996).

L'étude de Descarries et al. (1998) a fait appel à deux techniques pour vérifier la distribution de la NOS à la JNM de grenouille. La

première est une technique histochimique appelée NADPH-diaphorase (Dawson et al., 1991a). Cette technique tire avantage de la forte activité réductase de la NOS et du fait qu'il s'agit d'une des seules activités enzymatiques qui persistent après la fixation des tissus. Le substrat de ce marquage est le NBT (nitro blue-tetrazolium) qui est réduit en formazan, qui forme un précipité bleu foncé en microscopie à lumière transmise. À l'aide de cette technique Descarries et al. ont observé que le marquage NADPH-diaphorase était circonscrit par les limites du marquage aux cholinestérase, indiquant un marquage synaptique. À haute magnification, ils ont observé un marquage ponctué des CSPs par cette technique.

Cette technique affiche par contre certains défauts. Premièrement, elle prend pour acquis que seule l'activité de la NOS est maintenue suite à la fixation des tissus. Ceci est peut être vrai pour le système nerveux central et pour les tissus de mammifères mais la spécificité de cette technique n'a pas été évaluée chez la grenouille. De plus, cette technique procure une pauvre résolution spatiale, un facteur crucial lorsque l'on connaît le contact intime des éléments cellulaires de la JNM. Le fait que la NOS n'ait pas pu être détectée par immunocytochimie aux fibres musculaires, que la spécificité de l'anticorps ait été testé par western blot et que la NOS ait pu être

détectée dans les CSPs laissent planer un doute quant à la présence de cette enzyme à la plaque motrice de la JNM d'amphibien. Il serait plus qu'opportun de développer un anticorps spécifique à la version amphibienne de la nNOS et de vérifier la distribution musculaire de cette enzyme en microscopie électronique. Étant donné que la forme musculaire de la nNOS est plus longue (Silvagno et al., 1996), il serait surprenant qu'elle montre une moins grande immunoréactivité. En effet, on pourrait imaginer qu'une protéine tronquée pourrait avoir perdu quelques épitopes et être moins immunoréactive mais ce n'est pas du tout le cas ici.

Une bibliothèque des gènes codant pour les différentes NOS chez la grenouille permettrait d'utiliser des techniques additionnelles telles l'hybridation *in situ* ou la RT-PCR. Malheureusement, il n'y a pas d'effort en ce sens pour la *Rana pipiens*. Par contre, les génomes des *Xenopus Laevis* et *tropicalis* seront bientôt complets et l'on pourrait se servir de leurs séquences pour sonder les tissus de la *Rana pipiens*.

Il faut quand même reconnaître que le marquage NADPH-diaphorase obtenu au niveau des fibres musculaires est absent ou grandement réduit en présence d'inhibiteur métaboliques de la NOS, comme le L-NAME et le L-NMMA (Descarries et al., 1998).

Toutefois ces antagonistes métaboliques de la NOS ne font aucune discrimination entre les différentes isoformes de la NOS. Il est donc probable que le marquage musculaire résulte d'une NOS (puisque absent en bloquant l'activité enzymatique des NOS) mais d'une isoforme non-neuronale (puisque non reconnue par l'anticorps). En effet, il existe une forte concentration de eNOS dans les mitochondries musculaires (Bates et al., 1995) dont la présence peut être révélée par le marquage NADPH-diaphorase (Planitzner et al., 2000).

Outre la présence ou non de la NOS dans les fibres musculaires, un système responsable de son activation doit être présent afin qu'elle ait un impact fonctionnel à la JNM. La prochaine section présentera un modèle de régulation de la synthèse du NO par les fibres musculaires.

12.3.2.2. Mécanisme d'activation de nNOS musculaires par le glutamate

Un modèle de régulation glutamatergique de la synthèse de NO par les fibres musculaires à la JNM d'amphibien a été proposé récemment (Pinard et al., 2002). À cette synapse traditionnellement considérée purement cholinergique, le glutamate est un neuromodulateur

important dont les effets sur la transmission synaptique sont similaires à ceux du NO (Pinard et al., 2003). Il a donc été suggéré que le NO et le glutamate pouvaient faire partie de la même boucle de régulation de la transmission synaptique à la JNM, le NO agissant en tant que messager transcellulaire (Pinard et al., 2002).

Ce modèle est suggéré par une série d'observations expérimentales. Tout d'abord, le glutamate a des effets sur la transmission synaptique qui sont similaires à ceux du NO. En effet, l'administration de glutamate cause une diminution de l'amplitude des PPMs ainsi que de la fréquence des PPMs (Pinard et al., 2003). Tout comme le NO, le glutamate réduit la relâche de neurotransmetteurs sans réduire l'entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses (Pinard et al., 2003). De plus, la dépression synaptique dépendante de la fréquence serait aussi sous l'influence d'un système glutamatergique. Il a été montré que les effets du glutamate étaient dépendants de l'activation de récepteurs glutamatergiques métabotropiques, récepteurs qui seraient, entre autres, situés au niveau des fibres musculaires (Pinard et al., 2003).

La présence de récepteurs glutamatergiques post-synaptiques et les effets exclusivement présynaptiques du glutamate suggéraient l'intervention d'un intermédiaire diffusible rétrograde qui pouvait être

responsable des effets du glutamate. Étant donné la grande similitude entre les effets du glutamate et les effets du NO, il a été proposé que le NO était le messenger rétrograde responsable des effets du glutamate. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le glutamate n'a aucun effet sur la transmission synaptique et la dépression synaptique en présence de chélateur de NO ou en présence d'un inhibiteur de la nNOS (Pinard et al., 2002).

Le modèle de travail proposé par Pinard et al. (Pinard et al., 2002) se heurte par contre à quelques observations ou faits. Premièrement, bien que l'effet global du glutamate sur la transmission synaptique soit similaire à celui du NO, les effets du glutamate semblent posséder une double caractéristique temporelle : des effets rapides se manifestent en 5 min alors qu'une deuxième composante apparaît 20 min plus tard (figure 1a de Pinard et al., 2003). Il pourrait donc exister une certaine différence dans la cinétique des effets des deux molécules sur la transmission synaptique. Le modèle proposé n'explique pas les effets apparemment biphasiques du glutamate sur la transmission synaptique et comment et à quel moment le NO interviendrait.

Deuxièmement, le modèle repose sur la présence de NOS au niveau des fibres musculaires, ce qui n'a pas été révélé par marquage

immunologique. Le marquage à la NADPH-diaphorase musculaire pourrait provenir d'une enzyme dépendante du NO ou d'une NOS non-neuronale, comme il a été discuté un peu plus tôt. Il est extrêmement important de noter que dans leur étude préliminaire, Descarries et al. ont observé que seul un anticorps dirigé contre la eNOS était en mesure de marquer la fibre musculaire (Descarries et al., 1996).

Troisièmement, le modèle repose aussi sur une localisation post-synaptique des récepteurs glutamatergiques. Cette localisation m'apparaît peu exclusive et il est raisonnable de penser, à la lumière des images publiées, qu'il existe un marquage glial. Au risque de se répéter, les CSPs forment des contacts très intimes avec la synapse grâce à leurs « doigts ».

Quatrièmement, le couplage de mGLUrs avec la nNOS se produit par des cascades impliquant notamment l'IP3 et la relâche de Ca^{2+} des réserves calciques. Il est à noter qu'aucune relâche calcique n'a été observée dans les fibres musculaires lors de stimulation nerveuse intense provoquant une dépression et ce, malgré le fait que notre laboratoire utilise couramment des marqueurs calciques perméables aux membranes, que les fibres musculaires sont marquées lors de ces expériences et que

nous disposons de la résolution pour détecter ces relâches calciques (Castonguay and Robitaille, 2001).

Finalement, le modèle proposé (Pinard et al., 2002, section 8) fait abstraction totale d'un fait capital : la présence d'une nNOS dans les CSP (Descarries et al., 1998). Ce modèle est toutefois un modèle de travail et certaines des objections soumises ici font l'objet d'expériences en cours.

La prochaine section sera consacrée à la promotion d'un modèle de production de NO alternatif, mettant en jeu à la fois les CSP et les fibres musculaires. Dans un premier temps, nous ferons une rapide revue des preuves expérimentales indiquant la présence d'une nNOS dans les CSP. Nous verrons ensuite comment la synapto-physiologie des CSP les prédisposent à synthétiser du NO de façon active. Nous terminerons cette thèse par une description d'un modèle impliquant une production de NO d'origine gliale. Ce modèle sera proposé à partir de résultats préliminaires obtenus à l'aide de marqueurs fluorescents du NO.

12.3.3. LA nNOS DES CSPs

Dans cette section, nous reverrons rapidement les preuves scientifiques indiquant la présence d'une NOS de type neuronale, dépendante du Ca^{2+} dans les CSP. Nous verrons ensuite comment la synapto-physiologie des CSP pourraient leur permettre de produire du NO.

12.3.3.1. Étude de la distribution de la nNOS à la JNM d'amphibien

Comme nous l'avons vu précédemment (4.3.1 Localisation des NOS à la JNM), la présence d'une NOS de type neuronale a été révélée dans les CSP de la JNM d'amphibien par des techniques immunohistochimiques (Descarries et al., 1998). La spécificité de l'anticorps utilisé dans cette étude avait été confirmée par western blot. L'anticorps dirigé contre la nNOS révélait une bande dont le poids moléculaire correspondait à cet isoforme. Descarries et al. ont montré que l'enzyme était surtout associée à la membrane des CSP et qu'elle se retrouvait, entre autres, au niveau des fameux « doigts » des CSP. La

nNOS gliale semble donc stratégiquement localisée aux abords de la synapse.

Finalement, les travaux de Descarries et al. ont aussi montré que l'expression de la NOS nécessite une synapse mature et stable puisque la présence de l'enzyme était indétectable au niveau des jeunes grenouilles (<20 g, Descarries et al., 1996) de même que sept jours après une dénervation des préparations neuromusculaires.

12.3.3.2. La synapto-physiologie des CSP et la production de NO

La physiologie des CSP est sensible à la transmission synaptique (Reynolds and Woolf, 1992; Woolf et al., 1992; Georgiou et al., 1994; Love and Thompson, 1999) mais l'est plus particulièrement lors d'activité synaptique intense (Jahromi et al., 1992). En effet, les CSP répondent de façon rapide et dynamique à une activité synaptique intense par une augmentation de leur concentration calcique intracellulaire par la relâche de calcium de leurs réserves cytoplasmiques (Jahromi et al., 1992). Étant donné que la nNOS est une enzyme Ca^{2+} dépendante et que les CSP répondent à l'activité synaptique intense par une relâche de

Ca^{2+} , les CSPs forment les cellules les plus susceptibles de synthétiser le NO lors d'activité intense. Toutefois, des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire laissent un doute quant à la dépendance calcique de l'enzyme identifiée (Descarries et al., 1996). En effet, l'anticorps utilisé alors avait révélé une NOS indépendante au Ca^{2+} . Les CSP pourraient donc posséder plus d'un type de NOS.

Toutefois, pour déterminer de façon définitive les éléments cellulaires responsables de la production de NO ainsi que les mécanismes pharmacologiques et physiologiques responsables de la production de NO, il faudrait avoir une technique permettant de mesurer en temps réel et avec une résolution spatiale fine cette production de NO. Dans la prochaine section, je décrirai de nouveaux outils qui permettraient de répondre à de nombreuses questions laissées en suspens quant à l'origine de la production de NO. Ces outils sont des marqueurs fluorescents du NO qui permettent de visualiser la production de NO *in situ* et en temps réel.

12.3.4. LES DIAMINOFUORESCINES, DES MARQUEURS FLUORESCENTS UTILISÉS POUR VISUALISER LA PRODUCTION DE NO

Les diaminofluorescines (DAF) sont des marqueurs fluorescents qui ont été utilisés pour permettre la visualisation en temps réel et in situ de la production directe de NO (Kojima et al., 1998; Nakatsubo et al., 1998; Itoh et al., 2000). Ces marqueurs ont créé une révolution dans les méthodes de détection du NO. En effet, la plupart des méthodes existantes pour détecter la production de NO impliquait la quantification des produits de dégradation du NO dans les liquides de perfusions recueillis post hoc: les nitrites et nitrates (Li et al., 1995) ou encore la citrulline, le co-produit de la NOS (Kendrick et al., 1996).

Les DAF sont des marqueurs qui lient le NO directement. La première molécule synthétisée et utilisée fut le DAF-2, afin de visualiser la production de NO à partir de cellules en culture (Kojima et al., 1998; Nakatsubo et al., 1998). Le DAF-FM est une molécule nouvelle génération qui serait moins sensible au blanchissage optique et qui serait moins phototoxique (Itoh et al., 2000). Les DAFs peuvent être chargées dans le cytoplasme cellulaire lorsqu'ils sont conjugués à des

diacétates, par une méthode identique au chargement utilisant les esters (ex : marqueurs AM).

Une des limitations de ces marqueurs est leur faible émission. En effet, ces marqueurs sont idéaux pour détecter les fortes concentrations de NO produite par les iNOS par exemple (Roman et al., 2000). Seulement, leur utilisation pour visualiser la production de NO en culture ou in situ nécessite un microscope ayant une grande sensibilité. Par exemple, une variation en fluorescence relative d'à peine 4 % a été observée à l'aide du DAF-FM lors d'une étude sur la production de NO chez des astrocytes en culture (Li et al., 2003).

12.3.4.1. Observations préliminaires réalisées à l'aide des DAFs

Nous avons réalisé une série d'observations à l'aide des DAFs à la JNM d'amphibien. Suivant le chargement de l'indicateur, la fluorescence de base des divers éléments cellulaires de la JNM a permis de révéler une production de base ou tonique de NO à la JNM. En effet, la fluorescence des CSP était forte suivant le chargement de l'indicateur. Un faible marquage (environ 10 x moins intense) était aussi

présent au niveau des plaques motrices. Ces observations statiques ne peuvent toutefois indiquer hors de tout doute la source de cette production endogène tonique de NO. Par exemple, le marquage musculaire observé pourrait résulter d'une diffusion du NO à partir des CSP et vice-versa. Toutefois la forte différence en intensité des deux marquages suggère que les CSP constituent la source principale de production endogène tonique de NO.

La spécificité du marquage n'a pas été contrôlée à l'aide d'inhibiteur de NOS mais deux observations indiquent que les DAFs détectent bel et bien le NO. Tout d'abord, la fluorescence des cellules endothéliales des préparations chargées aux DAFs était forte et ces cellules sont connues pour posséder une eNOS. Deuxièmement, la photolyse de NO engagé a été détectée avec le DAF-FM indiquant que les marqueurs détectent bel et bien le NO directement.

Ce qui nous intéressait bien plus était l'origine de la production phasique, activité-dépendante du NO à la JNM, celle-là même qui pourrait être impliquée dans la modulation de la dépression synaptique. Aussi, nous avons stimulé le nerf moteur de notre préparation à haute fréquence et avons observé les variations de fluorescence de cellules chargées avec les DAFs.

Nous n'avons détecté aucune variation de fluorescence au niveau des plaques motrices chargées au DAFs durant la stimulation de la préparation (10, 50 et 100 Hz, 60s). En revanche, nous avons observé une élévation rapide et réversible de la fluorescence au niveau des CSP en réponse à des stimulations nerveuse ($26 \pm 5 \%$, N=3, Figure 14). Les CSP semblent donc constituer l'élément cellulaire de la JNM responsable de la production phasique de NO à cette synapse.

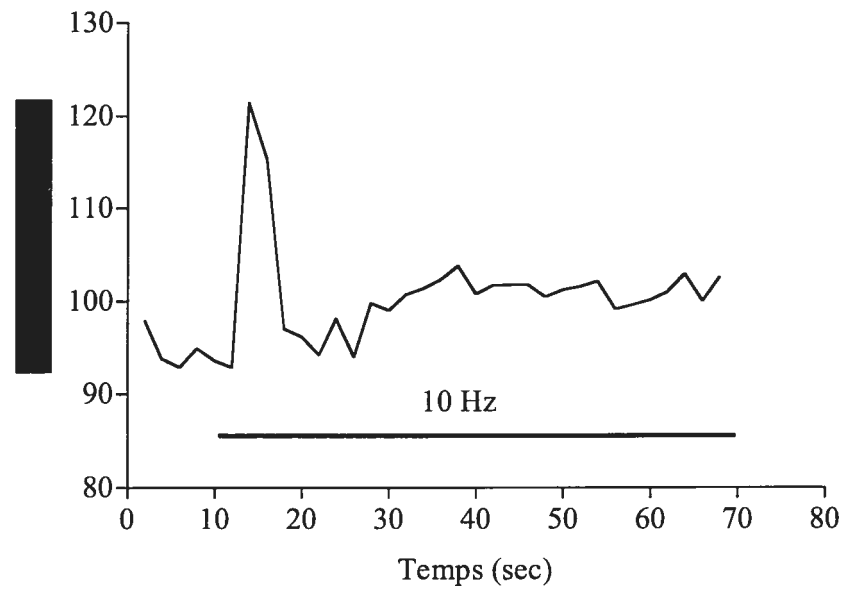


Figure 14. Production de NO d'une CSP visualisée à l'aide du DAF-FM.

Décours temporel de la fluorescence du corps cellulaire d'une CSP avant et durant une stimulation nerveuse induisant une dépression synaptique (10 Hz 60s). Remarquez la réponse nitroergique rapide mais réversible de la CSP suivant la stimulation nerveuse.

Une dernière série d'observations ont été faites dans le but d'étayer la pharmacologie régissant la production de NO. Pour ce faire, divers agonistes ont été dirigés sur une JNM chargée par le DAF-FM par une perfusion locale. Nous avons observé que la muscarine causait une élévation de fluorescence au niveau des CSP alors que l'ATP et l'adénosine ont causé une élévation de la fluorescence des plaques motrices. Ces données préliminaires suggèrent l'implication de récepteurs muscariniques dans la production activité-dépendante des CSP. De plus, elles mettent en lumière une nouvelle voie de signalisation qui, en plus du glutamate, pourrait régir une production musculaire de NO.

Malheureusement, ces expériences ne font qu'identifier les molécules susceptibles de réguler la production de NO et n'indiquent pas dans quelles conditions physiologiques leur action est recrutée. Des expériences réalisées avec des antagonistes des récepteurs identifiés ici et en imposant diverses conditions expérimentales pourraient nous renseigner un peu plus sur la contribution relative des voies de signalisation dans la production de NO.

12.3.5. MODÈLE PROPOSÉ

À la lumière des derniers résultats que nous avons obtenus, je propose un nouveau modèle de travail pour l'étude du NO à la JNM. Dans ce modèle, la production tonique de NO à la JNM origine à la fois des CSP et des fibres musculaires, les CSP produisant la majorité du NO. Cette différence dans la production de base pourrait résulter d'une différence dans l'expression respective des NOS ou d'une activité enzymatique différente.

La production phasique de NO induite par une stimulation à haute fréquence résulterait encore principalement des CSPs, nos données suggérant l'implication de récepteurs muscariniques. Étant donné la faible sensibilité des DAFs dans nos conditions expérimentales, il est possible que du NO d'origine musculaire soit produit. L'important volume cytoplasmique des fibres musculaires pourrait être un facteur créant une dilution des DAFs, abaissant le seuil de détection de synthèse nitriergique. Malgré tout, il ne semble pas que cette probable dilution de l'indicateur soit un facteur puisque la fluorescence de base des fibres musculaires était assez élevée, puisque les nNOS musculaires seraient fortement concentrées aux plaques motrices et puisque nous avons été

capable de détecter des changements de fluorescence induits par la perfusion locale d'agonistes purinergiques.

Bien que nous en sachions peu sur les conditions physiologiques qui pourraient réguler la production de NO musculaire, il semble que des récepteurs purinergiques soient impliqués. Cependant de nombreuses questions demeurent. Par exemple : ces récepteurs sont-ils des récepteurs gliaux ou musculaires ? Existe-t-il des patrons de stimulation qui pourrait engendrer une synthèse musculaire de NO via ces récepteurs?

L'hypothèse de la régulation glutamatergique de la synthèse nitrinergique pourrait tirer parti de l'utilisation des DAFs. Ainsi, on pourrait démontrer (ou non) que le glutamate peut engendrer la production de NO et déterminer si cette production est musculaire ou gliale. En outrepassant le débat au sujet de l'existence ou non de nNOS musculaire et de la localisation des récepteurs mGluRs à la JNM, il est aussi possible que l'activation des mGluRs crée une synthèse de NO d'un type nouveau, ne faisant pas appel aux NOS (Yamada and Nabeshima, 1998). Alternativement, la synthèse nitrinergique pourrait être contrôlée par le glutamate par un mécanisme plus classique, impliquant la relâche

de Ca^{2+} des réserves intracellulaires, tel qu'observé à la JNM (Pinard et al., 2003).

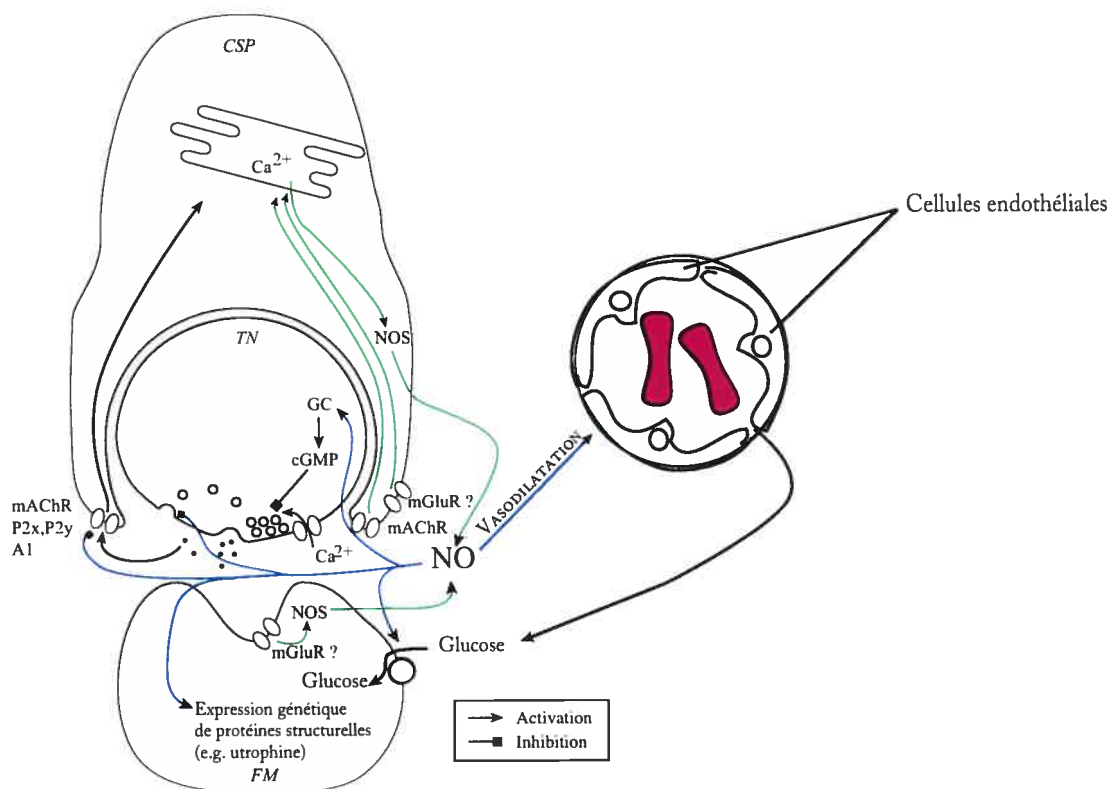


Figure 15. Modèle de travail intégrant les mécanismes susceptibles de réguler la synthèse du NO à la JNM.

Dans ce schéma récapitulatif, les mécanismes probables de régulation de la synthèse nitrique à la JNM sont indiqués en vert.

13. CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous avons vu dans cette thèse combien le NO est un modulateur important pour la jonction neuromusculaire. Il est un important régulateur synaptique, participant à l'établissement de la dépression synaptique par un mécanisme impliquant l'inhibition de l'endocytose rapide des vésicules synaptiques. Nos observations fournissent un exemple concret en faveur du modèle de déplétion dans notre compréhension de la dépression synaptique induite par la fréquence de stimulation.

En outre, nos observations font état de nombreuses similitudes entre les effets du NO et de l'adénosine sur la transmission synaptique et suggèrent que leurs mécanismes d'action pourraient être en partie communs ou, du moins se moduler réciproquement.

Étant donné l'importance capitale du NO dans les phénomènes de dépression à la jonction neuromusculaire, il serait plus qu'opportun de déterminer dans quelles conditions physiologiques le NO est produit et quelles sont les voies de signalisations impliquées. Nos expériences préliminaires, utilisant une nouvelle génération de marqueurs

fluorescents, ont permis d'étayer de façon sommaire les voies de signalisations potentielles et d'identifier des familles de récepteurs pharmacologiques qui pourraient être impliqués dans la régulation de la production de NO à la JNM. Ces marqueurs ouvrent une voie dans l'étude du NO et il serait important de saisir la richesse d'informations que de tels marqueurs peuvent fournir.

14. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adam L, Bouvier M, Jones TL (1999) Nitric oxide modulates beta(2)-adrenergic receptor palmitoylation and signaling. *J Biol Chem* 274:26337-26343.

Adams BA (1989) Temperature and synaptic efficacy in frog skeletal muscle. *J Physiol* 408:443-455.

Adler EM, Augustine GJ, Duffy SN, Charlton MP (1991) Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* 11:1496-1507.

Akasu T (1986) The effects of substance P on neuromuscular transmission in the frog. *Neurosci Res* 3:275-284.

Ales E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M, Alvarez de Toledo G (1999) High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss- and-run mechanism. *Nat Cell Biol* 1:40-44.

Almon RR, Appel SH (1976) Cholinergic sites in skeletal muscle. II. Interaction of an agonist and two antagonists with the acetylcholine site. *Biochemistry* 15:3667-3671.

- Alvarez de Toledo G, Fernandez-Chacon R, Fernandez JM (1993) Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 363:554-558.
- Anderson JE (2000) A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* 11:1859-1874.
- Aonuma H, Nagayama T, Takahata M (2000) Modulatory effects of nitric oxide on synaptic depression in the crayfish neuromuscular system [In Process Citation]. *J Exp Biol* 203 Pt 23:3595-3602.
- Auld DS, Robitaille R (2003a) Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *Neuroscientist* 9:144-157.
- Auld DS, Robitaille R (2003b) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.
- Auld DS, Colomar A, Belair EL, Castonguay A, Pinard A, Rousse I, Thomas S, Robitaille R (2003) Modulation of neurotransmission by reciprocal synapse-glia interactions at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* 32:1003-1015.
- Balch WE, Glick BS, Rothman JE (1984) Sequential intermediates in the pathway of intercompartmental transport in a cell-free system. *Cell* 39:525-536.

- Banerjee A, Barry VA, DasGupta BR, Martin TF (1996) N-Ethylmaleimide-sensitive factor acts at a prefusion ATP-dependent step in Ca^{2+} -activated exocytosis. *J Biol Chem* 271:20223-20226.
- Banner LR, Herrera AA (1986) Differences in synaptic efficacy at neuromuscular junctions in frog twitch muscles. *J Physiol* 379:205-215.
- Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB (1995) Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun* 213:896-900.
- Bennett MR, Farnell L, Gibson WG (2000) The probability of quantal secretion near a single calcium channel of an active zone. *Biophys J* 78:2201-2221.
- Berkels R, Purol-Schnabel S, Roesen R (2001) A new method to measure nitrate/nitrite with a NO-sensitive electrode. *J Appl Physiol* 90:317-320.
- Betz WJ (1970) Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol (Lond)* 206:629-644.
- Betz WJ, Bewick GS (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255:200-203.

- Betz WJ, Bewick GS (1993) Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 460:287-309.
- Betz WJ, Mao F, Bewick GS (1992a) Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci* 12:363-375.
- Betz WJ, Bewick GS, Ridge RM (1992b) Intracellular movements of fluorescently labeled synaptic vesicles in frog motor nerve terminals during nerve stimulation. *Neuron* 9:805-813.
- Betz WJ, Mao F, Smith CB (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:365-371.
- Bizzozero OA, Bixler H, Parkhani J; Pastuszyn A (2001) Nitric oxide reduces the palmitoylation of rat myelin proteolipid protein by an indirect mechanism. *Neurochem Res* 26:1127-1137.
- Borvendeg SJ, Gerevich Z, Gillen C, Illes P (2003) P2Y receptor-mediated inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Synapse* 47:159-161.
- Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 512:197-209.

- Breckenridge LJ, Almers W (1987a) Currents through the fusion pore that forms during exocytosis of a secretory vesicle. *Nature* 328:814-817.
- Breckenridge LJ, Almers W (1987b) Final steps in exocytosis observed in a cell with giant secretory granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1945-1949.
- Bredt DS (1998) NO skeletal muscle derived relaxing factor in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14592-14593.
- Bredt DS, Snyder SH (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8:3-11.
- Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH (1992) Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 267:10976-10981.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718.
- Brehm P, Henderson L (1988) Regulation of acetylcholine receptor channel function during development of skeletal muscle. *Dev Biol* 129:1-11.

- Brenman JE, Brecht DS (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol* 7:374-378.
- Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82:743-752.
- Brenman JE, Christopherson KS, Craven SE, McGee AW, Brecht DS (1996a) Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci* 16:7407-7415.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS (1996b) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.
- Brown RH, Jr. (1997) Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. *Annu Rev Med* 48:457-466.
- Brown TH, Chapman PF, Kairiss EW, Keenan CL (1988) Long-term synaptic potentiation. *Science* 242:724-728.
- Brundege JM, Dunwiddie TV (1997) Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 39:353-391.

- Burns ME, Sasaki T, Takai Y, Augustine GJ (1998) Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic vesicle traffic. *J Gen Physiol* 111:243-255.
- Burrone J, Lagnado L (2000) Synaptic depression and the kinetics of exocytosis in retinal bipolar cells. *J Neurosci* 20:568-578.
- Busse R, Mulsch A (1990) Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 275:87-90.
- Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Sancesario G, Morello M, Giorgi M, Pisani A, Bernardi G (1999) A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J Neurosci* 19:2489-2499.
- Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential Regulation of Transmitter Release by Presynaptic and Glial Ca²⁺ Internal Stores at the Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* 21:1911-1922.
- Chao DS, Silvagno F, Xia H, Cornwell TL, Lincoln TM, Bredt DS (1997) Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience* 76:665-672.
- Chao DS, Gorospe JR, Brenman JE, Rafael JA, Peters MF, Froehner SC, Hoffman EP, Chamberlain JS, Bredt DS (1996) Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy. *J Exp Med* 184:609-618.

- Chapman ER, An S, Barton N, Jahn R (1994) SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils. *J Biol Chem* 269:27427-27432.
- Chapman ER, Hanson PI, An S, Jahn R (1995) Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* 270:23667-23671.
- Chaubourt E, Fossier P, Baux G, Leprince C, Israel M, De La Porte S (1999) Nitric oxide and l-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: a possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* 6:499-507.
- Chaubourt E, Voisin V, Fossier P, Baux G, Israel M, De La Porte S (2002) Muscular nitric oxide synthase (muNOS) and utrophin. *J Physiol Paris* 96:43-52.
- Chen C, Regehr WG (1999) Contributions of residual calcium to fast synaptic transmission. *J Neurosci* 19:6257-6266.
- Chinet AE, Even PC, Decrouy A (1994) Dystrophin-dependent efficiency of metabolic pathways in mouse skeletal muscles. *Experientia* 50:602-605.
- Cho SJ, Kelly M, Rognlien KT, Cho JA, Horber JK, Jena BP (2002) SNAREs in opposing bilayers interact in a circular array to form conducting pores. *Biophys J* 83:2522-2527.

- Cohen MW, Jones OT, Angelides KJ (1991) Distribution of Ca²⁺ channels on frog motor nerve terminals revealed by fluorescent omega-conotoxin. *J Neurosci* 11:1032-1039.
- Cruz LJ, Kupryszewski G, LeCheminant GW, Gray WR, Olivera BM, Rivier J (1989) mu-conotoxin GIIIA, a peptide ligand for muscle sodium channels: chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization. *Biochemistry* 28:3437-3442.
- Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM, Zeikus RD, Kerr L, Yoshikami D, Moczydlowski E (1985) Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 260:9280-9288.
- D'Souza-Schorey C, Li G, Colombo MI, Stahl PD (1995) A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* 267:1175-1178.
- D'Souza-Schorey C, van Donselaar E, Hsu VW, Yang C, Stahl PD, Peters PJ (1998) ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J Cell Biol* 140:603-616.
- Daly C, Sugimori M, Moreira JE, Ziff EB, Llinas R (2000) Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6120-6125.

- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991a) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7797-7801.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH (1991b) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6368-6371.
- del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.
- Descarries LM, Marier C, Robitaille R (1996) NO synthase localization at the frog neuromuscular junction. *Soc Neurosci Abstr* 22:775.
- Descarries LM, Cai S, Robitaille R (1998) Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J Neurocytol* 27:829-840.
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH (1994) Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4214-4218.
- Dittman JS, Kreitzer AC, Regehr WG (2000) Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci* 20:1374-1385.

- Dixon AK, Gubitza AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 118:1461-1468.
- Doerner D, Alger BE (1988) Cyclic GMP depresses hippocampal Ca²⁺ current through a mechanism independent of cGMP-dependent protein kinase. *Neuron* 1:693-699.
- Donaldson JG, Radhakrishna H (2001) Expression and properties of ADP-ribosylation factor (ARF6) in endocytic pathways. *Methods Enzymol* 329:247-256.
- Dryden WF, Harvey AL, Marshall IG (1974) Pharmacological studies on the bungarotoxins: separation of the fractions and their neuromuscular activity. *Eur J Pharmacol* 26:256-261.
- Duman RS, Terwilliger RZ, Nestler EJ (1991) Endogenous ADP-ribosylation in brain: initial characterization of substrate proteins. *J Neurochem* 57:2124-2132.
- Duman RS, Terwilliger RZ, Nestler EJ (1993) Alterations in nitric oxide-stimulated endogenous ADP-ribosylation associated with long-term potentiation in rat hippocampus. *J Neurochem* 61:1542-1545.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.

- Eccles JC, Katz B, Kuffler SW (1941) Nature of the 'end plate potential' in curarized muscle. *J Neurophysiol* 4:362-387.
- Eizirik DL, Cagliero E, Bjorklund A, Welsh N (1992) Interleukin-1 beta induces the expression of an isoform of nitric oxide synthase in insulin-producing cells, which is similar to that observed in activated macrophages. *FEBS Lett* 308:249-252.
- Elferink LA, Peterson MR, Scheller RH (1993) A role for synaptotagmin (p65) in regulated exocytosis. *Cell* 72:153-159.
- Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH (1997) Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3396-3401.
- Erulkar SD, Rahamimoff R (1978) The role of calcium ions in tetanic and post-tetanic increase of miniature end-plate potential frequency. *J Physiol (Lond)* 278:501-511.
- Even PC, Decrouy A, Chinet A (1994) Defective regulation of energy metabolism in mdx-mouse skeletal muscles. *Biochem J* 304:649-654.
- Faundez V, Horng JT, Kelly RB (1997) ADP ribosylation factor 1 is required for synaptic vesicle budding in PC12 cells. *J Cell Biol* 138:505-515.

- Fernandez HL, Hodges-Savola CA (1996) Physiological regulation of G4 AChE in fast-twitch muscle: effects of exercise and CGRP. *J Appl Physiol* 80:357-362.
- Fesce R, Grohovaz F, Valtorta F, Meldolesi J (1994) Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol* 4:1-4.
- Filippov AK, Brown DA, Barnard EA (2000) The P2Y(1) receptor closes the N-type Ca(2+) channel in neurones, with both adenosine triphosphates and diphosphates as potent agonists. *Br J Pharmacol* 129:1063-1066.
- Fisher SA, Fischer TM, Carew TJ (1997) Multiple overlapping processes underlying short-term synaptic enhancement. *Trends Neurosci* 20:170-177.
- Fortune ES, Rose GJ (2001) Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends Neurosci* 24:381-385.
- Fozard JR, Pfannkuche HJ, Schuurman HJ (1996) Mast cell degranulation following adenosine A3 receptor activation in rats. *Eur J Pharmacol* 298:293-297.
- Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527-552.

- Galli T, McPherson PS, De Camilli P (1996) The V0 sector of the V-ATPase, synaptobrevin, and synaptophysin are associated on synaptic vesicles in a Triton X-100-resistant, freeze-thawing sensitive, complex. *J Biol Chem* 271:2193-2198.
- Gammie SC, Olaghere-da Silva UB, Nelson RJ (2000) 3-bromo-7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, impairs maternal aggression and citrulline immunoreactivity in prairie voles. *Brain Res* 870:80-86.
- Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP (1994) Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12:443-455.
- Geppert M, Bolshakov VY, Siegelbaum SA, Takei K, De Camilli P, Hammer RE, Sudhof TC (1994) The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* 369:493-497.
- Gincel D, Shoshan-Barmatz V (2002) The synaptic vesicle protein synaptophysin: purification and characterization of its channel activity. *Biophys J* 83:3223-3229.
- Glavinovic MI (1987) Synaptic depression in frog neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 58:230-246.
- Glavinovic MI (1995) Decrease of quantal size and quantal content during tetanic stimulation detected by focal recording. *Neuroscience* 69:271-281.

- Gramolini AO, Wu J, Jasmin BJ (2000) Regulation and functional significance of utrophin expression at the mammalian neuromuscular synapse. *Microsc Res Tech* 49:90-100.
- Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH (1984) The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 308:645-647.
- Grinnell AD, Herrera AA (1980) Physiological regulation of synaptic effectiveness at frog neuromuscular junctions. *J Physiol (Lond)* 307:301-317.
- Gu F, Gruenberg J (2000) ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. *J Biol Chem* 275:8154-8160.
- Haley JE, Wilcox GL, Chapman PF (1992) The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 8:211-216.
- Hauschildt S, Luckhoff A, Mulsch A, Kohler J, Bessler W, Busse R (1990) Induction and activity of NO synthase in bone-marrow-derived macrophages are independent of Ca²⁺. *Biochem J* 270:351-356.
- Heindel U, Schmidt MF, Veit M (2003) Palmitoylation sites and processing of synaptotagmin I, the putative calcium sensor for neurosecretion. *FEBS Lett* 544:57-62.

- Henkel AW, Betz WJ (1995) Staurosporine blocks evoked release of FM1-43 but not acetylcholine from frog motor nerve terminals. *J Neurosci* 15:8246-8258.
- Hess DT, Patterson SI, Smith DS, Skene JH (1993) Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* 366:562-565.
- Heuser JE, Reese TS (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:315-344.
- Hirsh JK, Silinsky EM, Solsona CS (1990) The role of cyclic AMP and its protein kinase in mediating acetylcholine release and the action of adenosine at frog motor nerve endings. *Br J Pharmacol* 101:311-318.
- Hort-Legrand C, Metral S (1982) Dual type of facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *Muscle Nerve* 5:357-362.
- Horton RH, Moran LA, Ochs RS, Rawn DJ, Scrimgeour GK (1994) *Principes de Biochimie: De Boek-Wesmael S.A.*
- Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA (1981) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 218:739-749.

- Ito M (1986) Long-term depression as a memory process in the cerebellum. *Neurosci Res* 3:531-539.
- Ito M, Kano M (1982) Long-lasting depression of parallel fiber-Purkinje cell transmission induced by conjunctive stimulation of parallel fibers and climbing fibers in the cerebellar cortex. *Neurosci Lett* 33:253-258.
- Itoh Y, Ma FH, Hoshi H, Oka M, Noda K, Ukai Y, Kojima H, Nagano T, Toda N (2000) Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. *Anal Biochem* 287:203-209.
- Jacobson MK, Loflin PT, Aboul-Ela N, Mingmuang M, Moss J, Jobson EL (1990) Modification of plasma membrane protein cysteine residues by ADP-ribose in vivo. *J Biol Chem* 265:10825-10828.
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069-1077.
- Johannes L, Lledo PM, Chameau P, Vincent JD, Henry JP, Darchen F (1998) Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of exocytosis by Rab3a. *J Neurochem* 71:1127-1133.
- Just I, Wollenberg P, Moss J, Aktories K (1994) Cysteine-specific ADP-ribosylation of actin. *Eur J Biochem* 221:1047-1054.

- Kandel ER, Siegelbaum SA (2000) Neurotransmitter release. In: Principles of Neural Science, fourth edition Edition (Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, eds), pp 253-279: McGraw-Hill.
- Katz B, Miledi R (1965a) The Measurement of Synaptic Delay, and the Time Course of Acetylcholine Release at the Neuromuscular Junction. Proc R Soc Lond B Biol Sci 161:483-495.
- Katz B, Miledi R (1965b) The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. Proc R Soc Lond B Biol Sci 161:496-503.
- Katz B, Miledi R (1967) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. J Physiol (Lond) 192:407-436.
- Katz E, Ferro PA, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R, Uchitel OD (1995) Effects of Ca²⁺ channel blockers on transmitter release and presynaptic currents at the frog neuromuscular junction. J Physiol 486 (Pt 3):695-706.
- Kaupp UB (1991) The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. Trends Neurosci 14:150-157.
- Kawasaki F, Hazen M, Ordway RW (2000) Fast synaptic fatigue in shibire mutants reveals a rapid requirement for dynamin in synaptic vesicle membrane trafficking. Nat Neurosci 3:859-860.

- Keitoku M, Okayama H, Satoh Y, Maruyama Y, Takishima T (1988) Does diffuse intimal thickening in human coronary artery act as a diffusion barrier to endothelium-derived relaxing factor? *Tohoku J Exp Med* 154:413-414.
- Kempermann G (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 22:635-638.
- Kendrick KM, Guevara-Guzman R, de la Riva C, Christensen J, Ostergaard K, Emson PC (1996) NMDA and kainate-evoked release of nitric oxide and classical transmitters in the rat striatum: in vivo evidence that nitric oxide may play a neuroprotective role. *Eur J Neurosci* 8:2619-2634.
- King RD, Wiest MC, Montague PR (2001) Extracellular calcium depletion as a mechanism of short-term synaptic depression. *J Neurophysiol* 85:1952-1959.
- Kitamura Y, Imai S, Matsueda R, Nomura Y (1990) Effects of sulfhydryl-modifying reagents, 3-nitro-2-pyridinesulfonyl compounds, on the coupling between inhibitory receptors and GTP-binding proteins Gi/Go in rat brain membranes. *Mol Pharmacol* 38:184-191.
- Klingauf J, Kavalali ET, Tsien RW (1998) Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature* 394:581-585.

- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS (1994) Nitric oxide in skeletal muscle [see comments]. *Nature* 372:546-548.
- Koenig JH, Yamaoka K, Ikeda K (1998) Omega images at the active zone may be endocytotic rather than exocytotic: implications for the vesicle hypothesis of transmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12677-12682.
- Koh HY, Jacklet JW (1999) Nitric oxide stimulates cGMP production and mimics synaptic responses in metacerebral neurons of *Aplysia*. *J Neurosci* 19:3818-3826.
- Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 46:373-375.
- Krauss M, Kinuta M, Wenk MR, De Camilli P, Takei K, Haucke V (2003) ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J Cell Biol* 162:113-124.
- Kriegsfeld LJ, Eliasson MJ, Demas GE, Blackshaw S, Dawson TM, Nelson RJ, Snyder SH (1999) Nocturnal motor coordination deficits in neuronal nitric oxide synthase knock-out mice. *Neuroscience* 89:311-315.

- Kulick MB, von Kugelgen I (2002) P2Y-receptors mediating an inhibition of the evoked entry of calcium through N-type calcium channels at neuronal processes. *J Pharmacol Exp Ther* 303:520-526.
- Kumar SM, Porterfield DM, Muller KJ, Smith PJ, Sahley CL (2001) Nerve Injury Induces a Rapid Efflux of Nitric Oxide (NO) Detected with a Novel NO Microsensor. *J Neurosci* 21:215-220.
- Kusner LL, Kaminski HJ (1996) Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res* 730:238-242.
- Laine R, de Montellano PR (1998) Neuronal nitric oxide synthase isoforms alpha and mu are closely related calpain-sensitive proteins. *Mol Pharmacol* 54:305-312.
- Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79:463-484.
- Le KT, Babinski K, Seguela P (1998) Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 18:7152-7159.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 388:674-678.

- Lee KH, Baek MY, Moon KY, Song WK, Chung CH, Ha DB, Kang MS (1994) Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. *J Biol Chem* 269:14371-14374.
- Lee MA, West RE, Jr., Moss J (1988) Atrial natriuretic factor reduces cyclic adenosine monophosphate content of human fibroblasts by enhancing phosphodiesterase activity. *J Clin Invest* 82:388-393.
- Lenhard JM, Colombo MI, Stahl PD (1994) Heterotrimeric GTP-binding proteins (G proteins) and ADP-ribosylation factor (ARF) regulate priming of endosomal membranes for fusion. *Arch Biochem Biophys* 312:474-479.
- Leonard RJ, Nakajima S, Nakajima Y, Carlson CG (1988) Early development of two types of nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 8:4038-4048.
- Lev-Ram V, Makings LR, Keitz PF, Kao JP, Tsien RY (1995) Long-term depression in cerebellar Purkinje neurons results from coincidence of nitric oxide and depolarization-induced Ca^{2+} transients. *Neuron* 15:407-415.
- Lev-Ram V, Jiang T, Wood J, Lawrence DS, Tsien RY (1997) Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and Ca^{2+} in the induction of cerebellar long-term depression. *Neuron* 18:1025-1038.

- Li JM, Fenton RA, Cutler BS, Dobson JG, Jr. (1995) Adenosine enhances nitric oxide production by vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 269:C519-523.
- Li N, Sul JY, Haydon PG (2003) A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *J Neurosci* 23:10302-10310.
- Lin CS, Lau A, Bakircioglu E, Tu R, Wu F, Week S, Nunes L, Lue TF (1998) Analysis of neuronal nitric oxide synthase isoform expression and identification of human nNOS- μ . *Biochem Biophys Res Commun* 253:388-394.
- Lindau M, Almers W (1995) Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 7:509-517.
- Lindgren CA, Laird MV (1994) Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *Neuroreport* 5:2205-2208.
- Lindner R, Ungewickell E (1991) Light-chain-independent binding of adaptors, AP180, and auxilin to clathrin. *Biochemistry* 30:9097-9101.

- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds [see comments]. *Nature* 364:626-632.
- Llinas R, Gruner JA, Sugimori M, McGuinness TL, Greengard P (1991) Regulation by synapsin I and Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II of the transmitter release in squid giant synapse. *J Physiol* 436:257-282.
- Love FM, Thompson WJ (1999) Glial cells promote muscle reinnervation by responding to activity-dependent postsynaptic signals. *J Neurosci* 19:10390-10396.
- Lu B, Fu WM (1995) Regulation of postsynaptic responses by calcitonin gene related peptide and ATP at developing neuromuscular junctions. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1050-1056.
- Luthardt J, Borvendeg SJ, Sperlagh B, Poelchen W, Wirkner K, Illes P (2003) P2Y(1) receptor activation inhibits NMDA receptor-channels in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal and parietal cortex. *Neurochem Int* 42:161-172.
- Lynch K (1980) Stimulation-induced reduction of large dense core vesicle numbers in cholinergic motor nerve endings. *Brain Res* 194:249-254.

- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.
- Lynge J, Schulte G, Nordsborg N, Fredholm BB, Hellsten Y (2003) Adenosine A_{2B} receptors modulate cAMP levels and induce CREB but not ERK1/2 and p38 phosphorylation in rat skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 307:180-187.
- MacDonald RL, Skerritt JH, Werz MA (1986) Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. *J Physiol* 370:75-90.
- Macek TA, Schaffhauser H, Conn PJ (1998) Protein kinase C and A₃ adenosine receptor activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP-binding proteins. *J Neurosci* 18:6138-6146.
- MacFarland RT, Zelus BD, Beavo JA (1991) High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 266:136-142.
- Malen PL, Chapman PF (1997) Nitric oxide facilitates long-term potentiation, but not long-term depression. *J Neurosci* 17:2645-2651.

- Malomouzh AI, Mukhtarov MR, Nikolsky EE, Vyskocil F, Lieberman EM, Urazaev AK (2003) Glutamate regulation of non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction. *J Neurochem* 85:206-213.
- Mancinelli L, Fano G, Ferroni L, Secca T, Dolcini BM (1983) Evidence for an inotropic positive action of cGMP during excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 61:590-594.
- Marcenac F, Gonon F (1985) Fast in vivo monitoring of dopamine release in the rat brain with differential pulse amperometry. *Anal Chem* 57:1778-1779.
- Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS (1988) Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27:8706-8711.
- Matsui W, Kirchhausen T (1990) Stabilization of clathrin coats by the core of the clathrin-associated protein complex AP-2. *Biochemistry* 29:10791-10798.
- Matsuoka I, Ohkubo S (2004) ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: adenosine receptor activation by ATP through rapid and localized generation of adenosine by ectonucleotidases. *J Pharmacol Sci* 94:95-99.

- Matteoli M, Haimann C, De Camilli P (1990) Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 37:271-275.
- Matteoli M, Haimann C, Torri-Tarelli F, Polak JM, Ceccarelli B, De Camilli P (1988) Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7366-7370.
- McClure SJ, Robinson PJ (1996) Dynamin, endocytosis and intracellular signalling (review). *Mol Membr Biol* 13:189-215.
- McDonald LJ, Wainschel LA, Oppenheimer NJ, Moss J (1992) Amino acid-specific ADP-ribosylation: structural characterization and chemical differentiation of ADP-ribose-cysteine adducts formed nonenzymatically and in a pertussis toxin-catalyzed reaction. *Biochemistry* 31:11881-11887.
- McMahon HT, Sudhof TC (1995) Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP25 forms high affinity alpha-SNAP binding site. *J Biol Chem* 270:2213-2217.

- McPherson PS, Takei K, Schmid SL, De Camilli P (1994) p145, a major Grb2-binding protein in brain, is co-localized with dynamin in nerve terminals where it undergoes activity-dependent dephosphorylation. *J Biol Chem* 269:30132-30139.
- Meffert MK, Premack BA, Schulman H (1994) Nitric oxide stimulates Ca(2+)-independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12:1235-1244.
- Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H (1996) Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions. *Neuron* 16:1229-1236.
- Meriney SD, Grinnell AD (1991) Endogenous adenosine modulates stimulation-induced depression at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 443:441-455.
- Michel RN, Vu CQ, Tetzlaff W, Jasmin BJ (1994) Neural regulation of acetylcholinesterase mRNAs at mammalian neuromuscular synapses. *J Cell Biol* 127:1061-1069.
- Micheva KD, Kay BK, McPherson PS (1997) Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *J Biol Chem* 272:27239-27245.
- Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, Smith SJ (2003) Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci* 6:925-932.

- Miyagoe-Suzuki Y, Takeda SI (2001) Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with alpha1-syntrophin at the sarcolemma. *Microsc Res Tech* 55:164-170.
- Miyata M, Matsubara T, Mori T (1969) Studies on denitrification. XI. Some properties of nitric oxide reductase. *J Biochem (Tokyo)* 66:759-765.
- Mizutani F (2002) Amperometric measurement of nitric oxide using a polydimethylsiloxane-coated electrode. *Methods Enzymol* 359:105-110.
- Mochida S (2000) Protein-protein interactions in neurotransmitter release. *Neurosci Res* 36:175-182.
- Mokhtarian A, Even PC (1996) Effect of intraperitoneal injection of glucose on glucose oxidation and energy expenditure in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Pflugers Arch* 432:379-385.
- Mokhtarian A, Decrouy A, Chinet A, Even PC (1996) Components of energy expenditure in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Pflugers Arch* 431:527-532.
- Moser T, Beutner D (2000) Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:883-888.

- Mothet JP, Fossier P, Tauc L, Baux G (1996) Opposite actions of nitric oxide on cholinergic synapses: which pathways? *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8721-8726.
- Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett* 427:263-266.
- Neher E (1993) Cell physiology. Secretion without full fusion. *Nature* 363:497-498.
- Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1995) Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 378:383-386.
- Nicholls DG (2003) Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal. *Neurochem Res* 28:1433-1441.
- Nishikawa KC (1999) Neuromuscular control of prey capture in frogs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:941-954.
- Nottebohm F (2002) Neuronal replacement in adult brain. *Brain Res Bull* 57:737-749.

- Okuda S, Kanda F, Kawahara Y, Chihara K (1997) Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in L6 rat skeletal muscle cells. *Am J Physiol* 272:C35-40.
- Palfrey HC, Artalejo CR (1998) Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first step. *Neuroscience* 83:969-989.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Pecot-Dechavassine M, Brouard MO (1997) Large dense-core vesicles at the frog neuromuscular junction: characteristics and exocytosis. *J Neurocytol* 26:455-465.
- Petrenko AG, Perin MS, Davletov BA, Ushkaryov YA, Geppert M, Sudhof TC (1991) Binding of synaptotagmin to the alpha-latrotoxin receptor implicates both in synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 353:65-68.
- Pevsner J, Hsu SC, Braun JE, Calakos N, Ting AE, Bennett MK, Scheller RH (1994) Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* 13:353-361.
- Phillis JW (1989) Adenosine in the control of the cerebral circulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1:26-54.

- Pinard A, Lévesque S, Robitaille R (2002) NO-dependence of glutamate-mediated synaptic depression at the frog neuromuscular junction. Soc Neurosci Abstr.
- Pinard A, Levesque S, Vallee J, Robitaille R (2003) Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. Eur J Neurosci 18:3241-3250.
- Planitzer G, Baum O, Gossrau R (2000) Skeletal muscle fibres show NADPH diaphorase activity associated with mitochondria, the sarcoplasmic reticulum and the NOS-1-containing sarcolemma. Histochem J 32:303-312.
- Poodry CA, Edgar L (1979) Reversible alteration in the neuromuscular junctions of *Drosophila melanogaster* bearing a temperature-sensitive mutation, *shibire*. J Cell Biol 81:520-527.
- Porkka-Heiskanen T (1999) Adenosine in sleep and wakefulness. Ann Med 31:125-129.
- Porkka-Heiskanen T, Alanko L, Kalinchuk A, Stenberg D (2002) Adenosine and sleep. Sleep Med Rev 6:321-332.
- Protti DA, Uchitel OD (1993) Transmitter release and presynaptic Ca²⁺ currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. Neuroreport 5:333-336.

- Putzke J, Seidel B, Huang PL, Wolf G (2000) Differential expression of alternatively spliced isoforms of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) in knockout mice deficient in nNOS alpha (nNOS alpha(Delta/Delta) mice). *Brain Res Mol Brain Res* 85:13-23.
- Radford KM, Virginio C, Surprenant A, North RA, Kawashima E (1997) Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *J Neurosci* 17:6529-6533.
- Radhakrishna H, Donaldson JG (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol* 139:49-61.
- Rafael JA, Tinsley JM, Potter AC, Deconinck AE, Davies KE (1998) Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* 19:79-82.
- Ramkumar V, Stiles GL, Beaven MA, Ali H (1993) The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J Biol Chem* 268:16887-16890.
- Rand MJ, Li CG (1995) Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu Rev Physiol* 57:659-682.

- Redman RS, Silinsky EM (1994) ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J Physiol (Lond)* 477:117-127.
- Reynolds ML, Woolf CJ (1992) Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol* 21:50-66.
- Ribeiro JA (1995) Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacol Toxicol* 77:299-305.
- Ribeiro JA, Dominguez ML (1978) Mechanisms of depression of neuromuscular transmission by ATP and adenosine. *J Physiol Paris* 74:491-496.
- Ribera J, Marsal J, Casanovas A, Hukkanen M, Tarabal O, Esquerda JE (1998) Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release. *J Neurosci Res* 51:90-102.
- Richards DA, Guatimosim C, Betz WJ (2000) Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron* 27:551-559.
- Richards DA, Guatimosim C, Rizzoli SO, Betz WJ (2003) Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 39:529-541.

- Robitaille R (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 15:7121-7131.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847-855.
- Robitaille R, Charlton MP (1992) Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J Neurosci* 12:297-305.
- Robitaille R, Tremblay JP (1991) Non-uniform responses to Ca^{2+} along the frog neuromuscular junction: effects on the probability of spontaneous and evoked transmitter release. *Neuroscience* 40:571-585.
- Robitaille R, Adler EM, Charlton MP (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5:773-779.
- Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP (1997) Muscarinic Ca^{2+} responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 504:337-347.

- Robitaille R, Thomas S, Charlton MP (1999) Effects of adenosine on Ca^{2+} entry in the nerve terminal of the frog neuromuscular junction. *Can J Physiol Pharmacol* 77:707-714.
- Roman V, Zhao H, Fourneau JM, Marconi A, Dugas N, Dugas B, Sigaux F, Kolb JP (2000) Expression of a functional inducible nitric oxide synthase in hairy cell leukaemia and ESKOL cell line. *Leukemia* 14:696-705.
- Ruegg MA, Bixby JL (1998) Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci* 21:22-27.
- Ruzzier F, Scuka M (1979) Effect of repetitive stimulation on the frog neuromuscular transmission. *Pflugers Arch* 382:127-132.
- Ryten M, Hoebertz A, Burnstock G (2001) Sequential expression of three receptor subtypes for extracellular ATP in developing rat skeletal muscle. *Dev Dyn* 221:331-341.
- Salter M, Knowles RG, Moncada S (1991) Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 291:145-149.
- Sarrazin C (1983) Mathematical model of synaptic facilitation and depression during and following repetitive stimulation. *Neurol Res* 5:45-78.

- Saura C, Ciruela F, Casado V, Canela EI, Mallol J, Lluís C, Franco R (1996) Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes. *J Neurochem* 66:1675-1682.
- Schafer DA, D'Souza-Schorey C, Cooper JA (2000) Actin assembly at membranes controlled by ARF6. *Traffic* 1:892-903.
- Schmidt HH, Walter U (1994) NO at work. *Cell* 78:919-925.
- Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178:153-175.
- Schmidt K, Mayer B (1998) Determination of NO with a Clark-type electrode. *Methods Mol Biol* 100:101-109. .
- Schuske KR, Richmond JE, Matthies DS, Davis WS, Runz S, Rube DA, van der Bliek AM, Jorgensen EM (2003) Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron* 40:749-762.
- Sequeira SM, Carvalho AP, Carvalho CM (1999) Both protein kinase G dependent and independent mechanisms are involved in the modulation of glutamate release by nitric oxide in rat hippocampal nerve terminals. *Neurosci Lett* 261:29-32.

- Sheng ZH, Westenbroek RE, Catterall WA (1998) Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery. *J Bioenerg Biomembr* 30:335-345.
- Shi G, Faundez V, Roos J, Dell'Angelica EC, Kelly RB (1998) Neuroendocrine synaptic vesicles are formed in vitro by both clathrin- dependent and clathrin-independent pathways. *J Cell Biol* 143:947-955.
- Shon KJ, Olivera BM, Watkins M, Jacobsen RB, Gray WR, Floresca CZ, Cruz LJ, Hillyard DR, Brink A, Terlau H, Yoshikami D (1998) mu-Conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. *J Neurosci* 18:4473-4481.
- Silberberg SD, Ginsburg S, Rahamimoff R (1986) Neuromuscular depression. *Rev Clin Basic Pharm* 6:15S-21S.
- Silinsky EM (1984) On the mechanism by which adenosine receptor activation inhibits the release of acetylcholine from motor nerve endings. *J Physiol (Lond)* 346:243-256.
- Silvagno F, Xia H, Brecht DS (1996) Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 271:11204-11208.

- Slepnev VI, Ochoa GC, Butler MH, De Camilli P (2000) Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J Biol Chem* 275:17583-17589.
- Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM, Walter U (1998) Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects [see comments]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:134-139.
- Song W, Zinsmaier KE (2003) Endophilin and synaptojanin hook up to promote synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 40:665-667.
- Stamler JS (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931-936.
- Stanley EF, Mirotznik RR (1997) Cleavage of syntaxin prevents G-protein regulation of presynaptic calcium channels. *Nature* 385:340-343.
- Stevens CF, Williams JH (2000) "Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12828-12833.

- Swanson TH, Drazba JA, Rivkees SA (1995) Adenosine A1 receptors are located predominantly on axons in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 363:517-531.
- Tanuma S, Kawashima K, Endo H (1988) Eukaryotic mono(ADP-ribosyl)transferase that ADP-ribosylates GTP-binding regulatory Gi protein. *J Biol Chem* 263:5485-5489.
- Thomas GD, Sander M, Lau KS, Huang PL, Stull JT, Victor RG (1998) Impaired metabolic modulation of alpha-adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15090-15095.
- Thomas S, Robitaille R (2001) Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21:1087-1095.
- Thurieu C, Brosius J, Burne C, Jolles P, Keen JH, Mattaliano RJ, Chow EP, Ramachandran KL, Kirchhausen T (1988) Molecular cloning and complete amino acid sequence of AP50, an assembly protein associated with clathrin-coated vesicles. *DNA* 7:663-669.
- Torres GE, Haines WR, Egan TM, Voigt MM (1998) Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* 54:989-993.

- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420:788-794.
- Trussell LO, Jackson MB (1985) Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4857-4861.
- Tsim KW, Choi RC, Siow NL, Cheng AW, Ling KK, Jiang JX, Tung EK, Lee HH, Xie QH, Simon J, Barnard EA (2003) ATP induces post-synaptic gene expressions in vertebrate skeletal neuromuscular junctions. *J Neurocytol* 32:603-617.
- Ungewickell E, Branton D (1981) Assembly units of clathrin coats. *Nature* 289:420-422.
- Valtorta F, Villa A, Jahn R, De Camilli P, Greengard P, Ceccarelli B (1988) Localization of synapsin I at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 24:593-603.
- Verstreken P, Koh TW, Schulze KL, Zhai RG, Hiesinger PR, Zhou Y, Mehta SQ, Cao Y, Roos J, Bellen HJ (2003) Synaptojanin is recruited by endophilin to promote synaptic vesicle uncoating. *Neuron* 40:733-748.

- Vickery RG, von Zastrow M (1999) Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J Cell Biol* 144:31-43.
- Virmani T, Han W, Liu X, Sudhof TC, Kavalali ET (2003) Synaptotagmin 7 splice variants differentially regulate synaptic vesicle recycling. *Embo J* 22:5347-5357.
- von Poser C, Zhang JZ, Mineo C, Ding W, Ying Y, Sudhof TC, Anderson RG (2000) Synaptotagmin regulation of coated pit assembly. *J Biol Chem* 275:30916-30924.
- Wagner JA, Carlson SS, Kelly RB (1978) Chemical and physical characterization of cholinergic synaptic vesicles. *Biochemistry* 17:1199-1206.
- Wang JH, Ko GY, Kelly PT (1997) Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity. *J Clin Neurophysiol* 14:264-293.
- Wang T, Xie Z, Lu B (1995) Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature* 374:262-266.
- Wang Y, Newton DC, Marsden PA (1999) Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev Neurobiol* 13:21-43.

- Weis S, Schneggenburger R, Neher E (1999) Properties of a model of Ca⁺⁺-dependent vesicle pool dynamics and short term synaptic depression [In Process Citation]. *Biophys J* 77:2418-2429.
- White TD (1984) Characteristics of neuronal release of ATP. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 8:487-493.
- Wiencken AE, Casagrande VA (1999) Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex. *Glia* 26:280-290.
- Wigge P, McMahon HT (1998) The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci* 21:339-344.
- Wilson RI, Yanovsky J, Godecke A, Stevens DR, Schrader J, Haas HL (1997) Endothelial nitric oxide synthase and LTP [letter]. *Nature* 386:338.
- Witzemann V, Barg B, Criado M, Stein E, Sakmann B (1989) Developmental regulation of five subunit specific mRNAs encoding acetylcholine receptor subtypes in rat muscle. *FEBS Lett* 242:419-424.

- Woolf CJ, Reynolds ML, Chong MS, Emson P, Irwin N, Benowitz LI (1992) Denervation of the motor endplate results in the rapid expression by terminal Schwann cells of the growth-associated protein GAP-43. *J Neurosci* 12:3999-4010.
- Wu LG, Betz WJ (1998) Kinetics of synaptic depression and vesicle recycling after tetanic stimulation of frog motor nerve terminals. *Biophys J* 74:3003-3009.
- Wu LG, Borst JG (1999) The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron* 23:821-832.
- Yamabhai M, Hoffman NG, Hardison NL, McPherson PS, Castagnoli L, Cesareni G, Kay BK (1998) Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J Biol Chem* 273:31401-31407.
- Yamada K, Nabeshima T (1998) Modulation of nitric oxide production in vivo in the brain. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 20:601-605.
- Yang CC, Alvarez RB, Engel WK, Haun CK, Askanas V (1997) Immunolocalization of nitric oxide synthases at the postsynaptic domain of human and rat neuromuscular junctions--light and electron microscopic studies. *Exp Neurol* 148:34-44.

- Yao PJ, Zhang P, Mattson MP, Furukawa K (2003) Heterogeneity of endocytic proteins: distribution of clathrin adaptor proteins in neurons and glia. *Neuroscience* 121:25-37.
- Ye W, Lafer EM (1995) Bacterially expressed F1-20/AP-3 assembles clathrin into cages with a narrow size distribution: implications for the regulation of quantal size during neurotransmission. *J Neurosci Res* 41:15-26.
- Young GP, Qiao JZ, Al-Awqati Q (1988) Purification and reconstitution of the proton-translocating ATPase of Golgi-enriched membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9590-9594.
- Young ME, Radda GK, Leighton B (1997) Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem J* 322:223-228.
- Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C (1991a) Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem* 266:12544-12547.
- Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Ohkawa S, Ohnishi K, Terao S, Kawai C (1991b) Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem* 266:3369-3371.

- Zhong H, Yokoyama CT, Scheuer T, Catterall WA (1999) Reciprocal regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nat Neurosci* 2:939-941.
- Zhou Z, Mislser S, Chow RH (1996) Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophys J* 70:1543-1552.
- Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12:13-31.
- Zucker RS (1993) Calcium and transmitter release. *J Physiol Paris* 87:25-36.
- Zucker RS (1999) Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 9:305-313.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.

15. ANNEXE

Figure ici en annexe un article de revue collectif publié dans *The Journal of Neurocytology* à l'occasion d'un numéro spécial sur la jonction neuromusculaire.

Daniel S. Auld, Aurore Colomar, Eve-Lyne Bélair, Annie Castonguay, Audrée Pinard, Isabelle Rousse, Sébastien Thomas et Richard Robitaille

Modulation of neurotransmission by reciprocal synapse-glia interactions at the neuromuscular junction

Journal of Neurocytology 32, 1003–1015 (2003)

Modulation of neurotransmission by reciprocal synapse-glia interactions at the neuromuscular junction

DANIEL S. AULD, AURORE COLOMAR, EVE-LYNE BÉLAIR,
ANNIE CASTONGUAY, AUDRÉE PINARD, ISABELLE ROUSSE,
SÉBASTIEN THOMAS and RICHARD ROBITAILLE*

Département de physiologie, Université de Montréal, Centre de Recherche en Sciences Neurologiques, PO-Box 6128, Station Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

Received 23 April 2003; revised 30 May 2003; accepted 4 June 2003

Abstract

Perisynaptic Schwann cells are glial cells that are closely associated with pre- and postsynaptic elements of the neuromuscular junction. Recent evidence shows that these cells detect and modulate neurotransmission in an activity-dependent fashion. Through G-protein signalling and Ca^{2+} released from internal stores they can decrease or increase neurotransmitter release, respectively. Thus, they help to establish the level of neurotransmission associated with activity dependent synaptic plasticity. We discuss evidence implicating perisynaptic Schwann cells as being active partners in neurotransmission at the neuromuscular junction, with emphasis on the modulation of short-term plasticity and potential implications for long-term changes.

Introduction

The neuromuscular junction (NMJ) consists of three cellular compartments: the nerve terminal, the postsynaptic muscle fibre and the perisynaptic Schwann cells (PSCs). The purpose of the NMJ is to generate a chemical synapse that results in nervous control over muscle contraction. By this functional definition, it is clear that the presynaptic nerve terminal and the postsynaptic muscle fibre are immensely important for the physiological economy of the NMJ. Nevertheless, PSCs are also a component of the NMJ and recent studies show that they play widespread and significant roles in synaptic plasticity, development, and repair following disruption of function. This review will focus on the interactions between PSCs and synaptic plasticity, including: the response of PSCs to neurotransmission, the feedback actions of PSCs on synaptic activity, the potential involvement of novel chemical neuromodulators, and possible links between PSCs and changes in long-term synaptic efficacy.

The neuromuscular junction and perisynaptic Schwann cells

Classically, the NMJ has been described as having two compartments: the presynaptic nerve terminal and the postsynaptic end-plate region of the muscle fibre. The nerve terminal is rich with neurotransmitter containing synaptic vesicles, which are located primarily at active zones near Ca^{2+} entry sites (Robitaille *et al.*, 1990). At frog and mammalian NMJs, acetylcholine (ACh) is the primary neurotransmitter. Indeed, the seminal work of Dr. Bernard Katz and his colleagues established the quantal theory of neurotransmission by studying cholinergic transmission at this synapse (Katz, 1971). In addition to ACh, adenosine triphosphate (ATP) is an important co-transmitter (Smith, 1991). Vesicular co-localization of ACh and ATP was initially identified at the Torpedo electric organ, a specialized NMJ (Dowdall, 1974; Meunier, 1975; Carlson, 1978; Tashiro, 1978). ATP is degraded by ectonucleotidases that give rise to the neurotransmitter-like substances adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate

*To whom correspondence should be addressed.

(AMP) and adenosine (Illes, 2000; Zimmermann, 2000).

Immunostaining has also revealed peptides, such as substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP), within large dense-core vesicles (LD-CVs) of the presynaptic nerve terminal (Matteoli, 1988, 1990). Several neuromodulatory influences have been ascribed to these peptides at the NMJ (Steinacker, 1977; Akasu, 1986; Van der Kloot *et al.*, 1998). However, the kinetics of peptide release differ from that of ACh and ATP containing small clear vesicles (SCVs) (Karhunen, 2001). In light of this, it is interesting that Aplysia motor neurons release ACh following a single action potential, but that repetitive firing is required for peptide secretion (Cohen *et al.*, 1978; Whim & Lloyd, 1989; Vilim *et al.*, 1996). Thus, the most significant actions of peptides likely occur in an activity-dependent manner. In keeping with this, PSC Ca^{2+} responses are activity-dependent and are regulated by endogenous peptide action at the NMJ (see below; Bourque & Robitaille, 1998).

The postsynaptic end-plate is a structural specialisation of the muscle fibre and is closely opposed to the presynaptic nerve terminal. The end-plate region is regularly invaginated by postjunctional folds. Nicotinic acetylcholine receptors (AChRs) are clustered atop these folds and are directly opposed to active zones (Salpeter, 1987). Despite the prominent role of pre- and postsynaptic elements in this specialised region of chemical communication, there is now a growing body of evidence that PSCs make key contributions to this communication (Castonguay *et al.*, 2001; Auld & Robitaille, 2003) (Fig. 1).

PSCs do not myelinate the nerve terminal, but they have several proteins that characterise myelinating Schwann cells [*e.g.*, P0, myelin associated protein (MAG) and galactocerebroside (Georgiou & Charlton, 1999)]. There are typically 3–5 PSCs found at each NMJ. Using various markers [*i.e.*, the 2A12 antibody (Astrow *et al.*, 1998)] it has been shown that PSC processes run along nerve terminal branches. In frogs, these processes make finger-like intrusions into the synaptic cleft at irregular intervals (1–3 μ m) between active zones (Couteaux & Pecot-Dechavassine, 1974; Peper *et al.*, 1974; Jahromi *et al.*, 1992; Astrow *et al.*, 1998). In mammals, the synaptic cleft is not completely traversed by PSC processes. However, processes still approach the cleft and are in close proximity to neurotransmitter release sites (Salpeter, 1987). PSCs respond to neurotransmission through receptors and ion channel activation. They have functional muscarinic ACh receptors (Jahromi *et al.*, 1992; Robitaille *et al.*, 1997; Georgiou *et al.*, 1999), purinergic receptors (Robitaille, 1995), substance P (SP) receptors (Bourque & Robitaille, 1998) and L-type voltage dependent Ca^{2+} channels (Robitaille *et al.*, 1996). Neurotransmitter receptors and the close association of PSCs with other elements of the NMJ facilitate

the capacity of these cells to detect changes in the NMJ environment (Auld & Robitaille, 2003).

Neurotransmission induces responses in perisynaptic Schwann cells

High frequency stimulation of the motor nerve is associated with rapid elevation of PSC Ca^{2+} in *in situ* frog muscle preparations (where NMJ anatomy is preserved as it is *in vivo*) (Fig. 1) (Jahromi *et al.*, 1992; Reist & Smith, 1992). These Ca^{2+} responses are related to neurotransmitter release, as opposed to other causes (*e.g.*, changes in extracellular ion concentration associated with repetitive neuronal depolarisation) because when transmitter release is blocked, PSC Ca^{2+} responses are greatly reduced (Jahromi *et al.*, 1992). Further supporting this is the observation that PSCs responded with Ca^{2+} elevation to exogenous application of ACh and ATP (Jahromi *et al.*, 1992). Mouse PSCs respond in a similar fashion to synaptic activity (Rochon *et al.*, 2001), implying that PSC sensitivity to neurotransmission is a fundamental, evolutionarily-conserved feature of NMJs.

Frog and mammal PSC Ca^{2+} responses involve intracellular Ca^{2+} stores, as responses to local applications of ATP or ACh were unaffected by removal of extracellular Ca^{2+} (Jahromi *et al.*, 1992). Interestingly, unlike the pharmacological profile of the muscle fibre, amphibian and mammalian PSCs do not respond to nicotinic stimulation with Ca^{2+} elevation (Jahromi *et al.*, 1992; Reist & Smith, 1992). They do, however, respond to muscarinic stimulation with Ca^{2+} elevation. At the frog NMJ, muscarinic agonists readily induce Ca^{2+} elevation (Robitaille *et al.*, 1997), but only gallamine—a subtype non-specific muscarinic antagonist—was able to block this effect. Thus, a receptor with unique pharmacology mediates the PSC response to muscarine at the normally innervated amphibian NMJ (Robitaille *et al.*, 1997; Georgiou *et al.*, 1999). By contrast, the mammalian PSC muscarine-induced Ca^{2+} response is blocked by atropine, thus conforming to a more typical pharmacology.

PSCs are also responsive to purinergic agonists. At frog NMJs, adenosine induces Ca^{2+} responses through A1 receptors, whereas ATP acts through P2X and P2Y receptors (Robitaille, 1995). After nerve-evoked transmitter release, antagonism of adenosine receptors did not prevent frog PSC Ca^{2+} responses. However, block of ATP receptors reduced the Ca^{2+} responses, indicating these cells are sensitive to endogenous ATP released during synaptic transmission (Robitaille, 1995).

At mammalian PSCs, adenosine also induced Ca^{2+} responses during synaptic transmission. This required A1 receptor activation since Ca^{2+} responses to endogenous nerve-activity were partially blocked by A1 antagonism (Rochon *et al.*, 2001). Thus, in contrast to the frog NMJ, endogenous adenosine helps to activate mammalian PSCs (Rochon *et al.*, 2001). As it does in the

frog, ATP evokes a significant Ca^{2+} response in PSCs at mouse NMJs. However, its role and mode of action remain unclear (Rochon *et al.*, 2001). These experiments show that there have been evolutionary modifications in the details of how PSCs respond to neurotransmission at the NMJ. These differences are expected to be related to—and contribute to—the different physiology of amphibian and mammalian NMJs. Despite the variations, there is a strong conservation of function between these synapses that is reflected by the similarities of their responses (*e.g.*, sensitive to ACh through muscarinic, not nicotinic receptors; frequency-dependence of synaptic-activity induced Ca^{2+} responses).

PSCs also respond to other neurotransmitter-like substances that are released during synaptic activity. For instance, SP induced Ca^{2+} responses in frog PSCs. These responses were blocked by an NK-1 receptor antagonist and, like ACh- and ATP-induced responses, they were dependent upon intracellular stores (Bourque & Robitaille, 1998). Although SP induced Ca^{2+} responses by itself, exposure to SP actually reduced Ca^{2+} responses associated with synaptic activity, muscarine or ATP exposure (Bourque & Robitaille, 1998). This effect was similar to the reduction in the Ca^{2+} response normally associated with high-frequency nerve stimulation. Moreover, the normal run-down that accompanies repetitive nerve stimulation was attenuated by an NK-1 antagonist (Bourque & Robitaille, 1998), showing that endogenous SP makes an important contribution to this reaction to activity. These data imply that SP released from the nerve terminal during high frequency stimulation modulates the strength of the PSC response to classic neurotransmit-

ters that are released concurrently with the peptide. Accordingly, it appears that PSC responses are controlled by different signals from the nerve terminal.

Depending on the duration and intensity of synaptic activity—resulting in secretion of different neurotransmitters, peptides, and possibly different retrograde messengers released from the muscle fibre—PSC reaction to neurotransmitter exposure is likely to be altered by variable activation of intracellular signalling pathways. In keeping with this, the Ca^{2+} response of PSCs to synaptic activity varies according to the intensity of that activity (Rousse & Robitaille, 2001). But the PSC Ca^{2+} response is likely only one of many reactions to neurotransmission. Indeed, given that several receptors are activated on PSCs during synaptic activity (summarized in Table 1), complex patterns of signal transduction are likely generated. An important question is whether these different signalling responses result in different regulation of synaptic function by PSCs. Evidence suggests that this is the case. In fact, PSCs differentially regulate neurotransmission according to activation of different signal transduction pathways in response to synaptic activity.

Perisynaptic Schwann cells and regulation of neurotransmission

The NMJ is characterised by several short-term plastic events that are coincident with—or immediately follow—intense synaptic activity (Regher & Stevens, 2001; Zucker & Regehr, 2002). These changes in neurotransmission are primarily the result of effects that are ultimately presynaptic. Prominent among these is

Table 1. Perisynaptic Schwann cell responses to synaptic activity.

	<i>Physiological effect on perisynaptic Schwann cells</i>	<i>Methods</i>	<i>References</i>
<i>Frog NMJ</i>			
Nerve stimulation	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase elicited by transmitter release	Ca^{2+} imaging	Jahromi <i>et al.</i> (1992) and Reist and Smith (1992)
Acetylcholine	Activation of muscarinic AChRs, increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Downregulation of GFAP expression	Ca^{2+} imaging GFAP immunostaining	Jahromi <i>et al.</i> (1992) and Robitaille (1997) Georgiou <i>et al.</i> (1994, 1999)
ATP	Activation of P2X, P2Y, increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$	Ca^{2+} imaging	Jahromi <i>et al.</i> (1992) and Robitaille (1995)
Substance P	Activation of NK1 receptors, increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$	Ca^{2+} imaging	Bourque and Robitaille (1998)
Deprivation of synaptic activity	Increase of GFAP expression	GFAP immunostaining	Georgiou <i>et al.</i> (1994, 1999)
<i>Mouse NMJ</i>			
Acetylcholine	Activation of muscarinic AChRs, increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$	Ca^{2+} imaging	Rochon <i>et al.</i> (2001)
Adenosine	Activation of A1 receptors, increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$	Ca^{2+} imaging	Rochon <i>et al.</i> (2001)

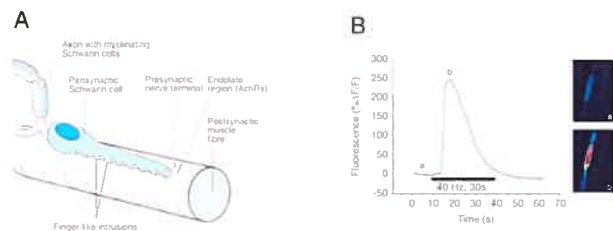


Fig. 1. Perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction and their Ca^{2+} response to synaptic activity. (A) PSCs, non-myelinating glial cells located at the NMJ, are closely apposed to nerve terminals and extend intermittent finger-like intrusions into the synaptic cleft. These intrusions are located near nerve terminal active zones, where synaptic vesicles are concentrated. Thus, PSCs are well placed anatomically to interact with neurotransmission. (B) A typical PSC Ca^{2+} response to high-frequency motor nerve stimulation at the frog NMJ. Intracellular fluorescence changes were monitored using the Ca^{2+} indicator Fluo3-AM. Nerve stimulation at 0.2 Hz did not elicit a PSC Ca^{2+} increase, whereas stimulation at 40 Hz for 30 sec elicited a robust increase. Insert *a*. shows a false color confocal image of a PSC at rest. Insert *b*. shows the same PSC at the peak of the Ca^{2+} response accompanying 40 Hz stimulation. Blue represents low levels of fluorescence. and red high levels. Insert *a*. and *b*. depict the same cell as in the graph.

depression (Betz, 1970), characterised by reduced neurotransmitter release coincident with depletion of the readily releasable pool of synaptic vesicles. In contrast to depression, neurotransmitter release is increased by facilitation when the nerve terminal is invaded by successive action potentials within a very short time frame

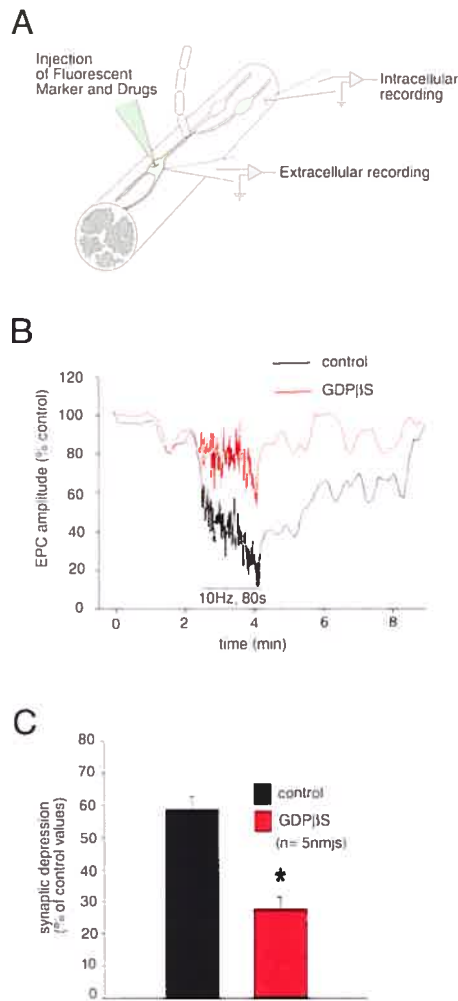


Fig. 2.

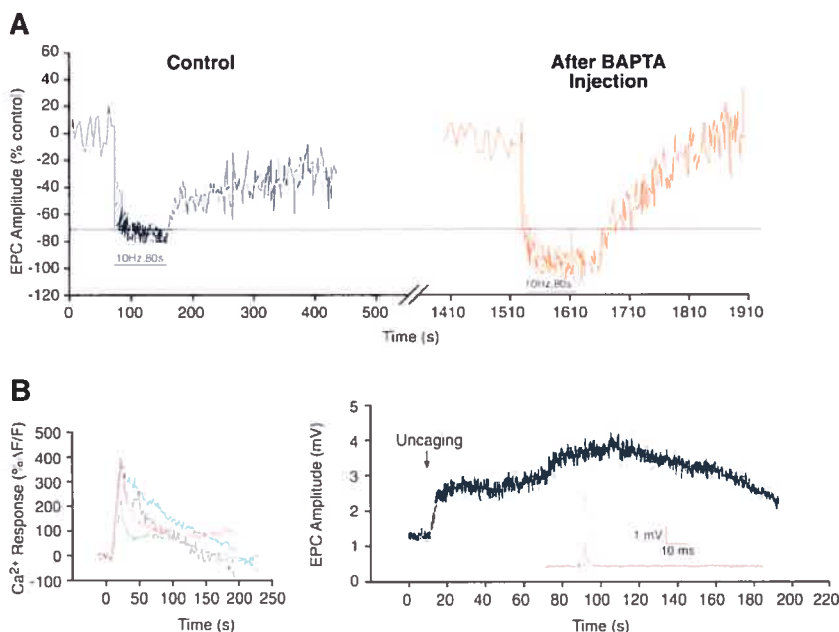


Fig. 3.

(tens of milliseconds) (Mallart & Martin, 1968). Under these conditions, presynaptic changes in the probability of release augment the number of quanta of neurotransmitter released and thus augment the size of the end-plate potential following action potential invasion of the nerve terminal. There is considerable evidence to suggest that residual terminal Ca^{2+} plays a role in this facilitation (Regher & Stevens, 2001; Zucker & Regehr, 2002). Other activity-dependent effects that enhance neurotransmission include augmentation (Magleby & Zengel, 1976) and potentiation (Rosenthal, 1969) and occur following more prolonged stimulation. Potentiation is initiated following a fairly sustained train of inputs. Here, the presynaptic increase in neurotransmitter release is larger and longer (up to several minutes) than that associated with facilitation. Presynaptic Ca^{2+} changes are also likely to play key roles in augmentation and potentiation, but the factors that influence these changes have not been fully elucidated (Regher & Stevens, 2001; Zucker & Regehr, 2002). Recent data suggest that PSCs can influence short-term plasticity at the NMJ, likely through secreted molecules that ultimately cause changes in the presynaptic terminal (Robitaille, 1998, Castonguay & Robitaille, 2001).

G-proteins and reduction of neurotransmission by perisynaptic Schwann cells

The contribution of PSCs' to short-term synaptic efficacy was evaluated by selective modulation of PSCs by specific intracellular injections that did not perturb the nerve terminal or muscle fibre. Considering that the most significant neurotransmitters responsible for activating PSCs during high-frequency stimulation act by G-protein coupled receptors, these cells

were injected with GTP analogues to mimic their activation by neurotransmitter or with GDP analogues to inhibit this activation (Robitaille, 1998). Immediately following PSC activation by injection of $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (a non-hydrolysable GTP-analogue), neurotransmitter release associated with low frequency-stimulation (0.2 Hz) was reduced. This decrease was related to a reduced probability of release and is thus consistent with a presynaptic effect (Robitaille, 1998). These data suggest that PSCs, upon activation, influence nerve terminal release of neurotransmitter.

By contrast, inhibition of G-proteins by $\text{GDP}\beta\text{S}$ (a non-hydrolysable GDP analogue) injection did not affect neurotransmitter release during low-frequency nerve terminal firing (Robitaille, 1998). Interestingly, similar low-frequency activity does not activate PSCs as indicated by the absence of detectable Ca^{2+} elevation (Jahromi *et al.*, 1992). Hence, PSCs do not modulate neurotransmitter release in a tonic fashion. Rather, their acute influence on synaptic activity is dependent upon G-protein activation, presumably in a manner directly related to synaptic activity. It should be indicated that even though low levels of synaptic activity are not associated with detectable PSC Ca^{2+} responses or PSC-dependent neuromodulation, PSCs can detect and respond to low-levels of synaptic activity in a different fashion. Indeed, low-frequency nerve firing helps to establish specific patterns of PSC gene expression (Georgiou *et al.*, 1994, 1999).

The activity-dependent hypothesis of feedback modulation of neurotransmission by PSCs was further investigated using injections of $\text{GDP}\beta\text{S}$ into PSCs during high-frequency nerve terminal firing (10 Hz, 80 s) (Fig. 2), a level of activity normally associated with depression of neurotransmission (Robitaille, 1998).

Fig. 2. Modulation of synaptic depression by perisynaptic Schwann cells. PSC G-protein pathways were manipulated to assess PSC modulation of synaptic depression. (A) G-protein activity in a single PSC was inhibited by specific ionophoretic injection of $\text{GDP}\beta\text{S}$. Focal electrode recordings of end-plate currents (EPCs) represent neurotransmitter release in the local vicinity of the injected PSC. Intracellular electrode recordings of end-plate potentials (EPPs) were used to monitor the possibility of nerve terminal perturbation during placement of the other electrodes (data not shown). (B) EPC amplitude expressed as a percentage of control value before, during and after a train of high-frequency stimuli (10 Hz, 80 s). In black, traces in control before $\text{GDP}\beta\text{S}$ injection in the PSC. In red, traces recorded 25 min after $\text{GDP}\beta\text{S}$ injection. Inhibition of PSC G-protein activity led to reduced synaptic depression in the local region of PSC coverage. (C) Average depression in control condition (black) and following PSC $\text{GDP}\beta\text{S}$ injection (red). Synaptic depression was significantly reduced by blocking PSC G-protein activity ($p < 0.05$). Adapted from Robitaille (1998).

Fig. 3. Ca^{2+} increase in perisynaptic Schwann cells enhances neurotransmission. (A) EPC amplitude expressed as a percentage of control value before, during and after a train of high-frequency stimuli (10 Hz, 80 s). In black, traces in control condition. Buffering intracellular Ca^{2+} with ionophoretic injection of BAPTA injection into a specific PSC resulted in a more pronounced depression (red trace). This demonstrates the existence of potentiating effects of PSCs on neurotransmitter release during high frequency synaptic activity. Adapted from Castonguay and Robitaille (2001). (B) Ca^{2+} uncaging with DMNP-EDTA-AM in PSCs increases intracellular Ca^{2+} in four PSCs from the same NMJ (each coloured line represents the response of a single PSC). This is associated with potentiation of EPP amplitude evoked at low frequency nerve stimulation (0.2 Hz) recorded in the presence of D-tubocurarine chloride to block muscle contractions. Insert shows a typical EPP before (black trace) and at the peak of glial induced potentiation (red trace). These data suggest that Ca^{2+} increase in PSCs is sufficient to induce synaptic potentiation.

Antagonism of G-protein signalling with GDP β S, a manipulation that effectively isolated the PSC from its most significant input (*e.g.*, ACh, ATP), reduced synaptic depression (increased transmitter release) (Robitaille, 1998). Accordingly, these observations suggest that high-frequency nerve stimulation results in activation of G-proteins in PSCs (probably via neurotransmitter receptors, including muscarinic and purinergic receptors), which causes the production/release of neuromodulators that subsequently reduce transmitter release.

Although these data suggest that PSCs contribute to the extent of synaptic depression, it is important to note that reduction in neurotransmitter release associated with high-frequency firing is an intrinsic neuronal function that occurs in the absence of PSCs. However, these data show that synaptic depression can be modulated not only by neuronal elements, but also by non-neuronal, glial elements.

These observations led to the proposal that glial cells should be considered important elements of chemical synapses (Ullian & Barres, 1998) and helped give rise to the concept of the tripartite synapse (Araque *et al.*, 1999), which contends that functionally as well as morphologically, synapses consist of not only of pre- and postsynaptic elements, but also of perisynaptic glial cells. One possible function for PSC control of neurotransmission at the NMJ could be to slow potentially overworked neurons or muscle fibres. This could contribute to a more rapid recovery from high-frequency firing, enabling reduced fatigue.

Glutamate and nitric oxide as neuromodulators at the NMJ

The evidence discussed previously suggests that PSCs influence a portion of synaptic depression at the NMJ. In light of this, our laboratory has investigated molecules that could be involved in PSC modulation of depression. Notably, glutamate and nitric oxide have been studied in light of an activity-dependent model of depression.

GLUTAMATE MODULATION OF NEUROTRANSMISSION AT THE NMJ

The NMJ has traditionally been considered to be purely cholinergic. However, recent evidence has shown that glutamate is a neuromodulator at this synapse. Application of exogenous glutamate decreases miniature EPP frequency and EPP amplitude, both by approximately 20%, and this is dependent upon metabotropic receptor signalling (Lévesque & Robitaille, 2000; Pinard *et al.*, 2002). Moreover, these effects are consistent with an ultimately presynaptic mechanism. Since the immunohistochemical data suggest that metabotropic receptors are located primarily on the postsynaptic muscle fibre,

to be consistent with a presynaptic mechanism, there must be a retrograde messenger(s) produced (possibly nitric oxide; see below) that affects the nerve terminal.

In addition to the effects of exogenous glutamate, endogenous glutamate makes a contribution to activity-dependent depression. Antagonists of metabotropic glutamate receptors reduced depression. By contrast, antagonists to the glutamate-aspartate transporter (GLAST) increased depression and this is consistent with reduced clearance and accumulation of excess glutamate in the synaptic cleft. GLAST immunoreactivity was found mainly on PSCs, although it may also be present on the nerve terminal (Pinard *et al.*, 2002). The finding of this transporter on PSCs is consistent with the observation that they stain intensely for glutamate (Waerhaug & Ottersen, 1993; Lévesque *et al.*, 2000). These observations are particularly poignant in light of the evidence that CNS glial cells (astrocytes) are key regulators of synaptic glutamate levels through action of their uptake systems (Bergles & Jahr, 1998; Danbolt, 2001). Moreover, CNS astrocytes can even release glutamate (Parpura *et al.*, 1994; Mazzanti *et al.*, 2001). Whether PSCs modulate synaptic depression by release of glutamate or by regulation of its uptake are current research focuses of the laboratory.

The presence of glutamate and its receptors at the NMJ, as well as its effects on neurotransmission, have also been described by other groups in different species and at different developmental stages. It was shown that NR-1 subunits of glutamate NMDA receptors are present at the rat and mouse NMJ (Berger *et al.*, 1995; Grozdanovic & Gossrau, 1998) and it has been reported that NMDA receptor activation can suppress non-quantal secretion of ACh at the NMJ (Malomuzh *et al.*, 2002). Moreover, glutamate has been shown to be excitatory at immature, developing NMJs (Liou *et al.*, 1996). The differences in glutamate action and receptor profile reported in these and our studies is likely related to species (*e.g.*, mouse versus frog) and developmental variations. Nevertheless, the common thread between these studies is that neurotransmission at this classic cholinergic synapse is modulated by glutamate, although the nature of this modulation appears to be context specific.

NITRIC OXIDE MODULATION OF NEUROTRANSMISSION AT THE NMJ

Nitric oxide (NO) is a membrane-permeant gas that has been implicated in various forms of synaptic plasticity (Bredt & Snyder, 1992; Brenman & Bredt, 1997). At the NMJ, NO-synthase (NOS; the enzyme responsible for NO production) is concentrated at the end-plate, in the nerve terminal and in PSCs (Kusner & Kaminski, 1996; Yang *et al.*, 1997; Descarries *et al.*, 1998). NO is thought to participate in myoblast fusion (Lee *et al.*, 1994) and synapse elimination (Wang *et al.*, 1995) at immature

NMJs. At mature NMJs, NO is important for muscle metabolism (Young *et al.*, 1997) and participates in tissue repair (Anderson, 2000). In addition, NO has been implicated in synaptic depression at crayfish (Aonuma *et al.*, 2000) and frog (Lindgren & Laird, 1994; Thomas & Robitaille, 2001) NMJs.

NO-donors reduced EPP amplitude and miniature EPP frequency at the frog NMJ and this is consistent with a presynaptic effect (Lindgren & Laird, 1994; Thomas & Robitaille, 2001). Moreover, NO constitutively modulates neurotransmission, with NO scavengers and NOS inhibitors increasing EPP amplitude. The effect of NO donors on neurotransmission at the NMJ was abolished by prior perfusion with a guanylate cyclase inhibitor, indicating that NO depresses transmitter release by a cGMP dependent mechanism(s) (Thomas & Robitaille, 2001).

In addition to tonic modulation of neurotransmission, NO contributes to the depression in an activity-dependent manner. Application of NO scavengers reduced the level of depression (increased neurotransmission) associated with high-frequency nerve firing (Thomas & Robitaille, 2001). However, NO participated in depression by cGMP-independent mechanisms, since the use of a guanylate cyclase inhibitor did not reduce depression.

Given that PSCs have NOS (Descarries *et al.*, 1998) and respond to high-frequency synaptic activity (Jahromi *et al.*, 1992), NO production may play a role in activity-dependent modulation of neurotransmission by PSCs. In light of the fact that PSC G-protein activation is coupled to depression of neurotransmission (Robitaille, 1998), it is interesting that NO production has been linked to G-protein receptors (including muscarinic receptors) in a variety of cell types (Balligand *et al.*, 1993; Quinson *et al.*, 2000).

Although PSCs may produce NO, the presence of NOS in other NMJ compartments implies that there could be multiple NO sources.

COULD NO BE INVOLVED IN GLUTAMATE ACTIONS?

There is considerable evidence that links glutamate to NO production in the CNS (Okada, 1992; Yamada & Nabeshima, 1997) and in the PNS (Malomuzh *et al.*, 2002). Moreover, glutamate receptors and NOS are often colocalized (Soares-Mota *et al.*, 2001).

There is a remarkable level of similarity between the effects of NO and glutamate on synaptic transmission at the NMJ (Lévesque *et al.*, 2000; Thomas & Robitaille, 2001). Application of exogenous glutamate or NO reduces neurotransmitter release at low synaptic-activity levels and both endogenous molecules increase depression induced by high-frequency firing of the nerve. The presence of mGluRs on the muscle fibre and the presynaptic effects of glutamate suggest that there is an intercellular signalling molecule. Owing to the clear similarities

in their effects, NO is a good candidate to mediate glutamate neuromodulation.

If the effects of glutamate are dependent on NOS activation, then glutamate effects on neurotransmitter release should be reduced when NO metabolism is impaired. In keeping with this hypothesis, glutamate effects on neurotransmission were markedly reduced in the presence of an NO scavenger or an NOS inhibitor (Pinard *et al.*, 2002). In contrast, not all the NO production and its consequent action on neurotransmission are the result of release of glutamate. This is suggested by the more pronounced action of NO versus glutamate on depression. In addition, endogenous NO tonically modulates synaptic transmission (Thomas & Robitaille, 2001), whereas glutamate does not (Lévesque *et al.*, 2000). These data suggest that an additional glutamate-independent pathway(s) of NO production contributes to synaptic depression and tonic modulation of neurotransmission.

Calcium and potentiation of neurotransmission by perisynaptic Schwann cells

As discussed previously, either high-frequency nerve activity or application of neurotransmitters induces release of internal Ca^{2+} stores within PSCs (Jahromi *et al.*, 1992). Nevertheless, until recently, the functional consequences of these Ca^{2+} transients have been unclear. In contrast to PSC G-protein activation, which decreases neurotransmission (Robitaille, 1998), recent experiments show that PSC Ca^{2+} elevation is associated with *increased* neurotransmission.

Thapsigargin, a potent and irreversible Ca^{2+} -ATPase pump inhibitor, was used as a tool to induce Ca^{2+} release from internal stores (Thastrup *et al.*, 1990). When bath applied, thapsigargin induced a delayed and transient Ca^{2+} increase in PSCs. This was likely the result of a gradual leak of Ca^{2+} from internal stores that eventually resulted in their depletion. Following thapsigargin treatment, internal stores likely remained empty, as indicated by the inability of various agonists to induce further Ca^{2+} increases in PSCs. These results suggest that, at rest, PSC Ca^{2+} stores are fully loaded and ready to respond to physiological input (*i.e.*, an increase in synaptic activity). Accordingly, internal Ca^{2+} stores likely serve as a trigger mechanism for glial activation by neurotransmission.

Following a rapid initial increase in transmitter release (likely associated with increased terminal Ca^{2+}), a second phase of transmitter release increase was observed (Castonquay & Robitaille, 2001). This was slower to build and was transient. The slow phase of increased transmitter release correlated with the slow increase of PSC Ca^{2+} that was also induced by thapsigargin. To test the hypothesis that thapsigargin-induced PSC Ca^{2+} increases might be responsible for this slow increase in transmitter release, BAPTA was

Table 2. Some mechanisms of synaptic plasticity at the neuromuscular junction: potential Perisynaptic Schwann cell involvement.

	<i>Molecules involved</i>	<i>Methods</i>	<i>References</i>
<i>Synaptic depression</i>	Glutamate → NO → depression	Antagonist of mGluR and NO scavenger decrease high frequency depression	Thomas and Robitaille (2001) and Pinard <i>et al.</i> (2002)
Evidence for potential PSC involvement	– Glutamate – GLAST – nNOS	Positive for glutamate staining Positive for GLAST immunostaining NADPH diaphorase assay, positive for nNOS immunostaining	Waerhaug and Ottersen (1993) and Lévesque <i>et al.</i> (2000) Pinard <i>et al.</i> (2002) Descarries <i>et al.</i> (1998)
<i>Enhancement of neurotransmission</i>	Prostaglandins	Indomethacin decreases EPP amplitude, PGE2 increases EPP amplitude	Madden and Van der Kloot (1982, 1985)
Evidence for potential PSC involvement	– PLA2 – COX1	Positive for PLA2 immunostaining Positive COX1 immunostaining	Pappas <i>et al.</i> (1999) Pappas <i>et al.</i> (1999)

specifically injected into PSCs to chelate Ca^{2+} . This manipulation abolished the delayed and slow increase in PSC Ca^{2+} and neurotransmitter release (Castonguay & Robitaille, 2001). These results strongly suggest that increases in PSC Ca^{2+} are responsible for the concurrent slow increase in nerve terminal transmitter release. The hypothesis that PSC Ca^{2+} responses could positively regulate neurotransmission was supported further by injections of IP_3 into PSCs, which induced Ca^{2+} release in PSCs and caused a slow and transient enhancement of low-frequency neurotransmitter release (Castonguay & Robitaille, 2001). Similarly, photolysis of Ca^{2+} in PSCs, using multiphoton excitation, increased transmitter release (Fig. 3).

Since Ca^{2+} elevation in PSCs resulted in a potentiation of transmitter release, it was hypothesised that the PSCs Ca^{2+} responses associated with high-frequency nerve stimulation would have similar effects. Thus, it was predicted that buffering intracellular Ca^{2+} in PSCs would result in increased in synaptic depression owing to occlusion of the Ca^{2+} -dependent potentiating mechanisms. Indeed, specific BAPTA injection into PSCs resulted in more pronounced synaptic depression (Castonguay & Robitaille, 2001) (Fig. 3). These data suggest that release of Ca^{2+} from internal PSC stores contributes to establishing synaptic efficacy at intact NMJs in an activity-dependent manner. One messenger possibly released by PSCs and involved in this positive feedback regulation is prostaglandin E2. Cyclooxygenase (COX; the prostaglandin E2 synthesis enzyme) is localized to PSCs. Moreover, prostaglandin E2 enhances neurotransmission at the NMJ (Pappas *et al.*, 1999), whereas pharmacological blockade of COX results in more pronounced synaptic depression.

Our data imply that the same G-protein coupled receptors likely activate pathways in PSCs that act to enhance (effected by Ca^{2+}) (Castonguay & Robitaille,

2001) or reduce (unidentified effector mechanism) (Robitaille, 1998) neurotransmission. The different feedback modulatory actions of PSCs on synaptic transmission are summarized in Table 2.

Perspective: Perisynaptic Schwann cells and synaptic plasticity

In response to high-frequency synaptic activity, positive and negative modulation of synaptic efficacy by PSCs likely contributes to the various plastic events associated with a particular level of activity. It may seem contradictory for PSCs to positively and negatively modulate neurotransmission in response to the same synaptic input within a brief time-period. This is, however, in keeping with what is understood regarding short-term synaptic plasticity. Indeed, during high-frequency stimulation, the associated decrease in neurotransmitter release is actually the net product of several plastic processes. These include depression, facilitation, augmentation and potentiation, and each makes a variable contribution according to the frequency and duration of nerve terminal activity (Regher & Stevens, 2001; Zucker & Regehr, 2002). Thus, the apparently contradictory neuromodulation by PSCs is in keeping with a role in providing activity-dependent feedback to control neurotransmission. Indeed, PSCs may make distinct contributions to the differential short-term plastic events associated with high-frequency activity. Most likely, these different effects are mediated by release of different effector molecules.

Since patterns of neurotransmission are important for the normal maintenance of the NMJ, PSCs may make contributions to changes in long-term synaptic efficacy associated with various physiological or pathological states. Any alterations in PSC condition (*i.e.*, extended processes after denervation; see below) may

shift their tendency to enhance or decrease neurotransmission. Although changes in PSC properties may respond to, rather than precede, other changes at the NMJ, it is likely that any changes in PSC modulation of transmitter release make contributions to the observed long-term changes in synaptic efficacy.

Perisynaptic Schwann cells and long-term changes at the neuromuscular junction

Traditionally, neurotransmission and long-term synaptic stability/change have been studied separately. Nevertheless, studies have clearly demonstrated that synaptic-activity is an important determinant of synaptic state. For instance, presynaptic blockade of neurotransmission with botulinum toxin induces both nerve terminal sprouting and PSC process extension (Son & Thompson, 1995a). More dramatically than neurotransmission blockade, denervation has been associated with robust PSC process extension (Reynolds & Woolf, 1992; Woolf *et al.*, 1992; Mehta *et al.*, 1993; Chen & Ko, 1994; Son & Thompson, 1995a, b; Son *et al.*, 1996; Astrow *et al.*, 1998; Love & Thompson, 1999; O'Malley *et al.*, 1999; Koirala *et al.*, 2000). One identified function of PSC processes following denervation-associated loss of nerve contact and neurotransmission appears to be to guide re-innervating nerve terminals to end-plates (Son & Thompson, 1995a, b; Son *et al.*, 1996; Astrow *et al.*, 1998; Love & Thompson, 1999; O'Malley *et al.*, 1999; Koirala *et al.*, 2000). There is also evidence that PSCs could guide innervating axons during normal NMJ development (Herrera *et al.*, 2000). Given that large changes in PSCs accompany the severe environmental changes associated with denervation, our laboratory is interested in whether PSCs may exhibit subtler differences between NMJs that are naturally dissimilar.

Evidence shows that the NMJ is a structure capable of physiological and morphological changes in response to a modified environment. These include various forms of short-term plasticity that accompany high levels of synaptic activity and last for a few minutes at most (see above). There are, however, longer-lasting forms of plasticity at the NMJ that can persist for several days and require alterations in gene expression and new protein synthesis (Nguyen & Atwood, 1990; Davis *et al.*, 1996). Long-lasting modifications of both pre- and postsynaptic elements have been described for many species in response to various factors, including aging, hormonal status and motor activity. When subjected to prolonged nerve stimulation, the rabbit NMJ undergoes morphological changes that include (1) reduced NMJ surface area, length and width, (2) increased number of postsynaptic folds per unit area and (3) increased nerve terminal vesicle and mitochondria density (Somasekhar *et al.*, 1996). Chronic nerve stimulation also imposes a decrease in transmitter release and a higher resistance to synapse fatigue at the frog NMJ (Hinze &

Wernig, 1988). Moreover, seasonal behavioural changes in the crayfish that are associated with increased neuronal activity result in a switch of phasic NMJs (characterized by large transmitter release and fast fatigue) to tonic NMJs (characterized by smaller transmitter release and slow fatigue) (Lnenicka *et al.*, 1986; Lnenicka & Zhao, 1991). By contrast, reduced nerve activity in winter frogs is associated with increased EPP amplitude, lower facilitation and higher depression (Wernig *et al.*, 1996). It is not known whether changes in PSCs could directly contribute to changes in neurotransmission observed with activity-dependent transformation. However, given that PSCs can modulate synaptic plasticity at the NMJ—resulting in either an increase or decrease in neurotransmission—it is possible that the balance of this modulation is changed during transformation.

In fact, it seems very likely that some PSC properties will be altered by long-term changes in patterns of neurotransmission. It is already known that reduced nerve activity results in GFAP upregulation (Georgiou *et al.*, 1994). Additionally, there are changes in PSC morphology, physiology and gene expression that follow environmental changes such as denervation. Following denervation, PSCs invade the synaptic cleft (Bevan *et al.*, 1973; Dennis & Miledi, 1974; Ko, 1981), can release ACh (Bevan *et al.*, 1973; Dennis & Miledi, 1974) and extend elaborate networks of processes (Reynolds & Woolf, 1992; Woolf *et al.*, 1992; Mehta *et al.*, 1993; Chen & Ko, 1994; Son & Thompson, 1995a, b; Son *et al.*, 1996; Astrow *et al.*, 1998; Love & Thompson, 1999; O'Malley *et al.*, 1999; Koirala *et al.*, 2000). Moreover, PSCs respond to denervation with functional expression of new neurotransmitter receptors (Robitaille *et al.*, 1997).

As discussed above, patterns of nerve activity can result in NMJ size changes (Somasekhar *et al.*, 1996). In support of the likelihood that there are PSC changes following altered neurotransmission, it is known that PSC numbers positively correlate to end-plate size. For instance, PSC number increases with end-plate size at testosterone-sensitive NMJs (Lubischer & Bebinger, 1999; Jordan & Williams, 2001) and decreases when end-plates shrink (Lubischer & Bebinger, 1999). Since chronic nerve stimulation is associated with reduced NMJ size (Somasekhar *et al.*, 1996), it is quite likely that there is a downregulation of PSC number associated with chronic synapse activity. Whether any changes in PSCs occurring coincident with long-term adjustment of the NMJ are passive (reacting to pre- and postsynaptic changes without reciprocally influencing these elements) or executive (playing an active role in coordinating and producing change) is a research focus of our laboratory. Given that PSCs guide nerve terminals during reinnervation and possibly development, it is likely that they may also play a similar role under less extreme circumstances associated with activity-dependent changes in NMJ size.

Conclusion

At the NMJ, PSCs have emerged as important players in processes relating to neurotransmission. They respond to neurotransmission in an activity-dependent fashion. Moreover, they help control neurotransmission in the short-term by modulating the level of depression associated with high-frequency firing. Given these functions in the short-term, as well as their involvement in the re-establishment of synaptic connections following denervation, we hypothesise that they may also participate in long-term modifications of NMJ morphology and physiology that occur in response to changes in synaptic activity. We predict that PSCs are likely important components of an activity-dependent continuum of synaptic efficacy, stability and plasticity at the NMJ. We expect that this relationship helps maintain synaptic efficacy in the short-term, contributes to re-establishing synaptic connections after denervation and may be involved in less dramatic reorganization of the synapse in response to different patterns of neurotransmission. The central feature of this hypothesis is the capacity of PSCs to detect and respond to neurotransmission.

Acknowledgments

The authors wish to thank Joanne Vallée for technical assistance in the laboratory and Claude Gauthier for help with figure preparation. The work described from the authors' laboratory was supported by grants to R. Robitaille from the Canadian Institutes for Health Research of Canada (CIHR), National Science and Research Council (NSERC) of Canada, *Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche* (FCAR), and by awards from The EJLB Research Foundation and The Alfred P. Sloan Foundation. R. Robitaille is currently a CIHR Investigator. D.S. Auld holds a NSERC Postdoctoral Fellowship, A. Colomar the J.P. Cordeau Neuroscience Fellowship, A. Castonguay a CIHR Doctoral Award, E.-L. Bélaïr and A. Pinard NSERC Postgraduate Scholarships, I. Rousseau a *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ) Studentship and currently a CIHR Doctoral Award and S. Thomas a CIHR studentship.

References

- AKASU, T. (1986) The effects of substance P on neuromuscular transmission in the frog. *Neuroscience Research* **3**, 275–284.
- ANDERSON, J. E. (2000) A role for nitric oxide in muscle repair: Nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 1859–1874.
- AONUMA, H., NAGAYAMA, T. & TAKAHATA, M. (2000) Modulatory effects of nitric oxide on synaptic depression in the crayfish neuromuscular system. *Journal of Experimental Biology* **203** (Pt 23), 3595–3602.
- ARAQUE, A., PARPURA, V., SANZGIRI, R. P. & HAYDON, P. G. (1999) Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences* **22**, 208–215.
- ASTROW, S. H., QIANG, H. & KO, C. P. (1998) Perisynaptic Schwann cells at neuromuscular junctions revealed by a novel monoclonal antibody. *Journal of Neurocytology* **27**, 667–681.
- AULD, D. S. & ROBITAILLE, R. (2003) Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: Nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity and reinnervation. *Neuroscientist* **9**, 144–157.
- BALLIGAND, J. L., KELLY, R. A., MARSDEN, P. A., SMITH, T. W. & MICHEL, T. (1993) Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **90**, 347–351.
- BERGER, U. V., CARTER, R. E. & COYLE, J. T. (1995) Immunocytochemical localization of N-acetylaspartyl glutamate, its hydrolysing enzyme NAALADase, and the NMDAR-1 receptor at the vertebrate neuromuscular junction. *Neuroscience* **64**, 847–850.
- BERGLES, D. E. & JAHR, C. E. (1998) Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *Journal of Neuroscience* **18**, 7709–7716.
- BETZ, W. J. (1970) Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *Journal of Physiology* **206**, 629–644.
- BEVAN, S., MILEDI, R. & GRAMPP, W. (1973) Induced transmitter release from Schwann cells and its suppression by actinomycin D. *Nature New Biology* **241**, 85–86.
- BOURQUE, M. J. & ROBITAILLE, R. (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology* **512**(Pt 1), 197–209.
- BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* **8**, 3–11.
- BRENMAN, J. E. & BREDT, D. S. (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Current Opinion in Neurobiology* **7**, 374–378.
- CARLSON, S. S., WAGNER, J. A. & KELLY, R. B. (1978) Purification of synaptic vesicles from Elasmobranch electric organ and the use of biophysical criteria to demonstrate purity. *Biochemistry* **17**, 1188–1199.
- CASTONGUAY, A., LÉVESQUE, S. & ROBITAILLE, R. (2001) Glial cells as active partners in synaptic functions. *Progress in Brain Research* **132**, 227–240.
- CASTONGUAY, A. & ROBITAILLE, R. (2001) Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. *Journal of Neuroscience* **21**, 1911–1922.
- CHEN, L. & KO, C. P. (1994) Extension of synaptic extracellular matrix during nerve terminal sprouting in living frog neuromuscular junctions. *Journal of Neuroscience* **14**, 796–808.
- COHEN, J. L., WEISS, K. R. & KUPFERMANN, I. (1978) Motor control of buccal muscles in *Aplysia*. *Journal of Neurophysiology* **41**, 157–180.
- COUTEAUX, R. & PECOT-DECHAVASSINE, M. (1974) [Specialized areas of presynaptic membranes]. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Serie D: Sciences Naturelles* **278**, 291–293.
- DANBOLT, N. C. (2001) Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* **65**, 1–105.

- DAVIS, G. W., SCHUSTER, C. M. & GOODMAN, C. S. (1996) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron* **17**, 669–679.
- DENNIS, M. J. & MILEDI, R. (1974) Electrically induced release of acetylcholine from denervated Schwann cells. *Journal of Physiology* **237**, 431–452.
- DESCARRIES, L. M., CAI, S. & ROBITAILLE, R. (1998) Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *Journal of Neurocytology* **27**, 829–840.
- DOWDALL, M. J., BOYNE, A. F. & WHITTAKER, V. P. (1974) Adenosine triphosphate: A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochemical Journal* **140**, 1–12.
- GEORGIU, J. & CHARLTON, M. P. (1999) Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia* **27**, 101–109.
- GEORGIU, J., ROBITAILLE, R. & CHARLTON, M. P. (1999) Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *Journal of Neuroscience* **19**, 3836–3846.
- GEORGIU, J., ROBITAILLE, R., TRIMBLE, W. S. & CHARLTON, M. P. (1994) Synaptic regulation of glial protein expression *in vivo*. *Neuron* **12**, 443–455.
- GROZDANOVIC, Z. & GOSSRAU, R. Co-localization of nitric oxide synthase I (NOS I) and NMDA receptor subunit 1 (NMDAR-1) at the neuromuscular junction in rat and mouse skeletal muscle. *Cell Tissue Research* **29**, 57–63.
- HERRERA, A. A., QIANG, H. & KO, C. P. (2000) The role of perisynaptic Schwann cells in development of neuromuscular junctions in the frog (*Xenopus laevis*). *Journal of Neurobiology* **45**, 237–254.
- HINZ, I. & WERNIG, A. (1988) Prolonged nerve stimulation causes changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology* **401**, 557–565.
- ILLES, P., KLOTZ, K.-N. & LOSHE, M. J. (2000) Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **362**, 295–298.
- JAHROMI, B. S., ROBITAILLE, R. & CHARLTON, M. P. (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells *in situ*. *Neuron* **8**, 1069–1077.
- JORDAN, C. L. & WILLIAMS, T. J. (2001) Testosterone regulates terminal Schwann cell number and junctional size during developmental synapse elimination. *Developmental Neuroscience* **23**, 441–451.
- KATZ, B. (1971) Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science* **173**, 123–126.
- KARHUNEN, T., VILIM, F. S., ALEXEEVA, V., WEISS, K. R., & CHURCH, P. J. (2001) Targeting of peptidergic vesicles in cotransmitting terminals. *Journal of Neuroscience* **21**, 1–5.
- KO, C. P. (1981) Electrophysiological and freeze-fracture studies of changes following denervation at frog neuromuscular junctions. *Journal of Physiology* **321**, 627–639.
- KOIRALA, S., QIANG, H. & KO, C. P. (2000) Reciprocal interactions between perisynaptic Schwann cells and regenerating nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *Journal of Neurobiology* **44**, 343–360.
- KUSNER, L. L. & KAMINSKI, H. J. (1996) Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Research* **730**, 238–242.
- LEE, K. H., BAEK, M. Y., MOON, K. Y., SONG, W. K., CHUNG, C. H., HA, D. B. & KANG, M. S. (1994) Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 14371–14374.
- LÉVESQUE, S. & ROBITAILLE, R. (2000) Ca²⁺-independent ionotropic glutamate depression of transmitter release at the amphibian neuromuscular junction. *Society for Neuroscience Abstract* **26**, 884.
- LINDGREN, C. A. & LAIRD, M. V. (1994) Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *Neuroreport* **5**, 2205–2208.
- LIU, H. C., YANG, R. S. & FU, W. M. (1996) Potentiation of spontaneous acetylcholine release from motor nerve terminals by glutamate in *Xenopus* tadpoles. *Neuroscience* **75**, 325–331.
- LNENICKA, G. A., ATWOOD, H. L. & MARIN, L. (1986) Morphological transformation of synaptic terminals of a phasic motoneuron by long-term tonic stimulation. *Journal of Neuroscience* **6**, 2252–2258.
- LNENICKA, G. A. & ZHAO, Y. G. (1991) Seasonal differences in the physiology and morphology of crayfish motor terminals. *Journal of Neurobiology* **22**, 561–569.
- LOVE, F. M. & THOMPSON, W. J. (1999) Glial cells promote muscle reinnervation by responding to activity-dependent postsynaptic signals. *Journal of Neuroscience* **19**, 10390–10396.
- LUBISCHER, J. L. & BEBINGER, D. M. (1999) Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience* **19**, RC46.
- MADDEN, K. S. & VAN DER KLOOT, W. (1985) Indomethacin, prostaglandin E₂ and transmission at the frog neuromuscular junction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **232**, 305–314.
- MADDEN, K. S. & VAN DER KLOOT, W. (1982) At the frog neuromuscular junction prostaglandin synthase inhibitors depress and PGE partially restores quantal acetylcholine release. *Brain Research* **234**, 464–468.
- MAGLEBY, K. L. & ZENGEL, J. E. (1976) Augmentation: A process that acts to increase transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology* **257**, 449–470.
- MALLART, A. & MARTIN, A. R. (1968) The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *Journal of Physiology* **196**, 593–604.
- MALOMUZH, A. I., MUKHTAROV, M. R., URAZAEV, A. K., NIKOL'SKII, E. E. & VYSKOCHEL, F. (2002) The effects of glutamate on spontaneous acetylcholine secretion processes in the rat neuromuscular synapse. *Neuroscience and Behavioral Physiology* **32**, 577–582.
- MATTEOLI, M., HAIMANN, C. & DE CAMILLI, P. (1990) Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* **37**, 271–275.
- MATTEOLI, M., HAIMANN, C., TORRI-TARELLI, F., POLAK, J. M., CECCARELLI, B., & DE CAMILLI, P. (1988) Differential effect of a-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proceedings of National Academy of Science* **85**, 7366–7370.
- MAZZANTI, M., SUL, J. Y. & HAYDON, P. G. (2001) Glutamate on demand: Astrocytes as a ready source. *Neuroscientist* **7**, 396–405.
- MEHTA, A., REYNOLDS, M. L. & WOOLF, C. J. (1993) Partial denervation of the medial gastrocnemius muscle results in growth-associated protein-43 immunoreactivity in sprouting axons and Schwann cells. *Neuroscience* **57**, 433–442.
- MEUNIER, F.-M., ISRAEL, M. & LESBATS, B. (1975) Release of ATP from stimulated nerve electroplaque junctions. *Nature* **257**.

- NGUYEN, P. V. & ATWOOD, H. L. (1990) Expression of long-term adaptation of synaptic transmission requires a critical period of protein synthesis. *Journal of Neuroscience* **10**, 1099–1109.
- OKADA, D. (1992) Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *Journal of Neurochemistry* **59**, 1203–1210.
- O'MALLEY, J. P., WARAN, M. T. & BALICE-GORDON, R. J. (1999) *In vivo* observations of terminal Schwann cells at normal, denervated, and reinnervated mouse neuromuscular junctions. *Journal of Neurobiology* **38**, 270–286.
- PAPPAS, D., HARZATI, L. N. & ROBITAILLE, R. (1999) Arachidonic acid and PGE₂ as possible glial modulators of synaptic activity at the frog neuromuscular junction. *Society for Neuroscience Abstract* **25**, 1256.
- PARPURA, V., BASARSKY, T. A., LIU, F., JEFTINIJA, K., JEFTINIJA, S. & HAYDON, P. G. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* **369**, 744–747.
- PEPER, K., DREYER, F., SANDRI, C., AKERT, K. & MOOR, H. (1974) Structure and ultrastructure of the frog motor endplate. A freeze-etching study. *Cell Tissue Research* **149**, 437–455.
- PINARD, A., LÉVESQUE, S., VALLÉE, J. & ROBITAILLE, R. (2002) NO-dependence of glutamate-mediated synaptic depression at the frog neuromuscular junction. *Society for Neuroscience Abstract* **838.6**.
- QUINSON, N., MIOLAN, J. P. & NIEL, J. P. (2000) Muscarinic receptor activation is a prerequisite for the endogenous release of nitric oxide modulating nicotinic transmission within the coeliac ganglion in the rabbit. *Neuroscience* **95**, 1129–1138.
- REGEHR, W. G. & STEVENS, C. F. (2001) Physiology of synaptic transmission and short-term plasticity. In *Synapses* (edited by STEVENS, C. F.) pp. 135–175. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- REIST, N. E. & SMITH, S. J. (1992) Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **89**, 7625–7629.
- REYNOLDS, M. L. & WOOLF, C. J. (1992) Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *Journal of Neurocytology* **21**, 50–66.
- ROBITAILLE, R., ADLER, E. M. & CHARLTON, M. P. (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* **5**, 773–779.
- ROBITAILLE, R. (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience* **15**, 7121–7131.
- ROBITAILLE, R. (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* **21**, 847–855.
- ROBITAILLE, R., BOURQUE, M. J. & VANDAELE, S. (1996) Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience* **16**, 148–158.
- ROBITAILLE, R., JAHROMI, B. S. & CHARLTON, M. P. (1997) Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology* **504**(Pt 2), 337–347.
- ROCHON, D., ROUSSE, I. & ROBITAILLE, R. (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience* **21**, 3819–3829.
- ROSENTHAL, J. (1969) Post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the frog. *Journal of Physiology* **203**, 121–133.
- ROUSSE, I. & ROBITAILLE, R. (2001) Frequency dependence of synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *Society for Neuroscience Abstract* **383.10**.
- SALPETER, M. (1987) Vertebrate neuromuscular junctions: General morphology, molecular organization, and functional consequences. In *The Vertebrate Neuromuscular Junction* (edited by Salpeter, M. & Liss, A. R.) Vol. 23, pp. 1–54. New York.
- SMITH, D. O. (1991) Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat. *Journal of Physiology* **432**, 343–354.
- SOARES-MOTA, M., HENZE, I. & MENDEZ-OTERO, R. (2001) Nitric oxide synthase-positive neurons in the rat superior colliculus: Colocalization of NOS with NMDAR1 glutamate receptor, GABA, and parvalbumin. *Journal of Neuroscience Research* **64**, 501–507.
- SOMASEKHAR, T., NORDLANDER, R. H. & REISER, P. J. (1996) Alterations in neuromuscular junction morphology during fast-to-slow transformation of rabbit skeletal muscles. *Journal of Neurocytology* **25**, 315–331.
- SON, Y. J. & THOMPSON, W. J. (1995a) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* **14**, 133–141.
- SON, Y. J. & THOMPSON, W. J. (1995b) Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* **14**, 125–132.
- SON, Y. J., TRACHTENBERG, J. T. & THOMPSON, W. J. (1996) Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends in Neurosciences* **19**, 280–285.
- STEINACKER, A. (1977) Calcium-dependent presynaptic action of substance P at the frog neuromuscular junction. *Nature* **267**, 268–270.
- TASHIRO, T. & STADLER, H. (1978) Chemical composition of cholinergic synaptic vesicles from Torpedo marmorata based on improved purification. *Journal of Biochemistry* **90**, 479–487.
- THASTRUP, O., CULLEN, P. J., DROBAK, B. K., HANLEY, M. R. & DAWSON, A. P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 2466–2470.
- THOMAS, S. & ROBITAILLE, R. (2001) Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *Journal of Neuroscience* **21**, 1087–1095.
- ULLIAN, E. M. & BARRES, B. A. (1998) The Schwann song of the glia-less synapse. *Neuron* **21**, 651–652.
- VAN DER KLOOT, W., BENJAMIN, W. B. & BALEZINA, O. P. (1998) Calcitonin gene-related peptide acts presynaptically to increase quantal size and output at frog neuromuscular junctions. *Journal of Physiology* **507**, 689–695.
- VILIM, F. S., PRICE, D. A., LESSER, W., KUPFERMANN, I. & WEISS, K. R. (1996) Costorage and corelease of modulatory peptide cotransmitters with partially antagonistic actions on the accessory radula closer muscle of *Aplysia californica*. *Journal of Neuroscience* **16**, 8092–8104.
- WAERHAUG, O. & OTTERSEN, O. P. (1993) Demonstration of glutamate-like immunoreactivity at rat neuromuscular junctions by quantitative electron microscopic immunocytochemistry. *Anatomy and Embryology (Berlin)* **188**, 501–513.

- WANG, T., XIE, Z. & LU, B. (1995) Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature* **374**, 262–266.
- WERNIG, A., DORLOCHTER, M. & PALAZIS, P. (1996) Differential sensitivity to Mg(2+)-and tubocurarine-block of frog neuromuscular junctions in summer and winter. *Neuroscience Letters* **207**, 41–44.
- WHIM, M. D., LLOYD, P. E. (1989) Frequency-dependent release of peptide cotransmitters from identified cholinergic motor neurons in *Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 9034–9038.
- WOOLF, C. J., REYNOLDS, M. L., CHONG, M. S., EMSON, P., IRWIN, N. & BENOWITZ, L. I. (1992) Denervation of the motor endplate results in the rapid expression by terminal Schwann cells of the growth-associated protein GAP-43. *Journal of Neuroscience* **12**, 3999–4010.
- YAMADA, K. & NABESHIMA, T. (1997) Two pathways of nitric oxide production through glutamate receptors in the rat cerebellum *in vivo*. *Neuroscience Research* **28**, 93–102.
- YANG, C. C., ALVAREZ, R. B., ENGEL, W. K., HAUN, C. K. & ASKANAS, V. (1997) Immunolocalization of nitric oxide synthases at the postsynaptic domain of human and rat neuromuscular junctions—light and electron microscopic studies. *Exp. Neurol.* **148**, 34–44.
- YOUNG, M. E., RADDA, G. K. & LEIGHTON, B. (1997) Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle *in vitro*. *Biochem J.* **322**, 223–228.
- ZIMMERMANN, H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **362**, 299–309.
- ZUCKER, R. S. & REGEHR, W. G. (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annual Review of Physiology* **64**, 355–405.

