

Université de Montréal

**Première évaluation de l'intégralité des propriétés  
synaptiques des terminaisons en compétition lors du  
développement de la jonction neuromusculaire**

Présenté par  
Alexandre St-Pierre-See

Département de neurosciences  
Faculté de médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise en neurosciences

Avril, 2019

© Alexandre St-Pierre-See, 2019

Université de Montréal

Département de neurosciences, Faculté de Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Première évaluation de l'intégralité des propriétés  
synaptiques des terminaisons en compétition lors du  
développement de la jonction neuromusculaire**

Présenté par  
Alexandre St-Pierre-See

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Bénédicte Amilhon**  
Président-Rapporteur

**Richard Robitaille**  
Directeur de recherche

**Gary Armstrong**  
Membre du jury

## Résumé

La compétition synaptique est un processus fondamental du développement du système nerveux qui permet la mise en place de circuits neuronaux fonctionnels et fiables. Les processus qui le sous-tendent sont multiples et complexes, et leur étude dans le SNC est compliquée par la taille et l'accessibilité réduites des structures d'intérêt. Par contre, la JNM offre un environnement favorable qui permet la mise en place de conditions expérimentales robuste où ces processus peuvent être sondés.

La caractérisation de ces processus permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de plusieurs maladies neuromusculaires. De plus, elle permettrait d'améliorer significativement nos chances de comprendre les processus correspondant au niveau du SNC en fournissant de nouvelles hypothèses à tester. Par contre, le développement de protocoles expérimentaux pour étudier la compétition synaptique à la JNM demeure difficile. Les processus qui influencent la compétition et les propriétés des terminaisons sont interdépendants et l'incapacité de mesurer simultanément ces propriétés représente une contrainte majeure.

L'objectif de ce projet de recherche était de développer des outils afin de mieux mesurer et caractériser les propriétés synaptiques des terminaisons en compétition à la JNM en développement et d'utiliser ces outils afin de mieux comprendre la dynamique de la compétition.

Nous avons été en mesure de caractériser la relation entre la facilitation et la probabilité de relâche à la JNM. Puisque la facilitation et le contenu quantique peuvent être mesurés simultanément, cette relation permet de connaître le ratio de force synaptique et de probabilité de relâche entre les terminaisons. Nous montrons aussi que ces informations permettent de déduire le ratio de leur couverture territoriale. Ensemble, ces résultats représentent la première évaluation simultanée et intégrale des propriétés synaptiques des terminaisons en compétition à des jonctions neuromusculaires en développement.

Ensuite, nous avons utilisé ces outils afin d'évaluer la relation entre ces différents paramètres synaptiques. D'abord, nous avons pu conclure que les ratios de probabilité

de relâche et de couverture territoriale ont peu de corrélation avec les ratios de force synaptique dans les stades initiaux de la compétition, mais qu'une corrélation plus forte s'installe lorsqu'une des terminaisons devient au moins deux fois plus forte que sa compétitrice. De plus, nos données suggèrent que la probabilité de relâche et la couverture territoriale sont toutes deux régulées de manière dynamique au cours du processus.

Finalement, nos données suggèrent que l'importance relative des ratios de probabilité de relâche et de couverture territoriale dans la détermination des ratios de force synaptique reste constante au cours du processus et que cette importance est équivalente.

**Mots-clés :** Synapse, synaptogenèse, compétition synaptique, facilitation, couverture territoriale, force synaptique, jonction neuromusculaire.

## Abstract

Synaptic competition is a fundamental process of development of the nervous system that allows the establishment of functional and reliable neural circuits. The processes that underlie it are multiple and complex, and their study in the CNS is complicated by the size and reduced accessibility of the structures of interest. On the other hand, the neuromuscular junction offers a favorable environment that allows the setting up of robust experimental conditions where these processes can be probed.

The characterization of these processes would lead to a better understanding of the pathophysiology of several neuromuscular diseases. In addition, it would significantly improve our chances of understanding CNS-level processes by providing new hypotheses to test. On the other hand, the development of experimental protocols to study synaptic competition at the JNM remains difficult. The processes that influence competition and the properties of synaptic inputs are interdependent and the inability to simultaneously measure these different synaptic properties is a major constraint.

The objective of this research project was to develop tools to better measure and characterize the synaptic properties of competing endings at the developing NMJ and to use these tools to better understand the dynamics of competition.

We were able to characterize the relationship between facilitation and release probability at the NMJ. Since facilitation and quantum content can be measured simultaneously, this relationship allows for knowledge of synaptic inputs strength and release probability ratios. We also show this information can be used to deduce the ratio of their territorial coverage. Together, these results represent the first simultaneous and integral evaluation of the synaptic properties of competing inputs at developing neuromuscular junctions.

We further used these tools to evaluate the relationship between the different synaptic parameters. First, we were able to conclude that the release probability and territorial coverage ratios have little correlation with synaptic strength ratios in the initial stages of competition, but that a stronger correlation occurs when one input becomes at least twice as strong as his competitor. In addition, our data suggest that the release

probability and the territorial coverage are both dynamically regulated during the process.

Finally, our data suggest that the relative importance of release probability and territorial coverage ratios in the determination of synaptic strength ratios remains constant throughout the process and that this importance is equivalent.

**Keywords :** Synapse, synaptogenesis, synaptic competition, facilitation, territorial coverage, quantal content, neuromuscular junction.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières .....	v
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations .....	xi
Remerciements .....	xiii
<b>I Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Développement du système nerveux.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Formation et différenciation cellulaire.....	3
1.1.2 Le guidage axonal et la sélection des cibles .....	5
1.1.2.1 Structure du cône de croissance.....	5
1.1.2.2 Transduction du signal dans le cône de croissance.....	5
1.1.2.3 Migration du cône de croissance.....	6
1.1.2.4 Sélection des cibles .....	8
<b>1.2 La jonction neuromusculaire .....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Élément présynaptique.....	10
1.2.1.1 Cytosquelette.....	11
1.2.1.2 Organelles et organisation sous-cellulaire .....	13
1.2.1.2.1 Zones actives.....	13
1.2.1.2.2 Vésicules synaptiques .....	15
1.2.1.2.3 Mitochondries .....	15
1.2.1.3 Libération de neurotransmetteurs .....	16
1.2.1.3.1 Potentiel d'action.....	17
1.2.1.3.2 Entrée calcique .....	18
1.2.1.3.3 Exocytose .....	19
1.2.1.3.4 Regroupements vésiculaires .....	20
1.2.1.3.5 Endocytose.....	22
1.2.1.3.6 Modulation de la libération de neurotransmetteurs.....	23

1.2.2	Fente synaptique.....	25
1.2.3	Élément postsynaptique .....	26
1.2.4	Élément glial : les cellules de Schwann périssynaptiques.....	27
1.2.4.1	Fonctions gliales à la jonction neuromusculaire .....	28
1.3	Développement de la jonction neuromusculaire .....	30
1.3.1	Formation et maturation neuromusculaire .....	31
1.3.2	Compétition et élimination synaptique .....	34
1.3.2.1	Dynamiques de la compétition et contexte historique .....	34
1.3.2.2	Paramètres de l'activité synaptique.....	37
1.3.2.2.1	Paramètres intrinsèques .....	38
1.3.2.2.2	Paramètres locaux .....	40
1.3.2.3	Régulation de la structure morphologique des terminaisons.....	44
1.4	Objectifs du mémoire.....	46
2	Méthodologie .....	48
2.1	Modèle expérimental .....	48
2.2	Détermination des seuils de stimulation.....	50
2.3	Enregistrements électrophysiologiques .....	50
2.3.1	Force synaptique.....	51
2.3.2	Validation du comportement synaptique des terminaisons.....	52
2.3.2.1	Taille moyenne approximative et variance d'un quanta .....	52
2.3.2.2	Distribution des amplitudes de PPM attendue .....	53
2.3.2.2.1	Probabilité qu'une réponse soit constituée de n-quanta .....	53
2.3.2.2.2	Distribution des amplitudes de PPM attendus pour n-quanta .....	53
2.3.3	Probabilité de relâche .....	53
2.4	Étude de la couverture territoriale .....	54
2.4.1	Marquage fluorescent des structures synaptiques et imagerie.....	54
2.4.1.1	Marquage postsynaptique.....	55
2.4.1.2	Marquage de la couverture territoriale et acquisition des images .....	55
2.4.2	Analyse d'images et extraction de mesures .....	56
2.4.2.1	Alignement des séries d'images .....	56
2.4.2.2	Détermination des seuils d'intensité.....	56



2.4.2.3	Extraction des mesures de couverture territoriale.....	60
2.4.2.3.1	Visualisation d'une pile d'images .....	60
2.4.2.3.2	Création des isosurfaces .....	60
2.4.2.3.3	Propriétés des isosurfaces.....	60
2.4.2.3.4	Traitement de l'isosurface postsynaptique.....	61
2.4.2.3.5	Extraction de la couverture respective de chaque terminaison .....	63
2.5	Analyses statistiques.....	65
2.5.1	Comparaison du niveau de facilitation.....	65
3	Résultats.....	66
3.1	Enregistrement des propriétés synaptiques à une JNM bi-innervée.....	66
3.1.1	Détermination du contenu quantique.....	67
3.1.1.1	La distribution des PPM observés est similaire à la celle attendue .....	68
3.1.1.2	Les jonctions étudiées se trouvent à des stades divers de compétition.....	70
3.1.2	Détermination de la facilitation.....	71
3.1.2.1	Le niveau de facilitation des terminaisons faibles est plus élevé.....	72
3.1.2.2	Les différences de facilitation augmentent conjointement aux ratios de force synaptique .....	74
3.2	La relation entre la facilitation et la probabilité de relâche.....	75
3.2.1	Considérations particulières .....	75
3.2.2	Adaptation de l'équation de Dobrunz et Stevens .....	76
3.2.3	Détermination de la relation entre la facilitation et la probabilité de relâche aux JNM étudiées.....	79
3.2.3.1	Ajustement de l'équation de Dobrunz et Stevens .....	80
3.2.3.2	Relation entre la facilitation et la probabilité de relâche ajustée .....	83
3.3	Intermède : concernant la manière dont la compétition synaptique est étudiée lors du développement de la JNM.....	85
3.4	La force synaptique et la probabilité de relâche permettent de connaître la couverture territoriale relative.....	87
3.4.1	Relations théoriques .....	87
3.4.2	Validation de la couverture territoriale estimée .....	89
3.4.2.1	Observation et quantification de la couverture territoriale .....	89

3.4.2.2	Comparaison des observations aux prédictions théoriques .....	91
3.5	Régulation de la couverture territoriale et de la probabilité de relâche .....	94
3.6	La probabilité de relâche et la couverture territoriale déterminent conjointement la force synaptique .....	96
4	Discussion .....	99
4.1	Développement des outils et techniques .....	99
4.1.1	La relation entre la facilitation et probabilité de relâche .....	100
4.1.2	La densité de sites de relâche .....	102
4.2	Application des outils et techniques .....	102
4.2.1	Taille morphologique, taille fonctionnelle et incertitude .....	102
4.2.2	Probabilité de relâche et nombre de sites de relâche .....	103
4.2.3	Régulation de la structure morphologique.....	104
4.2.4	Régulation de la probabilité de relâche.....	106
	Conclusion .....	107
	Bibliographi .....	108
	Annexe I Code source du plugiciel de détermination des seuils d'intensité .....	i
	Annexe II Preuve: $pn \propto p$ .....	v
	Annexe III Publication Cell Reports .....	vi

# Liste des figures

Figure 1.1. Cytosquelette du cône de croissance.....	6
Figure 1.2. Ultrastructure et organisation générale de la JNM. ....	10
Figure 1.3. Ramifications et couverture présynaptiques. ....	11
Figure 1.4. Ultrastructure du cytosquelette d'actine présynaptique d'un MN.....	12
Figure 1.5. Ultrastructure de l'organisation présynaptiques à la JNM.....	14
Figure 1.6. Ultrastructure de l'organisation des organelles présynaptique à la JNM.....	17
Figure 1.7. Cycle vésiculaire et intermédiaires endocytiques. ....	21
Figure 1.8. Ultrastructure de l'organisation synaptique à la JNM. ....	25
Figure 2.1. Modèle expérimental.....	49
Figure 2.2. Algorithme de détermination des seuils d'intensité. ....	59
Figure 3.1. Détermination du contenu quantique des terminaisons en compétition. ....	69
Figure 3.2. Les JNM étudiées se trouvaient à des stades de compétition divers. ....	71
Figure 3.3. Les deux types de terminaisons montrent une $F$ à la JNM bi-innervée. ....	72
Figure 3.4. Le niveau de facilitation des terminaisons faibles est plus élevé.....	73
Figure 3.5. Les différences de facilitation augmentent conjointement aux ratios de force synaptique. ....	74
Figure 3.6. L'équation de Dobrunz et Stevens peut être normaliser selon $n$ . ....	78
Figure 3.7. Les courbes des différents points sont déplacées le long de l'abscisse proportionnellement à leur $n$ relatif.....	80
Figure 3.8. Ajustement des paramètres de l'équation de Dobrunz et Stevens aux données recueillis.....	82
Figure 3.9. Relation entre la facilitation et la probabilité de relâche ajustée aux données. ....	85
Figure 3.10. La connaissance de la probabilité de relâche et de la force synaptique des terminaisons en compétition permet de déterminer leur couverture territoriale relative.....	88
Figure 3.11. Observation et quantification de la couverture territoriale.....	90
Figure 3.12. Validation que les différences de probabilité de relâche et de couverture territoriale expliquent entièrement les différences de force synaptique. ....	93
Figure 3.13. Dynamique de la régulation de la couverture territoriale et de probabilité de relâche.....	95

Figure 3.14. La régulation de la probabilité de relâche et de la couverture territoriale  
semblent participées conjointement à la détermination de la force synaptique  
tout au long du processus de compétition.....97

# Liste des abréviations

$\varphi$  : Facteur de facilitation  
ACh : Acétylcholine  
ATP : Adénosine triphosphate  
BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*  
c.-à-d. : C'est-à-dire  
 $\text{Ca}^{2+}$  : Calcium  
 $\text{Ca}_{\text{rés}}$  : Calcium résiduel  
CAM : *Cell adhesion molecule*  
cCav : Canal calcique dépendant du potentiel  
cK<sub>Ca</sub> : Canal potassique dépendant du calcium  
cK<sub>V</sub> : Canal sodiques dépendant du potentiel  
cNav : Canal potassiques dépendant du potentiel  
CSP : Cellules de Schwann périssynaptiques  
 $d_n$  : Densité de sites de relâche  
 $f_n$  : Facteur de normalisation sur  $n$   
FGF : *Fibroblast growth factor*  
GDNF : *Glial cell-derived neurotrophic factor*  
 $\text{K}^+$  : Potassium  
 $\text{Na}^+$  : Sodium  
JNM : Jonction neuromusculaire  
 $m$  : Contenu quantique d'une terminaison, soit sa probabilité de relâche cumulative  
MN : Neurone moteur spinal  
MuSK : Kinase spécifique au muscle  
 $n$  : Nombre de sites de relâche  
NT : Neurotransmetteur  
 $\bar{p}$  : Probabilité de relâche moyenne de chaque site de relâche  
 $p_n$  : Probabilité de relâche cumulative, normalisée en fonction de  $n$   
 $\bar{p}_n$  : Probabilité de relâche cumulative moyenne, normalisée en fonction de  $n$   
PPM : Potentiel de plaque motrice  
PPMm : Potentiel de plaque motrice miniature  
 $rA_I$  : Récepteur à adénosine  $A_I$   
 $rA_{2A}$  : Récepteur à adénosine  $A_{2A}$   
rCPG : Récepteurs couplés aux protéines G  
rnACh : Récepteur nicotinique à l'acétylcholine  
RLF : Regroupement à libération facilitée  
RR : Regroupement de réserve  
SHF : Stimulation haute fréquence  
SNC : Système nerveux central  
SNP : Système nerveux périphérique  
 $t$  : Couverture territoriale

*À Virginie, Antoine, Gustave et LeChat  
Ginette, Henry et Abigail*

## Remerciements

Merci Richard, pour la confiance, les responsabilités et le respect que tu m'as accordés.

Merci Joanne, tu rends notre vie plus drôle et plus facile.

Merci Danielle, tu as une présence incomparable qui a été importante.

Merci Éric, tu es une inspiration quotidienne au niveau intellectuel et humain.

Merci à tous les autres membres du laboratoire qui m'ont aidé, soit par des discussions éclairantes, soit par des rires contagieux.

Mais, surtout,

Merci Virginie, sans toi ce travail aurait été impossible. Ton sourire, ton énergie et ton Amour m'ont nourri. Ta patience et ton appui sont l'âme de ce mémoire.

# 1 Introduction

Le système nerveux est une organisation complexe de structures qui permettent la transduction et l'interprétation de signaux électriques et chimiques. Ce système est à la base de facultés diverses allant du mouvement volontaire à la cognition et à l'interprétation de notre environnement. Les éléments constitutifs à la base de ce système, au niveau fonctionnel, sont les neurones. Il s'agit de cellules ayant une physiologie permettant la transmission électrique d'un signal sur la longueur de leurs projections, qui peuvent par ailleurs atteindre une taille de plus d'un mètre. L'une des structures essentielles au bon fonctionnement de ce système est la synapse chimique (synapse). Celle-ci permet la transduction, par la relâche de neurotransmetteurs (NT), du signal électrique propagé le long d'un neurone. Ainsi, la communication entre les éléments fonctionnels primaires du système ou entre ces éléments et des cellules/structures effectrices devient possible.

Le rôle de la synapse, aussi central au bon fonctionnement du système nerveux, dépend d'une organisation bien définie. En effet, une machinerie fiable et précise doit être échafaudée aussi bien au niveau de l'élément présynaptique, afin de réguler la libération de NTs, que de l'élément postsynaptique, afin de détecter cette libération. La mise en place de cette organisation a lieu lors du développement et sa réussite est intimement liée à la maturation de la synapse, dont l'objectif ultime, régulé par un processus de compétition synaptique, est la stabilisation et le maintien des connexions adéquates et l'élimination des connexions surnuméraires.

Historiquement, en raison de sa grande taille et de son accessibilité, la jonction neuromusculaire (JNM) est un des modèles ayant le plus contribué à notre compréhension du processus de synaptogenèse. À la JNM, plusieurs axones moteurs contactent initialement une fibre musculaire. Lors des deux premières semaines postnatales, chez la souris, ces connexions seront graduellement éliminées jusqu'à ce qu'il n'en reste qu'une seule, qui sera stabilisée et maintenue. Malgré la richesse de la littérature concernant ces phénomènes, les mécanismes qui les sous-tendent demeurent mal définis. Ainsi, l'objectif de ce mémoire est d'étudier certaines des propriétés des



terminaisons axonales en compétition à la JNM de souris afin de mieux caractériser les facteurs qui déterminent l'issue de la compétition et de l'élimination synaptique.

Cette introduction traitera d'abord du développement du système nerveux jusqu'au stade de la sélection des cibles par les projections axonales. En raison du sujet de ce mémoire, une attention particulière sera portée au développement du système nerveux périphérique. Ensuite, le fonctionnement et la structure de la JNM seront détaillés. Finalement, le développement de la JNM sera présenté selon une perspective permettant une mise en contexte adéquate des résultats de ce mémoire.

## 1.1 Développement du système nerveux

Le défi est de taille, il est de mettre en place une structure composée d'environ  $10^{11}$  neurones qui établissent chacun entre  $10^4$  et  $10^5$  connexions avec d'autres neurones ou cellules/structures effectrices (Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum et Hudspeth, 2013, p. 21). Bien sûr, ces connexions doivent être établies selon des contraintes précises qui dépendent de la mise en place de divers mécanismes et de l'interaction de plusieurs types cellulaires afin d'assurer le bon fonctionnement du système et la prise en charge adéquate de fonctions complexes. Ainsi, le nombre et le type de cellules doivent être strictement contrôlés.

Ces cellules doivent également migrer à des sites particuliers et émettre des projections axonales afin d'établir un contact avec des cibles spécifiques. Ces projections axonales migrent parfois sur de très longues distances. Cette migration (Sanes, Harris et Reh, 2012, p. 105-142) ainsi que l'établissement subséquent des connexions synaptiques appropriées (Sanes et al., 2012, p. 143-169 et 209-248) dépendent tous deux de l'interaction de plusieurs types cellulaires et de l'action de cascades moléculaires à l'origine diverse. Une fois ces connexions initiales établies, un processus de maturation permet leur remodelage, leur raffinement et leur renforcement (Sanes et al., 2012, p. 249-285).

Aux fins de présentation de ce mémoire, le développement du système nerveux peut donc être séparé en trois grandes étapes, soit : 1. la formation et la différenciation cellulaire, 2. le guidage axonal et la sélection des cibles, 3. la synaptogenèse (formation, maturation et raffinement synaptique). Les sections suivantes présenteront un aperçu des deux premières de ces grandes étapes. La troisième sera abordée dans la section 1.3 *Développement de la jonction neuromusculaire*.

### 1.1.1 Formation et différenciation cellulaire

Lors du développement embryonnaire des vertébrés, la gastrulation est un événement charnière qui permet la transformation d'une structure relativement simple, la *blastula*, en une structure plus complexe constituée de trois feuillets cellulaires nommée *gastrula*. Lors de la gastrulation, les cellules mésodermiques du *centre de Spemann* relâchent des signaux moléculaires permettant l'induction de tissu neural à

partir de l'ectoderme dorsal environnant. Ce tissu neural formera une structure connue sous le nom de plaque neurale (Sanes et al., 2012, p. 1-22).

La plaque neurale est, quant à elle, la structure qui donnera naissance à l'ensemble du système nerveux, aussi bien les neurones que les cellules gliales. Par le processus de neurulation, la plaque neurale s'invaginera vers l'intérieur de l'embryon et donnera naissance au tube neural, origine du système nerveux central (SNC). Les limites dorsales de l'invagination de la plaque neurale donneront quant à eux naissance à la crête neurale, origine d'une partie substantielle du système nerveux périphérique (SNP) (Sanes et al., 2012, p. 1-22).

Sous l'influence de plusieurs cascades moléculaires, le tube neural sera subdivisé selon un axe antéro-postérieur. Bien que la majeure partie du tube soit destinée à produire la moelle épinière, cette subdivision permettra, d'abord, la régionalisation des autres sous-structures principales du système nerveux, soit le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Ensuite, les gènes de type homéotique permettront la subdivision de chacune des parties du tube neural le long de ce même axe ; les gènes de la famille *Hox*, par exemple, dans le rhombencéphale et la moelle épinière (Sanes et al., 2012, p. 23-48).

En parallèle, le tube neural est soumis à l'influence de facteurs qui permettront sa régionalisation selon un axe dorso-ventrale. Sous la partie ventrale du tube neural se trouve la notochorde. Cette structure est responsable de la relâche du facteur Shh qui induira l'émergence de la plaque du plancher sur la partie ventrale du tube neural, ainsi que de la différenciation des cellules ventrales du tube. À la limite de la plaque neurale et de l'ectoderme, la relâche des facteurs BMP et Wnts permettent l'émergence des cellules de la crête neurale et la différenciation des cellules dorsales du tube. La corne ventrale de la moelle épinière sera le berceau des neurones moteurs spinaux (MN) alors que la corne dorsale abritera les cellules cibles des neurones sensitifs ganglionnaires (Sanes et al., 2012, p. 23-48 et 77-104).

Ainsi, ces différents processus moléculaires permettent aux différentes cellules du système nerveux d'acquérir une identité précise en fonction de leur positionnement anatomique. Ces cellules mettront ensuite en place des mécanismes de différenciation

cellulaire qui leur permettront d'acquérir les propriétés nécessaires à leur développement et à la prise en charge de leurs fonctions respectives.

## **1.1.2 Le guidage axonal et la sélection des cibles**

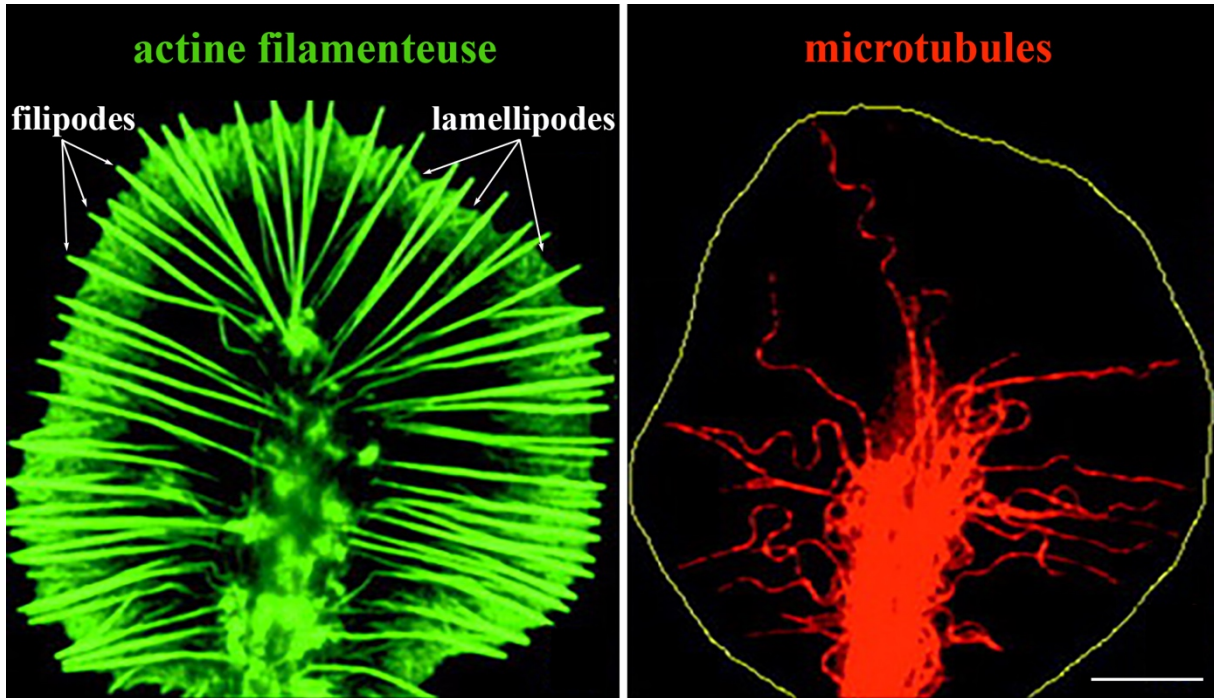
Une des structures fondamentales des neurones est l'axone, qui permet la transmission d'un signal électrique jusqu'à des cibles précises. Les axones de certains neurones, comme les MN, doivent migrer sur de très longues distances afin d'atteindre leurs cibles. Afin d'y parvenir, l'extrémité distale des axones forme un cône de croissance.

### **1.1.2.1 Structure du cône de croissance**

Le cône de croissance est une structure dynamique de forme amibe constituée de plusieurs protéines jouant un rôle dans le mouvement cellulaire (Figure 1.1). Les microtubules constituent le cœur du cytosquelette des axones et de la partie centrale des cônes de croissance. À mesure que le cône de croissance avance le long de sa voie migratoire, les microtubules sont allongés afin de stabiliser l'axone grandissant. Les filipodes sont de minces prolongements constitués principalement d'actines et de myosine. De par leur structure, ces prolongements sont extrêmement dynamiques et leur rôle est d'explorer l'environnement du cône de croissance. Une grande partie des récepteurs chimiques permettant au cône de croissance de déterminer la voie de migration adéquate est située dans la membrane des prolongements filipodes. Les prolongements lamellipodes constituent quant à eux la structure de transition entre le cœur des cônes de croissance et les prolongements filipodes. Ils sont constitués de microtubules, d'actines, de myosine et d'une panoplie d'autres protéines permettant l'échafaudage de ces différents niveaux d'organisation structuraux (Sanes et al., 2012, p. 105-142).

### **1.1.2.2 Transduction du signal dans le cône de croissance**

La majorité des récepteurs présents à la surface des cônes de croissance possèdent un domaine intracellulaire à activité tyrosine-kinase ou tyrosine-phosphatase. Les récepteurs n'ayant pas un tel domaine intracellulaire peuvent habituellement recruter d'autres protéines le possédant. Par exemple, la liaison du NCAM à son récepteur permet



**Figure 1.1. Cytosquelette du cône de croissance.**

Images en microscopie à fluorescence d'un cône de croissance immuno-marqué pour l'actine filamenteuse (Biodipy FL phalloïdine; vert) et les microtubules (alpha-tubuline, tubuline acétylé et tubuline tyrosine; rouge). Le marquage de l'actine permet de visualiser l'étendu du cône de croissance ainsi que ses structures caractéristiques que sont les lamellipodes et les filipodes. Notez la concentration de microtubules dans le cœur du cône de croissance (image de droite), alors qu'ils sont pratiquement absents des lamellipodes et des filipodes (tracé jaune, image de droite, pour référence). Échelle = 5  $\mu\text{m}$ . La figure a été modifiée de Zhou, Waterman-Storer et Cohan (2002). Droits de modification et de reproduction obtenus de *Rockefeller University Press*.

de recruter le récepteur aux FGF et d'induire une cascade de phosphorylation via son domaine tyrosine-kinase. La majorité des cascades moléculaires en aval de ces récepteurs signalent à des protéines impliquées dans le contrôle du cytosquelette. Ceci permet une réponse dynamique et rapide des filipodes à leur environnement qui guide le cône de croissance le long de sa voie migratoire (Sanes et al., 2012, p. 105-142)

### 1.1.2.3 Migration du cône de croissance

Lors de la migration, le cône de croissance adhère à la matrice extracellulaire au moyen de différents types de molécules d'adhésion. Par exemple, les intégrines sont une famille de protéines transmembranaires qui permettent aux cellules du SNC et du SNP

d'adhérer préférentiellement aux laminines et aux fibronectines, respectivement, de la matrice extracellulaire.

Les signaux permettant aux cônes de croissance de trouver le chemin adéquat peuvent être divisés en deux catégories, soit répulsifs ou attractifs. La répulsion et l'attraction peuvent se faire soit de manière locale, le plus souvent par des protéines ancrées à la matrice extracellulaire ou à d'autres cellules, soit à distance via des molécules diffusibles. La classe de molécule dominante permettant l'attraction des cônes de croissance est celle des *cell adhesion molecules* (CAM), qui permettent l'adhésion entre les cellules. Ces protéines seraient à l'origine de la fasciculation axonale, permettant à un axone pionnier d'ouvrir la voie et de guider des axones subséquents. Les protéines de la famille des sémaphorines sont quant à elles le plus souvent responsables de la répulsion et peuvent aussi bien être des molécules adhésives que des molécules diffusibles. Les processus d'attraction ou de répulsion à distance ont le plus souvent lieu le long de gradients de molécules diffusibles. L'attraction le long de gradients de facteurs trophiques, tels que le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), le *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF) et les protéines de la famille des nétrines, est un processus indispensable.

Bien que l'idée que la migration des axones et l'identification de leurs cibles soient guidées par un facteur diffusible provenant des cibles elles-mêmes soit attrayante, il est désormais accepté que la migration se fait par le biais de nombreux relais et que les cibles expriment des signaux attractifs qui sont relativement faibles (Sanes et al., 2012, p. 105-142). Par exemple, les cônes de croissance des MN ont plusieurs choix intermédiaires à effectuer tout au long de leur migration. Dans la moelle épinière, les MN sont organisés en colonnes motrices dont les projections axonales suivront des voies migratoires communes. En effet, les MN des colonnes motrices hypaxiale et latérale innervent respectivement les muscles de la paroi corporelle et ceux des membres. Leur projection axonale doit donc suivre une voie migratoire ventrale en sortant de la moelle épinière. Les projections axonales des MN de la colonne motrice médiale, qui innervent les muscles axiaux, doivent quant à eux suivre une voie migratoire dorsale. Le signal permettant aux projections axonales de la colonne motrice médiale de suivre une voie

migratoire dorsale serait certaines protéines diffusibles de la famille des *fibroblast growth factors* (FGF) relâchées par des cellules des somites et agissant de manière attractive.

Un autre exemple intéressant est celui des MN de la colonne motrice latérale. À la base des membres qu'ils innervent, les projections axonales des MN de plusieurs nerfs spinaux se rassemblent pour former des plexus. Les projections axonales se redistribueront à l'intérieur des plexus afin d'en émerger par une voie dorsale, pour l'innervation des muscles extenseurs, ou ventrale, pour l'innervation des muscles fléchisseurs. Les mécanismes permettant aux projections axonales de se rediriger vers la voie adéquate dépendent entre autres d'un gradient de GDNF et de contacts intercellulaires médiés par les protéines NCAM (Bonanomi et Pfaff, 2010).

#### 1.1.2.4 Sélection des cibles

Les MN innervant un même muscle sont regroupés aussi bien dans la moelle épinière que lors de la migration de leurs projections axonales. Ils partagent aussi certaines cascades moléculaires leur permettant la détection de signaux locaux lorsqu'ils s'approchent de leur muscle cible et ainsi procéder à son innervation. De plus, le positionnement rostro-caudal du corps cellulaire des MN, dans leur regroupement au sein de la moelle épinière, déterminerait leur positionnement final le long de l'axe rostro-caudal au sein du muscle cible. Les mécanismes sous-tendant cette topographie restent mal définis. Par contre, certaines études suggèrent que les protéines transmembranaires de la famille des éphrines et leurs interactions avec les récepteurs Eph seraient essentielles (Bonanomi et Pfaff, 2010).

Ensemble, ces différents exemples montrent la variété des signaux qui influencent la migration des axones moteurs et la sélection adéquate de leur cible.

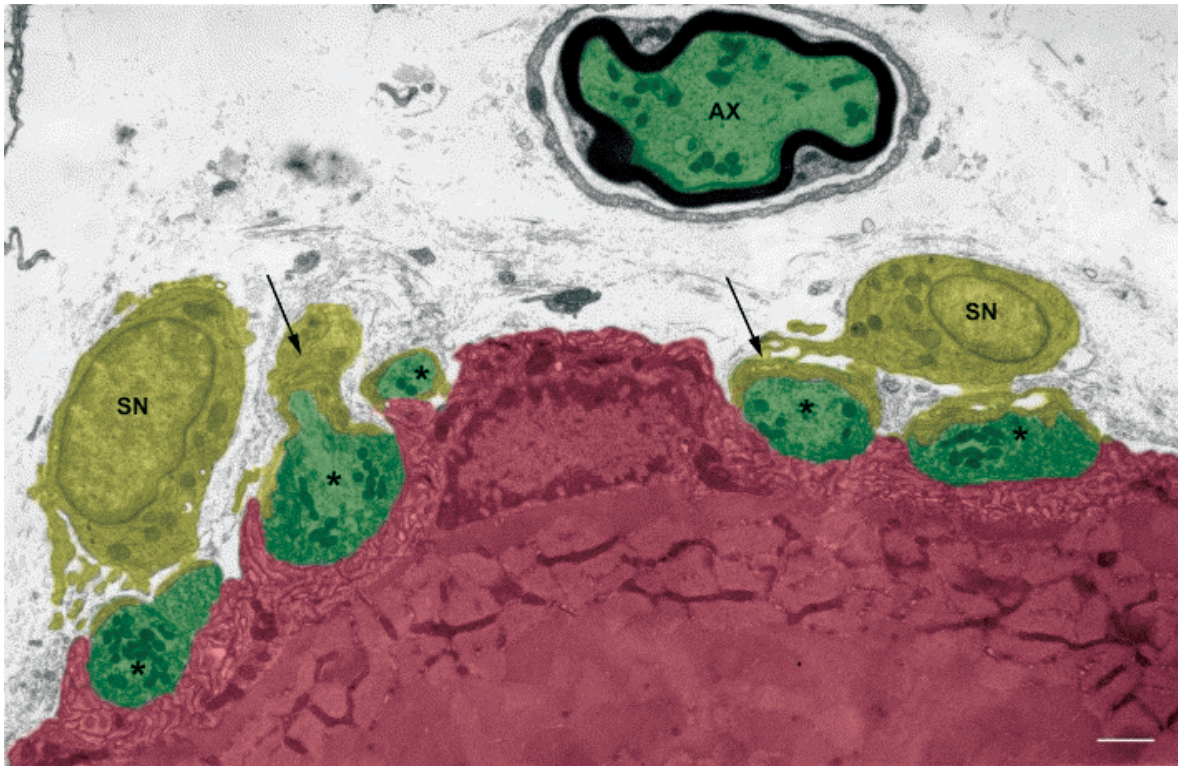
## 1.2 La jonction neuromusculaire

La JNM est une synapse du SNP où un MN innerve une fibre musculaire. Sa fonction principale est la transduction du signal électrique provenant du MN en un signal chimique permettant l'activation de la fibre musculaire, entraînant sa contraction. Il s'agit donc d'une structure primordiale lors du mouvement volontaire, par exemple.

En raison de sa relative simplicité et de son accessibilité, la JNM est devenue un modèle privilégié pour l'étude du développement (Balice-Gordon, 1997; Buffelli, Busetto, Bidoia, Favero et Cangiano, 2004; Colman, Nabekura et Lichtman, 1997; Darabid, Arbour et Robitaille, 2013; Darabid, Perez-Gonzalez et Robitaille, 2014; Gautam et al., 1996; Sanes et Lichtman, 1999, 2001), de la transmission (Del Castillo et Katz, 1954b; Fatt et Katz, 1952; Katz, 1969) et de la plasticité synaptique (Betz, 1970; Castonguay et Robitaille, 2001; Magleby et Zengel, 1976a, 1976b; Robitaille, 1998; Todd, Darabid et Robitaille, 2010). De plus, elle est couramment utilisée afin d'explorer les interactions entre les cellules neuronales et gliales (Castonguay et Robitaille, 2001; Darabid et al., 2013; Jahromi, Robitaille et Charlton, 1992; Robitaille, 1998; Rochon, Rouse et Robitaille, 2001; Smith, Mikesh, Lee et Thompson, 2013; Todd et al., 2010) et permet l'étude de plusieurs maladies neurodégénératives (Arbour, Tremblay, Martineau, Julien et Robitaille, 2015; Armstrong et Drapeau, 2013a, 2013b; Bose, Armstrong et Drapeau, 2019; Dzieciolowska, Drapeau et Armstrong, 2017; Huijbers et al., 2013; Miledi et Slater, 1968a, 1968b; Tremblay, Martineau et Robitaille, 2017).

La JNM est composée des quatre éléments suivants : la terminaison axonale du MN (élément présynaptique), la fente synaptique, les replis post-jonctionnels de la fibre musculaire (élément postsynaptique) et les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSP ; élément glial) (Figure 1.2) (Andersson-Cedergrén, 1959; Jahromi et al., 1992; Salpeter, 1987; Sanes et Lichtman, 1999). Les sections suivantes ont pour objectifs de décrire la morphologie et les fonctions respectives de chacun de ces éléments et de les placer dans le contexte de l'organisation générale de la JNM.



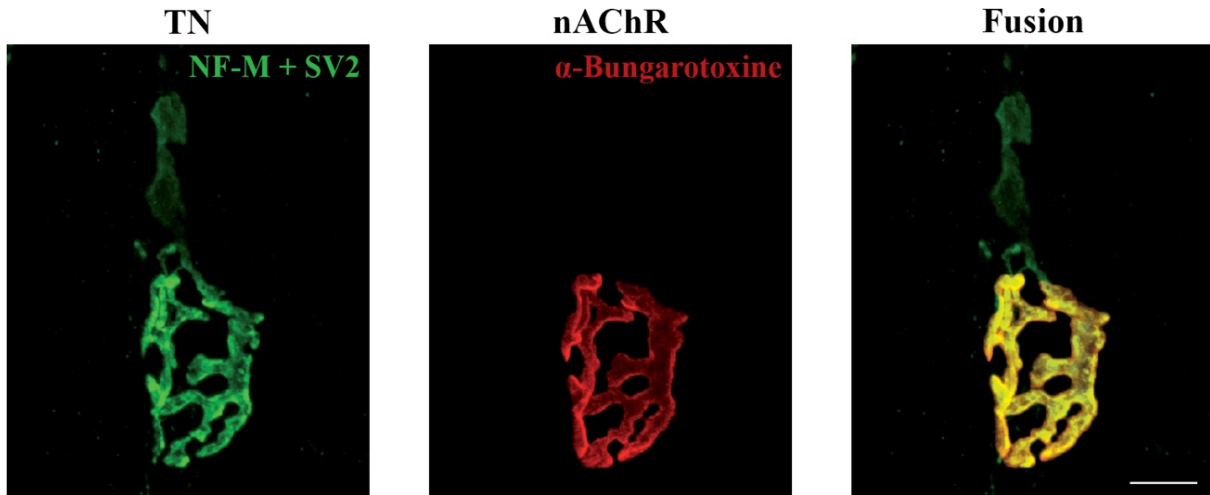


**Figure 1.2. Ultrastructure et organisation générale de la JNM.**

Image en microscopie électronique de l'organisation de la JNM de rat. Les terminaisons axonales (\* ; élément présynaptique) ainsi qu'un axone (AX) sont montrés en vert. La fibre musculaire est montrée en rose (élément postsynaptique). La fente synaptique se trouve aux appositions des éléments pré- et postsynaptiques. Les CSP avec leur noyau (SN) et certains de leurs prolongements (flèches), qui couvrent les surfaces présynaptiques qui ne sont pas en apposition avec l'élément postsynaptique (Andersson-Cedergren, 1959), sont montrées en olive (élément glial). Échelle = 1 µm. La figure a été modifiée de Rheuben, Autio, Xu et Atchison (2004). Droits de modification et de reproduction obtenus de *Elsevier*.

### 1.2.1 Élément présynaptique

L'élément présynaptique est composé de la terminaison axonale d'un MN. Chaque axone moteur peut faire synapse avec plusieurs fibres musculaires distinctes et l'on nomme unité motrice un MN et l'ensemble des fibres musculaires qu'il innerve (Ruff, 2003; Salpeter, 1987). Ainsi, à l'intérieur du muscle cible, le tronc axonal d'un MN se divise en branches à la pointe desquelles se formeront les terminaisons axonales. Ces terminaisons axonales, responsables de la relâche de NTs, couvrent le réseau de replis post-jonctionnels de leur fibre musculaire cible (Andersson-Cedergren, 1959), où se concentrent les récepteurs postsynaptiques (Figure 1.3) (Salpeter, 1987). Chez les



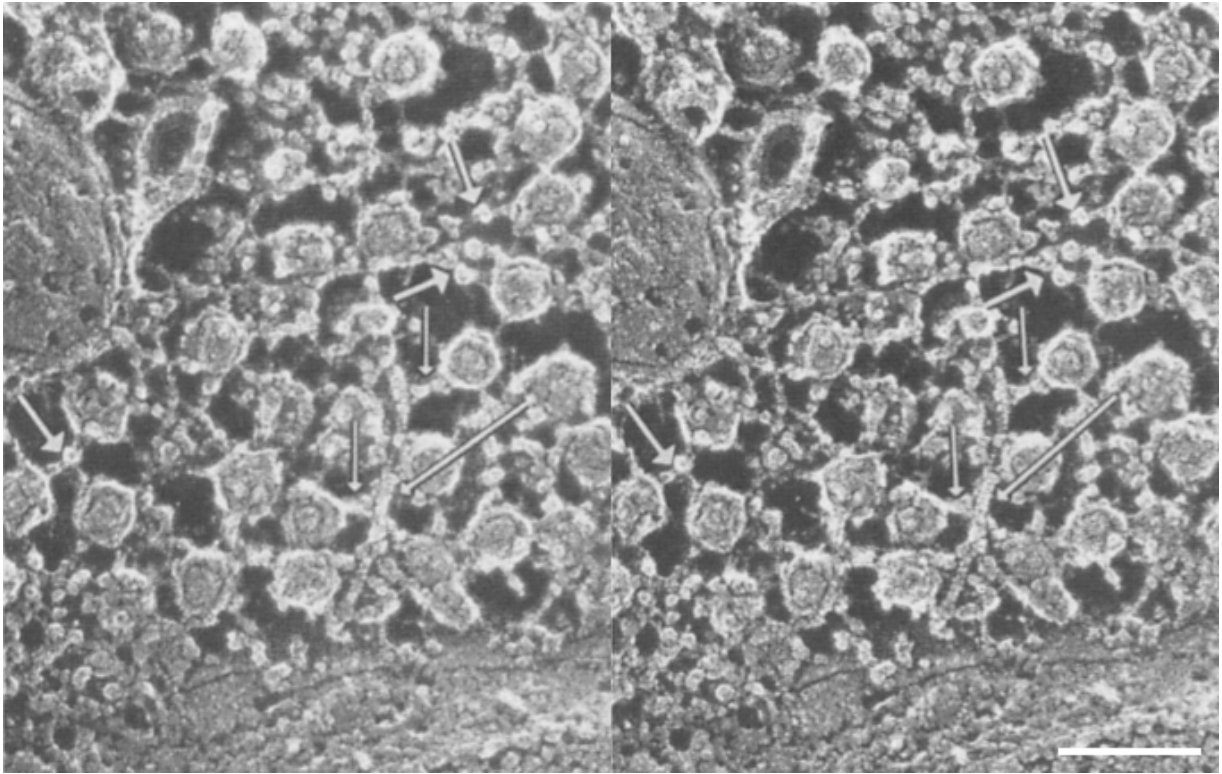
**Figure 1.3. Ramifications et couverture présynaptiques.**

Images en microscopie confocale d'une JNM de souris. La terminaison nerveuse (TN) a été immuno-marquée avec des anticorps contre les neurofilaments de type moyen (NF-M) et les protéines synaptiques vésiculaires 2 (SV2 ; vert). Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR), concentrés au niveau des replis post-jonctionnels, ont été marqués avec de l' $\alpha$ -Bungarotoxine (rouge). Notez l'étendue des ramifications présynaptiques et la précision de leur couverture de la spécialisation postsynaptique. Échelle = 10  $\mu$ m. La figure a été modifiée de Arbour et al. (2015). Droits de modification et de reproduction obtenus de *Society for Neuroscience*.

vertébrés, qui ont des fibres musculaires électriquement excitables, la JNM est composée d'un réseau de boutons synaptiques plus (rat, souris) ou moins (humain, crapaud, lézard) fusionnés qui sont rassemblés vers le centre des fibres musculaires (Slater, 2015). L'objectif de la présente section est d'explorer la structure de l'élément présynaptique et la manière dont celle-ci lui permet de réguler sa principale fonction, soit la relâche de NTs.

### 1.2.1.1 Cytosquelette

Au point de bourgeonnement des terminaisons, l'axone des MN perd sa gaine de myéline, s'élargit, se ramifie et son cytosquelette se transforme. Une des transformations majeures est la diminution de la densité de microtubules et de neurofilaments (Andersson-Cedergren, 1959; Brill et al., 2016; Cifuentes-Diaz et al., 2002; Fahim et Robbins, 1982; Peng, 1983; Yee, Pestronk, Alderson et Yuan, 1988), principales molécules structurantes des axones (Wuerker et Kirkpatrick, 1972). Ces



**Figure 1.4. Ultrastructure du cytosquelette d'actine présynaptique d'un MN.**

Image stéréoscopique en microscopie électronique à transmission de l'intérieur d'une terminaison présynaptique à la JNM de grenouille obtenue par cryofracturation (*Quick-Freeze/Deep-Etch*; voir Heuser (1981)). Un cytosquelette formé d'actine (**flèche longue**) est lié à des vésicules synaptiques par l'entremise de la protéine *synapsine 1* (**flèches courtes**). La tête globulaire de la *synapsine 1* peut également être observée à certains endroits (**flèches épaisses**). Échelle = 0,1 µm. L'image est tirée de (Hirokawa, Sobue, Kanda, Harada et Yorifuji, 1989). Droits de reproduction obtenus de *Rockefeller University Press*. Note : Pour apprendre à visualiser des images stéréoscopiques, veuillez visiter cette [page web](#) (Kúla 3D Ltd., n.d.).

structures deviennent plus diffuses et suivent les ramifications terminales sans s'insérer de manière significative dans les boutons synaptiques, où elles font place à un cytosquelette dont la composante la plus étudiée est l'actine filamenteuse (Figure 1.4) (Dillon et Goda, 2005; Doussau et Augustine, 2000; Hirokawa et al., 1989; Saheki et De Camilli, 2012).

L'actine serait impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires présynaptiques qui ont été étudiées principalement à des synapses du CNS ou à la JNM de grenouille (Cingolani et Goda, 2008; Dillon et Goda, 2005; Doussau et Augustine, 2000; Saheki et De Camilli, 2012). La fonction la plus intuitive est certainement le maintien de la structure

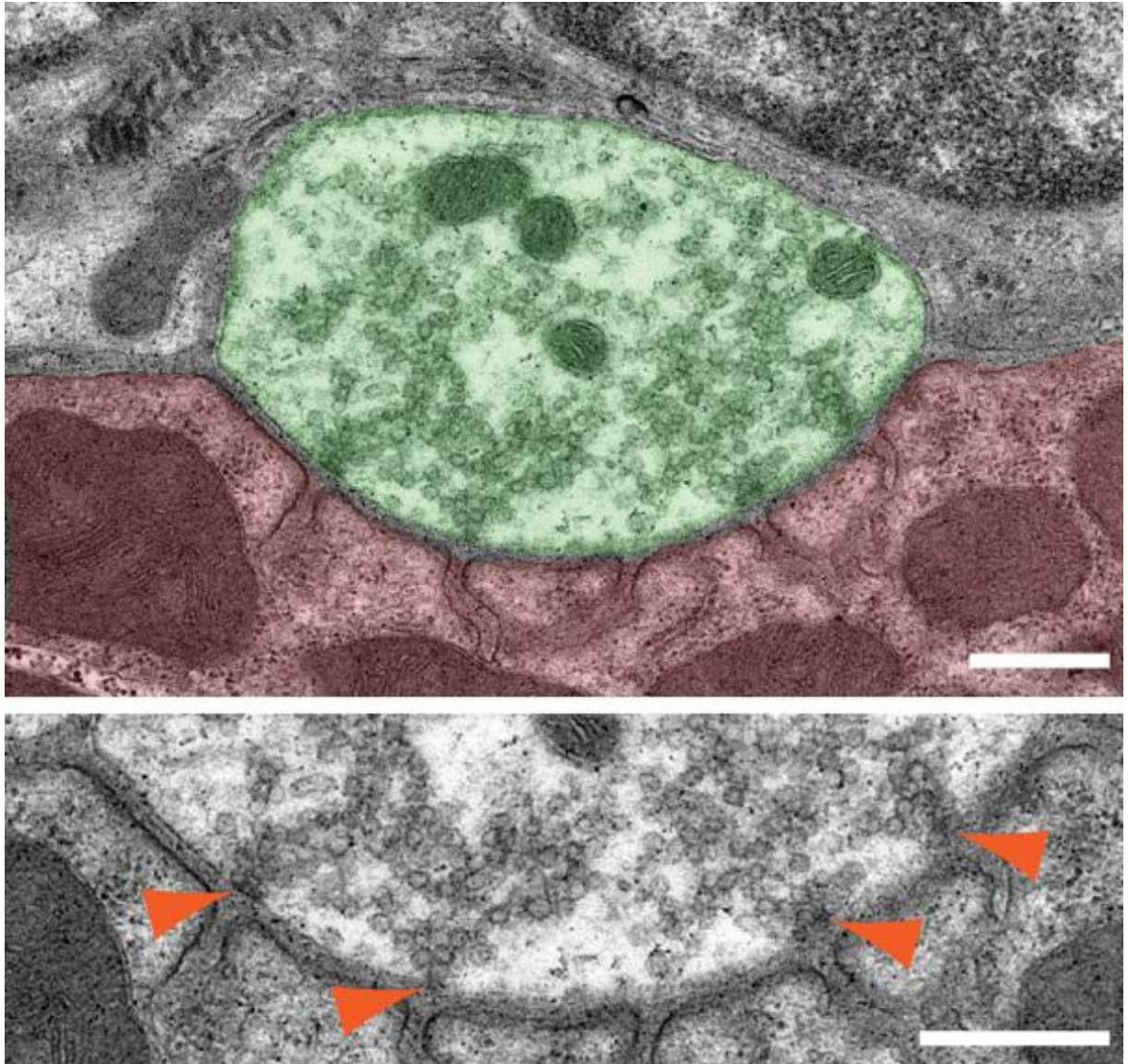
morphologique des terminaisons. Par contre, l'utilisation de latrunculine, une famille de toxine favorisant la dépolymérisation des filaments d'actine (Coue, Brenner, Spector et Korn, 1987), n'induit aucun changement morphologique perceptible à des synapses matures du CNS (Kim et Lisman, 1999) ou à la JNM de grenouille (Richards, Rizzoli et Betz, 2004). Des expériences similaires sur des neurones de l'hippocampe en cultures ont démontré que la résistance aux latrunculines était acquise au court de leur maturation (Zhang et Benson, 2001), au moment où l'expression de piccolo et de PSD-95 augmente substantiellement, des protéines qui sont impliquées dans l'échafaudage des structures intercellulaires pré- et postsynaptiques, respectivement (Li et Sheng, 2003). Ainsi, ces échafaudages semblent jouer un rôle important dans le maintien de la structure morphologique des terminaisons, mais celui de l'actine filamenteuse, s'il en est un, reste incertain (Dillon et Goda, 2005).

### **1.2.1.2 Organelles et organisation sous-cellulaire**

Le rôle principal d'une terminaison présynaptique étant la libération de NTs, l'intérieur de son cytoplasme est organisé d'une manière stéréotypée afin de maximiser l'efficacité de ce processus (Andersson-Cedergren, 1959; Fahim et Robbins, 1982; Salpeter, 1987). Les organelles essentielles à son bon fonctionnement seront disposées de manière à favoriser la mobilité et la disponibilité des ressources.

#### *1.2.1.2.1 Zones actives*

La structure sous-cellulaire la plus distinctive et la plus étudiée des terminaisons présynaptiques est sans contredit la zone active. Il s'agit de la structure où se produit la fusion des vésicules synaptiques à la membrane cellulaire lors de la libération de NT (Rash, Walrond et Morita, 1988). En microscopie électronique, elle apparaît sous la forme d'une région extrêmement dense aux électrons, apposée à la membrane *cis*musculaire de la terminaison présynaptique (Figure 1.5) (Couteaux et Pecot-Dechavassine, 1970; Rash et al., 1988; Rheuben et al., 2004; Zhai et Bellen, 2004). L'aspect particulièrement dense des zones actives leur est conféré par l'accumulation de protéines en apposition à la



**Figure 1.5. Ultrastructure de l'organisation présynaptiques à la JNM.**

Haut : Image en microscopie électronique à transmission du cytoplasme d'un bouton présynaptique (en vert) et des replis post-jonctionnels de la fibre musculaire (en rose) à la JNM de souris. Notez la distribution en agglomérations des vésicules synaptiques dans le cytoplasme présynaptique. Bas : Grossissement de l'image du haut. Les zones actives (flèches orange) sont très denses aux électrons, plusieurs vésicules synaptiques s'y accumulent et elles font face aux invaginations des replis post-jonctionnels. Échelles = 0,5  $\mu\text{m}$ . La figure est tirée de Nishimune (2012a). Droits de reproduction obtenus de *John Wiley and Sons*.

membrane cellulaire qui forment une matrice cellulaire particulière à cette région (Neher et Sakaba, 2008; Nishimune, 2012b; Sudhof, 2013). Les composantes principales de cette matrice cellulaire sont les protéines Bassoon, Piccolo, Munc13 et RIM (Juraneck et al.,

2006; Nishimune, Sanes et Carlson, 2004; Tokoro et al., 2007). Chez la souris, cette matrice forme, à chaque zone active, deux rangées parallèles (Nagwaney et al., 2009) d'environ 80 nm de longueur (Fukuoka et al., 1987) qui sont opposées aux invaginations des replis post-jonctionnels (Figure 1.5). La distance entre les zones actives est d'environ 0,5  $\mu\text{m}$  pour une densité d'environ 2,5 zones actives par  $\mu\text{m}^2$  (Fukuoka et al., 1987; Nagwaney et al., 2009).

#### 1.2.1.2.2 *Vésicules synaptiques*

Une organelle prépondérante de la terminaison présynaptique est la vésicule synaptique. Celle-ci contient les NTs, l'acétylcholine (ACh) à la JNM, qui seront relâchés dans la fente synaptique et seront les effecteurs de la transmission synaptique (Slater, 2015). Chez la grenouille, chacun des boutons synaptiques d'une terminaison axonale contient entre  $10^3$ - $10^4$  vésicules synaptiques, dont la taille moyenne varie entre 30-50 nm (Slater, 2015). À leur tour, chacune de ces vésicules synaptiques contient entre  $5 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  molécules d'ACh (Fatt et Katz, 1952; Kuffler et Yoshikami, 1975; Miledi, Molenaar et Polak, 1983). Les vésicules synaptiques abritent un nombre important d'autres molécules aussi bien dans leur lumen, tel que l'adénosine triphosphate (ATP) (Zimmermann, 1994), que dans leur membrane. Ces dernières sont impliquées dans plusieurs fonctions, mais les plus étudiées sont celles permettant l'internalisation des NT à partir du cytoplasme cellulaire et celles impliquées dans l'adhésion aux autres structures cellulaires (Chan-Palay, Engel, Palay et Wu, 1982; Slater, 2015; Sudhof, 2013; Takamori et al., 2006).

D'un point de vue morphologique, les vésicules synaptiques sont structurées en agglomérations dispersées à l'intérieur de la terminaison. Aux zones actives, leur densité est supérieure à celle du reste du cytoplasme des terminaisons (Figure 1.5). Les vésicules sont dynamiques et évoluent au sein d'un cycle fonctionnel particulier qui sera présenté à la section 1.2.1.3 *Libération de neurotransmetteurs*.

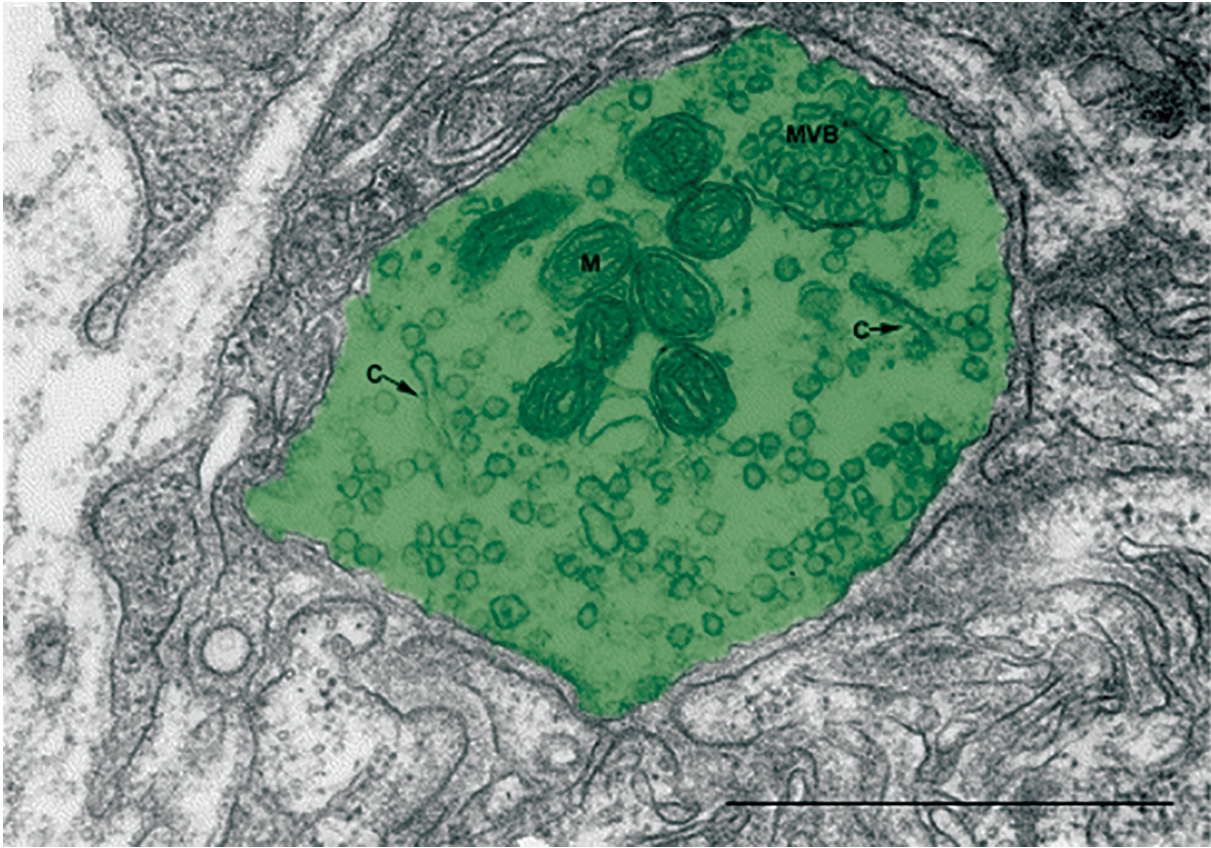
#### 1.2.1.2.3 *Mitochondries*

Une autre organelle présynaptique essentielle est la mitochondrie (Alnaes et Rahamimoff, 1975; David et Barrett, 2000; Tang et Zucker, 1997). Celles-ci sont, entre autres, responsables de la synthèse d'ATP (Friedman et Nunnari, 2014) et donc de

l'énergie disponible à la terminaison (David et Barrett, 2000; Nicholls, 2002). Un processus complexe de transfert en chaîne d'électrons entre différents complexes protéiques de la membrane interne mitochondriale permet le pompage de protons dans son espace intermembranaire. Ceci a pour effet de créer un gradient électrochimique entre l'espace intermembranaire et l'espace intracellulaire. L'énergie mise en réserve par l'établissement de ce gradient permet alors la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (Friedman et Nunnari, 2014). D'un point de vue morphologique, les mitochondries se retrouvent généralement plus près du centre des boutons synaptiques et dans la partie du cytoplasme opposée à la membrane *cis*musculaire (Figure 1.6) (Andersson-Cedergren, 1959; Fahim et Robbins, 1982; Rheuben et al., 2004).

### 1.2.1.3 Libération de neurotransmetteurs

La libération de NT est la fonction principale de la terminaison présynaptique d'une JNM. Les travaux pionniers de Bernard Katz et de ses collègues, à partir du début des années 1950 (Del Castillo et Katz, 1954b; Fatt et Katz, 1952; Katz, 1969), ont permis de découvrir la nature *quantique* de la libération de NTs. En effet, ils ont remarqué que, chez la grenouille, la taille des réponses évoquées par une stimulation du nerf et enregistrées dans la fibre musculaire (potentiel de plaque motrice; PPM) était systématiquement un multiple de la taille d'événements spontanés se produisant à une fréquence d'environ 1 Hz (PPM miniature; PPMm). Les observations en microscopie électronique de vésicules à l'intérieur de la terminaison présynaptique de JNM de grenouilles (Birks, Huxley et Katz, 1960; De Robertis et Bennett, 1955; Reger, 1958; Robertson, 1957), de reptiles (Robertson, 1956) et de rongeurs (Reger, 1955, 1958), ainsi que dans les terminaisons de neurones du CNS (Palay et Palade, 1955), ont mené Katz à émettre son *hypothèse vésiculaire* de la libération de NT (Del Castillo et Katz, 1956; Katz, 1969), selon laquelle un quanta représente une unité multimoléculaire associée au contenu d'une vésicule synaptique. Cette hypothèse est maintenant confirmée (Slater, 2015). L'objectif de cette section est d'expliquer la séquence d'événements permettant la libération quantique et de présenter les acteurs moléculaires impliqués.



**Figure 1.6. Ultrastructure de l'organisation des organelles présynaptique à la JNM.**

Image en microscopie électronique à transmission du cytoplasme de la partie centrale d'un bouton synaptique (en vert) à la JNM de rat. Notez la distribution des vésicules synaptiques dans la moitié cismusculaire du cytoplasme (**bas et droite**). Les autres organelles s'accablent dans l'autre moitié du cytoplasme. On peut y observer des mitochondries (**M**), un corps multivésiculaire (**MVB**) et des *cisternae* (**C**). Échelle = 1  $\mu\text{m}$ . La figure a été modifiée de Rheuben et al. (2004). Droits de modification et de reproduction obtenus de *Elsevier*.

#### 1.2.1.3.1 Potentiel d'action

La libération de NT se produit suite à l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la terminaison (Del Castillo et Katz, 1954b; Fatt et Katz, 1952; Katz et Miledi, 1969; Slater, 2015). Un potentiel d'action est un processus extrêmement rapide se produisant dans une région définie d'une cellule. Initialement, le potentiel membranaire augmente grandement dû à l'ouverture de canaux sodiques dépendants du potentiel ( $\text{cNa}_V$ ) qui permettent l'entrée de sodium ( $\text{Na}^+$ ) dans le cytoplasme cellulaire. Ensuite, le potentiel membranaire revient à son point initial sous l'influence de canaux potassiques dépendant du potentiel ( $\text{cK}_V$ ) qui permettent la sortie de potassium ( $\text{K}^+$ ) (Hodgkin et Huxley, 1952;



Katz, 1969). Il s'agit d'un mécanisme physiologique qui permet aux neurones, par sa régénération systématique, de transmettre un signal électrique le long de leur axone (Rama, Zbili et Debanne, 2018).

#### 1.2.1.3.2 *Entrée calcique*

Les terminaisons présynaptiques de la JNM possèdent les  $cNa_V$  et  $cK_V$  nécessaires à la régénération d'un potentiel d'action provenant de leur tronc axonal (Katz et Miledi, 1965b; Slater, 2015; Sudhof, 2013). Au moment où cette régénération se produit, des canaux calciques dépendants du potentiel ( $cCa_V$ ) seront recrutés et permettront l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme de la terminaison, un événement essentiel à la libération de NT (Augustine, Charlton et Smith, 1985, 1987; Dodge et Rahamimoff, 1967a; Katz, 1969).

Des études de microscopie électronique avec cryofracturation ont permis de démontrer l'accumulation de canaux ioniques dans la membrane cellulaire associée aux zones actives (Singer et Nicolson, 1972). Par la suite, des travaux à la JNM de grenouille ont démontré que certains de ces canaux sont des  $cCa_V$  et que ceux-ci ne sont pas présents à l'extérieur des zones actives (Robitaille, Adler et Charlton, 1990). D'autres études ont montré qu'à la JNM mature, l'entrée calcique induite par un potentiel d'action dépend des  $cCa_V$  de type P/Q (Bowersox et al., 1995; Katz, Protti, Ferro, Rosato Siri et Uchitel, 1997; Protti et Uchitel, 1993; Uchitel et al., 1992). Par contre, lorsque les  $cCa_V$  de type P/Q sont éliminés, des  $cCa_V$  de type R et de type N sont recrutés et des défauts de libération deviennent apparents (Urbano, Rosato-Siri et Uchitel, 2002). En plus de réguler l'entrée calcique nécessaire à la libération de NTs, les  $cCa_V$  permettent l'ancrage de la matrice cellulaire des zones actives à la membrane par des interactions avec Bassoon (Chen, Billings et Nishimune, 2011) et RIM (Day et al., 1997; Wachman, Poage, Stiles, Farkas et Meriney, 2004; Westenbroek, Hoskins et Catterall, 1998).

La quantité de  $Ca^{2+}$  qui pénètre dans la terminaison aura une incidence directe sur l'amplitude de la libération (Del Castillo et Stark, 1952; Dodge et Rahamimoff, 1967b; Katz et Miledi, 1967). Certains travaux sur la JNM de grenouille ont montré que des canaux potassiques dépendants du  $Ca^{2+}$  ( $cK_{Ca}$ ) permettent de restreindre le PA, ce qui mène à une diminution de l'entrée de  $Ca^{2+}$  et de la libération de NT (Robitaille et Charlton, 1992). Des études subséquentes ont montré que ces  $cK_{Ca}$  sont positionnés aux zones actives

(Robitaille, Garcia, Kaczorowski et Charlton, 1993) à très grande proximité des  $cCa_v$  (Robitaille et al., 1990; Robitaille, Adler et Charlton, 1993).

#### 1.2.1.3.3 Exocytose

Les zones actives possèdent une machinerie spécialisée permettant la fusion des vésicules synaptiques à la membrane cellulaire de manière efficace et contrôlée (Sudhof, 2013). Avant l'entrée calcique, la matrice cellulaire des zones actives, par l'intermédiaire de RIM, permet l'arrimage (*docking*) de quelques vésicules par une interaction avec les récepteurs couplés aux protéines G (rCPG) vésiculaires Rab 3/27 (Fernandez-Busnadiego et al., 2013; Han, Kaeser, Sudhof et Schneggenburger, 2011; Sudhof, 2013; Wang, Okamoto, Schmitz, Hofmann et Sudhof, 1997).

Une fois arrimées, les vésicules synaptiques doivent être amorcées (*primed*), en deux étapes, afin d'être aptes à la fusion membranaire en réponse à une entrée calcique (Sudhof, 2013). D'abord, la protéine vésiculaire Synaptobrevine/VAMP, membre de la famille des protéines SNARE (*soluble NSF attachment receptor proteins*), formera un complexe avec les protéines membranaires de la famille SNARE syntaxine-1 et SNAP-25 (Sollner et al., 1993). Ensuite, la protéine Complexine liera et stabilisera le complexe SNARE afin de finaliser l'amorçage (Tang et al., 2006). Chaque zone active des JNM de souris abriterait généralement deux vésicules synaptiques amorcées (Nagwaney et al., 2009), mais des travaux sur des JNM de rats ont montrées qu'en moyenne une autre vésicule non-amorcée serait arrimée à l'une de ses extrémités (Rowley, Mantilla, Ermilov et Sieck, 2007).

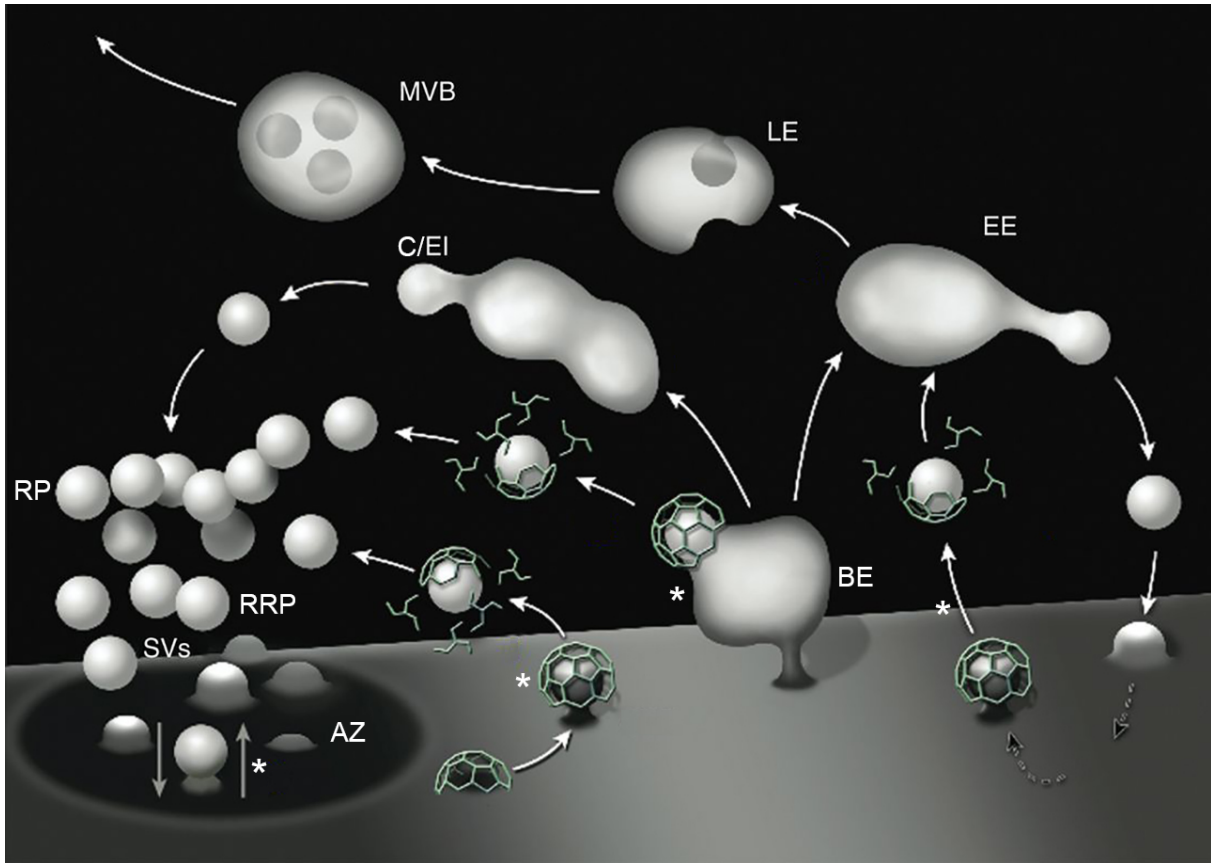
Au moment de l'entrée des ions  $Ca^{2+}$ , ces derniers se lieront à une protéine vésiculaire membre de la famille des Synaptotagmines, qui possède deux domaines de liaison au  $Ca^{2+}$  (Brose, Petrenko, Sudhof et Jahn, 1992). En utilisant des souris dont le gène endogène codant pour la Synaptotagmine-1 est muté de manière à diminuer son affinité au  $Ca^{2+}$  de moitié, Fernandez-Chacon et al. (2001) ont montré que la sensibilité de la libération de NT au  $Ca^{2+}$  était aussi diminuée de moitié. En utilisant un stratagème similaire, des études subséquentes ont montré que la fusion vésiculaire nécessitait une liaison  $Ca^{2+}$ -dépendante des Synaptotagmines aux phospholipides membranaires (Sorensen, Fernandez-Chacon, Sudhof et Neher, 2003) et au complexe SNARE (Pang,

Shin, Meyer, Rosenmund et Sudhof, 2006). La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  aux Synaptotagmines entraîne donc la fusion membranaire des vésicules synaptiques amorcées. La liaison subséquente de la protéine NSF au complexe SNARE permettra sa dissociation et le début d'un nouveau cycle de relâche (Sudhof, 2013).

Lors d'un PA, la terminaison doit relâcher suffisamment de vésicules pour induire à son tour un potentiel d'action dans la fibre musculaire cible. Une manière adéquate de déterminer la fiabilité d'une terminaison à évoquer cette réponse dans sa cellule cible est de calculer son facteur de sécurité (*safety factor*) en divisant la taille de la réponse évoquée moyenne dans la cellule cible par la taille requise pour induire un PA. À la JNM de souris et de rat, ce facteur de sécurité est habituellement d'environ 4 (Wood et Slater, 1997, 2001). Par contre, même si la terminaison relâche quatre fois la quantité de vésicules requises pour activer la cellule postsynaptique, il n'en demeure pas moins que la plupart des vésicules amorcées, soit environ 90-95%, ne sont pas relâchées (Nagwaney et al., 2009; Rash et al., 1988; Ruiz et al., 2011). Ainsi, la fiabilité de la terminaison présynaptique reposerait sur l'utilisation d'un très grand nombre de sites potentiels de relâche qui, individuellement, ont une faible fiabilité. Une hypothèse intéressante est que ceci permettrait à la terminaison d'accommoder des fréquences élevées de relâche en recrutant de nouveaux sites au lieu de dépendre de la réutilisation de ceux déjà utilisés (Slater, 2015).

#### 1.2.1.3.4 *Regroupements vésiculaires*

D'un point de vue fonctionnel, les vésicules synaptiques d'une terminaison peuvent se retrouver à plusieurs stades du cycle vésiculaire (Figure 1.7). Selon le stade auquel elles sont associées, elles se retrouveront dans des compartiments distincts. Les deux compartiments principaux sont le regroupement à libération facilitée (*readily releasable pool*; RLF), qui comprend les vésicules qui seront libérées de manière préférentielle lors d'une entrée calcique, et le regroupement de réserve (*reserve pool*; RR), qui servirait à renflouer le RLF lorsque celui-ci est complètement déplété suite à une libération soutenue (Alabi et Tsien, 2012; Gan et Watanabe, 2018; Richards, Guatimosim et Betz, 2000). Plusieurs données suggèrent que l'actine filamenteuse jouerait un rôle clé dans la translocation de vésicule du RR vers le RLF en plus de permettre la ségrégation



**Figure 1.7. Cycle vésiculaire et intermédiaires endocytiques.**

Les vésicules synaptiques (SVs) sont principalement associées à deux regroupements vésiculaires, soit le regroupement à libération facilitée (*readily releasable pool*; RRP), qui est en association préférentielle avec les zones actives (AZ), et le regroupement de réserve (*reserve pool*; RR). Plusieurs mécanismes distincts permettent la recapture des vésicules synaptiques suite à leur fusion avec la membrane (\*). Les *cisternea* (C/EI), un type d'intermédiaire endocytique, sont des organelles qui permettent la reformation des vésicules synaptiques à partir de compartiments issus de l'endocytose de masse (*bulk endocytosis*; BE). L'endocytose peut aussi mener à la formation d'endosomes impliqués dans le recyclage et la dégradation de composants cellulaires. Des endosomes précoces (*early endosomes*; EE) sont d'abord formés et donnent naissance à des endosomes tardifs (*late endosomes*; LE). Le bourgeonnement interne de la membrane des endosomes tardifs produit des corps multi-vésiculaires (*multivesicular bodies*; MVB), caractérisés par leurs inclusions vésiculaires. La figure a été modifiée de Saheki et De Camilli (2012). Droits de modification et de reproduction obtenus de *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

de ces deux regroupements (Doussau et Augustine, 2000). L'hypothèse courante, en termes de morphologie présynaptique, stipule que les vésicules du RLF sont associées de manière étroite aux zones actives, et correspondraient donc aux vésicules amorcées, alors que les vésicules du RR sont structurées en agglomérations dispersées à l'intérieur

de la terminaison (Figure 1.5 et Figure 1.7) (Rizzoli et Betz, 2004; Saheki et De Camilli, 2012; Slater, 2015). Chez la souris, cette hypothèse a reçu un appui de taille lorsque Ruiz et al. (2011) ont montré que la taille du RLF aux JNM du muscle *levator auris longus* était pratiquement identique au nombre de vésicules amorcées. En effet, ils ont d'abord établi la taille du RLF à 1730 en mesurant la cinétique de la diminution de la taille des réponses suite à une stimulation haute fréquence (SHF). Ensuite, ils ont établi le nombre de vésicules amorcées à 1700 en assumant que chacune des 850 zones actives observées par immunohistochimie abritait 2 vésicules amorcées.

Par contre, Rizzoli et Betz (2004) ont montré, en utilisant la photoconversion d'un marqueur fluorescent vésiculaire internalisé et imagé par microscopie électronique, qu'à la JNM de grenouille les vésicules synaptiques associées à la définition fonctionnelle du RLF, suite à leur recapture, se retrouvaient dispersées de manière aléatoire au pourtour de l'agglomération de vésicules habituellement associée au RR. Puisque ces vésicules sont de nouveau recrutées au sein du RLF suite à leur libération (Richards et al., 2000; Richards, Guatimosim, Rizzoli et Betz, 2003), Rizzoli et Betz (2004) concluent que les vésicules de ce regroupement possèdent des marqueurs moléculaires particuliers et/ou sont associées à des éléments du cytosquelette de manière préférentielle, comme l'actine. Ceci leur permettrait de conserver leur place au sein du RLF, même si d'un point de vue morphologique elles ne semblent pas être associées aux zones actives. Ces données suggèrent que, chez différentes espèces, le pendant morphologique du RLF n'est pas toujours le même (Ruiz et al., 2011).

#### 1.2.1.3.5 Endocytose

Le cycle vésiculaire comporte un autre pan important, soit l'endocytose, qui regroupe les mécanismes permettant la recapture et la gestion des vésicules synaptiques suite à leur fusion avec la membrane (Saheki et De Camilli, 2012). Les trois mécanismes principaux de l'endocytose (Figure 1.7) sont le *kiss-and-run*, où la vésicule ne fusionne pas complètement avec la membrane avant d'être recyclée (Aravanis, Pyle et Tsien, 2003; Ceccarelli, Hurlbut et Mauro, 1973; Fesce, Grohovaz, Valtorta et Meldolesi, 1994), l'endocytose médiée par la clathrine, où les vésicules sont directement reformées à partir de la membrane cellulaire (Heuser et Reese, 1973; Shupliakov et al., 1997) et l'endocytose

de masse, où une large section de membrane est internalisée (Meunier et al., 2010; Miller et Heuser, 1984).

À la JNM de grenouille, l'endocytose comprend un élément rapide, soit de quelques millisecondes et associée à l'endocytose médiée par la clathrine ou le *kiss-and-run*, et un élément plus lent, soit de quelques minutes et associé à l'endocytose de masse. Les vésicules récupérées par l'élément rapide de l'endocytose sont réintégrées au sein du RLF, comme nous venons de le voir, alors que celles récupérées par l'élément plus lent sont intégrées au sein du RR. La présence du mécanisme *kiss-and-run* demeure toutefois controversée (Gan et Watanabe, 2018).

Les différentes voies de l'endocytose mènent à la formation d'organelles constituées en tout ou en partie de vésicules recapturées. Un exemple intéressant est celui des *cisternae*, des intermédiaires endocytiques qui sont responsables de la reformation des vésicules à partir de compartiments issus de l'endocytose de masse (Figure 1.6 et Figure 1.7) (Mochida, 2015; Rheuben et al., 2004; Saheki et De Camilli, 2012). Cet événement de masse peut aussi mener à la formation de corps multivésiculaires, des organelles issues du processus de maturation endocytique. Ces compartiments sont reconnaissables à leurs inclusions vésiculaires, formées par le bourgeonnement interne de leur membrane. Ils sont responsables du triage de leurs composantes qui peuvent être dégradées via des lysosomes, recyclées de manière locale ou destinées au transport rétrograde vers le corps cellulaire (Figure 1.5 et Figure 1.7) (Futter, Pearce, Hewlett et Hopkins, 1996; Mochida, 2015; Rheuben et al., 2004; Saheki et De Camilli, 2012). Ces différents compartiments endocytiques se retrouvent généralement plus près du centre des boutons synaptiques et dans la partie du cytoplasme opposée à la membrane *cis*musculaire (Andersson-Cedergren, 1959; Rheuben et al., 2004).

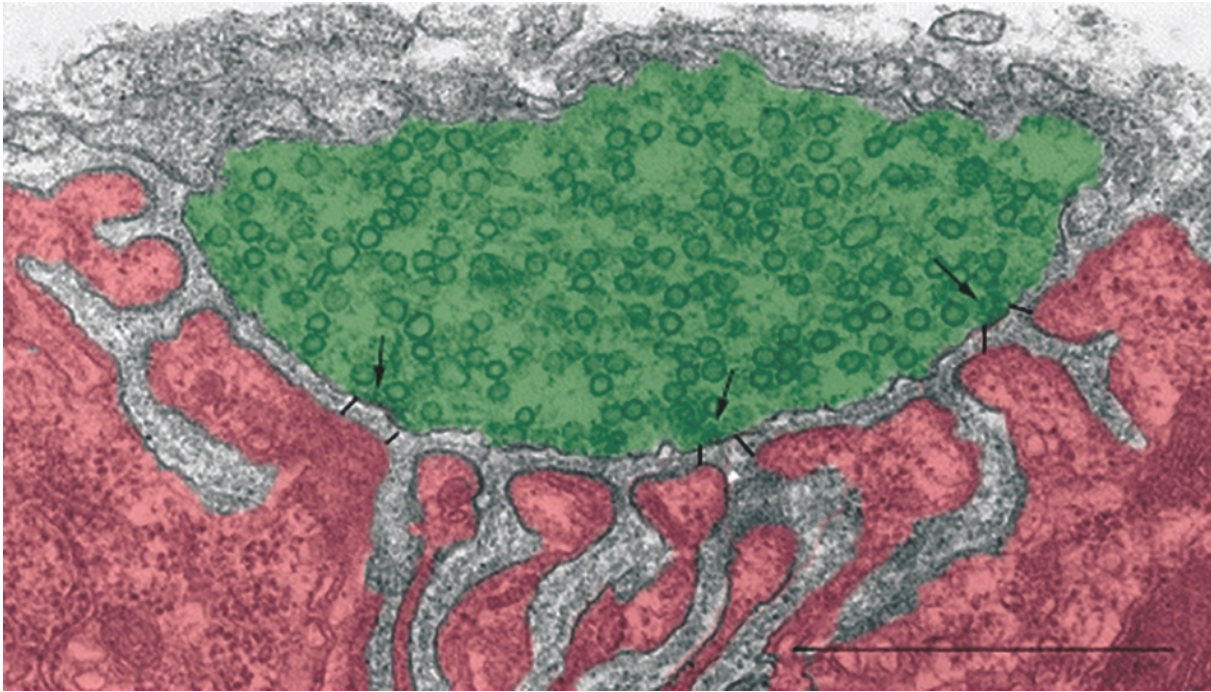
#### 1.2.1.3.6 *Modulation de la libération de neurotransmetteurs*

L'amplitude de la libération de NT à la JNM peut être modulée par différents facteurs. D'abord, à la suite d'un premier PA, du  $\text{Ca}^{2+}$  résiduel s'accumule au sein du microdomaine des zones actives (Katz et Miledi, 1965a, 1968; Magleby et Zengel, 1982). Si un deuxième potentiel d'action suit le premier avant que ce  $\text{Ca}^{2+}$  ne diffuse ou ne soit tamponné, moins de  $\sim 50$  ms à la JNM de souris (Kopp, Perkel et Balice-Gordon, 2000),

une facilitation de la libération sera observée sous la forme d'une augmentation de l'amplitude de la réponse observée.

Un autre facteur important est l'adénosine. Lors d'un événement de libération de NTs, l'ATP contenue dans les vésicules synaptiques (Searl et Silinsky, 2006), ou relâchée par les CSP suite à leur activation (Todd et al., 2010), peut être catabolisée en adénosine. À la JNM de grenouille (Redman et Silinsky, 1994; Robitaille, Thomas et Charlton, 1999; Silinsky, 1980; Silinsky et Solsona, 1992) et de souris (Ginsborg et Hirst, 1972; Silinsky, 2004; Todd et al., 2010), ce mécanisme est responsable d'une dépression de l'activité synaptique dépendante des récepteurs présynaptiques à adénosine  $A_1$  ( $rA_1$ ). Chez la souris, l'activation des  $rA_1$  entraîne une diminution de l'entrée calcique dans la terminaison présynaptique (Silinsky, 2004), alors que chez la grenouille l'entrée calcique est inchangée (Redman et Silinsky, 1994; Robitaille et al., 1999; Silinsky et Solsona, 1992) et la cible du mécanisme semble être en aval des  $cCa_V$  (Searl et Silinsky, 2006). Chez la souris, le patron de stimulation déterminera l'issue de la plasticité adénosine-dépendante. En effet, une SHF continue produit une potentiation de l'activité qui est dépendante des récepteurs à adénosine  $A_{2A}$  ( $rA_{2A}$ ), alors qu'une SHF en rafales produit une dépression dépendante des  $rA_1$  (Todd et al., 2010). Les terminaisons présynaptiques à la JNM possèdent aussi des autorécepteurs muscariniques à l'acétylcholine qui participent à la modulation de la transmission synaptique.

Finalement, l'activité synaptique d'une terminaison peut être modulée par la régulation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire des mitochondries (David et Barrett, 2000; Friedman et Nunnari, 2014; Nicholls, 2002; Tang et Zucker, 1997). À la JNM, les mitochondries permettent de limiter l'amplitude des augmentations de  $Ca^{2+}$  suite à une SHF (David et Barrett, 2000) et le blocage de ce mécanisme inhibe l'apparition d'une forme de potentiation de la transmission synaptique (Delaney, Zucker et Tank, 1989; Tang et Zucker, 1997).



**Figure 1.8. Ultrastructure de l'organisation synaptique à la JNM.**

Image en microscopie électronique à transmission d'une JNM de rat. Le cytoplasme présynaptique (en vert) est séparé des replis post-jonctionnels (en rose) par la fente synaptique. Cette dernière a une largeur d'environ 40-60 nm qui est extrêmement constante dans son ensemble (**lignes**). Les zones actives (**flèches**) font face aux invaginations des replis post-jonctionnels. Notez la présence de la lame basale dans la fente synaptique qui peut être visualisée sous forme de matière dense aux électrons. Échelle = 1  $\mu$ m. La figure a été modifiée de Rheuben et al. (2004). Droits de modification et de reproduction obtenus de *Elsevier*.

### 1.2.2 Fente synaptique

La fente synaptique de la JNM de souris est une structure d'environ 40-60 nm de largeur qui permet la séparation des membranes pré- et postsynaptiques (Figure 1.8) (Andersson-Cedergren, 1959; Rheuben et al., 2004). Elle contient une matrice extracellulaire qui, en raison de son rôle d'échafaudage structurel entre les éléments pré et postsynaptiques, joue le rôle de lame basale. Comme la lame basale de la plupart des cellules du corps, elle contient du collagène de type IV, des laminines, la protéine Entactine et du sulfate d'héparane (Sanes et Lichtman, 1999). Par contre, la lame basale synaptique de la JNM contient aussi des molécules qui ne se retrouvent pas dans la lame basale extrasynaptique. Des exemples notoires sont l'acétylcholinestérase (Krejci et al., 1997), la laminine  $\beta$ 2 (Hunter, Shah, Merlie et Sanes, 1989) ainsi que deux molécules de



signalisation, soit l'agrine (McMahan, 1990) et la neuréguline (Goodearl, Yee, Sandrock, Corfas et Fischbach, 1995). L'acétylcholinestérase est une enzyme qui permet la régulation spatiale et temporelle de l'effet de l'acétylcholine par sa dégradation en acétyl + choline (Li, Camp, Rachinsky, Getman et Taylor, 1991). Vu leur implication primordiale dans la formation des JNM, la laminine  $\beta_2$ , l'agrine et la neuréguline seront présentées dans la section 1.3 *Développement de la jonction neuromusculaire*.

### 1.2.3 Élément postsynaptique

La composante fondamentale de l'élément postsynaptique de la JNM est le réseau de replis post-jonctionnels de la membrane de la fibre musculaire. Sa fonction principale est d'effectuer la transduction du signal chimique provenant du MN en un potentiel d'action qui se propagera dans la fibre et entraînera une relâche massive de  $\text{Ca}^{2+}$  qui provoquera sa contraction. Ce processus est connu sous le nom de couplage excitation-contraction (Sandow, 1952).

Les replis post-jonctionnels contiennent deux compartiments principaux, les crêtes et les invaginations (Slater, 2015). Les crêtes, qui font face à l'élément présynaptique, sont riches en récepteurs ionotropes nicotiques à l'acétylcholine (nACh) (Salpeter, 1987). Aux JNM de souris adultes, des expériences de perte de fonction, soit par ARN interférent ou par inactivation conditionnelle du gène, ont montré que la kinase spécifique au muscle (MuSK) est essentielle au maintien de ces agglomérations de nACh (Hesser, Henschel et Witzemann, 2006; Kong, Barzaghi et Ruegg, 2004). Les invaginations, quant à elles, sont riches en  $\text{cNav}$  (Flucher et Daniels, 1989; Haimovich, Bonilla, Casadei et Barchi, 1984) de type 1.4 (de Lera Ruiz et Kraus, 2015). Lorsque l'acétylcholine se lie à un nACh, l'ouverture du canal permet au  $\text{Na}^+$  et au  $\text{Ca}^{2+}$  de suivre leur gradient électrochimique et de pénétrer dans le cytoplasme postsynaptique (Fucile, 2004). Cela a pour effet de produire un PPM qui mène à l'ouverture des  $\text{cNav}$ . La grande densité de ces canaux au sein des invaginations, qui offrent par ailleurs une grande superficie pour leur accumulation, permet une amplification extrêmement efficace du PPM et la génération d'un potentiel d'action (Martin, 1994; Slater, 2008; Vautrin et Mambrini, 1989; Wood et Slater, 1997).

Le potentiel d'action produit au niveau des replis post-jonctionnels se propagera sur la longueur et l'épaisseur entière des fibres musculaires en utilisant un réseau d'invaginations nommées tubules transverses, ou tubules T, qui transpercent la fibre de part en part à intervalles rapprochés (Calderon, Bolanos et Caputo, 2014). Les tubules T sont apposés au réticulum sarcoplasmique musculaire par des structures nommées couplons (Franzini-Armstrong, 2018). La membrane des tubules T contient des  $cCa_v$  de type L, aussi nommées récepteurs à la dihydropyridine, au niveau des couplons. L'ouverture de ces récepteurs lors d'un potentiel d'action entraînera à son tour l'ouverture des canaux à ryanodine, présent dans la membrane du réticulum sarcoplasmique, par un mécanisme qui serait dépendant d'une interaction physique entre les deux types de canaux et indépendant de la fonction ionotrope des récepteurs à la dihydropyridine (Franzini-Armstrong, 2018). Dans les muscles squelettiques de mammifères, les canaux à ryanodine de type 1 sont responsables de la relâche massive de  $Ca^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme (Meissner, 2017) qui provoquera le rapprochement des filaments fins d'actine aux filaments épais de myosine (Calderon et al., 2014). Le glissement de ces filaments provoquera le raccourcissement des sarcomères, unités contractiles des fibres musculaires, qui engendrera la contraction de ces dernières.

#### 1.2.4 Élément glial : les cellules de Schwann périssynaptiques

Les CSP sont des cellules gliales non myélinisantes de la JNM qui recouvrent les terminaisons présynaptiques (Figure 1.2) (Andersson-Cedergren, 1959; Georgiou et Charlton, 1999). À chaque JNM de grenouille ou de rongeur, on retrouve habituellement ~3-5 CSP et ce nombre est corrélé positivement avec la taille de la JNM (Ko et Robitaille, 2015; Love et Thompson, 1998; Lubischer et Bebinger, 1999). Les CSP sont recouvertes d'une lame basale (Saito et Zacks, 1969) contenant des molécules de matrice extracellulaire qui leur sont propres (Astrow, Tyner, Nguyen et Ko, 1997; Ko, 1987; Patton, Miner, Chiu et Sanes, 1997). À la JNM adulte, les CSP participent à plusieurs fonctions importantes dont le maintien de l'intégrité de la structure et de la fonction synaptique (Reddy, Koirala, Sugiura, Herrera et Ko, 2003), la régulation de la transmission synaptique (Castonguay et Robitaille, 2001; Robitaille, 1998; Todd et al., 2010) et la réinnervation suivant une lésion (Son, Trachtenberg et Thompson, 1996).

Ces différentes fonctions dépendent de la capacité des CSP à détecter la relâche de neurotransmetteurs, habituellement par des rCPG muscariniques (Georgiou, Robitaille et Charlton, 1999; Jahromi et al., 1992; Reist et Smith, 1992; Robitaille, Jahromi et Charlton, 1997; Rochon et al., 2001) ou purinergiques (Robitaille, 1995; Rochon et al., 2001; Todd et al., 2010). L'excitabilité des CSP en réponse à l'activation de ces récepteurs est médiée principalement par des mécanismes qui dépendent du  $Ca^{2+}$  (Auld et Robitaille, 2003), qui est relâché des réserves internes (Castonguay et Robitaille, 2001; Jahromi et al., 1992). Il est intéressant de noter que les CSP adaptent leurs propriétés de détection selon le type d'unité motrice à laquelle elles sont rattachées (Rousse, St-Amour, Darabid et Robitaille, 2010) et que ces propriétés peuvent être modulées à la JNM de souris par des facteurs neurotrophiques (Todd, Auld et Robitaille, 2007) ou à la JNM de grenouille par le peptide *substance P* (Bourque et Robitaille, 1998) et l'activité synaptique (Bélair, Vallée et Robitaille, 2010).

La découverte de ces influences bidirectionnelles entre l'activité synaptique et les CSP a participé à la naissance du concept de synapse tripartite, où les cellules gliales synaptiques sont élevées du rang d'élément passif à celui de partenaire indispensable (Araque et al., 2014; Araque, Parpura, Sanzgiri et Haydon, 1999; Auld et Robitaille, 2003; Volterra, Magistretti et Haydon, 2002).

#### 1.2.4.1 Fonctions gliales à la jonction neuromusculaire

L'importance des CSP dans le maintien de l'intégrité de la structure et de la fonction synaptique a été démontrée par Reddy et al. (2003) à la JNM de grenouille. En utilisant un anticorps spécifique à un antigène des CSP, ils ont pu étudier les effets de leur élimination par la voie du complément. Une semaine après le traitement, la fonction présynaptique était réduite de moitié et les rétractions de l'élément présynaptique étaient dix fois plus fréquentes.

Robitaille (1998) a montré pour la première fois, à la JNM de grenouille, que les CSP participent à la régulation de la transmission synaptique. En effet, l'injection dans les CSP d'une molécule qui active les protéines G a permis de diminuer la taille des PPM et ainsi d'occlure la dépression induite par une SHF. De plus, l'injection d'une molécule qui bloque les protéines G a permis de largement éliminer cette dépression. D'autres

travaux ont depuis obtenu des résultats comparables à la JNM de grenouille (Castonguay et Robitaille, 2001) et de souris (Todd et al., 2010). Cette dernière étude, présentée dans une section précédente, est particulièrement intéressante du fait qu'elle a permis de démontrer que la modulation par les CSP de l'activité synaptique dépendait de leur patron d'activation. En effet, une stimulation continue entraînait une potentiation de la transmission alors qu'une stimulation en rafale entraînait une dépression. Ainsi, les CSP sont non seulement capables de décoder l'activité synaptique, mais aussi de répondre d'une manière adaptée au contexte synaptique.

Les CSP jouent aussi un rôle important dans le processus de réinnervation suivant une lésion partielle ou complète du nerf. En créant des ponts entre les JNM dénervées et celles toujours innervées, elles permettent de guider les bourgeonnements des terminaisons présynaptiques (Son et Thompson, 1995a, 1995b), une fonction qui dépend de leur capacité à détecter l'activité synaptique (Tam et Gordon, 2003). De plus, il a été suggéré que certains éléments de la matrice extracellulaire spécifiquement associée aux PSCs participeraient au guidage de ces bourgeonnements (Chen et Ko, 1994; Ko et Chen, 1996).

Finalement, Arbour et al. (2015) ont montré que les propriétés des CSP reliées à leur capacité de détection de la neurotransmission sont altérées dans un modèle murin de la sclérose latérale amyotrophique. Ces altérations pourraient inhiber la capacité des CSP à promouvoir la réparation de JNM dégénérantes (Arbour et al., 2015) et participer à accentuer des changements, associés à une plus grande vulnérabilité, dans les propriétés synaptiques des MN (Tremblay et al., 2017). Ces résultats mettent en lumière l'importance du maintien de l'intégrité de la fonction des CSP (Arbour, Vande Velde et Robitaille, 2017).

### 1.3 Développement de la jonction neuromusculaire

Dans la section précédente, nous avons décrit en détail la structure et la fonction des différents éléments constitutifs d'une JNM mature. Auparavant, nous avons exploré le développement du système nerveux en général et des MN en particulier. Au moment où nous nous sommes arrêtés, les projections axonales de ces cellules pénétraient dans leur muscle cible et s'apprêtaient à former des JNM. Dans la présente section, nous survolerons l'état actuel de nos connaissances concernant les processus permettant la formation et la maturation de ces JNM.

Chez la souris, les contacts initiaux entre les MN et les fibres musculaires se forment dans les derniers jours du stade embryonnaire de développement (Darabid et al., 2014; Lin et al., 2001; Sanes et Lichtman, 1999; Tapia et al., 2012) et le nombre de fibres innervées par chaque MN est maximal au moment de la naissance (Tapia et al., 2012). En effet, en fonction du muscle observé, la taille moyenne d'une unité motrice peut y atteindre entre 60 à 80% du nombre total de fibres. Puisque chaque muscle contient des dizaines d'unités motrices (Major, Hegedus, Weber, Gordon et Jones, 2007), cette grande divergence dans le motif d'innervation de chacune d'elles implique une énorme convergence au niveau de chaque JNM (Tapia et al., 2012). De fait, au moment de la naissance, chaque JNM est innervée par une dizaine de terminaisons provenant d'unités motrices distinctes. Au cours des deux premières semaines postnatales, un processus de compétition entraînera l'élimination systématique de toutes ces terminaisons à l'exception d'une seule, qui sera stabilisée et maintenue (Brown, Jansen et Van Essen, 1976; Darabid et al., 2014; Purves et Lichtman, 1980; Redfern, 1970; Sanes et Lichtman, 1999; Wyatt et Balice-Gordon, 2003). Ainsi, la maturation de la JNM est dépendante de mécanismes qui permettent l'établissement d'une organisation synaptique complexe entre ses différents éléments et, en parallèle, l'élimination des terminaisons superflues (Darabid et al., 2014).

Dans les prochaines sous-sections, nous présenterons d'abord les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation et la maturation des différents éléments de la JNM. Ensuite, nous présenterons le processus de compétition et d'élimination synaptique par lequel est établie la monoinnervation des fibres musculaires mature.

### 1.3.1 Formation et maturation neuromusculaire

Comme nous l'avons vu précédemment, les MN innervent un seul muscle. Ainsi, leur projection axonale ne forme que très rarement des embranchements avant d'atteindre le muscle cible (Sanes et Lichtman, 1999). Par contre, au niveau du muscle cible, chaque projection axonale formera des embranchements sur plusieurs niveaux successifs (Tapia et al., 2012) et chacun de ces embranchements formera son propre cône de croissance qui pourra innerver une cible différente (Sanes et Lichtman, 1999). Ces cônes de croissance développent la capacité de relâcher des neurotransmetteurs avant même de faire un contact initial avec une fibre musculaire (Hume, Role et Fischbach, 1983; Young et Poo, 1983), bien qu'ils ne contiennent que peu de vésicules synaptiques et qu'aucune zone active ne soit reconnaissable au niveau ultrastructural (Linden, Jerian et Letinsky, 1988). Au moment du contact initial, les terminaisons perdent les structures typiquement associées aux cônes de croissance, soit les lamellipodes et les filipodes, et adoptent une forme bulbeuse. Les étapes subséquentes de maturation auront pour objectif de favoriser la croissance des terminaisons présynaptiques et la polarisation de leurs compartiments, de mettre en place les zones actives et d'y regrouper les vésicules synaptiques (Kelly et Zacks, 1969; Ko, 1985; Lupa et Hall, 1989; Sanes et Lichtman, 1999).

Du côté postsynaptique, des regroupements de nACh sont présents avant l'arrivée de l'axone moteur (Lin et al., 2001; Yang, Arber, et al., 2001; Yang, Li, Prescott, Burden et Wang, 2000). La protéine transmembranaire postsynaptique LRP4 (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008) et les facteurs WNTs (Jing, Lefebvre, Gordon et Granato, 2009; Wu, Xiong et Mei, 2010) joueraient un rôle dans l'émergence et l'organisation de ces regroupements. Des études chez le poisson-zèbre (Flanagan-Steet, Fox, Meyer et Sanes, 2005; Panzer, Song et Balice-Gordon, 2006) et la souris (Kim et Burden, 2008; Vock, Ponomareva et Rimer, 2008) suggèrent que ces regroupements participent à définir l'endroit où la JNM sera formée sur la fibre musculaire. Une fois le contact initial effectué, la maturation de l'élément postsynaptique vise essentiellement à augmenter le nombre, la stabilité et la densité des nACh et à favoriser leur concentration aux crêtes des replis post-jonctionnels qui seront, eux-mêmes, alignés précisément aux zones actives présynaptiques (Darabid et al., 2014; Salpeter, 1987).

Le processus de maturation des différents éléments de la JNM et leur synchronisation repose sur plusieurs voies de signalisation moléculaires antérogrades et rétrogrades. L'une des premières molécules importantes, et l'une des plus étudiées, est le protéoglycan agrine (Darabid et al., 2014). L'agrine, relâché principalement par les terminaisons présynaptiques (Bowen, Sugiyama, Ferns et Hall, 1996; Ferns, Campanelli, Hoch, Scheller et Hall, 1993) et les CSP (Yang, Cao, Koirala, Reddy et Ko, 2001), interagit avec LRP4 (Weatherbee, Anderson et Niswander, 2006; Zhang et al., 2008). Ce complexe permettra l'autophosphorylation et l'activation de MuSK (agrine + LRP4  $\rightarrow$  MuSK  $\ominus$ ) (DeChiara et al., 1996; Kim et Burden, 2008; Kim et al., 2008), une autre protéine transmembranaire postsynaptique (Valenzuela et al., 1995). L'activation de MuSK est un évènement important pour la maturation postsynaptique. D'abord, elle permet l'accumulation membranaire de la protéine rapsyn, impliquée dans l'agrégation des rnACh et de plusieurs molécules qui leur sont associées (Gautam et al., 1995; Sanes et Lichtman, 2001). Ensuite, l'activation de MuSK permet l'accumulation des récepteurs à la Neuréguline de la famille ERBB (Burden, Yumoto et Zhang, 2013). L'activation de ces récepteurs promeut la synthèse de rnACh et de protéines associées (Ngo, Cole, Sunn, Phillips et Noakes, 2012; Rimer, Cohen, Lomo, Burden et McMahan, 1998; Sandrock et al., 1997). Par contre, certaines études suggèrent que l'activation des récepteurs ERBB présents sur les CSP, impliquées dans la survie et la maturation de ces dernières (Garratt, Britsch et Birchmeier, 2000; Riethmacher et al., 1997), pourraient être responsables de cette synthèse protéique postsynaptique (Escher et al., 2005; Sanes et Lichtman, 2001).

La cascade d'évènements présentée dans le paragraphe précédent, ayant pour point de départ l'agrine, joue un rôle important dans l'organisation de la plaque de récepteurs postsynaptiques. De manière intéressante, l'accumulation d'agrine est maintenue à l'intérieur du compartiment synaptique par des métalloprotéases qui sont enrichies à son pourtour, près des prolongements des CSP (VanSaun, Herrera et Werle, 2003; VanSaun et Werle, 2000; Werle et VanSaun, 2003). Il a été proposé que les CSP pourraient être responsables de la relâche de ces molécules, ce qui leur conférerait un rôle important dans le maintien de l'organisation synaptique en limitant l'étendue de la plaque de rnACh (Darabid et al., 2014). De plus, la relâche de TGF $\beta$  par les CSP participerait à la régulation de l'expression de l'agrine (Feng et Ko, 2008).

Du côté présynaptique, l'un des premiers signes de maturation est l'accumulation de vésicules synaptiques dans la terminaison. Cette accumulation dépendrait du collagène de type IV présent dans la matrice extracellulaire synaptique et de la relâche de FGF par la fibre musculaire (Fox et al., 2007). Ensuite, les zones actives sont mises en place et les vésicules synaptiques sont regroupées près de celles-ci. La protéine LRP4 jouerait un rôle essentiel dans ces deux fonctions, mais il demeure incertain si l'interaction entre LRP4 et MuSK y est nécessaire (Burden et al., 2013; Huijbers et al., 2013; Yumoto, Kim et Burden, 2012). Ces fonctions seraient aussi dépendantes de la relâche de la glycoprotéine laminine  $\beta 2$  par la fibre musculaire (Fox et al., 2007; Knight, Tolley, Kim, Lavidis et Noakes, 2003; Noakes, Gautam, Mudd, Sanes et Merlie, 1995). De plus, la laminine  $\beta 2$  se lie aux  $cCa_v$  présynaptiques et permet leur concentration aux zones actives (Nishimune et al., 2004), un mécanisme essentiel pour assurer l'intégrité de ces dernières (Noakes et al., 1995), entre autres, par la régulation de la localisation de protéines de la matrice cellulaire des zones actives comme Bassoon (Chen et al., 2011).

La laminine  $\beta 2$  est aussi importante pour prévenir l'infiltration de la fente synaptique par les prolongements des CSP (Knight et al., 2003; Noakes et al., 1995; Patton, Chiu et Sanes, 1998). De plus, par son interaction avec les récepteurs à intégrines postsynaptiques, elle participe à l'agrégation des nACh (Nishimune et al., 2008; Singhal et Martin, 2011). D'autres laminines, en particulier celles contenant les chaînes  $\alpha 4/\alpha 5$ , se lient à des dystroglycans et favorisent ainsi la stabilisation des nACh et le recrutement d'acétylcholinestérase près de ces récepteurs (Arikawa-Hirasawa, Rossi, Rotundo et Yamada, 2002; Cote, Moukhles, Lindenbaum et Carbonetto, 1999; Jacobson, Cote, Rossi, Rotundo et Carbonetto, 2001; Nishimune et al., 2008). Finalement, une étape importante de la maturation de la JNM est l'alignement des zones actives présynaptiques aux replis postjonctionnels. Les laminines  $\alpha 4/\alpha 5$  seraient essentiels afin que ce processus se déroule adéquatement (Singhal et Martin, 2011).

Ensemble, ces données montrent la diversité des mécanismes impliqués dans la régulation de la maturation de la JNM et l'importance des éléments gliale, pré- et postsynaptique.



### 1.3.2 Compétition et élimination synaptique

En parallèle aux processus favorisant la maturation des différents éléments synaptiques à la JNM, d'autres mécanismes sont mis en place pour assurer l'élimination des terminaisons redondantes. Au niveau du muscle, l'élimination aux différentes JNM se déroule de manière asynchrone. En effet, certaines d'entre elles seront déjà mono-innervées à la fin de la première semaine postnatale, alors que d'autres resteront polyinnervées jusqu'à la fin de la deuxième (Darabid, St-Pierre-See et Robitaille, 2018; Redfern, 1970; Rosenthal et Taraskevich, 1977).

L'aspect compétitif du phénomène d'élimination a rapidement été reconnu (Brown et al., 1976), principalement en raison du fait qu'il mène invariablement à l'innervation d'une fibre musculaire par une seule unité motrice, qu'il nécessite que les terminaisons soient relativement proches les unes des autres ( $< \sim 1$  mm) et que le sort d'une terminaison dépend de la présence ou de l'absence d'au moins une compétitrice (Colman et Lichtman, 1993). Aujourd'hui, l'hypothèse majoritairement acceptée est que l'activité synaptique relative des terminaisons est la source principale des signaux de discrimination permettant de déterminer l'issue de l'élimination. Par contre, le terme « activité synaptique » reste assez général et comprend plusieurs phénomènes différents qui seront mis en relation au cours de cette section.

#### 1.3.2.1 Dynamiques de la compétition et contexte historique

Chaque terminaison à une JNM est constituée de plusieurs bourgeons distincts qui, ensemble, forment un cartel (Balice-Gordon, Chua, Nelson et Lichtman, 1993). Initialement, les bourgeons de chaque terminaison sont entremêlés et distribués de manière aléatoire sur l'ensemble de la plaque motrice (Tapia et al., 2012). À mesure que la compétition progresse et que des terminaisons sont éliminées, celles restantes sont graduellement ségréguées à des régions distinctes de la plaque (Gan et Lichtman, 1998; Walsh et Lichtman, 2003).

Les premiers projets de recherches visant à étudier la dynamique des changements de territoire ont observé que la rétraction d'un bourgeon était précédée par la régulation négative de la densité de mACh lui étant associé (Balice-Gordon et

Lichtman, 1990, 1993). Qui plus est, ils observèrent que des mACh inactifs pouvaient être déstabilisés par des récepteurs actifs à proximité, ce qui menait à la rétraction du bourgeon surplombant (Balice-Gordon et Lichtman, 1994).

Cette série de résultats était un premier soutien direct à la théorie mise de l'avant près de 20 ans plus tôt par Gunther Stent (1973) décrivant un mécanisme physiologique selon lequel le postulat de Hebb (1949) pourrait être mis en application. Le postulat de Hebb stipule que si l'axone d'une cellule A participe de manière répétée et persistante à induire un potentiel d'action dans une cellule B, une forme de croissance ou de changement métabolique, dans une ou les deux cellules, fera en sorte d'augmenter l'efficacité de la cellule A à induire des potentiels d'action dans la cellule B.

Inspiré par les résultats de Hubel et Wiesel (1965) concernant les colonnes de dominance oculaire et la plasticité des connexions synaptiques dans le cortex visuel primaire de chat, Stent (1973) proposa une version complémentaire au postulat de Hebb. Selon celle-ci, si l'axone d'une cellule A échoue de manière répétée et persistante à exciter une cellule B, alors que celle-ci produit des potentiels d'action sous l'influence d'autres terminaisons présynaptiques, des changements métaboliques, dans une ou les deux cellules, feront en sorte de diminuer l'efficacité de la cellule A à induire des potentiels d'action dans la cellule B.

Au moment de formuler cette nouvelle version du postulat, Stent avait une hypothèse concernant le mécanisme physiologique impliqué. Lorsqu'un potentiel d'action est induit dans la cellule B, celui-ci produit une dépolarisation d'amplitude uniforme au niveau de la membrane cellulaire se rapprochant du potentiel d'équilibre du  $\text{Na}^+$ , soit environ +60 mV. Par contre, la dépolarisation des régions de membrane apposées aux récepteurs postsynaptiques ayant participé à induire le potentiel d'action aura une amplitude significativement moindre, puisqu'elle n'atteindra que le potentiel d'équilibre des récepteurs associés, soit environ -15mV pour les mACh qui sont perméables au  $\text{Na}^+$  et au  $\text{K}^+$  (Del Castillo et Katz, 1954a; Takeuchi et Takeuchi, 1960). Ainsi, selon Stent, la dépolarisation complète de la membrane aurait un effet déstabilisateur sur les récepteurs, alors que la dépolarisation partielle aurait un effet protecteur.

Par contre, malgré le fait que les travaux de Balice-Gordon et Lichtman (1990, 1993, 1994) aient été produits il y a plus de 25 ans, le rôle joué par la dépolarisation postsynaptique dans la transmission du signal de déstabilisation des rnACh n'a jamais été démontré. En effet, il semble que la réalité soit plus complexe et que ce soit en fait une combinaison (Culican, Nelson et Lichtman, 1998; Jennings, 1994; Sanes et Lichtman, 1999) de facteurs trophiques (postulat de Hebb; Snider et Lichtman, 1996) et toxiques (postulat de Stent; Glazner et al., 1997; Tyc et Vrbova, 1995) qui agit comme vecteurs de transmission des signaux compétitifs. Par exemple, Gan et Lichtman (1998) ont montré que les bourgeons d'une terminaison semblaient régulés de manière indépendante puisque certains se rétractaient alors que d'autres restaient stables, un résultat qui n'est pas cohérent avec l'idée que la dépolarisation postsynaptique soit le vecteur de transmission d'un signal de déstabilisation direct.

De plus, bien que plusieurs pistes soutiennent que la densité de rnACh soit régulée lors du processus de compétition (Colman et al., 1997; Kopp et al., 2000), l'importance relative de ce facteur dans la détermination de son issu n'est plus aussi évidente. Effectivement, Walsh et Lichtman (2003) ont démontré que la rétraction des bourgeons se produisait habituellement sans perte de rnACh significative, puisqu'un bourgeon voisin venait rapidement prendre sa place et faire contact avec les récepteurs vacants. Ces résultats surprenants ont permis de mettre en lumière le dynamisme intrinsèque des bourgeons ainsi que le manque de résolution disponible dans les études antérieures. Les auteurs comprirent rapidement que l'utilisation du même marqueur fluorescent pour identifier toutes les terminaisons à une même JNM avait empêché l'observation des changements de territoire. Ainsi, seules les rétractions sans prise de territoire subséquentes avaient été observées par Balice-Gordon *et al.*, menant à une surestimation de l'importance de la régulation de la densité de rnACh.

Ces données mettent en lumière la complexité des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les processus de compétition et d'élimination synaptique. Ainsi, la catégorisation et la mise en relation des observations sont essentielles afin d'espérer comprendre la nature de ces différents mécanismes, qui sont chacun constitués de la manière générale suivante :

- 1) une source de signal
- 2) un vecteur de transmission du signal
- 3) une cible effectrice du signal
- 4) un effet net sur la structure ou la fonction d'une terminaison

Par exemple, selon la théorie de Stent (1) la source du signal serait l'asynchronie de l'activité pré- et postsynaptique (2) le vecteur de transmission serait la dépolarisation postsynaptique (3) la cible serait la déstabilisation des rnACh qui aurait pour (4) effet d'induire la rétraction du bourgeon présynaptique. Dans les prochaines sections, nous explorerons le rôle de l'activité des terminaisons dans la compétition synaptique et les avantages de penser dans ces termes deviendront rapidement évidents.

### 1.3.2.2 Paramètres de l'activité synaptique

Comme nous l'avons mentionné auparavant, l'activité synaptique relative des terminaisons en compétition est considérée comme l'un des facteurs déterminants l'issu du processus. Par contre, mentionner l'activité synaptique sans spécifier plus précisément à quoi l'on fait référence peut facilement porter à confusion et rendre l'interprétation de nos déclarations difficiles.

En effet, l'activité synaptique d'une terminaison est constituée de plusieurs paramètres de sa physiologie. Chacun de ces paramètres pourrait potentiellement avoir des effets distincts et spécifiques sur la progression du processus de compétition et d'élimination. Ainsi, il est important de bien les distinguer afin d'interpréter les résultats de manière adéquate.

Le premier niveau de distinction est entre les paramètres intrinsèques, qui dépendent du MN, et les paramètres locaux, qui dépendent de la régulation au niveau des terminaisons. Ensuite, les paramètres intrinsèques sont divisés de la manière suivante :

- (a) le niveau d'activité, soit la fréquence moyenne des potentiels d'action sur une période prolongée.

- (b) le patron d'activité, soit la possibilité d'encoder de l'information dans des patrons d'activité ponctuels.
- (c) la synchronisation de l'activité entre les différentes terminaisons présynaptiques.

Les paramètres locaux sont les suivants :

- (a) la force synaptique, soit le nombre moyen de quanta relâchés à chaque potentiel d'action.
- (b) l'efficacité synaptique, soit l'effet net de chaque quanta.
- (c) la synchronisation de l'activité entre chacune des terminaisons présynaptiques et l'élément postsynaptique.

Chacun de ces paramètres sera présenté et mis en contexte dans les prochaines sous-sections.

#### 1.3.2.2.1 Paramètres intrinsèques

Comme nous venons de le mentionner, les paramètres intrinsèques dépendent de l'activité du MN. Il s'agit en fait des différentes manières de qualifier l'activité produite en amont de la terminaison.

D'abord, le niveau d'activité est la fréquence moyenne des potentiels d'action sur une période prolongée. Plusieurs études se sont penchées sur l'effet de ce paramètre sur l'élimination. Quand le niveau d'activité était augmenté *in vivo* (O'Brien, Ostberg et Vrbova, 1978; Thompson, 1983) ou *in vitro* (Magchielse et Meeter, 1986; Nelson, Fields, Yu et Liu, 1993), le rythme de l'élimination était lui aussi augmenté. À l'inverse, il était diminué lorsque le niveau d'activité était diminué (Benoit et Changeux, 1975; Brown et Hopkins, 1981; Thompson, Kuffler et Jansen, 1979). De plus, peu importe leur niveau total d'activité, les terminaisons dont le niveau d'activité est plus élevé que leurs compétitrices sont habituellement favorisées et maintenues (Buffelli et al., 2003; Ribchester et Taxt, 1983; Ridge et Betz, 1984). Ensemble, ces données suggèrent fortement que le niveau total d'activité n'influence que le rythme de l'élimination, alors que le niveau relatif d'activité

des terminaisons serait la source d'un signal compétitif (Personius et Balice-Gordon, 2000).

Le deuxième paramètre intrinsèque est le patron d'activité. Par exemple, Todd et al. (2010) ont démontré que, à la JNM mature, une SHF de 20 Hz mène à une potentiation de la force synaptique lorsque la stimulation est continue. De manière surprenante, lorsque la stimulation était appliquée à la même fréquence, mais selon un patron de rafale, une dépression de la force synaptique était induite. Ainsi, le patron de l'activité semble encoder un signal qui est la source d'une plasticité synaptique. Les auteurs ont aussi démontré que le vecteur de transmission de ce signal était les CSP. Bien que la présence de ce mécanisme lors du développement de la JNM reste inconnue, nous avons récemment montré (Darabid et al., 2018) qu'un mécanisme similaire y était présent. En effet, lors d'une SHF de 50 Hz, les CSP produisent une potentiation préférentielle de la terminaison dont la force synaptique est la plus élevée. Aussi, Thompson (1983) a montré que le rythme de l'élimination était fortement augmenté lorsqu'un certain nombre de stimuli étaient présentés sous la forme de rafales à 100 Hz, alors qu'aucun changement n'était observé lorsque le même nombre de stimuli était présenté à 1 Hz. Ces données suggèrent que le patron de l'activité synaptique peut être la source d'un signal compétitif.

Finalement, le dernier paramètre intrinsèque est la synchronisation de l'activité présynaptique. Au moment de la naissance, l'activité des différentes unités motrices à une même JNM est synchronisée au moyen de jonctions GAP (Personius et Balice-Gordon, 2001), un mécanisme dont la régulation dépendrait en partie des récepteurs NMDA (Personius, Karnes et Parker, 2008; Personius, Slusher et Udin, 2016). Par contre, entre les jours postnatals 4 et 6, la synchronisation de la majorité des unités motrices est éliminée (Personius et Balice-Gordon, 2001) et le processus d'élimination est grandement retardé lorsque la synchronisation de l'activité des unités motrices est maintenue de manière artificielle (Busetto, Buffelli, Tognana, Bellico et Cangiano, 2000; Favero, Buffelli, Cangiano et Busetto, 2010; Favero, Busetto et Cangiano, 2012). Une observation intéressante est que l'élimination se remet en marche si l'asynchronie est rétabli tout en maintenant égal le niveau d'activité des unités motrices (Favero et al., 2012). Ces résultats suggèrent que l'asynchronie des unités motrices est nécessaire afin d'induire l'élimination des terminaisons redondante et constituerait une source de signal permissif.

Selon Favero et al. (2012), elle serait non seulement nécessaire, mais suffisante, constituant la source d'un signal instructif. Par contre, l'argument de la suffisance, tel qu'il est présenté, ne considère que l'apport des paramètres intrinsèques. Si une différence dans les paramètres locaux, même minime, existe lorsque l'asynchronie est établie, celle-ci pourrait fournir la source du signal compétitif. Ces questions seront considérées en plus de détails dans la section sur les paramètres locaux.

#### 1.3.2.2.2 *Paramètres locaux*

Certains paramètres de l'activité des terminaisons en compétition sont régulés de manière locale. D'abord, un premier paramètre local est la synchronisation de l'activité pré- et postsynaptique des différentes terminaisons. Il s'agit en fait d'une combinaison de la force et de l'efficacité synaptique ainsi que des paramètres intrinsèques de la fibre musculaire qui déterminent sa sensibilité. Par contre, il semble que ce paramètre ait un rôle modeste dans la détermination de l'issue de la compétition. En effet, très tôt, toutes les terminaisons présentes à une JNM sont en mesure d'éliciter un potentiel d'action dans la fibre musculaire cible à chaque stimulation (Brown et al., 1976). Cette observation n'est pas très surprenante considérant le facteur de sécurité élevé associé aux terminaisons de JNM (Wood et Slater, 2001), soit le rapport entre son contenu quantique et le nombre de quanta nécessaire pour induire un potentiel d'action dans sa fibre musculaire cible.

Ensuite, un autre paramètre local de l'activité des terminaisons est l'efficacité synaptique. Ce paramètre réfère à l'effet net de chaque quanta de NT relâché sur l'activité postsynaptique et il est régulé principalement de trois manières. D'abord, la terminaison présynaptique peut modifier la concentration d'ACh qui est incluse dans chacune des vésicules synaptiques, un phénomène qui a été démontré chez des souris adultes suite au blocage chronique de l'activité neuronale (Wang et al., 2005). Ensuite, la concentration d'ACh dans la fente synaptique peut être régulée en modifiant la concentration d'acétylcholinestérase. Duxson et Vrbova (1985) ont d'ailleurs démontré que l'inhibition de cette enzyme accélérerait le processus d'élimination synaptique lors du développement de la JNM de rat. Finalement, comme l'ont démontré les travaux par Balice-Gordon et Lichtman présentés plus haut (1990, 1993, 1994), la densité de mACh peut être modulée.

Par contre, comme nous l'avons vu, le rôle de la régulation de ces récepteurs dans les différents mécanismes qui promeuvent la compétition demeure inconnu.

Finalement, nous considérerons la force synaptique, aussi appelé contenu quantique ( $m$ ). La force synaptique d'une terminaison réfère au nombre moyen de quanta de NT qui sont relâchés par potentiel d'action, où un quanta correspond à une vésicule synaptique (Del Castillo et Katz, 1954b). Elle est entièrement déterminée par deux paramètres, soit le nombre de sites de relâche de la terminaison ( $n$ ) et la probabilité de relâche moyenne de chacun de ces sites ( $\bar{p}$ ). Cette relation s'écrit

$$m = n \times \bar{p}.$$

Initialement, les différentes terminaisons ont une force synaptique similaire. Au fil de la compétition, elle diverge graduellement jusqu'à ce que la terminaison la plus forte soit stabilisée et maintenue et que les autres soient éliminées (Colman et al., 1997).

En parallèle à leur force, la taille des terminaisons est régulée de manière extrêmement dynamique (Smith et al., 2013; Turney et Lichtman, 2012; Walsh et Lichtman, 2003) et la densité de sites de relâche ( $d_n$ ) semble demeurée relativement constante (Chen, Mizushige et Nishimune, 2012; Clarke, Chen et Nishimune, 2012). Cela implique que le nombre de sites de relâche évolue en parallèle à la taille des terminaisons. En effet, si la densité de sites de relâche est constante, le nombre de ces sites sera proportionnel au territoire que la terminaison couvrira ( $t$ ), selon l'équation

$$n = d_n \times t.$$

Ainsi, la régulation de la taille d'une terminaison affecterait directement sa force synaptique, selon l'équation

$$m = d_n \times t \times \bar{p}.$$

Par ailleurs, d'autres évidences (Darabid, 2018; Kopp, 2000; Colman 1997) indiquent que la probabilité de relâche des terminaisons est aussi régulée activement durant le processus compétitif.



Ainsi, la relation entre la force synaptique et le processus compétitif semble bidirectionnelle. En effet, les mécanismes qui influencent la compétition ont vraisemblablement tous un effet minimalement indirect sur les paramètres qui déterminent la force synaptique, faisant de celle-ci un proxy de l'état de progression du processus. En contrepartie, la force synaptique serait un déterminant dans certains mécanismes ayant une influence sur le processus compétitif en jouant le rôle de source ou de vecteur de signal.

Nous avons présenté un exemple intéressant de ce concept plus haut, soit la potentiation des terminaisons les plus fortes suite à une SHF de 50 Hz (Darabid et al., 2018). Dans cet exemple, la source du signal serait le patron de stimulation, le vecteur de transmission serait une combinaison de la force synaptique et des propriétés intrinsèques des CSP, la cible serait les récepteurs adénosine présynaptiques et l'effet serait l'augmentation de la probabilité de relâche présynaptique. Dans cette étude, nous avons aussi démontré que le blocage de ce mécanisme menait à une prolongation de la période d'élimination synaptique. Ainsi, dans ce seul exemple, la force synaptique se retrouve à être aussi bien un déterminant du processus compétitif, en jouant le rôle de vecteur pour le signal, qu'un proxy de l'effet du mécanisme sur ce processus.

Un autre exemple intéressant est celui des facteurs trophiques, comme le BDNF (Hurtado et al., 2017; Je et al., 2012; Je et al., 2013). En utilisant des cocultures nerfs-muscle provenant de myocytes de *Xenopus*, Je et al. (2012) ont montré que le proBDNF était converti en mBDNF de manière proportionnelle au niveau d'activité des MN. Ils ont aussi montré que le proBDNF favorisait la rétraction des terminaisons via les récepteurs présynaptiques p75, alors que le mBDNF favorisait leur stabilisation via les récepteurs présynaptiques TrkB. Dans une étude subséquente à la JNM de souris (Je et al., 2013), ils ont démontré que l'application de proBDNF exogène accélérerait l'élimination synaptique alors que le blocage des récepteurs p75 ou l'application de mBDNF exogène la ralentissait. Finalement, Hurtado et al. (2017) ont montré que, à la JNM de souris mature, la contraction musculaire et l'activité présynaptique augmentaient toutes deux le niveau de mBDNF et le niveau d'activation des récepteurs TrkB, ce qui menait à une potentiation de la force synaptique par l'augmentation de la probabilité de relâche suite à la

phosphorylation de SNAP-25 (Simo et al., 2019). La cellule musculaire a été identifiée comme source du proBDNF.

Ainsi, ce mécanisme pourrait être modélisé en considérant à la fois le niveau d'activité et la force synaptique comme des sources de signal. En effet, ce mécanisme semble reposé sur la synergie du niveau d'activité, qui détermine la fréquence des contractions musculaires et donc de la relâche musculaire de proBDNF, et de la force synaptique, qui régule l'amplitude de l'activité enzymatique responsable de la transformation du proBDNF en mBDNF. Ces deux isoformes du BDNF seraient donc les vecteurs de la transmission d'un signal toxique et trophique, respectivement, avec le mBDNF particulièrement associé à la terminaison la plus active. Leurs récepteurs pourraient être considérés comme les cibles du mécanisme et l'augmentation de la force synaptique, dans le cas du mBDNF, comme l'effet.

Notons un premier aspect intéressant de cet exemple, soit qu'il met en évidence l'importance de la synergie entre le niveau d'activité et la force synaptique. Ensemble, ces deux paramètres déterminent la quantité de NT qui sera relâchée par une terminaison sur une période de temps donnée. Ainsi, n'importe quel mécanisme qui dépend exclusivement de la quantité de NT relâché aura comme source de signal une synergie de ces deux paramètres. Un autre aspect important de cet exemple est qu'il permet à lui seul de mettre en évidence un mécanisme physiologique pour les postulats de Hebb (1949), soit l'effet trophique du mBDNF sur la terminaison la plus active en termes de niveau d'activité et de force synaptique, et de Stent (1973), soit l'effet toxique du proBDNF sur les autres terminaisons. Ensuite, un autre des aspects intéressants est l'observation que la force synaptique peut être considérée aussi bien comme source d'un signal compétitif que comme cible ultime par l'augmentation de la probabilité de relâche. L'implication de la force synaptique comme source de signal compétitif permettrait d'expliquer l'observation de Favero et al. (2012) que l'élimination procède normalement lorsque le niveau d'activité des terminaisons est égal, mais désynchronisé. Finalement, cet exemple permet de bien démontrer l'idée que les différents paramètres de l'activité synaptique peuvent jouer des rôles distincts dans les différents mécanismes compétitifs.

### 1.3.2.3 Régulation de la structure morphologique des terminaisons

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, les différents mécanismes qui participent à déterminer l'issue de l'élimination synaptique sont nombreux. Toutefois, la caractéristique principale qui départage les terminaisons gagnantes de leurs compétitrices est le fait d'être maintenue et stabilisée. Ainsi, tous les mécanismes qui influencent la compétition doivent, de façon directe ou indirecte, influencer la structure morphologique des terminaisons.

Plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation de la structure des terminaisons ont été décrits. Du côté cellulaire, les CSP sont impliquées dans la gestion des débris des axones qui se rétractent des JNM (Bishop, Misgeld, Walsh, Gan et Lichtman, 2004), une fonction qui dépend de leur activité lysosomal (Song et al., 2008). Smith et al. (2013) ont d'ailleurs montré que, au cours des premiers jours postnatals, les CSP projettent des protrusions cellulaires qui transpercent toutes les terminaisons à une même JNM. Selon les auteurs, cela leur permettrait d'internaliser des volumes présynaptiques d'une manière aléatoire. Par contre, le mécanisme de détection de l'activité synaptique des CSP que nous avons récemment décrit laisse croire que le ciblage pourrait ne pas être aléatoire (Darabid et al., 2018). Il s'agit d'une hypothèse intéressante qui créerait un lien tangible entre les signaux instructifs de la compétition et les mécanismes physiologiques de régulation de la morphologie cellulaire.

Du côté moléculaire, plusieurs acteurs potentiels ayant un effet sur la morphologie des terminaisons ont été identifiés. Un des exemples les plus notoires est le GDNF. Sa surexpression mène à une augmentation significative du nombre de terminaisons innervant une même JNM (Nguyen, Parsadanian, Snider et Lichtman, 1998). De plus, l'application de GDNF exogène à partir de la naissance est une des seules interventions ayant permis d'étendre la période de polyinnervation à la JNM à plus de 21 jours postnatals (Keller-Peck et al., 2001). En fait, après 40 jours d'injections, plusieurs fibres musculaires étaient toujours polyinnervées. Les auteurs ont conclu que le GDNF semblait réguler directement la croissance des terminaisons. D'autres acteurs moléculaires ont aussi été impliqués dans le bourgeonnement des terminaisons (English,

2003), par exemple les neuroleukines, les IGF, les NCAM et, chez *Xenopus* (Stoop et Poo, 1995, 1996), les CNTF.

Toutes ces pistes sont intéressantes, mais plusieurs questions demeurent sans réponses. Par exemple, quel lien existe-t-il entre ces différents mécanismes de régulation de la structure des terminaisons et les paramètres de l'activité synaptique? Existe-t-il d'autres mécanismes qui font le lien entre l'activité synaptique des terminaisons et la régulation de leur structure? Ces mécanismes sont-ils reliés à la régulation de la probabilité de relâche des terminaisons? Par exemple, plusieurs des mécanismes qui influencent la compétition et que nous avons décrits plus haut semblent avoir un effet primaire sur la probabilité de relâche des terminaisons. Il sera intéressant de comprendre la nature de la relation entre ces changements et la régulation de la structure des terminaisons. Notre compréhension des processus de compétition et d'élimination synaptique restera fragmentaire tant que les réponses à ces questions demeureront inconnues.

La force synaptique joue un rôle prépondérant aussi bien dans la détermination de l'issue de la compétition que dans l'observation de sa progression. Il est donc évident que la réponse aux questions soulevées nécessitera la capacité de déterminer de manière précise non seulement la force synaptique des terminaisons en compétition, mais aussi la contribution relative des paramètres sous-jacents ( $d_n, t, \bar{p}$ ). En plus de répondre aux questions soulevées plus haut, ceci permettrait, d'abord, de mieux caractériser l'effet (sur  $t$ ? sur  $\bar{p}$ ?) des différents mécanismes qui influencent la compétition. Il deviendrait aussi possible de mieux caractériser les mécanismes eux-mêmes en déterminant plus précisément quels sont les paramètres importants, l'effet de chaque paramètre et les interactions entre les différents paramètres et entre les différents mécanismes.

## 1.4 Objectifs du mémoire

Comme nous l'avons vu au cours des sections précédentes, la force synaptique relative des terminaisons en compétition est un des déterminants majeurs de l'issue du processus d'élimination synaptique à la JNM. Nous savons que la couverture territoriale de la terminaison qui sera maintenue doit augmenter jusqu'à circonscrire le territoire synaptique complet et que sa probabilité de relâche semble augmenter en parallèle. À l'inverse, la couverture territoriale des terminaisons qui seront éliminées doit diminuer jusqu'à leur retrait complet et leur probabilité de relâche semble diminuer en parallèle. Finalement, d'autres données suggèrent que la densité des sites de relâche des deux types de terminaisons est constante tout au long du processus, indiquant que le nombre de sites progresse en parallèle avec la taille de la terminaison.

Bien que ces données semblent brosser un portrait général adéquat du processus d'élimination synaptique, comme nous l'avons vu, elles ne fournissent que très peu d'information par rapport aux mécanismes qui sous-tendent les changements de probabilité de relâche et de couverture territoriale et à la dynamique temporelle de ceux-ci. Plusieurs limitations majeures ont inhibé l'avancement de ces recherches. Par exemple, à notre connaissance, aucune étude n'a jamais été en mesure de directement déterminer la probabilité de relâche des terminaisons en compétition à la JNM. Habituellement, la facilitation ( $F$ ) est utilisée comme mesure de procréation, malgré le fait que la relation qui lie celle-ci à la probabilité de relâche ne soit jamais clairement explorée. Une autre limitation est la difficulté d'obtenir des mesures de contenu quantique ou de probabilité de relâche lors d'études sur les changements de couverture territoriale, un prérequis essentiel à toute expérimentation visant à comprendre l'interrelation dans la régulation de ces paramètres.

Ainsi, nous avons entrepris ce projet de recherche avec l'intention de répondre à deux séries de questions. La première vise à tenter développer des outils pour étudier les phénomènes présentés :

1. Peut-on déterminer de manière plus précise la relation entre la facilitation et la probabilité de relâche à la JNM?

2. Une meilleure compréhension de cette relation pourrait-elle nous permettre de mieux évaluer la probabilité de relâche des terminaisons en compétition?
3. Serait-il possible, alors, d'extraire des informations par rapport au nombre de sites de relâche ou à la couverture territoriale?

La deuxième série de questions vise à appliquer les outils ainsi développés afin de poser les bases d'une meilleure compréhension de la dynamique de la régulation de la probabilité de relâche et de la couverture territoriale lors du processus de compétition et d'élimination synaptique :

1. La force synaptique relative des terminaisons en compétition est-elle entièrement déterminée par leurs différences de couverture territoriale et de probabilité de relâche, ce qui confirmerait que leur densité de sites de relâche constante durant tout le processus de compétition synaptique?
2. Quelle est la dynamique des changements de couverture territoriale et de probabilité de relâche en fonction de la force relative des terminaisons?
3. La probabilité de relâche et la couverture territoriale influencent-elles de manière équivalente la détermination de la force synaptique?
4. Cette influence relative dépend-elle du stade de la compétition?

Afin de répondre à ces différentes questions, nous avons d'abord effectué des enregistrements électrophysiologiques nous permettant d'obtenir des mesures de la force synaptique et de la facilitation des terminaisons en compétition à des JNM bi-innervées. Nous avons ensuite adapté une méthode d'analyse développée pour des synapses du CNS qui permet d'établir la relation entre la facilitation et la probabilité de relâche. Afin d'obtenir des mesures de couverture territoriale, nous avons utilisé une technique permettant l'internalisation de marqueurs fluorescents complémentaires dans les vésicules synaptiques de chacune des terminaisons, combinée à l'imagerie de ces marqueurs à l'aide d'un microscope confocal. Ensemble, ces techniques nous ont permis d'adresser les questions soulevées.

## 2 Méthodologie

### 2.1 Modèle expérimental

Des souriceaux mâles CD-1 (Charles River) âgés de 7-8 jours postnatals (P7-8) ont été euthanasiés par une injection intrapéritonéale de kétamine (15 mg/ml) / xylazine (1 mg/ml). Le muscle soléaire gauche et ses innervations, jusqu'aux racines ventrales, ont été disséqués et disposés dans une chambre d'enregistrement contenant un lit de Sylgard 184 (Paisley Produit du Canada). Les tendons inférieur et supérieur du muscle soléaire ont été immobilisés à l'aide d'épingle *Minutien* de 0.1 mm de diamètre (*Fine Science Tools*) de manière à ce que sa longueur soit 105-115% de celle *ex vivo*, au repos et non immobilisée (ce qui se rapproche de sa longueur *in vivo*). Deux ou trois des racines ventrales (L3-L5) ont été isolées et aspirées dans des tubes de polyéthylène (PE-160) indépendants contenant chacun une électrode de stimulation en platine. Chaque électrode de stimulation est couplée à une électrode de référence en platine située près de l'embouchure de la pipette de polyéthylène (Figure 2.1a).

Notre objectif étant d'identifier des JNM bi-innervées afin d'étudier les propriétés de ses terminaisons axonales en compétition, il est primordial d'être en mesure de stimuler chacune de ces terminaisons de manière indépendante. Notre montage permet d'établir une différence de potentiel entre une électrode de stimulation et son électrode de référence, ce qui produit un courant permettant d'induire électriquement un potentiel d'action dans les axones présents dans la racine ventrale aspirée. Ainsi, si les deux terminaisons axonales en compétition à une JNM donnée avaient des axones qui quittaient la moelle épinière par des racines ventrales distinctes, il devenait possible de les stimuler de manière indépendante (Figure 2.1b). Cette technique a été décrite auparavant (Darabid et al., 2013; Kopp et al., 2000).

Lors des dissections, la chambre contenant la préparation a été continuellement perfusée avec une solution oxygénée de Ringer de Rees (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> ; en mM) : 110 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 11 glucose, 0.3 glutamate, 0.4 glutamine, 5 BES, 4.34X10<sup>-7</sup> thiamine pyrophosphate et 0.036 chlorure de choline. Une fois la dissection

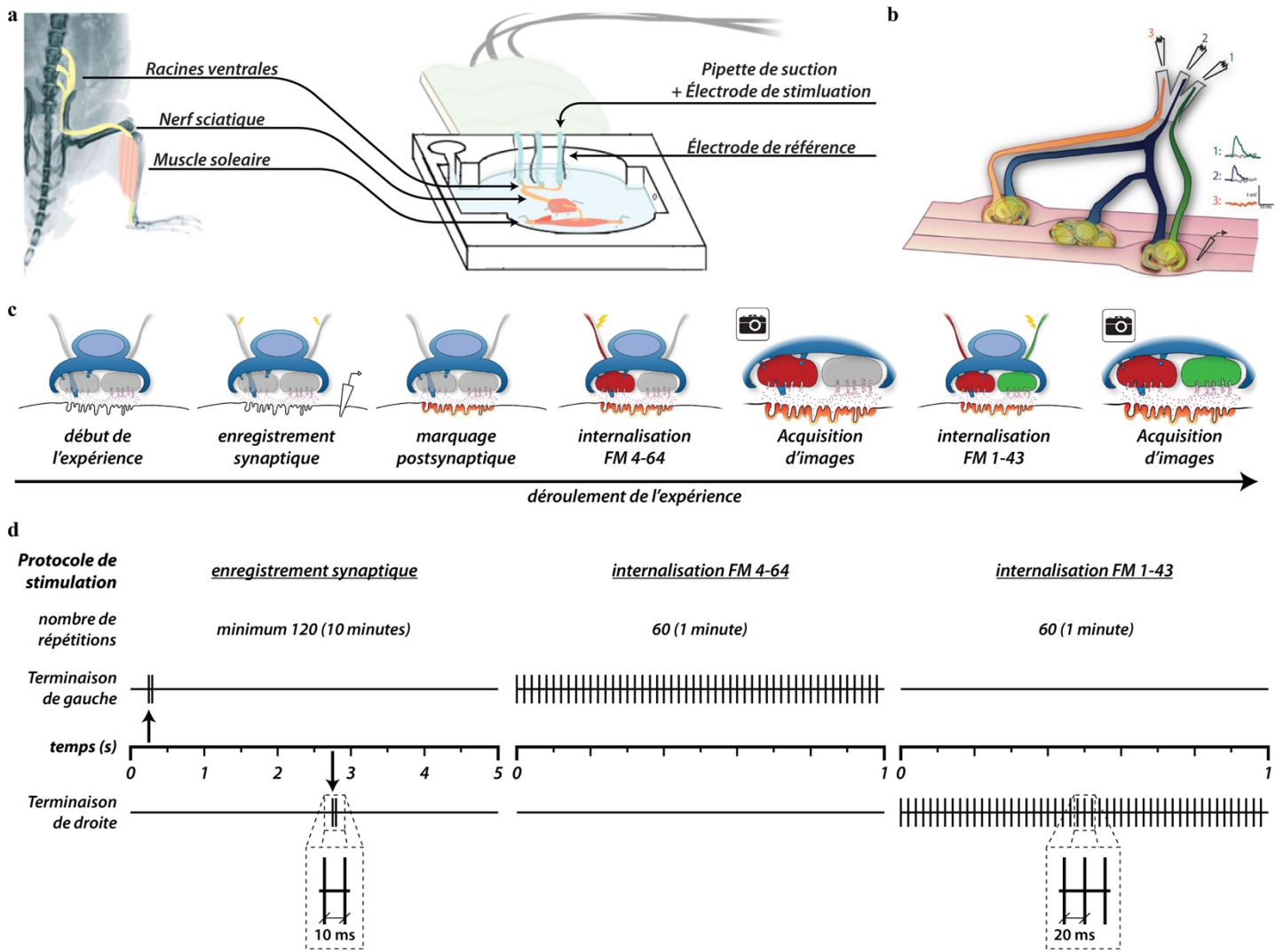


Figure 2.1. Modèle expérimental.

a. Schéma montrant le montage du muscle soléaire, du nerf sciatique et de ses racines ventrales dans une chambre d'enregistrement. Les tendons du muscle soléaire sont immobilisés à l'aide d'épingles. Chacune des racines est aspirée dans un tube contenant une électrode de stimulation couplé à une électrode de référence, ce qui permet de stimuler les axones qu'elle contient.

b. Si une fibre musculaire est innervée par deux terminaisons axonales provenant de racines ventrales distinctes, il est alors possible de stimuler chacune de ces terminaisons indépendamment l'une de l'autre et d'enregistrer leurs propriétés synaptiques.

c. Schéma montrant le déroulement typique d'une expérience. Les éclairs signifient la stimulation de la terminaison associée.

d. Schéma descriptif des différents protocoles de stimulation utilisés. Lors d'une expérience typique, les protocoles de stimulation utilisés sont les protocoles illustrés mis en fonction de manière récurrente pour le nombre de répétitions indiqué. Le panneau **b** est tiré de Darabid et al. (2013). Droits de modification et de reproduction obtenus de *Society for Neuroscience*.



terminée, la chambre contenant la préparation a été installée sur un microscope confocal droit Olympus FV1000 équipé d'un objectif d'immersion à l'eau 60x (0.90 NA, Olympus). Toutes les expériences subséquentes ont été effectuées en gardant la solution de perfusion de la préparation entre 28-30°C et la température a été suivie et ajustée de manière automatique en utilisant un chauffe-solution TC-324B (Warner Instruments).

Toutes les expériences ont été faites en accord avec les lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux et du Comité de déontologie animale de l'Université de Montréal.

## 2.2 Détermination des seuils de stimulation

D'abord, il était nécessaire de déterminer, pour chacune des racines isolées, l'intensité de stimulation nécessaire afin d'induire un potentiel d'action dans les axones s'y trouvant. Ceci est effectué en augmentant graduellement l'intensité de stimulation d'une racine (impulsions carrées ; 0.1 mV à 2.0 mV pendant 0.1 ms), en utilisant un stimulateur Master-8 (AMPI) et un isolateur de courant ISO-Flex (AMPI), jusqu'à l'observation d'une contraction musculaire. Une fois le seuil de contraction musculaire identifier pour une racine, l'intensité de stimulation pour cette racine était doublée afin d'assurer la stimulation d'un nombre maximal d'axones. Cette nouvelle intensité de stimulation, pour chaque racine, a été utilisée pour toutes les expériences subséquentes.

## 2.3 Enregistrements électrophysiologiques

Tous les enregistrements visant à déterminer la force synaptique et la probabilité de relâche des terminaisons innervant une JNM ont été obtenus en perfusant une solution modifiée de Ringer de Rees contenant moins de  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM) et plus de  $\text{Mg}^{2+}$  (6-7 mM). Cette solution permet aussi le blocage de la contraction musculaire en diminuant considérablement la probabilité de relâche des terminaisons. Tous ces enregistrements ont été effectués au début de chaque expérience (Figure 2.1c).

Une JNM était d'abord identifiée et la fibre musculaire associée était ciblée pour enregistrement à l'aide d'une électrode d'enregistrement intracellulaire. Cette électrode était constituée d'un tube de verre (1.0 mm O.D.), dont l'embout était étiré à l'aide d'un

tire-pipette P-97 (Sutter Instrument Co.), contenant une électrode au chlorure d'argent baignant dans une solution de KCl (3M). La procédure d'étirement de l'embout du tube de verre était ajustée afin que la résistance de l'électrode soit entre 40-60 M $\Omega$ . Les racines participant à l'innervation de cette fibre musculaire étaient identifiées en stimulant chacune d'elle indépendamment (impulsions carrées ; intensité précédemment établie, pendant 0.1 ms). La participation d'une racine à l'innervation de la JNM était observée par la présence d'un potentiel de plaque motrice (PPM) évoqué par sa stimulation. Seules les JNM bi-innervées ont été enregistrées; elles devaient montrer des PPM évoquées par la stimulation indépendante de deux des racines ventrales. Si une augmentation de l'amplitude des PPM suivait une augmentation de l'intensité de stimulation dans une électrode donnée, l'enregistrement était arrêté puisque cela suggère que plus d'une terminaison axonale innervant la JNM à l'étude quittait la moelle épinière par la même racine ventrale (Buffelli, Busetto, Cangiano et Cangiano, 2002; Busetto et al., 2000; Redfern, 1970). Une autre JNM était alors identifiée pour enregistrement.

Une fois qu'une JNM bi-innervée était identifiée, deux stimulations étaient appliquées à 10 ms d'intervalle (stimulation appariée), à une fréquence de 0.2 Hz, pour chacune des racines ventrales participant à son innervation. Ces deux racines étaient stimulées en alternance de manière à ce que la stimulation d'une racine se produise au milieu de la période interstimulation de l'autre racine (Figure 2.1d).

Les évènements synaptiques ont été enregistrés en utilisant un amplificateur Axoclamp 2B (Axon Instruments) et ensuite amplifiés de nouveau (100x) et filtrés à 2 kHz par un amplificateur Warner Instruments. Le DigiData 1322A (Axon Instruments) a permis la numérisation des PPM (10 kHz). Les données ont été recueillies et analysées en utilisant le logiciel pClamp 8.0 (Axon Instruments).

### 2.3.1 Force synaptique

Comme nous venons de l'expliquer, chacune des racines participant à l'innervation de la JNM à l'étude recevait une stimulation appariée à une fréquence de 0.2 Hz. La première des deux stimulations appariées permet de déterminer la force synaptique d'une terminaison. Ceci est effectué en calculant le contenu quantique ( $m$ )

des PPM qu'elle évoque:  $m = \log_e \frac{\# \text{stimulations}}{\# \text{échecs}}$  (Del Castillo et Katz, 1954b). Un échec est défini comme la stimulation d'une terminaison n'induisant aucun PPM. Ainsi, une terminaison dont le nombre d'échecs évoqués lors de la première des deux stimulations appariées est moins élevé aura un contenu quantique plus élevé. Dans cette étude, la terminaison ayant le contenu quantique le plus élevé est désignée comme étant la terminaison *forte*, alors que l'autre est désigné comme étant la terminaison *faible*. La caractéristique d'une terminaison forte est donc de libérer, en moyenne, un plus grand nombre de quanta de NT que sa compétitrice lorsqu'elle est activée.

### 2.3.2 Validation du comportement synaptique des terminaisons

Nous avons tenter de valider que la distribution des amplitudes de PPM était normale et que les terminaisons étudiées se comportait de manière attendue au niveau synaptique. Pour y arriver, nous avons d'abord déterminer la taille moyenne approximative d'un quanta pour chacune des terminaisons. Ensuite, nous avons utiliser cette information, combiner au taux d'échecs, afin de produire une distribution attendue pour l'amplitude des PPM de cette terminaison. Cela permettait de comparer la distribution attendue à la distribution observée.

#### 2.3.2.1 Taille moyenne approximative et variance d'un quanta

Afin de déterminer la taille approximative d'un quanta, il était nécessaire d'établir un seuil supérieur selon la distribution des amplitudes de PPM. Cette détermination s'est fait de manière visuelle par la personne qui analysait les données. En pratique, ce seuil se retrouvait entre les deux premiers maximums dans l'histogramme de distribution des amplitudes, vis-à-vis le plus grand creux. Le premier maximum correspondant de près à l'amplitude moyenne d'un quanta, et le deuxième maximum à celle de deux quanta.

Une fois le seuil supérieur établi, la taille moyenne approximative d'un quanta était déterminée en calculant la taille moyenne des PPM ayant une amplitude plus petite que le seuil déterminé. Il est aussi possible de calculé aisément la variance de la taille d'un quanta.

### 2.3.2.2 Distribution des amplitudes de PPM attendue

#### 2.3.2.2.1 Probabilité qu'une réponse soit constituée de $n$ -quanta

La loi de Poisson (1837, p. 207) décrit la distribution du nombre de quanta participant aux PPM d'une série de plusieurs observations. Cette distribution peut être décrite selon un seul paramètre,  $\lambda$ , qui correspond au taux moyen d'événement. Dans notre cas, ce paramètre est équivalent au contenu quantique,  $m$ .

Ainsi, lorsque  $m$  est connu, il est possible de connaître la probabilité qu'une réponse soit constitué de  $n$ -quanta, selon l'équation suivante :

$$P(n|m) = e^{-m} \times \frac{m^n}{n!}$$

Cette équation permet donc de déterminer le nombre d'événements attendus pour chaque valeur de  $n$ , lorsque le nombre total d'événement (# stimulations) et le taux moyen ( $m$ ) sont connus, ce qui est notre cas.

#### 2.3.2.2.2 Distribution des amplitudes de PPM attendus pour $n$ -quanta

Nous connaissons maintenant la taille moyenne et la variance d'un quanta, et la probabilité que chaque réponse soit constituée de  $n$ -quanta. Ensemble, ces informations permettent de calculer le nombre d'événements attendus par taille de PPM.

D'abord, il est nécessaire de diviser les valeurs possibles d'amplitude de PPM en plages de 0.125 mV. Ensuite, pour chaque nombre de quanta,  $n$ , nous pouvons calculer la distribution des probabilités cumulatives pour chacune des plages, compte tenu de la variance établit et en assumant une distribution gaussienne, et la multiplié par le nombre d'événements attendus pour  $n$ -quanta. Il ne reste ensuite qu'à additionner, pour chacune des plages, le nombre d'événements prédits pour chaque  $n$ .

### 2.3.3 Probabilité de relâche

La probabilité de relâche de chaque terminaison en compétition a été déterminée à partir de la facilitation ( $F$ ) des PPM produite par la seconde impulsion de la stimulation

appariée par rapport à la première, en incluant les échecs :  $F = \frac{\text{Amplitude moyenne } 2^{\text{e}} \text{ PPM}}{\text{Amplitude moyenne } 1^{\text{er}} \text{ PPM}}$  (Darabid et al., 2013; Kopp et al., 2000).  $F$  est donc une mesure de l'augmentation de la libération de NT observée suite à une stimulation appariée ayant un intervalle interstimulation plus petit qu'environ 1 seconde (Slater, 2015).  $F$  est liée de manière très forte à la probabilité de relâche ( $\bar{p}$ ) de manière qu'une terminaison ayant une  $\bar{p}$  plus élevée aura nécessairement une  $F$  diminuée. En effet, la relation entre  $p$  et  $F$  est décrite par la formule suivante :  $F = \frac{1 - (1 - \bar{p})^{\frac{1}{\bar{p}}}}{\bar{p}}$  (Dobrunz et Stevens, 1997). Il est important de noter que ces paramètres ne sont pas indépendants de  $m$ . En effet,  $m = n * \bar{p}$ , où  $n = \text{nombre de sites de libérations}$  (Del Castillo et Katz, 1954b),  $\bar{p}$  est donc un des déterminants majeurs de  $m$ . Ainsi, puisqu'une augmentation de  $\bar{p}$  mène à une augmentation de  $m$  (pour un  $n$  constant) et une diminution de  $F$ , une terminaison forte aura, en règle générale, une  $F$  plus basse que sa compétitrice (Darabid et al., 2013; Kopp et al., 2000).

## 2.4 Étude de la couverture territoriale

L'objectif de l'étude de la couverture territoriale est de mettre en relation les propriétés synaptiques et morphologiques des terminaisons. La base de cette relation est la définition de  $m$ , soit :  $m = n \times p$ . Cette relation peut être réécrite  $m = d \times t \times p$ , où  $n = d \times t$ ,  $d = \text{densité des sites de libération}$  et  $t = \text{couverture territoriale}$ . Il devient ainsi possible d'évaluer la contribution des différences de  $t$  et de  $p$  sur les différences de  $m$  des terminaisons en compétition. Nous avons déjà présenté les méthodes permettant l'évaluation de  $m$  et  $p$ , nous présentons maintenant les méthodes permettant l'évaluation de  $t$ .

### 2.4.1 Marquage fluorescent des structures synaptiques et imagerie

Une fois les enregistrements électrophysiologiques complétés, la perfusion d'une solution de Ringer Rees contenant des concentrations normales de  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) et de  $\text{Mg}^{2+}$  (1 mM) a été utilisée afin d'effectuer les procédures suivantes de l'expérience. Par contre, la solution contenait du chlorure de D-tubocurarine (1.8-2.0  $\mu\text{M}$ , Sigma), un antagoniste réversible des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, afin de bloquer la contraction musculaire. La transition entre les solutions de perfusion durait environ 20 minutes.

Toutes les images analysées ont été acquises à l'aide du microscope présenté précédemment (Section 2.1).

#### **2.4.1.1 Marquage postsynaptique**

Puisque notre objectif est de comparer l'étendue de la couverture territoriale des terminaisons en compétition à une JNM, il est nécessaire d'établir une mesure du territoire synaptique total afin de servir de référence aux mesures de couverture. Une manière relativement simple d'arriver à cette fin est d'utiliser de l' $\alpha$ -Bungarotoxine conjuguée à un fluorophore. Cette toxine se liera avec une affinité élevée aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (Lukas, Morimoto, Hanley et Bennett, 1981). Cette technique permet donc un marquage extrêmement spécifique de la plaque de récepteurs postsynaptiques, soit l'ensemble du territoire synaptique. Ainsi, une fois la transition de solution de perfusion terminée, la préparation nerfs-muscle a été incubé en bain fermé dans la solution de perfusion contenant de l' $\alpha$ -Bungarotoxine conjugué à un fluorophore CF-405 (10-20  $\mu$ M, Biotium) pour 15 minutes, suivi d'un nettoyage de 15 minutes dans la solution de perfusion (Figure 2.1c).

#### **2.4.1.2 Marquage de la couverture territoriale et acquisition des images**

Par la suite, la préparation nerfs-muscle a été incubé dans la solution de perfusion contenant le marqueur SynptoRed C2 (8  $\mu$ M, FM 4-64, Biotium). Après 7 minutes d'incubation, une SHF de 50 Hz (impulsions carrées de 0.1 ms) pendant 1 minute (Figure 2.1d) a été appliquée au hasard à l'une des deux électrodes de stimulation contenant une racine participant à l'innervation de la JNM à l'étude. Cette stimulation permet l'internalisation du marqueur FM 4-64 dans les vésicules synaptiques de la terminaison stimulée (Betz et Bewick, 1992; Gaffield et Betz, 2006), et la visualisation subséquente de la couverture territoriale fonctionnelle (c.-à-d. : où la relâche a eu lieu) d'une terminaison. La stimulation a été suivie d'un nettoyage de 30-45 minutes dans la solution de perfusion permettant l'élimination de l'excédent extracellulaire de FM 4-64.

Une fois le nettoyage terminé, une première série d'images de la JNM d'intérêt a été acquise en utilisant les lasers 405 ( $\alpha$ -Bungarotoxine-CF-405, fenêtre spectrale

d'émission 410-490 nm) et 488 (FM 4-64, filtre d'émission à bande de 650-750 nm; argon multilignes 458/488/515).

Par la suite, la même procédure que pour le FM4-64 a été répétée en utilisant du FM1-43 (8  $\mu$ M, ThermoFisher), et en appliquant une stimulation identique à l'autre racine ventrale. Une deuxième série d'images a ensuite été acquise en utilisant les lasers 405 ( $\alpha$ -Bungarotoxine-CF-405, fenêtre spectrale d'émission 410-490 nm) et 488 (FM 1-43, fenêtre spectrale d'émission 510-560 nm; argon multilignes 458/488/515).

Les deux marqueurs FM ont été imagés séquentiellement afin d'éviter la pollution du signal FM 4-64 par le signal FM 1-43. Cette limitation est due aux spectres d'émissions atypiques des marqueurs FM et à la sélection de filtres disponibles sur notre système d'imagerie.

La Figure 2.1c montre un schéma du déroulement typique de l'expérience décrite.

## 2.4.2 Analyse d'images et extraction de mesures

### 2.4.2.1 Alignement des séries d'images

Les séries d'images obtenues pour chacun des marquages FM ont d'abord été alignées en utilisant le plugiciel *MultiStackReg* (transformation de type *Rigid Body*) inclus dans le logiciel *ImageJ* (NIH). Le signal du marquage postsynaptique a été utilisé comme référence pour l'alignement. À partir de cet alignement, tous les marquages d'une même préparation ont été réunis en un seul fichier ( $\alpha$ -Bungarotoxine, FM 4-64 et FM 1-43). Le signal postsynaptique de la première acquisition a été utilisé comme référence pour les étapes subséquentes de l'analyse en raison du photoblanchiment rendant la deuxième acquisition de moindre qualité.

### 2.4.2.2 Détermination des seuils d'intensité

Pour chacun des marquages ( $\alpha$ -Bungarotoxine, FM 4-64 et FM 1-43), une projection d'intensité maximale a été créée. Un plugiciel personnalisé, fonctionnant sous *ImageJ*, a ensuite été utilisé afin de déterminer le seuil d'intensité optimal permettant de différencier le signal spécifique du signal non spécifique et du bruit, de manière non

biaisé. Le principe du plugiciel repose sur l'idée que le signal spécifique peut-être défini selon :

$$signal \geq \bar{b} + (2 * SD_b), \text{ où}$$

$\bar{b}$  = Intensité moyenne du signal non-spécifique et du bruit

$SD_b$  = Écart type de l'intensité du signal non-spécifique et du bruit

Le fonctionnement du plugiciel peut être visualisée dans la Figure 2.2 et le code source peut être consulté à l'Annexe I. Les étapes principales du processus sont les suivantes :

1. Les intensités de pixel minimale (*min*) et maximale (*max*) de la projection sont obtenues.
2.  $range = max - min$
3.  $increment = \frac{range}{20}$  (Taille de l'incrément entre chaque pré-approximation)
4. Une première approximation (*approx*) du seuil est obtenue sous la forme d'une moyenne de 20 *pré\_approximations*. Pour déterminer la  $x^e$  *pré\_approximation* :
  - i.  $thisMax = min + (x * increment)$
  - ii. Déterminer l'intensité moyenne (*average*) et l'écart type (*SD*) des pixels inclus dans l'intervalle entre *min* et *thisMax*.
  - iii.  $pré\_approximation = average + (2 * SD)$
5.  $approx = \frac{(\sum_{i=1}^{20} pré\_approximation_i)}{20}$
6. À partir d'*approx*, la détermination finale du *seuil* est établie en fonction du type de marquage. Le marquage postsynaptique contient très peu de signal non-spécifique alors que les marqueurs FM produisent relativement plus de ce type de signal. Ainsi, l'algorithme a été adapté à chacune de ces situations. Dans les deux cas, le principe reste le même que précédemment, soit :



- i. Déterminer une plage d'intensités de pixels. Les équations permettant d'établir les valeurs des variables suivantes ont été déterminées de manière empirique à partir de préparations contrôles. Il s'agit de la seule étape qui diffère entre les types de marquage.
  - a) Marquage postsynaptique :
    1.  $startMax = approx$
    2.  $endMax = \frac{max - approx}{4}$
  - b) Marquages FM :
    1.  $startMax = \frac{max - approx}{2}$
    2.  $endMax = max$
- ii. Diviser cette plage en 20 afin de trouver la taille de l'incrément.
  - a)  $newRange = endMax - startMax$
  - b)  $newIncrement = \frac{newRange}{20}$
- iii.  $seuil = \frac{(\sum_{i=1}^{20} pré\_seuil_i)}{20}$ , soit la moyenne de 20 *pré\_seuil*, établie comme les *pré\_approximation* précédemment. Pour déterminer le  $x^e$  *pré\_seuil* :
  - a)  $thisMax = startMax + (x * newIncrement)$
  - b) Déterminer l'intensité moyenne (*average*) et l'écart type (*SD*) des pixels inclus dans l'intervalle *min-thisMax*.
  - c)  $pré\_seuil = average + (2 * SD)$

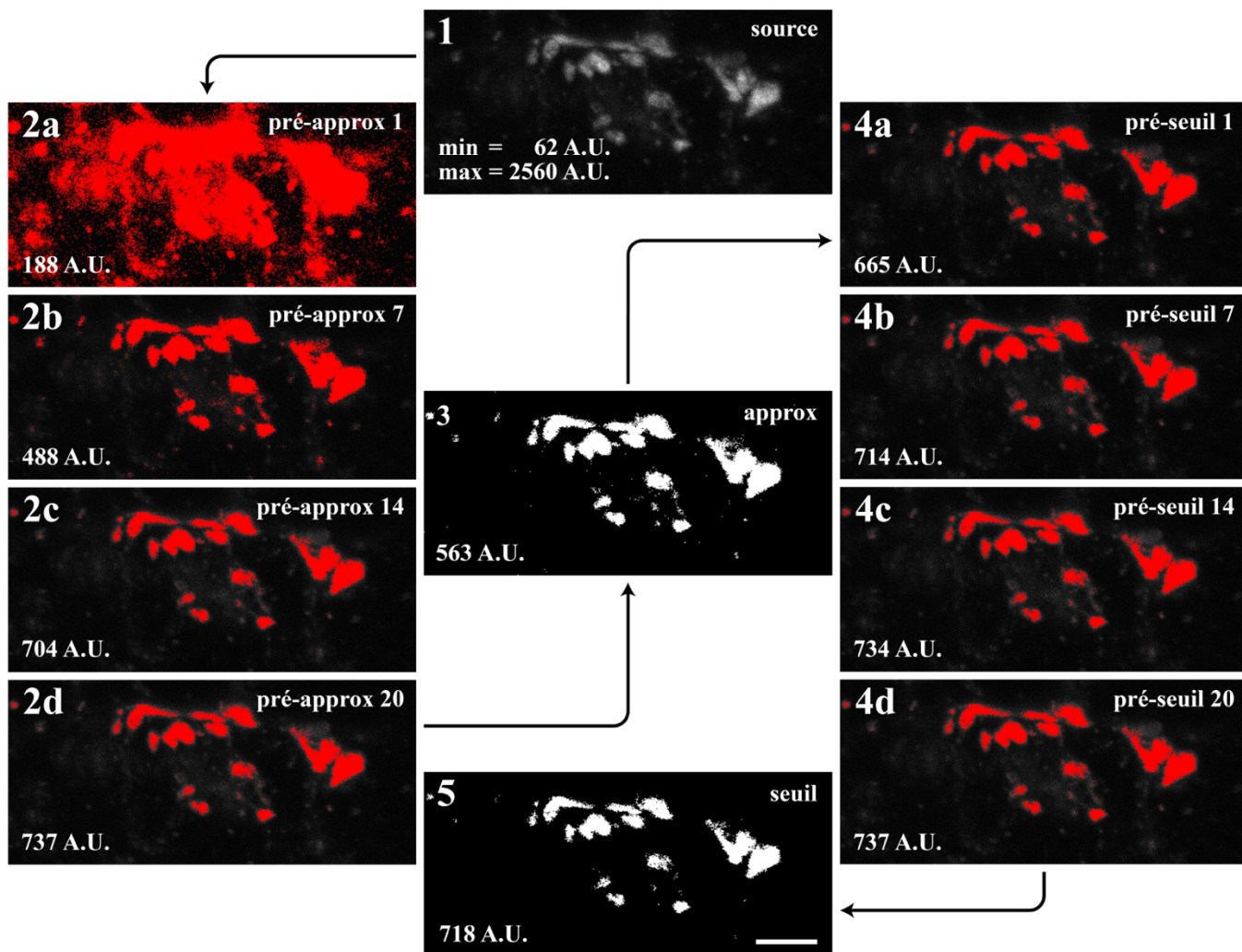


Figure 2.2. Algorithme de détermination des seuils d'intensité.

À partir de l'image source et de ses valeurs de pixel minimale et maximale (1 ; projection d'intensité maximale), l'algorithme détermine une première approximation du seuil (3). Cette approximation est la moyenne de 20 pré-approximations, dont certains exemples sont montrés (2a-d). À partir de cette approximation, le seuil est déterminé (5). Le seuil correspond à la moyenne du calcul de 20 pré-seuils (4a-d). Le calcul des pré-seuils est presque identique au calcul des pré-approximations, seule les valeurs de départ et de fin du calcul sont ajustées en fonction de l'approximation qui vient d'être déterminée et de la quantité de marquage non spécifique contenue dans l'image. Les intensités indiquées en unités arbitraires (A.U.) correspondent au résultat de l'étape du processus à laquelle elles sont rattachées. Échelle = 5  $\mu$ m.

### 2.4.2.3 Extraction des mesures de couverture territoriale

Une fois que les trois marquages étaient alignés et regroupés en un seul fichier, ce dernier était importé dans le logiciel Imaris (Bitplane) afin d'être visualisé et analysé. L'objectif principal était, dans un premier temps, de déterminer l'aire totale de la structure postsynaptique. Dans un deuxième temps, il était nécessaire de déterminer la couverture territoriale de chacune des structures présynaptiques.

#### 2.4.2.3.1 Visualisation d'une pile d'images

La première caractéristique intéressante d'Imaris est son moteur de rendu 3D permettant la visualisation des piles d'images. Les métadonnées de la pile sont utilisées afin d'espacer adéquatement le centre de chaque *voxel*, dont la valeur d'intensité est connue. Le moteur de rendu effectue une interpolation trilineaire afin de combler les espaces entre les points connus, ce qui permet un rendu fluide et continu des structures fluorescentes. Les outils de navigation permettent de changer l'orientation et le grossissement du rendu afin de mettre en évidence les structures d'intérêt.

#### 2.4.2.3.2 Création des isosurfaces

Afin d'effectuer les analyses quantitatives permettant de déterminer la couverture territoriale de chacune des terminaisons, il était nécessaire de délimiter et localiser chacune des structures fluorescentes. Imaris possède un outil permettant d'effectuer cette tâche en créant des *isosurfaces*. Il s'agit de surfaces numériques, spécifiques à chacun des marquages, qui englobent tous les *voxels* dont la valeur de fluorescence est supérieure à celle spécifiée par l'utilisateur. Il est donc possible d'identifier chacune des structures d'intérêt en tenant compte du seuil de marquage spécifique déterminé dans une étape précédente (2.4.2.2).

#### 2.4.2.3.3 Propriétés des isosurfaces

Les *isosurfaces* reconstruites à l'aide d'Imaris sont composées de sommets et d'arrêtes organisés en maillages triangulaires. Cette organisation permet de facilement calculer l'aire de chacune des surfaces. De plus, puisque la localisation de chacun des sommets d'une surface est connue, il est aisé de déterminer la distance séparant les différentes structures.

#### 2.4.2.3.4 Traitement de l'isosurface postsynaptique

Une particularité de l'isosurface postsynaptique est qu'elle englobe totalement la fluorescence de la structure associée. Puisqu'elle l'englobe, l'isosurface aura une demi-surface complètement sur le dessus de la structure et une autre complètement en dessous. Ainsi, l'aire calculée sera environ du double de celle de la structure associée. Il est donc nécessaire d'isoler la demi-surface supérieure et d'éliminer la demi-surface inférieure.

Imaris ne contient pas d'outils préimplantés permettant d'effectuer ce genre de traitement. Par contre, le logiciel possède un pont permettant d'échanger des données avec MATLAB (MathWorks). Ainsi, il est possible d'envoyer une structure de données contenant la définition d'une isosurface à un plugiciel MATLAB. Celui-ci peut ensuite effectuer un traitement sur ces données et elles peuvent ensuite être renvoyées à Imaris afin que ce dernier puisse créer de nouvelles isosurfaces.

Afin de séparer l'isosurface en ses deux parties, soit la partie supérieure et la partie inférieure, il est d'abord nécessaire de délimiter manuellement le périmètre où la séparation doit avoir lieu. Imaris contient un outil nommé *Points* qui permet de placer précisément des points qui interceptent une isosurface. Ainsi, des points sont manuellement placés à intervalles réguliers sur le pourtour de l'isosurface postsynaptique à la manière d'une ceinture.

Ensuite, deux structures de données sont envoyées à un plugiciel MATLAB, soit celle contenant la position de tous les points de ceinture et celle contenant la définition de l'isosurface. Voici un aperçu du fonctionnement du plugiciel :

- i. Identification d'une série de sommets consécutifs formant un périmètre de séparation des surfaces inférieure et supérieure.
  - i. Pour chacun des points de la ceinture, déterminer le sommet de l'isosurface le plus rapproché.
  - ii. Pour chacun des sommets identifiés, calculer le chemin le plus court en termes de nombre de sauts jusqu'au sommet suivant dans la liste

et enregistrer la liste des sommets traversés. Utilisation de l'algorithme de Dijkstra (1959) pour le calcul du chemin le plus court.

2. Séparation des triangles de l'*isosurface* en deux populations délimitées par le périmètre établi en (1).
  - i. Créer une nouvelle structure de données pour contenir des listes des triangles décrivant une nouvelle surface.
  - ii. Choisir un sommet au hasard sur l'*isosurface* qui ne fait pas partie du périmètre.
  - iii. Trouver tous les triangles associés à ce sommet et les ajouter à la structure de donnée créée.
  - iv. Pour chacun de ces triangles, identifier chacun des sommets toujours inexplorés. Pour chaque sommet ne faisant pas partie du périmètre, effectuer les opérations en (2.iii).
  - v. Quand tous les sommets contigus ont été explorés, la première surface est reconstruite. Pour la seconde surface, recommencer les opérations en (2.i). Une fois rendu à (2.ii), recommencer jusqu'à ce qu'un sommet inexploré soit sélectionné.

Finalement, les deux nouvelles structures de données sont retransmises à Imaris et ce dernier crée deux nouvelles *isosurfaces*, qui correspondent aux demi-surfaces inférieure et supérieure de la structure postsynaptique. La surface inférieure peut être supprimée, alors que la surface supérieure sera utilisée pour toutes les étapes subséquentes de l'analyse.

#### 2.4.2.3.5 Extraction de la couverture respective de chaque terminaison

L'*isosurface* créée dans la section précédente était utilisée comme référence postsynaptique afin de déterminer la couverture territoriale de chacune des terminaisons. L'algorithme fonctionnait en déterminant si, pour chacun des sommets de l'*isosurface* postsynaptique, il était possible de détecter une couverture par l'une des terminaisons.

- i. Transmettre à un plugiciel MATLAB les structures de données suivantes :
  - i. L'*isosurface* postsynaptique.
  - ii. Un masque binaire de l'état de chacun des voxels pour chacune des *isosurfaces* associées aux marquages des terminaisons.
    - a. Il s'agit d'une structure de données à 3-dimensions de taille  $i, j, k$ , où ces trois indices correspondent respectivement au nombre de pixels de l'image sous-jacente en  $x, y$  et  $z$ .
    - b. Chaque élément de cette structure est une donnée binaire représentant si le voxel est à l'extérieur (o) ou à l'intérieur (1) de l'*isosurface*.
2. Pour chacun des sommets de l'*isosurface* postsynaptique, déterminer s'il est considéré comme couvert par chacune des terminaisons.
  - i. Un sommet était considéré comme étant couvert par une terminaison si l'*isosurface* associée à cette terminaison se trouvait à l'intérieur d'un certain rayon ( $r$ ) du sommet en question. En pratique, il s'agissait de déterminer si un voxel positif (1) se trouvait à l'intérieur du rayon. Ce rayon a été déterminé de manière empirique en utilisant des échantillons contrôles ( $r = 250$  nm).

3. Créer trois nouvelles *isosurfaces* :
  - i. Une première constituée de tous les triangles de l'*isosurface* postsynaptique dont les trois sommets étaient couverts par les deux terminaisons. Il s'agit de la couverture territoriale de chevauchement des deux terminaisons.
  - ii. Une *isosurface* pour la couverture de chacune des deux terminaisons. Chacune de ces *isosurfaces* était constituée de tous les triangles de l'*isosurface* postsynaptique dont seule la terminaison associée couvrait les trois sommets.
  
4. Déterminer la couverture territoriale de chacune des terminaisons en calculant l'aire de l'ensemble des triangles composant sa surface associée. Lors de l'analyse des résultats, l'aire totale de la surface de chevauchement redistribué également entre les deux terminaisons. De plus, la couverture territoriale d'une terminaison ( $term_i$ ) était normalisée en fonction de l'aire postsynaptique totale et est présentée sous forme de pourcentage de couverture postsynaptique selon l'équation suivante :

$$Couverture\ term_1 = \frac{aire_{surface\ term_1} + \left(\frac{aire_{surface\ chevauchement}}{2}\right)}{aire_{surface\ postsynaptique}} \times 100$$

## **2.5 Analyses statistiques**

Toutes les informations qui ne sont pas présentés ici se retrouvent dans le texte aux endroits pertinents.

### **2.5.1 Comparaison du niveau de facilitation**

Pour comparer le niveau de facilitation entre les terminaisons (Figure 3.4b), le test bilatéral des rangs signés de Wilcoxon a été utilisé. Il s'agit d'un test non paramétrique pour échantillons appariés qui peut être utilisé pour remplacer un test de Student pour échantillons appariés quand les différences entre les valeurs appariées ne sont pas présumées être constantes.



### 3 Résultats

Comme nous l'avons vu précédemment, la force synaptique relative des terminaisons en compétition à la JNM en développement est un déterminant majeur de l'issue du processus d'élimination. À son tour, la force synaptique d'une terminaison est directement dépendante du nombre de sites de relâche et de leur probabilité de relâche moyenne.

Ce projet de recherche vise essentiellement à répondre à deux séries de questions. La première série de questions a pour objectif de développer des outils expérimentaux et portent sur la relation entre la facilitation ( $F$ ) et la la probabilité de relâche moyenne ( $\bar{p}$ ) d'une terminaison, ainsi que sur les informations auxquelles une meilleure compréhension de cette relation permettrait d'accéder. La deuxième série de questions vise à mieux comprendre certains aspects du processus de compétition et d'élimination synaptique et portent sur la relation entre la régulation de la  $\bar{p}$  et de la  $t$  et leur importance relative dans la détermination des différences de  $m$ .

Les résultats seront présentés de manière à d'abord répondre aux questions nous permettant de développer de nouveaux outils. Nous verrons ensuite comment ces outils nous permettent d'apporter des réponses à la deuxième série de questions.

#### 3.1 Enregistrement des propriétés synaptiques à une JNM bi-innervée

D'abord, nous avons entrepris de mesurer par électrophysiologie certaines propriétés synaptiques des terminaisons en compétition à des JNM de souris en développement. Chez cette espèce, les animaux âgés de 7-8 jours postnatals (P7-8) montrent le plus fort taux de JNM bi-innervées (Darabid et al., 2013; Darabid et al., 2018). L'électrophysiologie permet de mesurer le contenu quantique ( $m$ ) et la  $F$  d'une terminaison. Notre premier objectif était donc de valider notre méthode en s'assurant que ces deux propriétés, aux JNM que nous étudions, étaient similaires à ce qui a été publié précédemment.

Pour ce faire, nous avons sélectionné le muscle soléaire. Ce muscle est relativement accessible, peut être isolée en minimisant les dommages à ses fibres et les MN qui l'innervent sortent de la moelle épinière par des nerfs spinaux distincts. Cette dernière particularité est extrêmement importante, car un prérequis pour être en mesure de distinguer les propriétés synaptiques de deux terminaisons innervant une même JNM est de pouvoir observer des réponses évoquées distinctes pour chacune d'elles. Ainsi, en isolant ces nerfs spinaux les uns des autres afin de pouvoir les stimuler électriquement de manière indépendante, il devient possible d'étudier les propriétés synaptiques de deux terminaisons, dont l'axone emprunte des nerfs spinaux distincts, à la même JNM bi-innervée (voir la sous-section 2.1 de Méthodologie).

### 3.1.1 Détermination du contenu quantique

La première propriété que nous avons mesurée est le  $m$  des terminaisons en compétition. Comme nous l'avons vu,  $m = n \times \bar{p}$ . Cette propriété représente donc la probabilité de relâche cumulative de tous les sites de relâche d'une terminaison, ou, plus simplement, le nombre moyen de quanta de neurotransmetteurs qu'elle relâchera à chaque PA. Afin d'évaluer cette propriété de manière adéquate, et du fait que les enregistrements sont effectués dans la fibre musculaire cible, il est important de satisfaire à au moins deux exigences particulières.

D'abord, il est essentiel d'éviter l'influence des cNav musculaires qui amplifient la réponse postsynaptique. La technique principale utilisée historiquement afin de répondre à cette exigence est de diminuer la  $\bar{p}$  des terminaisons en modifiant leur environnement ionique, plus particulièrement la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Mg}^{2+}$  (Del Castillo et Engbaek, 1954; Del Castillo et Katz, 1954b; Del Castillo et Stark, 1952). En effet, ceci permet de réduire le  $m$  d'une terminaison de manière à ce que le seuil d'activation des cNav ne soit jamais atteint. Par contre, puisque la relation entre  $m$  et  $\bar{p}$  est linéaire, le ratio du  $m$  de deux terminaisons restera le même indépendamment de l'environnement ionique et leur force synaptique relative peut donc être déterminée de manière adéquate. Une autre technique digne de mention est l'utilisation de  $\mu$ -conotoxine, qui permet le blocage spécifique des cNav musculaires sans modifier le  $m$  (Tremblay et al., 2017). Par

contre, le coût de cette toxine rend cette option prohibitive, particulièrement dans les situations où la technique précédemment mentionnée est entièrement satisfaisante.

Ensuite, puisque l'objectif est de déterminer la réponse moyenne en termes de quanta/PA, il faut être en mesure de déterminer la réponse moyenne correspondant à un seul quanta. Dans une situation où une seule terminaison est présente à une JNM, cela ne représente pas un problème significatif. En effet, la réponse induite par un seul quanta peut être facilement estimée en mesurant la taille moyenne des PPMs, ces événements spontanés correspondant justement à la relâche non évoquée d'un quanta de neurotransmetteurs. Dans cette situation,  $m = \frac{\text{Amplitude moyenne des PPMs}}{\text{Amplitude moyenne des PPMs}}$ . Par contre, lorsque deux terminaisons sont présentes à une JNM, il est impossible de distinguer les PPMs de chacune d'elles. Il est donc nécessaire de déterminer le  $m$  d'une autre manière.

Dans un papier extrêmement élégant, Del Castillo et Katz (1954b) ont élaboré une manière d'y arriver. D'abord, ils ont montré que la  $\bar{p}$  d'une terminaison peut être diminuée de manière à ce qu'un pourcentage significatif des potentiels d'action n'induisent aucun PPM. Dans ces conditions, montrent-ils, le nombre de quanta participant aux PPM d'une série de plusieurs observations est distribué de la manière décrite par la loi de Poisson (Poisson, 1837, p. 207). Le seul paramètre nécessaire afin de définir une distribution de Poisson est le taux moyen d'événements, nommé *lambda*, qui correspond justement à  $m$ , notre inconnu. Une autre particularité des distributions de Poisson est que toute probabilité non nulle d'*aucun événement* (soit, dans notre cas, l'échec d'un potentiel d'action à induire la relâche d'un quanta) correspond à un *lambda* déterminé. Ainsi, en comptant le nombre de fois où un échec se produit, il est possible de déterminer *lambda*, et donc  $m$ . Cette méthode est nommée la *méthode des échecs* et elle représente la meilleure façon de déterminer le  $m$  de deux terminaisons innervant la même JNM, puisqu'elle est uniquement dépendante de l'observation des événements évoqués.

### 3.1.1.1 La distribution des PPM observés est similaire à la celle attendue

Nous avons utilisé la méthode des échecs afin de déterminer le  $m$  des deux types de terminaisons, fortes et faibles, en compétition à 19 JNM bi-innervées provenant de 16

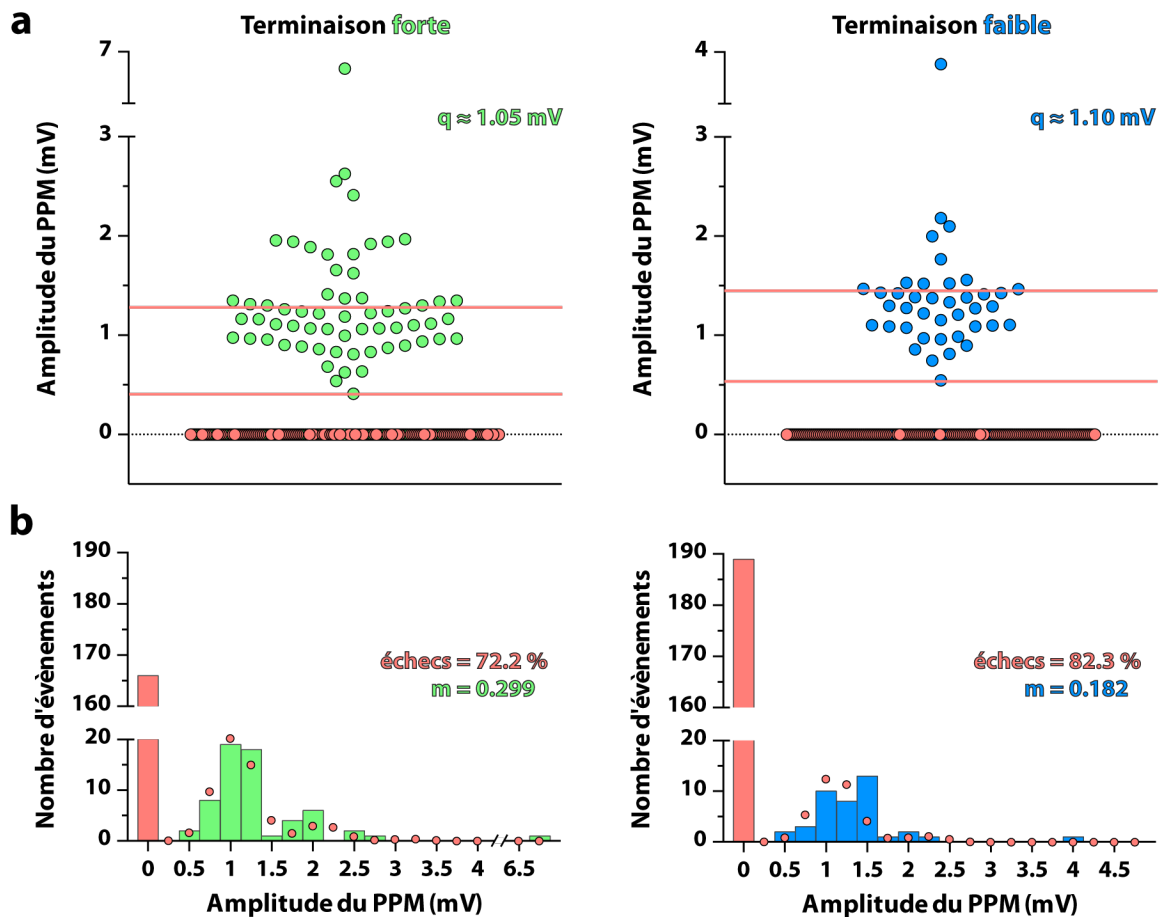


Figure 3.1. Détermination du contenu quantique des terminaisons en compétition.

a. Nuages de points montrant un exemple représentatif de l'amplitude des PPM individuels observés pour une terminaison forte (en vert, à gauche) et une terminaison faible (en bleu, à droite) à une JNM bi-innervée. Les points saumon représentent les échecs. Les deux barres saumon représentent les limites déterminées pour estimer l'amplitude moyenne approximative d'un quanta ( $q$ ). b. Histogrammes montrant la distribution des amplitudes de PPM montrés en (a). Dans chacun des histogrammes, la barre en saumon représente le nombre d'échecs observés et les points en saumon représentent le nombre d'événements attendus selon la distribution de Poisson adaptée (voir méthodologie) pour l'amplitude correspondante. Cette distribution attendue a été calculée selon le nombre d'échecs observés et la taille approximative d'un quanta ( $q$ ) déterminée en (a).

animaux différents. Les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  (1.0 mM) et  $\text{Mg}^{2+}$  (6.2 mM) ont été ajustées de manière à diminuer le  $\bar{p}$  des terminaisons suffisamment pour bloquer la contraction musculaire. Entre 180-240 stimulations ont été appliquées à chacune des terminaisons à une fréquence de 0.2 Hz et la terminaison montrant le  $m$  plus élevé était considéré comme forte. La Figure 3.1a montre un exemple représentatif de la distribution des amplitudes de PPM individuels enregistrées pour chaque type de terminaison. À partir

de cette distribution, nous avons estimé la taille moyenne d'un quanta en déterminant une limite supérieure approximative à l'amplitude d'une réponse unitaire et en calculant la taille moyenne des réponses inférieures à cette limite. La limite supérieure a été déterminée en tenant compte du fait qu'il peut être difficile de discerner une réponse provoquée par la relâche d'un seul quanta ayant une taille plus grande que la moyenne, d'une réponse produite par deux quanta ayant des tailles plus petites que la moyenne. À partir de l'estimation de l'amplitude d'un quanta et du nombre d'échecs observés (Figure 3.1b; barres en saumon), nous avons calculé la distribution de Poisson adaptée (voir méthodologie), correspondant au nombre de réponses attendues par groupes d'amplitudes (Figure 3.1b; points en saumon), pour la comparer à celle des réponses observées (Figure 3.1b; barres vertes et bleues).

Bien que la distribution attendue soit approximative, en raison du fait que l'amplitude moyenne réelle d'un quanta est inconnue, il est possible de voir que la distribution des réponses observées lui est très similaire. Ceci confirme que les terminaisons enregistrées ont un comportement synaptique normal et que le  $m$  calculé est représentatif.

### 3.1.1.2 Les jonctions étudiées se trouvent à des stades divers de compétition

Comme nous l'avons vu, une des particularités de l'élimination synaptique est qu'elle se produit de manière asynchrone aux différentes JNM d'un muscle. Ainsi, les terminaisons à des jonctions bi-innervées d'animaux P7-8 peuvent se retrouver à des stades de compétition très variés. D'un point de vue électrophysiologique, le stade de la compétition à une JNM bi-innervée est habituellement déterminé en calculant le ratio de force synaptique des terminaisons  $\left(\frac{m_{forte}}{m_{faible}}\right)$  (Colman et al., 1997; Kopp et al., 2000).

Si les JNM étudiées proviennent d'une population aléatoire non biaisée, elles devraient se retrouver à plusieurs stades distincts du processus de compétition. En effet, la Figure 3.2 montre que la terminaison la plus forte était de 1 à 79 fois plus forte que sa compétitrice. Ces données démontrent que notre échantillon provient

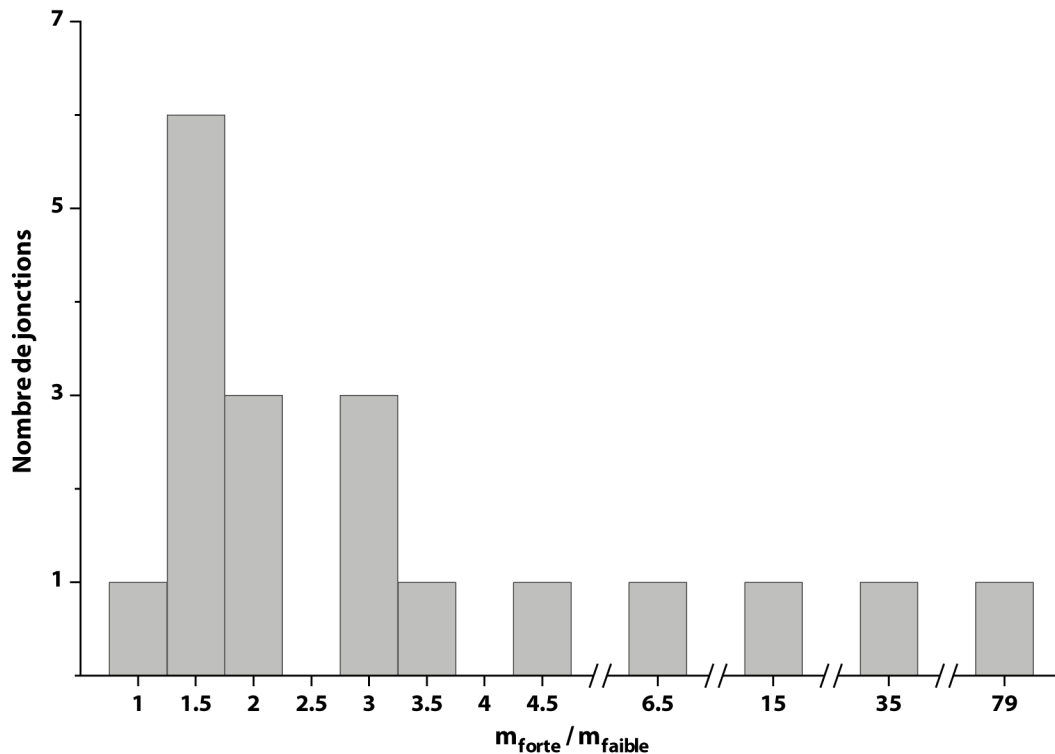


Figure 3.2. Les JNM étudiées se trouvaient à des stades de compétition divers.

Histogramme de la distribution des ratios de force synaptique des terminaisons en compétition aux JNM étudiées. Notez la diversité des ratios observés.

de JNM à divers stade du processus de compétition et suggèrent que nos données sont représentatives de la variabilité inhérente à ce phénomène.

### 3.1.2 Détermination de la facilitation

La deuxième propriété que nous avons mesurée est la facilitation ( $F$ ). Il a déjà été démontré que la  $F$  est inversement relié à la  $\bar{p}$ , et ce, aussi bien dans le CNS (Dobrunz et Stevens, 1997) qu'à la JNM (Kopp et al., 2000). Ainsi, il est intéressant de la mesurer afin d'extraire de l'information supplémentaire par rapport à la  $\bar{p}$  des terminaisons en compétition.

La  $F$  est mesurée en appliquant une stimulation appariée (Del Castillo et Katz, 1954c; Katz et Miledi, 1968), soit deux stimulations dans un intervalle de moins de  $\sim 50$  ms (Dobrunz et Stevens, 1997; Kopp et al., 2000; Magleby et Zengel, 1982). Ce protocole de



Figure 3.3. Les deux types de terminaisons montrent une  $F$  à la JNM bi-innervée.

Tracés représentatifs des réponses synaptiques induites par l'application d'une stimulation appariée (10 ms d'intervalle) à une terminaison **forte** et une terminaison **faible**. Dix tracés bruts sont montrés en gris foncé et leur moyenne est montrée en noire. Notez que les deux types de terminaisons montrent une facilitation ( $F$ ) de la réponse à la deuxième stimulation. Échelles : verticale = 1 mV; horizontale = 10 ms.

stimulation permet d'observer une augmentation de la taille moyenne de la réponse à la deuxième stimulation par rapport à celle de la première (Figure 3.3). La  $F$  serait due à la présence, lors de la deuxième stimulation, de  $\text{Ca}^{2+}$  résiduel ( $\text{Ca}_{\text{rés}}$ ) présent dans le microdomaine des zones actives. Ainsi, de manière intuitive, la  $F$  est diminuée à mesure que l'intervalle entre les stimulations appariées est augmenté.

### 3.1.2.1 Le niveau de facilitation des terminaisons faibles est plus élevé

Ainsi, nous avons utilisé la méthode des stimulations appariées, avec un intervalle de 10 ms, pour déterminer la  $F$  des deux types de terminaisons aux JNM étudiées. Il s'agit de l'intervalle le plus petit nous permettant de discerner clairement le PPM induit par chacune des stimulations et celui où, à la JNM de souris, la  $F$  est maximale (Kopp et al., 2000). Dans 14 cas sur 19, la  $F$  de la terminaison faible était supérieure à celle de la terminaison forte (Figure 3.4a). Dans les 5 autres cas, le fait que la terminaison forte ait une  $F$  supérieure à celle sa compétitrice ne semblait pas être relié à la valeur de  $m$  absolu respective d'aucune des deux terminaisons (Figure 3.4b). Dans l'ensemble (Figure 3.4c), les terminaisons faibles avaient une  $F$  supérieure à celle des terminaisons fortes ( $p = 0.03$ ; Test des rangs signés de Wilcoxon, bilatéral). Ainsi, ces données sont similaires à celles déjà publiées sur le sujet et confirment la relation inverse entre la  $F$  et le  $m$  des terminaisons aux JNM étudiées (Darabid et al., 2013; Darabid et al., 2018; Kopp et al., 2000).

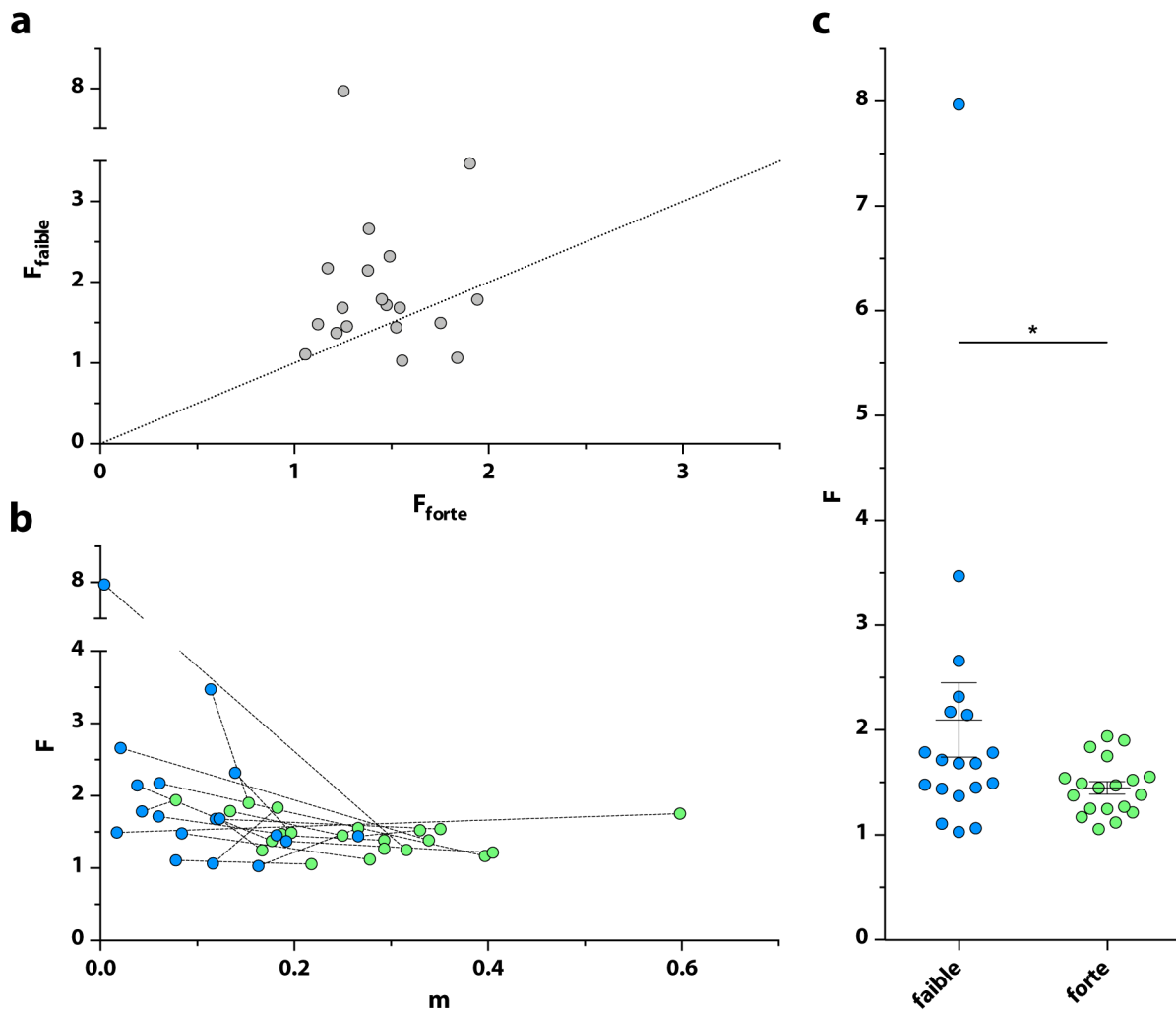


Figure 3.4. Le niveau de facilitation des terminaisons faibles est plus élevé.

a. Nuage de points montrant la relation entre la  $F$  des terminaisons faibles et fortes. Chaque point représente une JNM. Dans 14 cas sur 19, la terminaison faible à une  $F$  plus élevée que la terminaison forte, tel que démontré par la localisation du point au-dessus de la ligne pointillée ayant une pente de 1. b. Nuage de points montrant la relation entre la  $F$  et le  $m$  des terminaisons fortes (en vert) et faibles (en bleu). Les terminaisons à une même JNM sont reliées par une ligne pointillée. Notez la relation inverse entre  $F$  et  $m$  dans 14 cas sur 19 et l'absence apparente de corrélation entre le fait qu'une terminaison forte ait une  $F$  supérieure à sa compétitrice et leur niveau de  $m$  absolu respectif. c. En moyenne, la  $F$  des terminaisons faibles étaient plus élevée que celle des terminaisons fortes ( $p = 0.03$ ; Test des rangs signés de Wilcoxon, bilatéral).



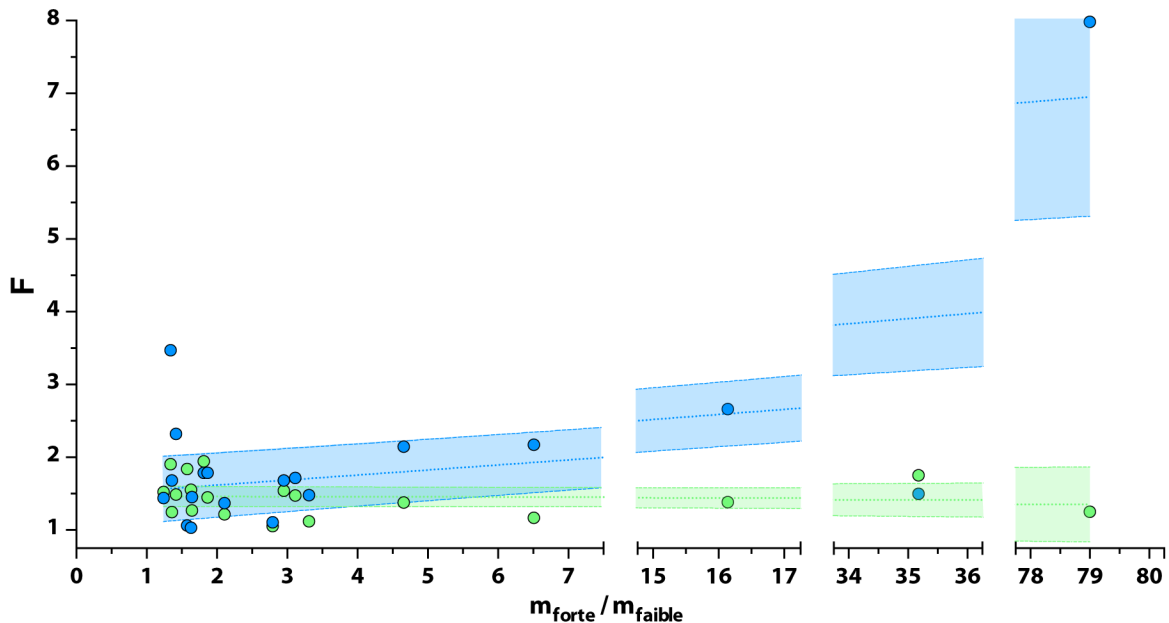


Figure 3.5. Les différences de facilitation augmentent conjointement aux ratios de force synaptique.

Nuage de points montrant que la  $F$  des terminaisons faibles (en **bleu**) à tendance à augmenter progressivement à mesure que le ratio de force des terminaisons augmente, contrairement à celle des terminaisons fortes (en **vert**). La droite de régression des terminaisons faibles est montrée en **bleu** et celle des terminaisons fortes est montrée en **vert**. L'espace coloré montré de chaque côté des droites de régression représentent l'intervalle de confiance à 95 %. Les pentes des deux droites de régression sont significativement différentes ( $p < 0.0001$ , Test F de la somme des carrés *Extra*,  $F = 39.51$ ).

### 3.1.2.2 Les différences de facilitation augmentent conjointement aux ratios de force synaptique

Bien que nous ayons observé que les terminaisons faibles ont une  $F$  généralement plus élevée que les terminaisons fortes, Kopp et al. (2000) ont montré que la différence entre leur  $F$  respective augmentait conjointement à l'augmentation de leur ratio de force ( $\frac{m_{forte}}{m_{faible}}$ ). Nous avons voulu confirmer cette observation. De fait, la  $F$  des terminaisons faibles étudiées avait tendance à augmenter à mesure que le ratio de force des terminaisons augmentait (pente de la droite de régression  $> 0$ ,  $p < 0.0001$ , Test F de la somme des carrés *Extra*,  $F = 41.72$ ) et les pentes des droites de régression expliquant la progression de la  $F$  des deux types de terminaisons étaient significativement différentes ( $p < 0.0001$ ; Test F de la somme des carrés *Extra*,  $F = 39.51$ ). Ainsi, ces données

confirment, encore une fois, que nos observations sont en accord avec les données précédemment publiées et que, de manière générale, le ratio de  $F$  des terminaisons en compétition, et donc possiblement leur ratio de  $\bar{p}$ , a tendance à augmenter à mesure que le processus de compétition synaptique progresse.

## 3.2 La relation entre la facilitation et la probabilité de relâche

Jusqu'ici, nous avons étudié la relation entre la  $F$  des terminaisons et leur rapport de force. L'intérêt principal de mesurer la  $F$  est en raison de sa relation inverse avec la  $\bar{p}$ , nous espérons ainsi obtenir plus d'information sur cette dernière. Par contre, la manière dont ces deux propriétés sont reliées demeure mal définie à la JNM et l'interprétation des différences de  $F$  entre deux terminaisons en compétition demeure donc risquée. Être en mesure de clarifier cette relation pourrait donc potentiellement ouvrir la porte à mettre sur pied des expériences permettant de mieux sonder la régulation de la  $\bar{p}$ , l'impact de celle-ci sur l'élimination synaptique ainsi que sa relation avec la régulation de la  $t$ .

Cette section présente donc nos résultats concernant l'établissement d'une relation plus précise entre la  $F$  et la  $\bar{p}$  pour les terminaisons à la JNM en développement.

### 3.2.1 Considérations particulières

La relation entre la  $F$  et la  $\bar{p}$  a été étudiée de manière détaillée par Dobrunz et Stevens (1997) à des synapses de l'hippocampe ne possédant qu'un seul site de relâche ( $n = 1$ ). Dans ce contexte, la  $\bar{p}$  et le  $m$  sont équivalents. Les auteurs ont enregistré la  $\bar{p}$  et la  $F$  de plusieurs de ces synapses et ont réussi à développer une équation élégante leur permettant d'expliquer la relation entre ces paramètres de manière extrêmement satisfaisante. L'équation est la suivante :

$$F = \frac{1 - (1 - \bar{p})^\varphi}{\bar{p}}$$

où  $\varphi$  est un facteur de facilitation. Cette équation repose sur le concept que la facilitation est une augmentation temporaire de la  $\bar{p}$ . Elle est donc construite à la manière d'un ratio entre la  $\bar{p}$  lors de la deuxième impulsion d'une stimulation appariée (terme du haut) sur la  $\bar{p}$  lors de la première impulsion (terme du bas). Le terme du haut, malgré les

apparences, est assez simple à comprendre. D’abord, si l’on enlève le terme  $\varphi$ , la  $F$  sera de 1 (donc nulle) peu importe la  $\bar{p}$ . La  $F$  est donc complètement déterminée par  $\varphi$ . Ensuite, il est assez aisé d’observer que  $\varphi$  possède une relation positive avec  $F$ . Ainsi, l’augmentation de  $\varphi$  mènera à une augmentation de  $F$ .

Bien que cette forme générale de l’équation semble adéquate, il est nécessaire de mieux définir  $\varphi$ . D’abord, en raison de la relation entre le  $\text{Ca}_{\text{rés}}$  et la  $F$ , les auteurs proposent une relation entre  $\varphi$  et une puissance de ce  $\text{Ca}_{\text{rés}}$ . Ils émettent donc l’hypothèse que le  $\text{Ca}_{\text{rés}} \sim \bar{p}^\beta$ , où  $\beta$  est une constante qui varie en fonction du temps à mesure que le  $\text{Ca}_{\text{rés}}$  diminue, et propose l’équation

$$\varphi = u\bar{p}^\beta$$

où  $u$  est une fonction qui décrit la relation entre  $\varphi$  et  $\bar{p}^\beta$ , et qui serait dépendante de l’intervalle entre les deux stimulations appariées. Bien que  $u$  et  $\beta$  puissent sembler similaires en raison de leur dépendance au temps, il est intéressant de noter que  $u$  est déterminée de manière externe par le contexte expérimental alors que  $\beta$  serait une propriété intrinsèque des terminaisons relevant de la manière dont elles gèrent le  $\text{Ca}_{\text{rés}}$ . Ces deux paramètres varient donc vraisemblablement de manière différente. Ensemble, ces propositions permettent de poser l’équation

$$F = \frac{1-(1-\bar{p})^{u\bar{p}^\beta}}{\bar{p}}. \quad \text{équation 1}$$

Cette équation (équation de Dobrunz et Stevens) stipule que la facilitation serait dépendante de la  $\bar{p}$ , ainsi que de deux paramètres, dont l’un est dépendant de la gestion du  $\text{Ca}_{\text{rés}}$  et l’autre de l’intervalle entre les deux stimulations appariées.

### 3.2.2 Adaptation de l’équation de Dobrunz et Stevens

Considérant que les paramètres définissant l’équation de Dobrunz et Stevens (1997) (équation 1) dépendent de propriétés qui, à priori, sont applicables aussi à la JNM, nous avons tenté de l’adapter. La première difficulté est que, contrairement aux terminaisons de l’hippocampe, les terminaisons à une JNM possèdent plusieurs sites de

relâche ( $n > 1$ ). Cela implique que la  $F$  mesurée est reliée à la probabilité de relâche cumulative de la terminaison, soit son  $m$ , et non sa  $\bar{p}$ .

Par contre, nous savons aussi que la relation entre la  $\bar{p}$  et le  $m$  d'une terminaison est linéaire. Ainsi, lorsque les conditions ioniques diminuent la  $\bar{p}$  d'une terminaison de manière à ce que son  $m = 1$ , l'échelle de la courbe décrite par l'équation 1 peut être alignée à celle de  $m$  de manière à ce que  $p_n = m$  (**courbe en saumon**, Figure 3.6). Notez ici le changement de notation pour la probabilité de relâche. Suite à cette normalisation, et comme nous venons de le noter, la probabilité qui est déterminée par la nouvelle échelle n'est plus la probabilité de relâche moyenne ( $\bar{p}$ ) de chacun des sites de relâche, mais bien la probabilité de relâche cumulative normalisée selon  $n$  ( $p_n$ ) de tous les sites de relâche. Pour l'instant,  $p_n$  et  $m$  sont équivalents. Mais nous verrons bientôt qu'une modification à l'équation 1 fera en sorte que ce ne sera pas toujours le cas. Pour l'instant, l'équation 1 prend la forme

$$F = \frac{1 - (1 - p_n)^{np_n^\beta}}{p_n} \quad \text{équation 2}$$

Ainsi, afin de comprendre cette normalisation, imaginons une terminaison, dénotée par un  $_1$ , pour laquelle  $m_1 = 1$  et  $F_1 = 1$  (**point en saumon et à droite**, Figure 3.6). Puisque l'échelle de  $m_1$  et celle de la  $p_n$  sont équivalente pour le moment, la terminaison aura une  $p_{n1} = 1$ . Si cette terminaison conserve un  $n$  ( $n_1$ ) constant, mais que  $p_{n1}$ , et donc  $m_1$ , diminuent à 0.4, la courbe décrite par l'équation 2 prédit que cette terminaison aura maintenant une  $F_1 = 1.5$  (**point en saumon et à gauche**, Figure 3.6). Bien que les paramètres de l'équation ne soient pas encore ajustés afin de prendre en compte les particularités de notre protocole expérimental, ceci décrit d'une façon générale la manière dont la relation entre  $m_1$  et  $F_1$  devrait varier dans une circonstance semblable.

Maintenant, imaginons une seconde terminaison, dénotée par un  $_2$ , qui, dans les mêmes conditions expérimentales, a un  $m_2 = 0.1$ . Si cette terminaison a aussi  $F_2 = F_1 = 1.5$  (**point en bleu**, Figure 3.6), et donc une  $p_n$  équivalente à la première, cela veut dire qu'elle à quatre fois moins de  $n$  que la première terminaison. En effet, à  $p_n$  égale,

$$n_2 = \frac{n_1}{4}, \text{ puisque } \frac{m_1}{m_2} = \frac{0.4}{0.1} = 4.$$

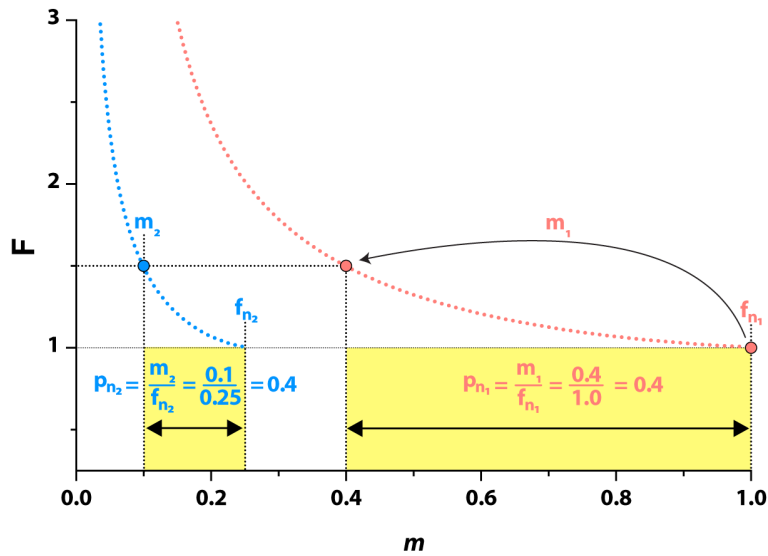


Figure 3.6. L'équation de Dobrunz et Stevens peut être normaliser selon  $n$ .

Diagramme montrant la relation entre deux courbes générées à partir de l'équation de Dobrunz et Stevens (équation 1) avec les paramètres simplifiés  $u = 1$  et  $\beta = -0.5$ . La courbe **bleue** possède les mêmes paramètres que la courbe **saumon**, à la différence qu'elle a été normalisée en utilisant le facteur de normalisation selon  $n$ ,  $f_{n2} = 0.25$  (détermine le début d'une courbe, soit le  $m$  où elle croise  $F = 1$ ). Notez que les points se trouvant à  $F = 1.5$  possèdent une  $p_n$  équivalente. Cela découle de la propriété de mise à l'échelle de ces courbes. En effet, un même ratio (flèches et boîtes jaunes) entre le  $m$  d'un point et le  $f_n$  de sa courbe associée équivaut toujours au même  $p_n$ . De plus, un même  $p_n$  est toujours associé à une même  $F$ .

Comment peut-on, dès lors, modifier l'équation 2 afin qu'elle décrive la variation de la relation entre  $m_2$  et  $F_2$  pour la deuxième terminaison lorsque son  $p_n$  change, mais que  $n_2$  reste constant, et ce, en tenant compte de l'échelle de  $m_2$ ?

Puisque la relation entre  $m$ ,  $n$  et  $\bar{p}$  est linéaire, la  $p_n$  peut être mise à l'échelle sur des  $m$  différents de 1. La solution est donc d'intégrer à l'équation 2 un facteur de normalisation selon  $n$  ( $f_n$ ), sous la forme  $f_{n2} = \frac{n_2}{n_1} \times f_{n1} = 0.25$ . Ici,  $f_{n1} = 1$  puisque la première courbe est alignée à  $m = 1$ . Le rôle de  $f_{n2}$  peut être visualisé en regardant la courbe du point bleu de la Figure 3.6. Ce paramètre détermine le point de départ de cette courbe (0.25). Ainsi, la probabilité de relâche cumulative normalisée selon  $n$  de la deuxième terminaison  $p_{n2} = \frac{m_2}{f_{n2}} = \frac{0.1}{0.25} = 0.4 = p_{n1}$ . La courbe bleue peut être décrite selon l'équation

$$F_2 = \frac{1-(1-p_{n2})^u p_{n2}^\beta}{p_{n2}} = \frac{1-(1-\frac{m_2}{f_{n2}})^u \frac{m_2^\beta}{f_{n2}^\beta}}{\frac{m_2}{f_{n2}}} = \frac{1-(1-\frac{m_2}{0.25})^u \frac{m_2^\beta}{0.25^\beta}}{\frac{m_2}{0.25}}.$$

Il est important de mettre l'emphasis sur la relation qui unit les courbes bleue et rouge à la Figure 3.6. La  $p_n$  d'un point est toujours égale au ratio entre son  $m$  et le  $f_n$  de sa courbe associée (flèches **noires** et boîtes **jaunes**, Figure 3.6). De plus, deux courbes croiseront toujours  $F$  au même point à des ratios  $\frac{m_{point}}{f_n}$  égal. Ainsi, le ratio de  $n$  entre les points sur deux courbes correspond au ratio du  $f_n$  entre ces courbes. Pour comprendre le rôle du terme  $f_{n1}$  dans la définition de  $f_{n2}$ , imaginons que la courbe de départ (en saumon) soit alignée à  $m = 0.5$  au lieu de  $m = 1$ . Dans cette condition,  $m_1$  serait réduit de moitié, ainsi  $n_2 = \frac{n_1}{2}$ , puisque  $\frac{m_1}{m_2} = \frac{0.2}{0.1}$ . Si on tentait de calculer  $f_{n2} = \frac{n_2}{n_1} = 0.5$ , la courbe bleue serait alignée au même endroit que la courbe saumon. Comme nous l'avons mentionné, le  $f_n$  d'une courbe correspond au  $m$  auquel elle est alignée. Ainsi,  $f_{n1} = 0.5$ . On intègre donc ce terme et  $f_{n2} = \frac{n_2}{n_1} \times f_{n1} = 0.5 \times 0.5 = 0.25$ . Il est ainsi possible de créer une nouvelle courbe à partir de n'importe quelle autre courbe, du moment où le  $f_n$  de la courbe source est connue.

Cette section avait pour objectif principal de démontrer l'applicabilité théorique de l'équation de Dobrunz et Stevens à l'étude de terminaisons ayant un  $n > 1$ . Nous avons montré que cette possibilité émanait de la relation linéaire entre  $m$ ,  $\bar{p}$  et  $n$ . En effet, la  $p_n$  de deux terminaisons peut être comparée en normalisant selon leur  $n$  relatif, et le ratio de leur  $p_n$  est proportionnel au ratio de leur  $\bar{p}$ .

### 3.2.3 Détermination de la relation entre la facilitation et la probabilité de relâche aux JNM étudiées

La section précédente nous a permis de développer une meilleur compréhension de la relation entre la  $F$  et la  $\bar{p}$  à la JNM, où le  $n > 1$ . Dans la présente section, nous verrons comment cette compréhension nous permet de mettre sur pied une méthode afin d'évaluer la  $p_n$  des terminaisons en compétition aux JNM en développement enregistrées lors de cette étude.

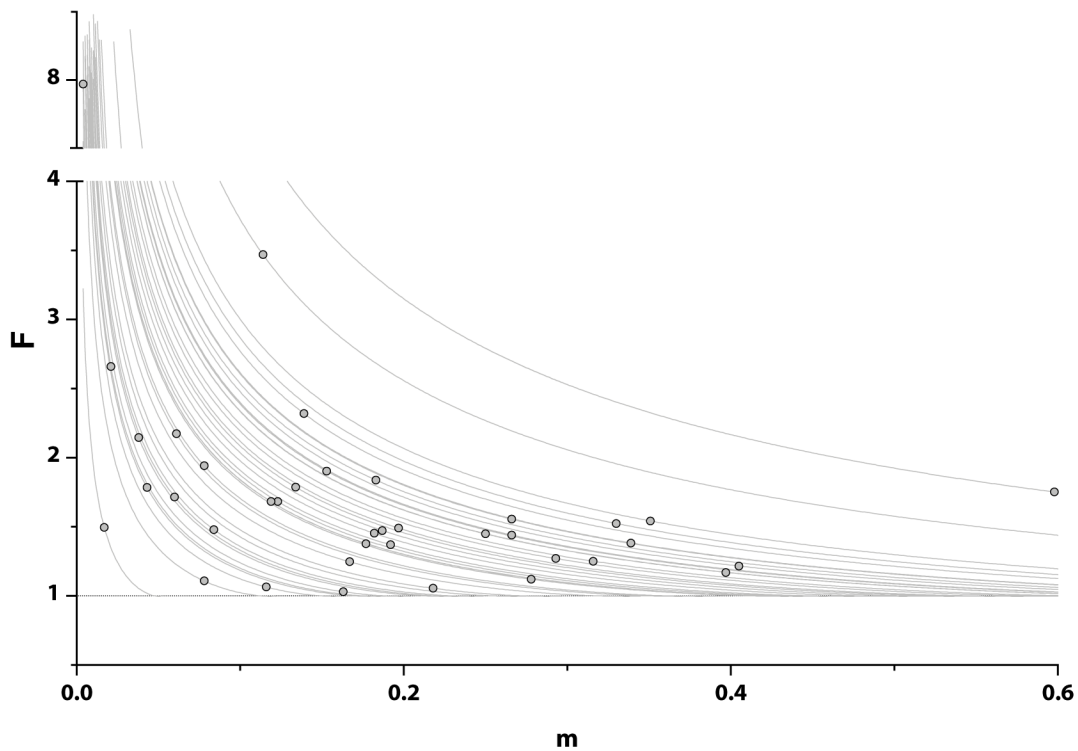


Figure 3.7. Les courbes des différents points sont déplacées le long de l'abscisse proportionnellement à leur  $n$  relatif.

La courbe décrite par l'équation de Dobrunz et Stevens associée à chacune des terminaisons que nous avons étudiées sera déplacée la long de l'axe des abscisse dans une proportion équivalente à son  $n$  relatif.

### 3.2.3.1 Ajustement de l'équation de Dobrunz et Stevens

Le modèle théorique que nous venons de présenter semble posséder les attributs nécessaires afin d'expliquer adéquatement la relation entre la  $F$  et la  $\bar{p}$  aux terminaisons de JNM. Par contre, les paramètres  $u$  et  $\beta$  déterminés par Dobrunz et Stevens (1997) étaient adaptés à leurs conditions expérimentales. Nous avons donc mis au point une manière d'ajuster ces paramètres à nos propres données.

Idéalement, les paramètres devraient être ajustés en utilisant des terminaisons ayant un  $n$  identique. Cela permettrait de minimiser la variance due au fait que, bien que toutes les courbes partagent les mêmes paramètres  $u$  et  $\beta$ , ces mêmes courbes seront déplacées horizontalement sur l'axe de  $p_n$  (Figure 3.7) dans une proportion dépendante du ratio de  $n$  entre les terminaisons. Afin de minimiser ce problème et de maximiser le

nombre de terminaisons utilisables dans l'analyse, nous avons gardé les terminaisons séparées selon leur groupe de force respectif (fortes et faibles). Cela permet de réduire la variance induite par le fait que les JNM ont des  $n$  variables dans chacune des populations servant à ajuster les paramètres décrivant les courbes.

Nous avons utilisé une analyse de régression non linéaire pour ajuster les paramètres de l'équation à chacune des deux populations de terminaisons. L'équation utilisée pour cette analyse est la suivante :

$$F = \frac{1 - \left(1 - \frac{m}{f_n}\right) u \frac{m^\beta}{f_n}}{\frac{m}{f_n}}$$

où la probabilité de relâche cumulative *moyenne*, normalisée selon  $n$ , de chaque population de terminaisons  $\bar{p}_n = \frac{m}{f_n}$ . Le terme de droite de cette équation, qui doit être ajusté, contient une variable indépendante,  $m$ , et trois paramètres,  $f_n$ ,  $u$  et  $\beta$ . Afin de trouver une courbe uniforme pour les deux populations, les paramètres  $u$  et  $\beta$  de la solution finale ont été contraint d'être les mêmes pour les deux populations. Le paramètre  $f_n$  a été laissé libre de varier afin de permettre de tenir compte de la différence potentielle entre le  $n$  moyen des terminaisons de chaque population.

Afin de diminuer la variance introduite par des terminaisons ayant un  $n$  très différent de la moyenne de leur population, une méthode statistique a été utilisée afin d'identifier et d'éliminer les données aberrantes avec un coefficient de sensibilité relativement élevé ( $Q = 30\%$ ) (Motulsky et Brown, 2006). Les courbes résultantes de notre analyse sont présentées à la Figure 3.8a et les trois données aberrantes identifiées et éliminées sont désignées par un contour saumon.

Les valeurs de meilleur ajustement pour les différents paramètres sont  $u = 0.964$ ,  $\beta = -0.5117$ ,  $f_n$  (terminaisons faibles) = 0.266 et  $f_n$  (terminaisons fortes) = 0.598. L'hypothèse que la courbe ayant le meilleur ajustement pour les deux populations partage le même  $n$  a été rejetée ( $p = 0.0002$ , Test F de la somme des carrés *Extra*,  $F = 18.09$ ), ce qui suggère que le  $n$  moyen des terminaisons faibles est inférieure à celui des



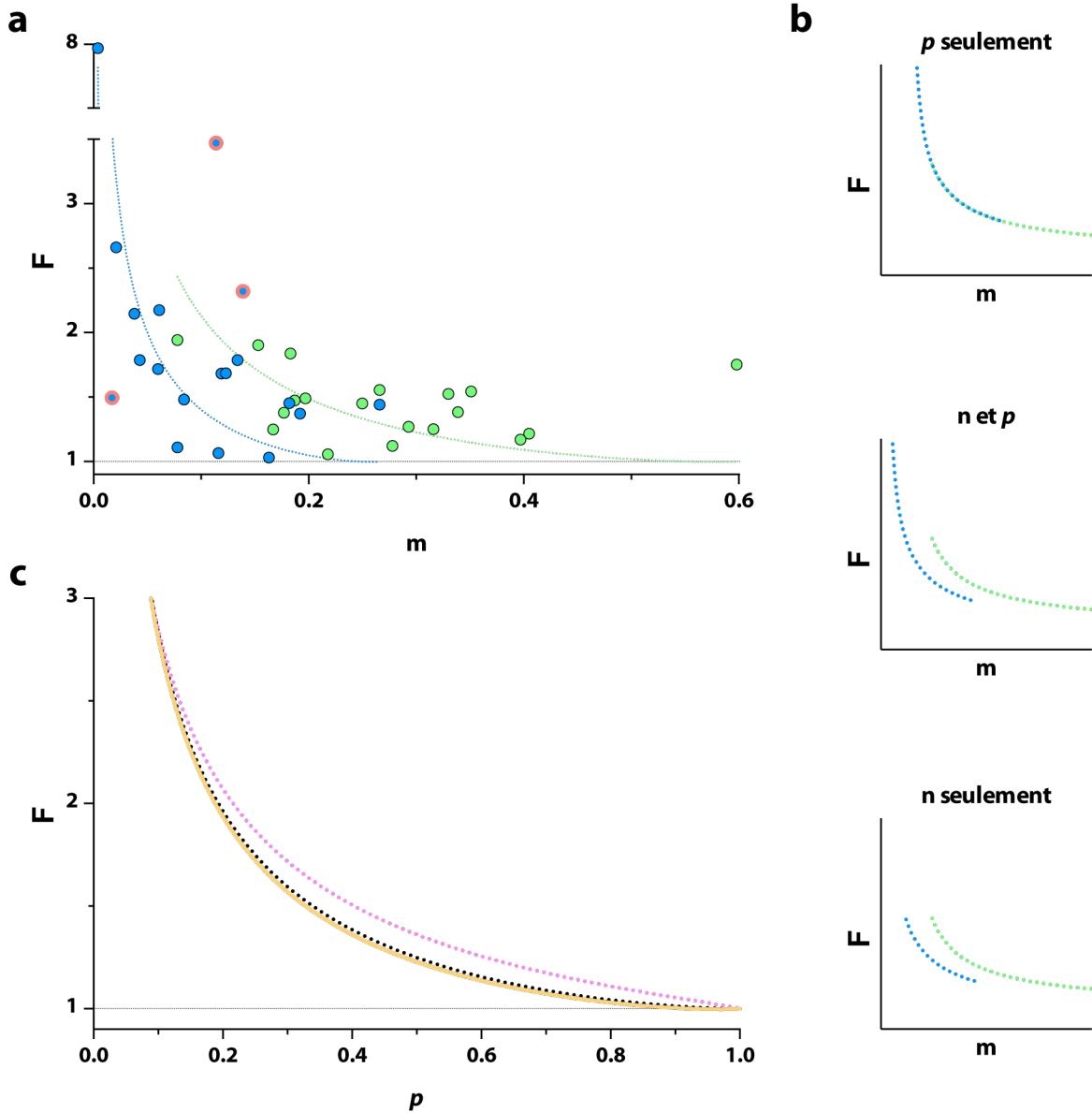


Figure 3.8. Ajustement des paramètres de l'équation de Dobrunz et Stevens aux données recueillies.

**a.** Nuage de points montrant les courbes d'ajustement de l'équation de Dobrunz et Stevens aux terminaisons fortes (en vert) et aux terminaisons faibles (en bleu). Les points ayant un contour saumon ont été identifier comme données aberrantes et éliminées de l'analyse. **b.** Diagramme de la relation attendue entre les courbes des terminaisons faibles (en bleu) et des terminaisons fortes (en vert) si leurs différences de  $m$  étaient dues principalement à des différences de  $\bar{p}$  (haut), à des différences de  $\bar{p}$  et de  $n$  (centre) ou principalement à des différences de  $n$  (bas). Noter la ressemblance entre l'hypothèse de la contribution de différences de  $\bar{p}$  et de  $n$  et les résultats obtenus en (a). **c.** Diagramme montrant les courbes générées par l'équation ajustée à nos données (en jaune), celle ajustée aux données de Dobrunz et Stevens (1997) (en saumon, pointillée) et celle dite simplifiée (en noir, pointillée). Notez la ressemblance entre la courbe ajustée à nos données et cette dernière.

terminaisons fortes. De plus, la relation entre les courbes (Kopp et al., 2000) suggère que les différences de  $m$  entre les terminaisons fortes et les terminaisons faibles s'expliquent par des différences au niveau de  $n$  et de  $\bar{p}$  (Figure 3.8b, **centre**). En effet, si les différences de  $m$  étaient dues principalement à des différences de  $\bar{p}$ , les courbes auraient un  $f_n$  similaire et la seule différence entre les courbes serait que celle des terminaisons faibles tendrait vers des valeurs de  $F$  plus élevées (Figure 3.8b, **haut**). Finalement, si les différences de  $m$  étaient due principalement à des différences de  $n$ , la courbe des terminaisons faibles ne tendrait pas vers des valeurs de  $F$  plus élevées (Figure 3.8b, **bas**), comme c'est le cas.

Puisque le  $n$  des différentes terminaisons d'une population peut potentiellement varier grandement, il était important de s'assurer de la normalité de la distribution des valeurs résiduelles. Il s'agit d'une condition nécessaire afin de pouvoir conclure que la courbe résultante est celle se rapprochant de la courbe décrivant la relation entre  $m$  et  $F$  pour le  $n$  moyen de la population étudiée. L'hypothèse nulle que les valeurs résiduelles sont distribuées de manière normale n'a pas été rejetée par le test de D'Agostino et Pearson *omnibus*  $K2$  (terminaisons forte :  $p = 0.79$ ; terminaisons faibles :  $p = 0.18$ ).

Finalement, la Figure 3.8c montre les courbes obtenues par trois équations différentes : (1) celle que nous venons d'ajuster à nos données (en **jaune**), (2) celle ajustée aux données de Dobrunz et Stevens (1997) (en **saumon**, pointillée) et celle dite simplifiée, proposée par ces mêmes auteurs (en **noire**, pointillée). La ressemblance entre la courbe ajustée à nos données et celle de l'équation simplifiée est frappante et suggère que la méthode que nous avons développée pour adapter cette équation à nos conditions expérimentales est adéquate.

### 3.2.3.2 Relation entre la facilitation et la probabilité de relâche ajustée

Dans la section précédente, nous avons adapté les paramètres de l'équation de Dobrunz et Stevens à notre contexte expérimental. Ainsi, l'équation qui permet de décrire la relation entre la  $F$  et la  $p_n$  pour les terminaisons que nous avons étudiées est

$$F = \frac{1 - (1 - p_n)^{0.964 p_n^{-0.5117}}}{p_n}.$$

La Figure 3.9 montre cette relation, où la  $p_n$  de chaque terminaison correspond au point sur la **courbe jaune** qui est aligné verticalement à sa valeur de  $F$ . Il est intéressant de noter que la courbe de la  $p_n$  croise  $F = 1$  à 0.93. D'abord, ceci implique qu'il aurait été impossible de discerner des terminaisons ayant une  $p_n$  supérieure à ce seuil. Cette caractéristique de la courbe est liée à la valeur du paramètre  $u$  lorsque ce dernier est plus petit que 1, ce qui a pour conséquence de faire correspondre certains de ses points à des  $F < 1$ . Notez que la courbe change ensuite de direction pour revenir croiser  $F = 1$  à  $p_n = 1$ .

Comment expliquer ce phénomène? D'abord,  $u$  dépend théoriquement de l'intervalle entre les stimulations appariées. Ainsi, nous suggérons qu'une terminaison à une JNM en développement doit avoir une  $p_n < 0.93$  afin de produire une facilitation lors d'une stimulation appariée avec un intervalle de 10 ms. Cette hypothèse suppose qu'afin d'être en mesure de distinguer les terminaisons ayant une  $p_n > 0.93$ , il aurait fallu soit (1) diminuer la  $p_n$  de toutes les terminaisons en ajustant l'environnement ionique ou (2) diminuer l'intervalle de la stimulation appariée. Bien que cette limitation ne nous ait pas posé de problème, puisque toutes les terminaisons examinées avaient une  $F > 1$ , elle permet de suggérer une explication à l'observation par d'autres (Kopp et al., 2000) que la  $F$  de certaines terminaisons puisse être inférieure à 1.

Ensemble, les résultats présentés jusqu'ici permettent de confirmer, d'abord, qu'il est possible de mieux caractériser la relation entre la  $F$  et la  $\bar{p}$  à la JNM, même si les terminaisons de celle-ci ont des  $n > 1$ . Ceci découle de la relation linéaire entre  $m$ ,  $n$  et  $\bar{p}$  qui permet à la relation entre la  $\bar{p}$  et la  $p_n$  des différentes terminaisons d'être normalisée selon  $n$ . Ensuite, nous avons montré que cette compréhension de la relation entre  $F$  et  $p_n$ , à la JNM, permet de déterminer les paramètres de l'équation de Dobrunz et Stevens qui la régissent. Il nous a ainsi été possible de déterminer la  $p_n$  relative de toutes les terminaisons étudiées. Nous verrons dans les sections subséquentes comment la connaissance de ce paramètre nous permet d'extraire de l'information concernant la couverture territoriale relative des terminaisons et, ultimement, d'utiliser ces informations pour sonder la dynamique sous-jacente à la régulation de la probabilité de relâche et de la couverture territoriale lors de la compétition synaptique.

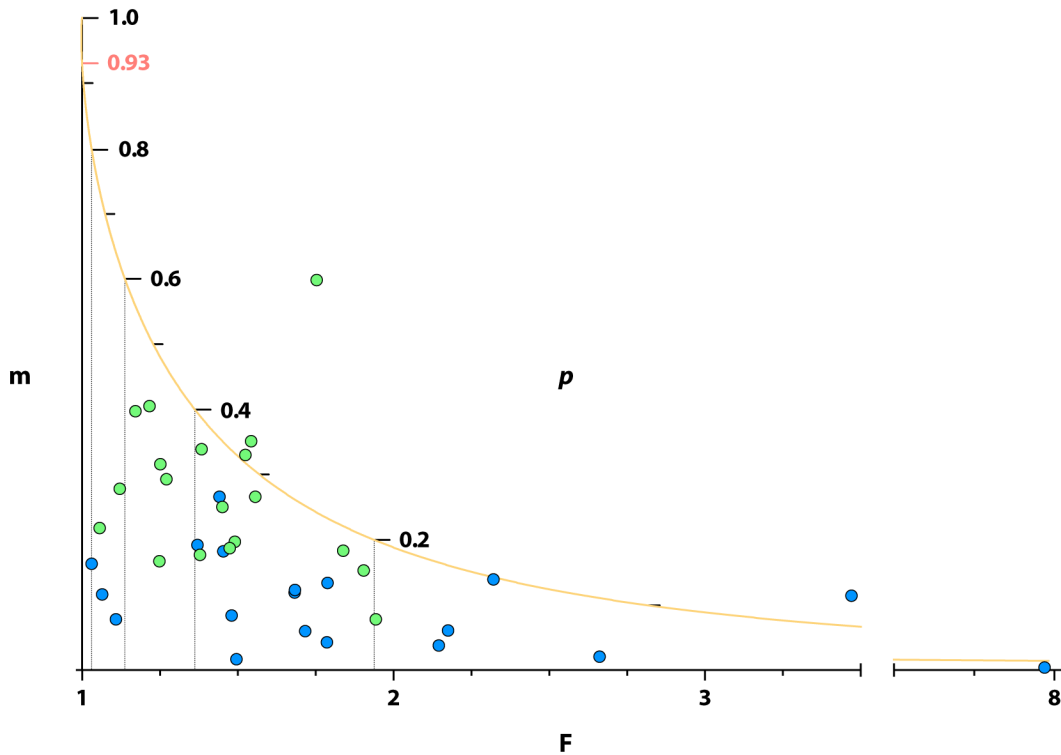


Figure 3.9. Relation entre la facilitation et la probabilité de relâche ajustée aux données.

Nuage de points montrant la relation entre la  $F$  et la  $p_n$  (axe = courbe en jaune) des terminaisons fortes (en vert) et faibles étudiées (en bleu). Chaque point sur l'axe de la  $F$  est associée au point qui lui est aligné verticalement sur l'axe de la  $p_n$ . Les points sont distribués sur l'axe verticale en fonction de leur  $m$ , par soucis de clarté, mais cette distribution n'influence pas la relation entre la  $F$  et la  $p_n$  d'un point. La courbe de la  $p_n$  croise  $F = 1$  à 0.93 (en saumon), indiquant que, dans nos conditions expérimentales, il aurait été impossible de départager les terminaisons ayant une  $p_n$  au-dessus de ce seuil.

### 3.3 Intermède : concernant la manière dont la compétition synaptique est étudiée lors du développement de la JNM

Jusqu'ici, nous avons été en mesure de déterminer la  $p_n$  et la  $m$  de chacune des terminaisons à plusieurs JNM bi-innervées. Par contre, pour étudier le processus de compétition synaptique, il est nécessaire de mettre en relation les propriétés des différentes terminaisons à une même JNM. Cette section a donc pour objectif de clarifier les différents indices qui seront utilisés dans les étapes subséquentes de notre étude et qui permettent d'établir ces relations.

D'abord, rappelons que l'équation qui décrit la relation entre les propriétés synaptiques d'une terminaison est

$$m = n \times \bar{p},$$

$$m = d_n \times t \times \bar{p}.$$

Cette équation peut être ré-écrite afin de décrire la relation entre deux terminaisons à une même JNM bi-innervée

$$\frac{m_{faible}}{m_{forte}} = \frac{d_{n_{faible}}}{d_{n_{forte}}} \times \frac{t_{faible}}{t_{forte}} \times \frac{\bar{p}_{faible}}{\bar{p}_{forte}}.$$

Cette nouvelle équation nous permet d'exprimer le  $m$  relatif des terminaisons comme une fonction du ratio de leurs différentes propriétés synaptiques. Ainsi, les différences de  $m$  devraient être complètement expliquées par une combinaison des différences de  $d_n$ , de  $t$  et de  $\bar{p}$ . Rappelons que nous assumons que la  $d_n$  des terminaisons, fortes et faibles, reste constante au cours du développement. Nous validerons ce postulat dans une section subséquente. Ainsi, nous pouvons ré-écrire l'équation sous la forme

$$\frac{m_{faible}}{m_{forte}} = \frac{1}{1} \times \frac{t_{faible}}{t_{forte}} \times \frac{\bar{p}_{faible}}{\bar{p}_{forte}},$$

$$\frac{m_{faible}}{m_{forte}} = \frac{t_{faible}}{t_{forte}} \times \frac{\bar{p}_{faible}}{\bar{p}_{forte}}.$$

Ainsi, si nous créons les indices

$$\text{Indice } m = \frac{m_{faible}}{m_{forte}},$$

$$\text{Indice } t = \frac{t_{faible}}{t_{forte}},$$

$$\text{Indice } p = \frac{\bar{p}_{faible}}{\bar{p}_{forte}} = \frac{p_{n_{faible}}}{p_{n_{forte}}} \text{ (voir Annexe II),}$$

il devient possible de réécrire l'équation sous la forme

Indice  $m$  = Indice  $t$   $\times$  Indice  $p$ .

Chacune des propriétés synaptiques peut ainsi être (1) comparer individuellement et (2) mis en relation avec les autres. Nous utiliserons ces trois indices afin d'effectuer la plupart des analyses dans les sections subséquentes.

Remarquez que l'Indice  $m$  ( $\frac{m_{faible}}{m_{forte}}$ ) est l'inverse du ratio de forces synaptiques présenté précédemment ( $\frac{m_{forte}}{m_{faible}}$ , Figure 3.2). La décision d'inverser ce ratio a été prise principalement afin de faciliter l'analyse et la présentation des données, puisque, par définition, les Indices  $m$  de toutes les terminaisons auront des valeurs entre 0 et 1. Cet avantage deviendra évident dans les sections subséquentes. De plus, comme nous l'avons vu, l'Indice  $m$  peut être vu comme une mesure du stade de la compétition. Selon notre définition de cet indice, plus il est bas, plus la compétition est à un stade avancé.

### **3.4 La force synaptique et la probabilité de relâche permettent de connaître la couverture territoriale relative**

#### **3.4.1 Relations théoriques**

Nous avons maintenant mis en place toutes les notions nécessaires afin de poursuivre notre analyse. Il reste toutefois à répondre à une question concernant le développement d'outils, soit de savoir qu'elles informations par rapport au  $n$  ou à la  $t$  des terminaisons nous pouvons extraire à partir des données de  $m$  et de  $p_n$  que nous avons recueillis. Nous pouvons répondre à cette question par deux approches distinctes, mais équivalentes.

La première méthode est de se rappeler que nous connaissons maintenant les paramètres pour les courbes de Dobrunz et Stevens décrivant nos données. Ainsi, à une JNM donnée, le ratio du  $f_n$  des courbes associées à chacune des terminaisons représente le ratio des  $n$  de ces terminaisons. Par exemple, à la Figure 3.10a, le ratio du  $f_n$  de chacune des courbes = 0.557, ce qui équivaut au ratio de leur  $n$ .

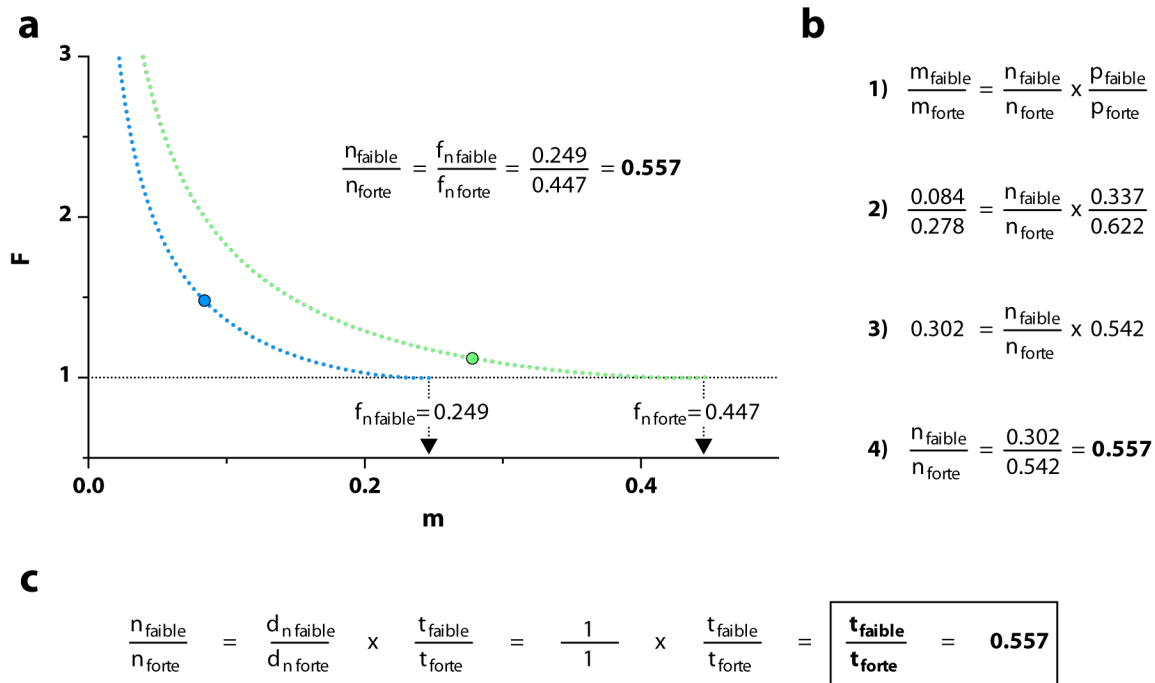


Figure 3.10. La connaissance de la probabilité de relâche et de la force synaptique des terminaisons en compétition permet de déterminer leur couverture territoriale relative.

a. Diagramme montrant les courbes de Dobrunz et Stevens pour deux terminaisons innervant une même JNM. La courbe de la terminaison **faible** (en **bleu**) a une  $f_n = 0.249$ , alors que celle de la terminaison **forte** (en **vert**) a une  $f_n = 0.447$ . Puisque le  $f_n$  des courbes est relié à leur ratio de  $n$ , ces données impliquent que la terminaison faible possède 0.557 fois le nombre de sites de relâches de la terminaison forte (voir équation sur le diagramme).

b. Lorsque le  $m$  et la  $p_n$  des deux terminaisons en compétition à une JNM bi-innervée sont connus, l'équation décrivant le rapport entre leur  $m$ , leur  $n$  et leur  $p_n$  (1) peut être utilisée afin d'isoler leur  $n$  relatif (4). Notez que cette technique est équivalente à celle décrite en (a).

c. Équation montrant que le  $n$  relatif de deux terminaisons en compétition à une JNM bi-innervée est équivalent à leur  $t$  relatif. Cette équivalence repose sur le postulat que la  $d_n$  des terminaisons faibles et fortes est équivalente.

La deuxième méthode est d'utiliser l'équation de la relation entre les paramètres synaptiques de deux terminaisons présentée dans la section précédente. La Figure 3.10b montre comment calculer le  $n$  relatif des deux terminaisons présentées dans le paragraphe précédent en utilisant cette méthode. Il est aisé de constater que les deux méthodes sont équivalentes.

Finalement, puisque que nous avons posé le postulat que la  $d_n$  des terminaisons faibles et fortes était égale au cours du développement, la différence entre le  $n$  de deux

terminaisons en compétition à une JNM bi-innervée est équivalente à la différence de leur couverture territoriale (Figure 3.10c).

Ainsi, en théorie, les informations que nous avons recueillies jusqu'ici concernant le  $m$  et la  $p_n$  nous ont permis d'estimer la couverture territoriale relative des terminaisons aux JNM étudiées. Dans la prochaine section, nous présenterons les résultats de la validation de cette théorie.

### 3.4.2 Validation de la couverture territoriale estimée

Les sections précédentes ont permis de démontrer que, d'un point de vue théorique, la connaissance du  $m$  et de la  $p_n$  des terminaisons en compétition à une JNM bi-innervée est suffisante pour estimer leur couverture territoriale relative. Cette théorie repose, d'abord, sur le postulat que la  $d_n$  des terminaisons faibles et fortes est, et reste, équivalente tout au long de la compétition synaptique. Ensuite, elle dépend du fait que la méthode utilisée afin de déterminer la  $p_n$  à partir de la  $F$  soit adéquate. Afin de valider ces deux points, nous avons déterminé la couverture territoriale réelle des terminaisons en compétition à 4 des JNM étudiées et l'avons comparée aux prédictions théoriques.

#### 3.4.2.1 Observation et quantification de la couverture territoriale

Afin de déterminer la couverture territoriale respective des terminaisons faibles et fortes à une même JNM, nous avons utilisé une technique permettant l'internalisation de marqueurs fluorescents lipophiliques distincts dans leurs vésicules synaptiques. Brièvement, suite à l'enregistrement des propriétés synaptiques, la préparation nerfs-muscle a été incubée avec de l' $\alpha$ -Bungarotoxine ( $\alpha$ -btx) conjuguée à un fluorophore afin de visualiser la plaque de récepteurs postsynaptiques. Ensuite, la préparation a été incubée avec un marqueur FM4-64. Une stimulation haute-fréquence (SHF) a ensuite été appliquée à une des deux terminaisons, produisant une relâche massive de vésicules synaptiques. Lors de leur recapture, la membrane des vésicules synaptiques contenait le marqueur fluorescent FM qui pouvait ainsi être internalisé. La procédure a ensuite été répétée avec un marqueur FM1-43 et en stimulant l'autre terminaison. Ainsi, cette technique permet de visualiser la couverture territoriale de chacune des terminaisons en



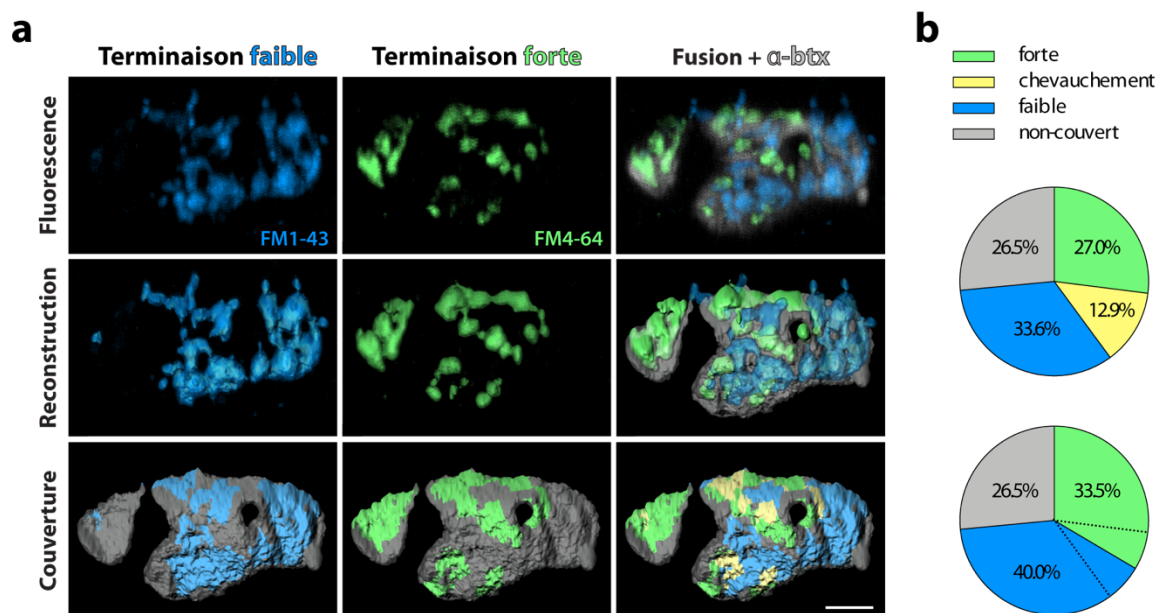


Figure 3.11. Observation et quantification de la couverture territoriale.

**a.** Exemple représentatif de la couverture territoriale de deux terminaisons en compétition à une JNM du muscle soléaire d'une souris P7. La première rangée montre une projection à intensité maximale de la **fluorescence** brute représentant les vésicules synaptique de chacune des terminaisons (faible en **bleue**, forte en **vert**) et la plaque de récepteurs postsynaptique ( $\alpha$ -btx en **gris**). Les structures fluorescentes ont été **reconstruites** à l'aide du logiciel Imaris. Un plugiciel sur mesure a été mis sur pied afin de déterminer de manière non-biaisée la **couverture** territoriale de chacune des terminaisons (voir méthodologie). Le **jaune** représente le chevauchement de la couverture des terminaisons. Échelle = 5  $\mu$ m.

**b.** Diagrammes montrant le résultat de l'analyse de quantification de la couverture territoriale avant (**haut**) et après (**bas**) la redistribution de la couverture de chevauchement (**jaune**) de manière égale entre les deux terminaisons.

compétition à une JNM bi-innervée. La première rangée d'images de la a montre un exemple représentatif des données de fluorescence brutes acquises en utilisant cette technique.

Afin de quantifier la couverture territoriale de chacune des terminaisons, nous avons d'abord déterminé le seuil du signal spécifique de manière non biaisée pour chacune des structures (terminaison faible, terminaison forte et plaque de récepteurs postsynaptiques; voir méthodologie). Ensuite, comme le montre la deuxième rangée d'images de la a, nous avons reconstruit chacune des structures en utilisant le logiciel Imaris. Finalement, nous avons développé des plugiciels Imaris personnalisés afin de

quantifier la couverture territoriale de chacune des terminaisons (troisième rangée d'images, a; voir méthodologie).

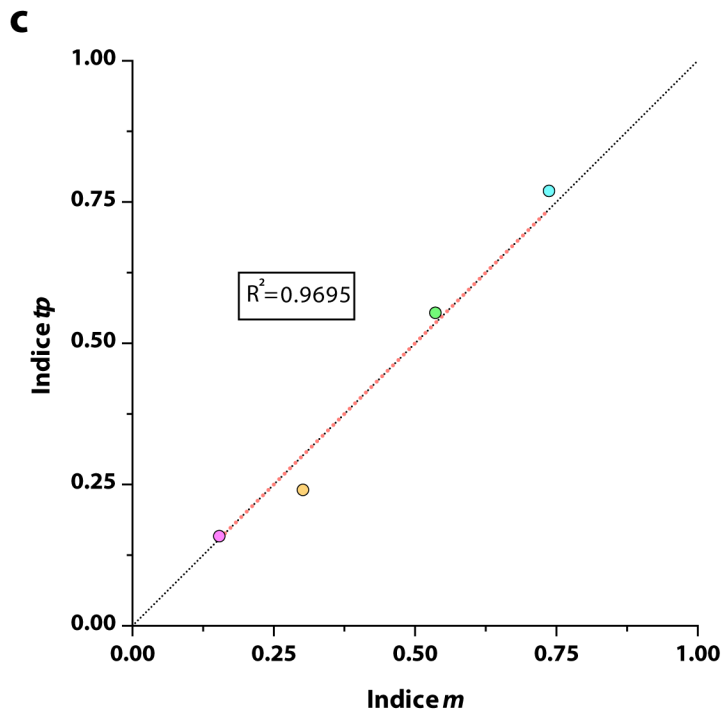
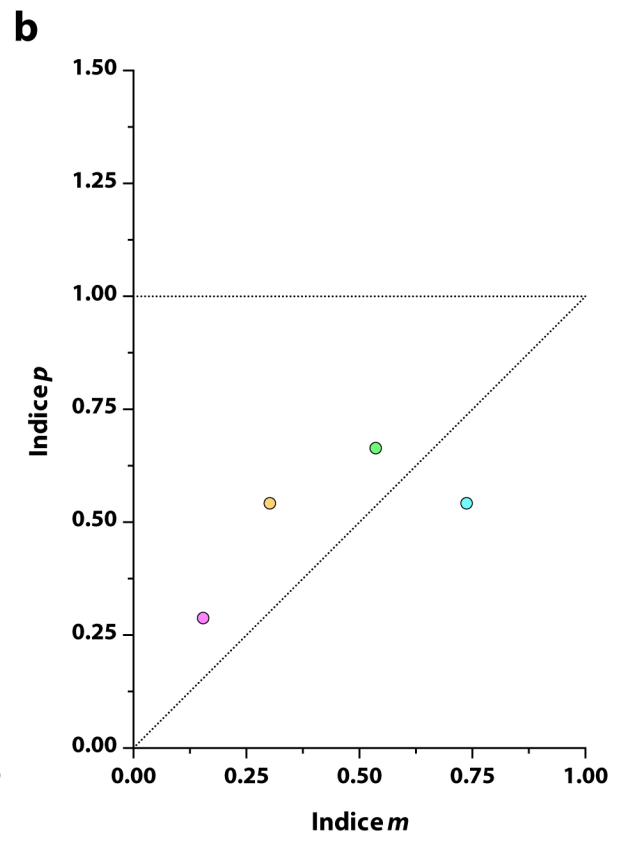
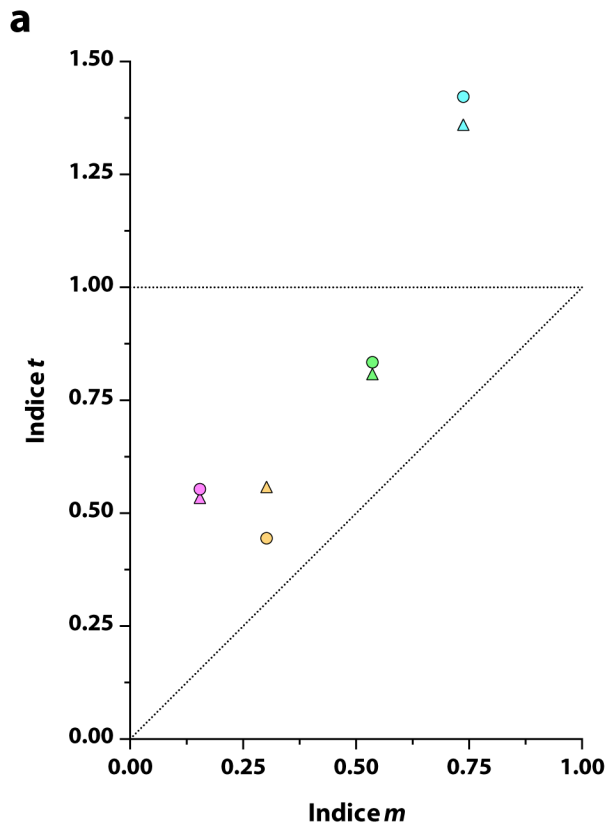
La b montre le résultat de la quantification de la couverture territoriale de chacune des terminaisons à la JNM montrée en (a), sous forme d'un pourcentage de couverture de la plaque de récepteurs postsynaptiques. Noter que le territoire couvert par les deux terminaisons (territoire de chevauchement) a été redistribué de manière égale entre elles. L'observation du territoire de chevauchement est sans-doute due à la limite de résolution optique de notre système d'imagerie. Ainsi, ces données permettent de calculer l'Indice  $t$  observé de la JNM à l'étude. Par exemple, pour la JNM montrée à la :

$$\text{Indice } t = \frac{t_{faible}}{t_{forte}} = \frac{40.0}{33.5} = 1.26.$$

Ainsi, la terminaison faible couvre 1.26 fois le territoire couvert par la terminaison forte.

#### 3.4.2.2 Comparaison des observations aux prédictions théoriques

D'abord, la Figure 3.12a montre la comparaison des Indices  $t$  observés (**ronds**) et théoriques (**triangles**), en fonction de leur Indice  $m$ , pour chacune des quatre JNM étudiées. La première chose à remarquer est la proximité entre les prévisions et les observations, qui suggère que nos prévisions sont relativement précises. Ensuite, comme nous l'avons mentionné précédemment, l'Indice  $m$  peut être vu comme une mesure du stade de la compétition. Ainsi, il est intéressant de noter la tendance de l'Indice  $t$  à diminué en parallèle à l'Indice  $m$ . Cela suggère que la couverture territoriale de la terminaison forte devient graduellement supérieure à celle de la terminaison faible à mesure que le processus de compétition progresse. Il est aussi intéressant de noter que la JNM où la terminaison faible couvre un plus grand territoire que la terminaison forte (en **turquoise**) est aussi celle où l'Indice  $m$  est le plus élevé, suggérant qu'à cette JNM le processus de compétition a relativement moins progressé.



**Figure 3.12. Validation que les différences de probabilité de relâche et de couverture territoriale expliquent entièrement les différences de force synaptique.**

**a.** Nuage de points montrant la relation entre les Indices  $t$  observés (**ronds**) ou théoriques (**triangles**) et l'Indice  $m$  à quatre JNM bi-innervées. Notez la similitude entre les points observés et les points théoriques. **b.** Nuage de points montrant la relation entre l'Indices  $p$  et l'Indice  $m$  des JNM présentées en (a). **c.** Nuage de points montrant la relation entre l'Indice  $tp$  (Indice  $t \times$  Indice  $p$ ) et l'Indice  $m$  des mêmes JNM présentées en (a) et en (b). L'hypothèse nulle que la droite expliquant le mieux ces données ait une pente = 1 et intercepte l'axe des ordonnées à Indice  $tp = 0$  n'a pas été rejetée ( $p = 0.9971$ , Test de F de la somme des carrés *Extra*,  $F = 0.0029$ ).

Ensuite, la Figure 3.12b montre la relation entre l'Indice  $p$  et l'Indice  $m$  aux mêmes JNM. Il est intéressant de noter que, comme pour l'Indice  $t$ , l'Indice  $p$  diminue de manière parallèle à l'indice  $m$ . Cela suggère que la  $p_n$  des terminaison forte devient graduellement supérieure à celle de la terminaison faible à mesure que le processus de compétition progresse.

Finalement, puisque notre hypothèse est que les différences de  $t$  et de  $p_n$  expliquent complètement les différences de  $m$ , multiplié l'Indice  $t$  et l'Indice  $p$  (Indice  $tp$ ) devrait donner un nombre égale à l'Indice  $m$  (Indice  $m =$  Indice  $t \times$  Indice  $p$ ). En effet, la Figure 3.12c montre que toutes les JNM ont une relation entre leur Indice  $tp$  et leur Indice  $m$  se rapprochent grandement de la droite ayant une pente = 1 (Indice  $tp =$  Indice  $m$ ). L'hypothèse nulle que la droite de meilleur ajustement ait une pente = 1 et intercepte l'axe des ordonnées à Indice  $tp = 0$  n'a pas été rejetée ( $p = 0.9971$ , Test de F de la somme des carrés *Extra*,  $F = 0.0029$ ). De plus, cette droite de meilleur ajustement à un  $R^2 = 0.97$ , ce qui signifie que 97% de la variance de l'Indice  $m$  est expliquée par l'Indice  $tp$  (l'Indice  $m$  est considéré ici comme la variable dépendante, malgré le fait qu'il soit illustré sur l'axe des abscisse pour simplifier la présentation).

Ces résultats sont extrêmement convaincant et la divergence des points de la droite ayant une pente = 1 est minime considérant la variété de techniques expérimentales (enregistrement physiologiques et imagerie confocale) et d'analyses (adaptation de l'équation de Dobrunz et Stevens et extraction des mesures de couverture territoriale) utilisées, qui introduisent tous un certain niveau d'erreur dans les données.

Ensemble, ces données suggèrent fortement (1) que le postulat selon lequel la  $d_n$  des terminaisons faibles et fortes est égale et constante au cours du processus de compétition synaptique est vrai, (2) que l'équation de Dobrunz et Stevens explique la relation entre la  $F$  et la  $p_n$  des terminaisons étudiées, (3) que l'adaptation de cette équation a été fait de manière adéquate et (4) que les différences de couverture territoriale et de probabilité de relâche expliquent complètement les différences de force synaptique aux JNM bi-innervées lors du processus de compétition synaptique.

### 3.5 Régulation de la couverture territoriale et de la probabilité de relâche

Jusqu'ici, nous sommes parvenus à répondre à toutes les questions que nous avons initialement soulevées concernant le développement d'outils afin de mieux étudier le processus de compétition et d'élimination synaptique. Les réponses que nous avons apportées à ces questions nous ont d'abord permis de déterminer la probabilité de relâche relative des terminaisons en compétition aux JNM étudiées. Nous avons ensuite utilisé ces données afin de montré que les différences de  $m$  étaient entièrement déterminées par les différences de couverture territoriale et de probabilité de relâche, répondant ainsi à la première de notre deuxième série de questions. Dans la présente section, nous explorerons la seconde question de cette série, soit la dynamique des changements dans les rapports de  $t$  et de  $p_n$  au cours du processus de compétition.

La Figure 3.13a montre la relation entre l'Indice  $t$  et l'Indice  $m$  des 19 JNM pour lesquelles les propriétés synaptiques ont été enregistrées. L'indice  $t$  des terminaisons pour lesquelles la  $t$  n'a pas été observée a été déterminé de la manière présentée précédemment (Figure 3.10). La Figure Figure 3.13b montre la relation entre l'Indice  $p$  et l'Indice  $m$  pour ces mêmes JNM. Dans les deux nuages de points, les symboles de losange représentent les JNM où la terminaison faible avait une  $t$  supérieure à la terminaison forte, mais une  $p_n$  inférieure. À l'inverse, les symboles carrés représentent des JNM où la terminaison faible avait une  $p_n$  supérieure à la terminaison forte, mais une  $t$  inférieure. Il est intéressant de noter que, puisque ces deux paramètres définissent entièrement l'Indice  $m$ , si un point se retrouve au dessus de 1 sur l'axe des ordonnés dans un des deux

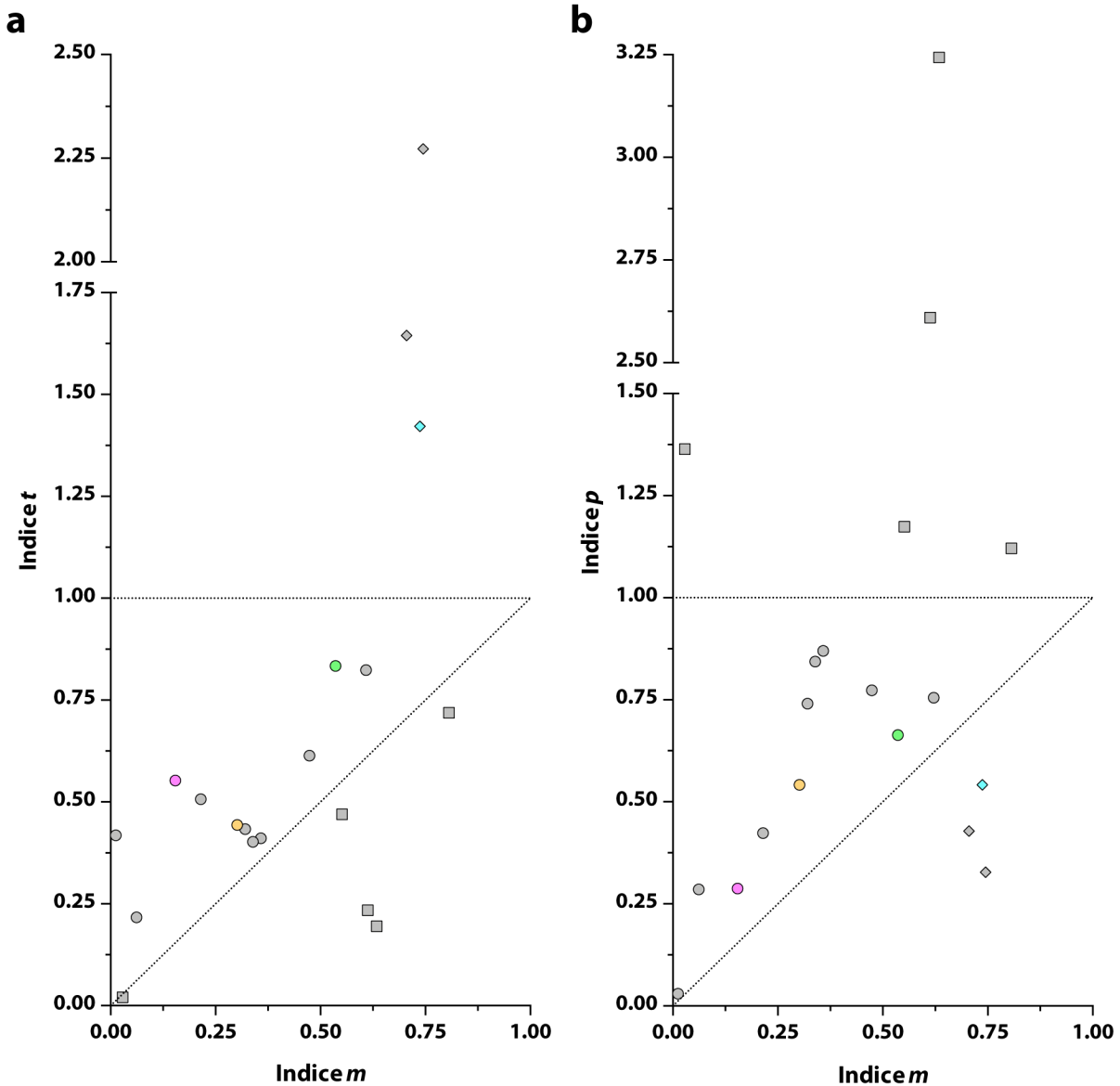


Figure 3.13. Dynamique de la régulation de la couverture territoriale et de probabilité de relâche.

a. Relation entre l'Indice  $t$  et l'Indice  $p$  des 19 JNM pour lesquelles les propriétés synaptiques ont été enregistrées. Les points de couleur représentent les JNM où la  $t$  a été observée, alors que les points en gris représentent les JNM où la  $t$  a été calculée de la manière présentée à la Figure 3.10. Les symboles carrés représente des JNM où la terminaison faible à une  $p_n$  supérieure à celle de la terminaison forte (voir en b). Les symboles losanges représentent les JNM où la terminaison faible a une  $t$  supérieure à celle de la terminaison forte. b. Relation entre l'Indice  $p$  et l'Indice  $m$  pour les mêmes JNM qui sont montrées en (a). Les codes de couleur et de forme des symboles sont les mêmes que pour le panneau (a). Notez la grande variabilité dans le rapport de  $t$  et de  $p$  lorsque le stade de la compétition est relativement peu avancé (Indice  $m > 0.5$ ).

graphiques, son point associé dans l'autre graphique se retrouvera nécessairement sous la droite ayant une pente = 1.

L'observation générale la plus évidente est que les terminaisons faibles ont une probabilité beaucoup plus élevée de voir un de leurs paramètres synaptiques ( $t$  ou  $p_n$ ) être supérieure à celui de la terminaison forte lorsque le stade de la compétition est relativement peu avancé (Indice  $m > 0.5$ ). Lorsque la compétition est plus avancée (Indice  $m < 0.5$ ), une seule terminaison faible sur 10 a une propriété synaptique supérieure à sa compétitrice (ici, la  $p_n$ ; carré gris ayant un Indice  $p$  d'environ 1.35, Figure 3.13b).

Ensembles, ces données montrent une grande variabilité dans les propriétés synaptiques des terminaisons lors du stade initiale de la compétition (Indice  $m > 0.5$ ). Par contre, lorsque la compétition est plus avancée (Indice  $m < 0.5$ ), la variabilité diminue et les terminaisons fortes ont généralement des propriétés synaptiques ( $t$  et  $p_n$ ) supérieures à celles des terminaisons faibles. Cette tendance semble aller en s'accroissant à mesure que la compétition progresse. Finalement, ces données suggèrent que la  $t$  et la  $p_n$  des terminaisons en compétition subissent toutes deux une régulation dynamique tout au long du processus de compétition synaptique.

### **3.6 La probabilité de relâche et la couverture territoriale déterminent conjointement la force synaptique**

Dans les sections précédentes, nous avons montré que les différences de  $t$  et de  $p_n$  expliquaient entièrement les différences de  $m$  des terminaisons en compétition aux JNM bi-innervées. Ensuite, nous avons montré que la variabilité de la  $t$  et de la  $p_n$  entre les terminaisons étaient élevée lors du stade initiale de la compétition (Indice  $m > 0.5$ ) et que cette variabilité diminuait progressivement au cours de ce processus.

Puisque l'ampleur de la régulation de la  $t$  et la  $p_n$  pourraient différer lors du processus de compétition, nous avons voulu la quantifier. La Figure 3.14 montre l'ampleur relative des différences de  $t$  et de  $p_n$  à chacune des JNM étudiées. La valeur établie correspond au ratio  $\frac{\Delta p}{\Delta t}$ . Chacun de ces ratios ( $\Delta p$  et  $\Delta t$ ) a été déterminé sans tenir

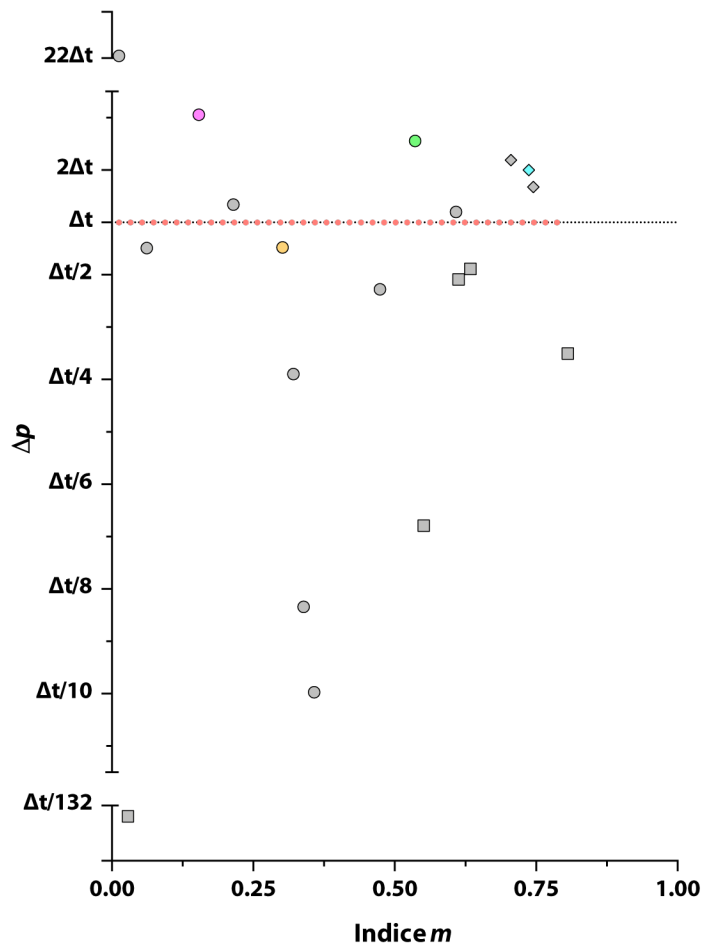


Figure 3.14. La régulation de la probabilité de relâche et de la couverture territoriale semblent participées conjointement à la détermination de la force synaptique tout au long du processus de compétition.

Nuage de points montrant l'ampleur relative des différences de  $p_n$  et de  $t$  aux 19 JNM enregistrees en fonction de l'Indice  $m$ . Les points de couleur représentent les JNM où la  $t$  a été observée, alors que les points en gris représentent les JNM où la  $t$  a été calculée de la manière présentée à la Figure 3.10. Les symboles carrés représentent des JNM où la terminaison faible à une  $p_n$  supérieure à celle de la terminaison forte (voir Figure 3.13). L'hypothèse nulle que la droite de meilleur ajustement expliquant la distribution des points a une pente = 0 et croise l'axe des ordonnées à  $\Delta p = \Delta t$  n'a pas été rejetée ( $p = 0.26$ , Test de F de la somme des carrés *Extra*,  $F = 1.463$ ).

compte de quelle terminaison étaient la plus forte (voir méthodologie). Il s'agit donc d'un ratio de l'ampleur absolue des différences. Ce ratio permet donc de visualiser l'importance relative de la régulation de la  $p_n$  et de la  $t$  à différents moments du processus de compétition.



Deux questions distinctes nous intéressaient par rapport à ces données. D'abord, de savoir si l'une des propriétés synaptiques était régulée de manière plus importante que l'autre et, ensuite, de savoir si cette importance relative fluctuait au cours du processus de compétition. Nous avons d'abord tenté de déterminer quel modèle s'ajustait le mieux à nos données entre une droite et une courbe polynomiale de second degré. L'hypothèse nulle que le modèle le plus simple (la droite) était adéquat n'a pas été rejetée ( $p = 0.34$ , Test de F de la somme des carrés *Extra*,  $F = 0.9622$ ). Nous nous sommes ensuite demandé si l'hypothèse la plus simple, soit que cette droite possède une pente = 0 et croise l'axe des ordonnées à  $\Delta p = \Delta t$ , était adéquate. Cette hypothèse nulle n'a pas été rejetée ( $p = 0.26$ , Test de F de la somme des carrés *Extra*,  $F = 1.463$ ).

Le fait que la pente de la droite de meilleur ajustement soit nulle suggère que l'importance relative de la régulation de la  $t$  et de la  $p_n$  ne fluctue pas au cours du processus de compétition. De plus, le fait que cette droite de pente = 0 croise l'axe des ordonnées à  $\Delta p = \Delta t$  suggère que la régulation de la  $t$  et de la  $p_n$  ont une importance équivalente dans la détermination des différences de  $m$ . Par contre, il existe des limites importantes à cette analyse. Celles-ci seront explorées lors de la discussion.

## 4 Discussion

La compétition synaptique est un processus fondamental du développement du système nerveux qui permet la mise en place de circuits neuronaux fonctionnels et fiables. Les processus qui le sous-tendent sont multiples et complexes. De plus, leur étude dans le SNC est compliquée par la taille et l'accessibilité réduites des structures d'intérêt. Par contre, la JNM offre un environnement favorable qui permet la mise en place de conditions expérimentales robuste où ces processus peuvent être sondés.

La caractérisation des différentes voies de signalisations impliquées dans le déroulement de la compétition synaptique à la JNM, de la source à l'effet sur la cible, permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de plusieurs maladies neuromusculaires. De plus, elle permettrait d'améliorer significativement nos chances de comprendre les processus correspondant au niveau du SNC en fournissant de nouvelles hypothèses à tester.

Par contre, le développement de protocoles expérimentaux pour étudier la compétition synaptique à la JNM demeure difficile. Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, les processus qui influencent la compétition et les propriétés des terminaisons sont interdépendants. Ainsi, l'incapacité de mesurer simultanément les différentes propriétés synaptiques des terminaisons représente une contrainte majeure.

Les objectifs de ce projet de recherche étaient donc 1) de développer des outils afin de mieux mesurer et caractériser les propriétés synaptiques des terminaisons en compétition à la JNM en développement et 2) d'utiliser ces outils pour mieux comprendre la dynamique de la compétition. Dans cette section, nous présenterons les implications et les limitations de nos résultats.

### 4.1 Développement des outils et techniques

D'abord, il est important de remettre en contexte nos travaux. Comme nous l'avons vu, plusieurs aspects de la compétition synaptique ont déjà été étudiés. Le processus a été qualitativement décrit de manière honorable. Par contre, dû aux limitations techniques, seulement un paramètre était analysé à la fois. Par exemple,

certaines études se sont penchées sur l'évolution de la taille relative des terminaisons en fonction du temps tout en négligeant leurs propriétés physiologiques (Turney et Lichtman, 2012; Walsh et Lichtman, 2003). D'un autre côté, d'autres projets s'étaient attardés à l'évolution de la force relative des terminaisons en fonction du temps, tout en négligeant l'évolution de leur rapport de taille (Colman et al., 1997; Kopp et al., 2000).

Bien entendu, il importe d'être en mesure de mesurer ces différents paramètres de manière simultanée si l'on espère un jour faire la lumière sur les relations qui existent dans leur régulation. Il est donc pertinent de mettre l'accent sur le caractère innovateur de notre approche. En effet, non seulement celle-ci nous a-t-elle permis de mesurer simultanément la force synaptique relative des terminaisons et leur rapport de couverture territoriale, une combinaison d'observations n'ayant jamais été publiée auparavant, mais elle a aussi permis de déterminer leur probabilité de relâche relative. Ce type de mesure à la JNM est tout à fait nouveau.

La combinaison de ces techniques permettra à l'avenir de déployer des protocoles expérimentaux beaucoup plus robustes qui permettront de mettre en relation ces paramètres comme jamais auparavant.

#### **4.1.1 La relation entre la facilitation et probabilité de relâche**

Notre premier résultat significatif est l'adaptation de l'équation de Dobrunz et Stevens afin de décrire la relation entre la facilitation et la probabilité de relâche. La possibilité d'effectuer une estimation convaincante du ratio de probabilité de relâche des terminaisons synaptique à une même JNM représente une avancée significative. Par contre, la technique que nous décrivons pour y arriver repose sur un certain nombre de postulats que nous jugeons pertinent de clarifier.

D'abord, nos résultats ont été obtenus en utilisant la technique de la diminution du contenu quantique par changement de milieu ionique. Il est intéressant de tenter de comprendre comment cela pourrait les avoir influencés.

Comme nous l'avons vu, une diminution de la probabilité de relâche déplace le point décrivant la relation entre le contenu quantique et la facilitation vers la gauche le

long de la courbe décrite par l'équation de Dobrunz et Stevens, mais le point où cette courbe croise  $F = 1$  ( $f_n$ ) n'est pas déplacée. En effet, comme le démontre la Figure 3.7, un déplacement de  $f_n$  est observé lorsque le nombre de sites de relâche est modifié.

Dans un environnement ionique normal, les terminaisons ont des contenus quantiques supérieurs à 40-50 (Tremblay et al., 2017). Puisque dans ces conditions elles ont aussi des niveaux de facilitation supérieurs à 1, cela implique que leur  $f_n$  est d'au moins 40-50 en situation normale.

La  $f_n$  des courbes décrivant la relation entre le contenu quantique et la facilitation (Figure 3.10) dans les conditions de basse probabilité de relâche (environnement ionique modifié) sont significativement inférieures au contenu quantique dans les conditions normales (moins de 1). Cela implique que la modification de l'environnement ionique n'entraîne pas seulement une diminution de la probabilité de relâche moyenne de ces terminaisons, mais aussi une diminution de leur nombre de sites de relâche actif.

Ainsi, la validité des résultats que nous avons obtenus repose sur le postulat que le ratio du nombre de sites de relâche des terminaisons en compétition est équivalent avant et après le changement d'environnement ionique. Bien que l'altération de l'environnement ionique soit une technique utilisée depuis très longtemps pour évaluer le contenu quantique relatif des terminaisons (Del Castillo et Engbaek, 1954; Del Castillo et Katz, 1954b; Del Castillo et Stark, 1952), certaines questions demeurent.

D'abord, il serait intéressant d'étudier la manière dont la facilitation et le contenu quantique varient à une même terminaison lorsque l'environnement ionique est modifié. Ces résultats permettraient de mieux comprendre l'effet des changements de milieu ionique sur la régulation de la probabilité de relâche et du nombre de sites de relâche, respectivement. De plus, il serait intéressant d'effectuer ce genre de manipulation à des JNM bi-innervées afin de valider que le ratio du nombre de sites de relâche demeure constant.

### 4.1.2 La densité de sites de relâche

Une autre observation significative est celle que le ratio de couverture territoriale prédit par notre détermination analytique de la probabilité de relâche était pratiquement identique à celle observée à l'aide des marquages FM. Une des interprétations que nous avons tirée de ces résultats est que cela supportait l'hypothèse que la densité des sites de relâches était similaire et constante entre les différentes terminaisons. Par contre, il est convenable de mettre cette interprétation en perspective.

D'abord, il est nécessaire de considérer que la distance habituellement observée entre les sites de relâche à la JNM est similaire à la taille de la PSF moyenne observée sur notre système (voir méthodologie). Ensuite, il est plausible de supposer que seulement les sites de relâche actifs seront marqués lors de notre intervention. Ensemble, ces points soutiennent l'idée que la taille observée par marquage FM est une taille fonctionnelle directement proportionnelle au nombre de sites de relâche, car seuls les endroits de la terminaison participant à la relâche sont marqués. Ainsi, il serait possible de soutenir que l'observation du marquage FM nous renseigne mieux par rapport au nombre de sites de relâche de la terminaison que par rapport à sa structure morphologique ou à sa densité de sites de relâche.

Il est intéressant de noter que le fait d'accepter cette interprétation implique que nos résultats ne dépendent plus de l'acceptation du postulat de la densité égale et constante des sites de relâche. En effet, dans ces conditions, nos observations sont plus adaptées au modèle  $m = n \times \bar{p}$  qu'au modèle  $m = d_n \times t \times \bar{p}$ . Par contre, l'avantage de mesurer plus directement le nombre de sites de relâche vient au prix d'accepter que notre connaissance de la couverture morphologique réelle soit diminuée.

## 4.2 Application des outils et techniques

### 4.2.1 Taille morphologique, taille fonctionnelle et incertitude

Bien que les considérations de la sous-section précédente n'affectent en rien la validité de notre analyse, elles mettent tout de même en lumière l'importance de la distinction entre les couvertures territoriales fonctionnelle et morphologique. Cette

question est pertinente d'un point de vue conceptuel, mais aussi expérimental. En effet, plusieurs études se sont basés sur le postulat que la taille morphologique des terminaisons était un proxy fiable de l'état de la compétition (par exemple, voir Brill et al. (2016)). Quant à eux, nos résultats montrent que la taille fonctionnelle peut souvent donner une perception extrêmement erronée de l'indice de force synaptique entre les terminaisons, particulièrement lorsque celui-ci est de plus de 0.5. Ces résultats mettent en lumière l'importance de mesurer simultanément les différentes propriétés synaptiques des terminaisons afin d'avoir un portrait juste de l'état de la compétition.

Ainsi, il sera intéressant d'étudier la relation qui existe entre la taille fonctionnelle et la taille morphologique des terminaisons et de comprendre si elle corrèle avec les autres paramètres synaptiques. Ce type d'expérience apporterait une compréhension nouvelle de l'organisation des sites de relâche au sein d'une terminaison.

D'ailleurs, nous avons entrepris de mettre en place un projet de recherche qui permettra d'étudier cette relation au niveau ultrastructural. Le protocole expérimental est extrêmement similaire à celui des expériences de marquage FM présentées dans ce mémoire. Par contre, les FM sont remplacés par de la peroxydase de raifort (HRP) qui permet le marquage des vésicules synaptiques à la 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Ces tissus sont ensuite préparés pour observation à l'aide d'un microscope électronique. Ce type d'expérience sera extrêmement important pour faire le lien entre les paramètres synaptiques fonctionnels des terminaisons et leurs paramètres morphologiques.

#### **4.2.2 Probabilité de relâche et nombre de sites de relâche**

Nos résultats soutiennent l'idée que le ratio de force synaptique entre les terminaisons est établi aussi bien par les différences de couverture territoriale (nombre de sites de relâche) que de probabilité de relâche. De plus, l'influence relative de ces deux paramètres resterait constante au long de la compétition.

Bien que ces résultats soient intéressants, la variabilité observée indique qu'il faudrait augmenter significativement le nombre d'observations afin d'être en mesure d'obtenir des résultats robustes. Néanmoins, ces données permettent de mettre en lumière le type d'analyse que les outils développés ici pourront permettre. En effet, il est

intéressant de se rappeler que, selon l'interprétation choisie, chaque point de ces graphiques permet de considérer l'ensemble des propriétés synaptique des deux terminaisons en compétition à une JNM. Le pouvoir explicatif de telles expériences sera immense lorsqu'il sera inclus au sein d'une étude plus étendue ayant un pouvoir statistique supérieur.

### 4.2.3 Régulation de la structure morphologique

Un des aspects extrêmement intéressants de la compétition synaptique est la manière dont la morphologie des terminaisons est régulée. Il s'agit évidemment d'une question complexe qui doit considérer plusieurs facteurs. En effet, ce genre de régulation dépend à la fois de mécanismes internes et externes à la terminaison. Du côté interne, on peut penser à tous les mécanismes qui seront impliqués dans la gestion de la dynamique du cytosquelette. Du côté externe, il y aura toutes les voies de signalisations qui pourront être détectées à l'interface cellulaire. Évidemment, les systèmes responsables de la détection de ces signaux subissent eux-mêmes une régulation stricte. Un niveau de complexité supplémentaire s'ajoute lorsque l'on considère l'interrelation possible entre la régulation de la morphologie et de la physiologie synaptique des terminaisons. Par contre, des techniques expérimentales comme celles présentées ici permettront de mettre sur pied des protocoles afin d'évaluer l'influence du blocage de mécanismes cibles sur chacun des paramètres cellulaires. Ces expériences permettront sans doute de mieux caractériser quels paramètres sont affectés par le blocage de ces voies, qui pourront éventuellement être finement disséquées.

Plusieurs hypothèses à tester sont d'ailleurs déjà sur la table. Des voies de signalisation comme celle du BDNF sont des candidats de choix (Darabid et al., 2014; Je et al., 2012; Je et al., 2013). Notre laboratoire a récemment montré que les CSP sont en mesure de préférentiellement augmenter le contenu quantique des terminaisons les plus fortes selon un mécanisme qui dépend du  $Ca^{2+}$  et des récepteurs purinergic  $P2Y_1$ , ce qui influençait l'issue de la compétition (Darabid et al., 2018). Ainsi, ces résultats soutiennent que cette régulation par les CSP pourrait être reliée à des changements territoriaux.

Fait intéressant, de récentes découvertes ont révélé l'importance du clivage dépendant de l'activité du proBDNF en BDNF mature (mBDNF) sur la rétraction et la

stabilisation des terminaisons nerveuses, respectivement (Je et al., 2012; Je et al., 2013; VanSaun, Humburg, Arnett, Pence et Werle, 2007). Ce clivage est médié par les enzymes de la matrice extracellulaire métalloprotéinase 3 et 9 (MMP3 / 9) (Je et al., 2012; Je et al., 2013), qui se sont révélées être étroitement associées aux CSP (VanSaun et al., 2003; VanSaun et al., 2007). En outre, les CSP sont considérées comme des candidats de choix pour la relâche ou la modulation de l'activité des MMP (Darabid et al., 2014).

L'étude des CSP est intimement liée à celle de la régulation des changements de territoire des terminaisons. En effet, ces cellules sont directement impliquées dans la phagocytose des terminaisons en rétraction (Bishop et al., 2004). De plus, lors des premiers stades de la compétition, elles sont en mesure de produire des prolongements cellulaires qui pénètrent et phagocytosent des pans cellulaires entiers des terminaisons (Smith et al., 2013). Les auteurs de cette étude soutiennent que le ciblage de ces prolongements se produit de manière aléatoire. Par contre, nous avons récemment proposée qu'en raison de leur capacité à détecter l'activité synaptique relative des terminaisons et de cibler préférentiellement les plus fortes, les CSP pourraient aussi développer la capacité d'effectuer un ciblage précis leurs prolongements (Darabid et al., 2014; Darabid et al., 2018). Les expériences de microscopie électronique présentée dans une sous-section précédente seront assurément en mesure de fournir de l'information précieuse à cette égard.

De manière intéressante, les travaux chez la mouche drosophile pavent la voie à une meilleure compréhension des différentes voies de signalisation qui régulent le cytosquelette (Long et Van Vactor, 2013; Menon, Carrillo et Zinn, 2013; Pollard, 2007). Certaines études ont aussi permis d'établir des liens entre certaines de ces voies et le niveau d'activité synaptique (Budnik, Zhong et Wu, 1990; Rieckhof, Yoshihara, Guan et Littleton, 2003). Il sera intéressant d'explorer cette littérature afin de développer des hypothèses testables dans notre modèle expérimental.

Enfin, il sera essentiel de s'interroger sur (1) la manière dont les différents mécanismes de régulation de la l'expansion/rétraction des terminaisons sont liés entre eux et (2) leur interaction avec des mécanismes tels que le remodelage du cytosquelette



cellulaire, la constitution/stabilisation des zones actives et la régulation de libération de neurotransmetteur.

#### **4.2.4 Régulation de la probabilité de relâche**

La probabilité de relâche d'une terminaison est un paramètre central permettant d'expliquer son comportement synaptique. Il est extrêmement probable que tous les mécanismes impliqués dans sa régulation, dont certains ont été mentionnés précédemment, influencent aussi le processus de compétition synaptique.

L'adaptation de l'équation de Dobrunz et Stevens ouvre la porte à la mise en place d'une nouvelle catégorie de protocole expérimental qui permettra une meilleure compréhension de sa régulation et de son influence dans le processus compétitif.

# Conclusion

Les résultats présentés dans ce mémoire constituent la première démonstration de la possibilité de mesurer simultanément l'intégralité des paramètres ayant une influence sur le comportement synaptique d'une terminaison, soit la force synaptique, la probabilité de relâche et la couverture territoriale/nombre de sites de relâche. Il s'agit d'une étape importante pour toute la communauté impliquée dans la recherche sur la synaptogenèse.

Le premier point marquant de ce travail est l'adaptation de l'équation de Dobrunz et Stevens. Bien que certaines validations restent à faire, il s'agit d'une avancée conceptuelle significative. La possibilité de déterminer le ratio de probabilité de relâche entre les terminaisons en compétition à une même JNM représente une innovation significative.

Un second point marquant est la démonstration que la connaissance du ratio de force synaptique et de probabilité de relâche permettait de déduire assez précisément le ratio de taille fonctionnelle d'une terminaison, une mesure relié à son nombre de sites de relâche. Ainsi, une généralisation de cette règle est que la connaissance précise et simultanée de deux de ces paramètres permet de trouver le troisième. Bien que cette conclusion était déjà prédite par la théorie, il s'agit d'une démonstration importante qui permettra de construire des bases solides pour des études subséquentes. Idéalement, d'autres laboratoires répliqueront ces résultats.

Finalement, nos observations mettent en lumière le danger de se fier à un seul paramètre (par exemple, la couverture territoriale) afin de tirer des conclusions concernant la terminaison qui sera éventuellement maintenue. En effet, nos données montrent clairement le manque de corrélation entre les ratios de force synaptique et ceux de probabilité de relâche ou de couverture territoriale lors des stades plus précoces de la compétition. Il s'agit d'une leçon importante à considérer aussi bien dans l'élaboration de projets futures que dans l'interprétation de travaux déjà publiés.

## Bibliographie

- Alabi, A. A. et Tsien, R. W. (2012). Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(8), a013680. doi: 10.1101/cshperspect.a013680
- Alnaes, E. et Rahamimoff, R. (1975). On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. *J Physiol*, 248(2), 285-306.
- Andersson-Cedergren, E. (1959). *Ultrastructure of motor end plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections*. (Diss med - Karolinska institutet, Stockholm, New York,). (9916820)
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H., Robitaille, R. et Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, 81(4), 728-739. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.007
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. et Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, 22(5), 208-215.
- Aravanis, A. M., Pyle, J. L. et Tsien, R. W. (2003). Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature*, 423(6940), 643-647. doi: 10.1038/nature01686
- Arbour, D., Tremblay, E., Martineau, É., Julien, J. P. et Robitaille, R. (2015). Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model. *J Neurosci*, 35(2), 688-706. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1379-14.2015
- Arbour, D., Vande Velde, C. et Robitaille, R. (2017). New perspectives on amyotrophic lateral sclerosis: the role of glial cells at the neuromuscular junction. *J Physiol*, 595(3), 647-661. doi: 10.1113/JP270213
- Arikawa-Hirasawa, E., Rossi, S. G., Rotundo, R. L. et Yamada, Y. (2002). Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci*, 5(2), 119-123. doi: 10.1038/nm801
- Armstrong, G. A. et Drapeau, P. (2013a). Calcium channel agonists protect against neuromuscular dysfunction in a genetic model of TDP-43 mutation in ALS. *J Neurosci*, 33(4), 1741-1752. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4003-12.2013
- Armstrong, G. A. et Drapeau, P. (2013b). Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS. *Hum Mol Genet*, 22(21), 4282-4292. doi: 10.1093/hmg/ddt278
- Astrow, S. H., Tyner, T. R., Nguyen, M. T. et Ko, C. P. (1997). A Schwann cell matrix component of neuromuscular junctions and peripheral nerves. *J Neurocytol*, 26(2), 63-75.
- Augustine, G. J., Charlton, M. P. et Smith, S. J. (1985). Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid. *J Physiol*, 367, 163-181.
- Augustine, G. J., Charlton, M. P. et Smith, S. J. (1987). Calcium action in synaptic transmitter release. *Annu Rev Neurosci*, 10, 633-693. doi: 10.1146/annurev.ne.10.030187.003221
- Auld, D. S. et Robitaille, R. (2003). Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *Neuroscientist*, 9(2), 144-157. doi: 10.1177/1073858403252229
- Balice-Gordon, R. J. (1997). In vivo approaches to neuromuscular structure and function. *Methods Cell Biol*, 52, 323-348.

- Balice-Gordon, R. J., Chua, C. K., Nelson, C. C. et Lichtman, J. W. (1993). Gradual loss of synaptic cartels precedes axon withdrawal at developing neuromuscular junctions. *Neuron*, *11*(5), 801-815.
- Balice-Gordon, R. J. et Lichtman, J. W. (1990). In vivo visualization of the growth of pre- and postsynaptic elements of neuromuscular junctions in the mouse. *J Neurosci*, *10*(3), 894-908.
- Balice-Gordon, R. J. et Lichtman, J. W. (1993). In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J Neurosci*, *13*(2), 834-855.
- Balice-Gordon, R. J. et Lichtman, J. W. (1994). Long-term synapse loss induced by focal blockade of postsynaptic receptors. *Nature*, *372*(6506), 519-524. doi: 10.1038/372519a0
- Bélaïr, E. L., Vallée, J. et Robitaille, R. (2010). In vivo long-term synaptic plasticity of glial cells. *J Physiol*, *588*(Pt 7), 1039-1056. doi: 10.1113/jphysiol.2009.178988
- Benoit, P. et Changeux, J. P. (1975). Consequences of tenotomy on the evolution of multiinnervation in developing rat soleus muscle. *Brain Res*, *99*(2), 354-358.
- Betz, W. J. (1970). Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol*, *206*(3), 629-644.
- Betz, W. J. et Bewick, G. S. (1992). Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science*, *255*(5041), 200-203.
- Birks, R., Huxley, H. E. et Katz, B. (1960). The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol*, *150*, 134-144.
- Bishop, D. L., Misgeld, T., Walsh, M. K., Gan, W. B. et Lichtman, J. W. (2004). Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron*, *44*(4), 651-661. doi: 10.1016/j.neuron.2004.10.026
- Bonanomi, D. et Pfaff, S. L. (2010). Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *2*(3), a001735. doi: 10.1101/cshperspect.a001735
- Bose, P., Armstrong, G. A. B. et Drapeau, P. (2019). Neuromuscular junction abnormalities in a zebrafish loss-of-function model of TDP-43. *J Neurophysiol*, *121*(1), 285-297. doi: 10.1152/jn.00265.2018
- Bourque, M. J. et Robitaille, R. (1998). Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, *512* ( Pt 1), 197-209.
- Bowen, D. C., Sugiyama, J., Ferns, M. et Hall, Z. W. (1996). Neural agrin activates a high-affinity receptor in C2 muscle cells that is unresponsive to muscle agrin. *J Neurosci*, *16*(12), 3791-3797.
- Bowersox, S. S., Miljanich, G. P., Sugiura, Y., Li, C., Nadasdi, L., Hoffman, B. B., . . . Ko, C. P. (1995). Differential blockade of voltage-sensitive calcium channels at the mouse neuromuscular junction by novel omega-conopeptides and omega-agatoxin-IVA. *J Pharmacol Exp Ther*, *273*(1), 248-256.
- Brill, M. S., Kleele, T., Ruschkies, L., Wang, M., Marahori, N. A., Reuter, M. S., . . . Misgeld, T. (2016). Branch-Specific Microtubule Destabilization Mediates Axon Branch Loss during Neuromuscular Synapse Elimination. *Neuron*, *92*(4), 845-856. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.049
- Brose, N., Petrenko, A. G., Sudhof, T. C. et Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, *256*(5059), 1021-1025.
- Brown, M. C. et Hopkins, W. G. (1981). Role of degenerating axon pathways in regeneration of mouse soleus motor axons. *J Physiol*, *318*, 365-373.

- Brown, M. C., Jansen, J. K. et Van Essen, D. (1976). Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *J Physiol*, 261(2), 387-422.
- Budnik, V., Zhong, Y. et Wu, C. F. (1990). Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *J Neurosci*, 10(11), 3754-3768.
- Buffelli, M., Burgess, R. W., Feng, G., Lobe, C. G., Lichtman, J. W. et Sanes, J. R. (2003). Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature*, 424(6947), 430-434. doi: 10.1038/nature01844
- Buffelli, M., Busetto, G., Bidoia, C., Favero, M. et Cangiano, A. (2004). Activity-dependent synaptic competition at mammalian neuromuscular junctions. *News Physiol Sci*, 19, 85-91.
- Buffelli, M., Busetto, G., Cangiano, L. et Cangiano, A. (2002). Perinatal switch from synchronous to asynchronous activity of motoneurons: link with synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), 13200-13205. doi: 10.1073/pnas.202471199
- Burden, S. J., Yumoto, N. et Zhang, W. (2013). The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(5), a009167. doi: 10.1101/cshperspect.a009167
- Busetto, G., Buffelli, M., Tognana, E., Bellico, F. et Cangiano, A. (2000). Hebbian mechanisms revealed by electrical stimulation at developing rat neuromuscular junctions. *J Neurosci*, 20(2), 685-695.
- Calderon, J. C., Bolanos, P. et Caputo, C. (2014). The excitation-contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophys Rev*, 6(1), 133-160. doi: 10.1007/s12551-013-0135-x
- Castonguay, A. et Robitaille, R. (2001). Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca<sup>2+</sup> internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci*, 21(6), 1911-1922.
- Ceccarelli, B., Hurlbut, W. P. et Mauro, A. (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 57(2), 499-524.
- Chan-Palay, V., Engel, A. G., Palay, S. L. et Wu, J. Y. (1982). Synthesizing enzymes for four neuroactive substances in motor neurons and neuromuscular junctions: light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(21), 6717-6721.
- Chen, J., Billings, S. E. et Nishimune, H. (2011). Calcium channels link the muscle-derived synapse organizer laminin beta2 to Bassoon and CAST/Erc2 to organize presynaptic active zones. *J Neurosci*, 31(2), 512-525. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3771-10.2011
- Chen, J., Mizushige, T. et Nishimune, H. (2012). Active zone density is conserved during synaptic growth but impaired in aged mice. *J Comp Neurol*, 520(2), 434-452. doi: 10.1002/cne.22764
- Chen, L. et Ko, C. P. (1994). Extension of synaptic extracellular matrix during nerve terminal sprouting in living frog neuromuscular junctions. *J Neurosci*, 14(2), 796-808.
- Cifuentes-Diaz, C., Nicole, S., Velasco, M. E., Borra-Cebrian, C., Panozzo, C., Frugier, T., . . . Melki, J. (2002). Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet*, 11(12), 1439-1447.
- Cingolani, L. A. et Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci*, 9(5), 344-356. doi: 10.1038/nrn2373

- Clarke, G. L., Chen, J. et Nishimune, H. (2012). Presynaptic Active Zone Density during Development and Synaptic Plasticity. *Front Mol Neurosci*, 5, 12. doi: 10.3389/fnmol.2012.00012
- Colman, H. et Lichtman, J. W. (1993). Interactions between nerve and muscle: synapse elimination at the developing neuromuscular junction. *Dev Biol*, 156(1), 1-10. doi: 10.1006/dbio.1993.1054
- Colman, H., Nabekura, J. et Lichtman, J. W. (1997). Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science*, 275(5298), 356-361.
- Cote, P. D., Moukhles, H., Lindenbaum, M. et Carbonetto, S. (1999). Chimaeric mice deficient in dystroglycans develop muscular dystrophy and have disrupted myoneural synapses. *Nat Genet*, 23(3), 338-342. doi: 10.1038/15519
- Coue, M., Brenner, S. L., Spector, I. et Korn, E. D. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett*, 213(2), 316-318.
- Couteaux, R. et Pecot-Dechavassine, M. (1970). [Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 271(25), 2346-2349.
- Culican, S. M., Nelson, C. C. et Lichtman, J. W. (1998). Axon withdrawal during synapse elimination at the neuromuscular junction is accompanied by disassembly of the postsynaptic specialization and withdrawal of Schwann cell processes. *J Neurosci*, 18(13), 4953-4965.
- Darabid, H., Arbour, D. et Robitaille, R. (2013). Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci*, 33(4), 1297-1313. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2935-12.2013
- Darabid, H., Perez-Gonzalez, A. P. et Robitaille, R. (2014). Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nat Rev Neurosci*, 15(11), 703-718.
- Darabid, H., St-Pierre-See, A. et Robitaille, R. (2018). Purinergic-Dependent Glial Regulation of Synaptic Plasticity of Competing Terminals and Synapse Elimination at the Neuromuscular Junction. *Cell Rep*, 25(8), 2070-2082 e2076. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.075
- David, G. et Barrett, E. F. (2000). Stimulation-evoked increases in cytosolic [Ca(2+)] in mouse motor nerve terminals are limited by mitochondrial uptake and are temperature-dependent. *J Neurosci*, 20(19), 7290-7296.
- Day, N. C., Wood, S. J., Ince, P. G., Volsen, S. G., Smith, W., Slater, C. R. et Shaw, P. J. (1997). Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci*, 17(16), 6226-6235.
- de Lera Ruiz, M. et Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem*, 58(18), 7093-7118. doi: 10.1021/jm501981g
- De Robertis, E. D. et Bennett, H. S. (1955). Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J Biophys Biochem Cytol*, 1(1), 47-58.
- DeChiara, T. M., Bowen, D. C., Valenzuela, D. M., Simmons, M. V., Poueymirou, W. T., Thomas, S., . . . Yancopoulos, G. D. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell*, 85(4), 501-512.
- Del Castillo, J. et Engbaek, L. (1954). The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J Physiol*, 124(2), 370-384.

- Del Castillo, J. et Katz, B. (1954a). The membrane change produced by the neuromuscular transmitter. *J Physiol*, 125(3), 546-565.
- Del Castillo, J. et Katz, B. (1954b). Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol*, 124(3), 560-573.
- Del Castillo, J. et Katz, B. (1954c). Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J Physiol*, 124(3), 574-585.
- Del Castillo, J. et Katz, B. (1956). Biophysical aspects of neuro-muscular transmission. *Prog Biophys Biophys Chem*, 6, 121-170.
- Del Castillo, J. et Stark, L. (1952). The effect of calcium ions on the motor end-plate potentials. *J Physiol*, 116(4), 507-515.
- Delaney, K. R., Zucker, R. S. et Tank, D. W. (1989). Calcium in motor nerve terminals associated with posttetanic potentiation. *J Neurosci*, 9(10), 3558-3567.
- Dijkstra, E. W. (1959). A note on two problems in connexion with graphs. *Numerische Mathematik*, 1, 269-271.
- Dillon, C. et Goda, Y. (2005). The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci*, 28, 25-55. doi: 10.1146/annurev.neuro.28.061604.135757
- Dobrunz, L. E. et Stevens, C. F. (1997). Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron*, 18(6), 995-1008.
- Dodge, F. A., Jr. et Rahamimoff, R. (1967a). Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol*, 193(2), 419-432.
- Dodge, F. A., Jr. et Rahamimoff, R. (1967b). On the relationship between calcium concentration and the amplitude of the end-plate potential. *J Physiol*, 189(2), 90P-92P.
- Doussau, F. et Augustine, G. J. (2000). The actin cytoskeleton and neurotransmitter release: an overview. *Biochimie*, 82(4), 353-363.
- Duxson, M. J. et Vrbova, G. (1985). Inhibition of acetylcholinesterase accelerates axon terminal withdrawal at the developing rat neuromuscular junction. *J Neurocytol*, 14(3), 337-363.
- Dzieciolowska, S., Drapeau, P. et Armstrong, G. A. B. (2017). Augmented quantal release of acetylcholine at the vertebrate neuromuscular junction following tdp-43 depletion. *PLoS One*, 12(5), e0177005. doi: 10.1371/journal.pone.0177005
- English, A. W. (2003). Cytokines, growth factors and sprouting at the neuromuscular junction. *J Neurocytol*, 32(5-8), 943-960. doi: 10.1023/B:NEUR.0000020634.59639.cf
- Escher, P., Lacazette, E., Courtet, M., Blindenbacher, A., Landmann, L., Bezakova, G., . . . Brenner, H. R. (2005). Synapses form in skeletal muscles lacking neuregulin receptors. *Science*, 308(5730), 1920-1923. doi: 10.1126/science.1108258
- Fahim, M. A. et Robbins, N. (1982). Ultrastructural studies of young and old mouse neuromuscular junctions. *J Neurocytol*, 11(4), 641-656.
- Fatt, P. et Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol*, 117(1), 109-128.
- Favero, M., Buffelli, M., Cangiano, A. et Busetto, G. (2010). The timing of impulse activity shapes the process of synaptic competition at the neuromuscular junction. *Neuroscience*, 167(2), 343-353. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.01.055
- Favero, M., Busetto, G. et Cangiano, A. (2012). Spike timing plays a key role in synapse elimination at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(25), E1667-1675. doi: 10.1073/pnas.1201147109
- Feng, Z. et Ko, C. P. (2008). The role of glial cells in the formation and maintenance of the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci*, 1132, 19-28. doi: 10.1196/annals.1405.016

- Fernandez-Busnadiego, R., Asano, S., Oprisoreanu, A. M., Sakata, E., Doengi, M., Kochovski, Z., . . . Lucic, V. (2013). Cryo-electron tomography reveals a critical role of RIM1alpha in synaptic vesicle tethering. *J Cell Biol*, *201*(5), 725-740. doi: 10.1083/jcb.201206063
- Fernandez-Chacon, R., Konigstorfer, A., Gerber, S. H., Garcia, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., . . . Sudhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, *410*(6824), 41-49. doi: 10.1038/35065004
- Ferns, M. J., Campanelli, J. T., Hoch, W., Scheller, R. H. et Hall, Z. (1993). The ability of agrin to cluster AChRs depends on alternative splicing and on cell surface proteoglycans. *Neuron*, *11*(3), 491-502.
- Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F. et Meldolesi, J. (1994). Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol*, *4*(1), 1-4.
- Flanagan-Steet, H., Fox, M. A., Meyer, D. et Sanes, J. R. (2005). Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development*, *132*(20), 4471-4481. doi: 10.1242/dev.02044
- Flucher, B. E. et Daniels, M. P. (1989). Distribution of Na<sup>+</sup> channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron*, *3*(2), 163-175.
- Fox, M. A., Sanes, J. R., Borza, D. B., Eswarakumar, V. P., Fassler, R., Hudson, B. G., . . . Umemori, H. (2007). Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell*, *129*(1), 179-193. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.035
- Franzini-Armstrong, C. (2018). The relationship between form and function throughout the history of excitation-contraction coupling. *J Gen Physiol*, *150*(2), 189-210. doi: 10.1085/jgp.201711889
- Friedman, J. R. et Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, *505*(7483), 335-343. doi: 10.1038/nature12985
- Fucile, S. (2004). Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*, *35*(1), 1-8.
- Fukuoka, T., Engel, A. G., Lang, B., Newsom-Davis, J., Prior, C. et Wray, D. W. (1987). Lambert-Eaton myasthenic syndrome: I. Early morphological effects of IgG on the presynaptic membrane active zones. *Ann Neurol*, *22*(2), 193-199. doi: 10.1002/ana.410220203
- Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J. et Hopkins, C. R. (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*, *132*(6), 1011-1023.
- Gaffield, M. A. et Betz, W. J. (2006). Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. *Nat Protoc*, *1*(6), 2916-2921. doi: 10.1038/nprot.2006.476
- Gan, Q. et Watanabe, S. (2018). Synaptic Vesicle Endocytosis in Different Model Systems. *Front Cell Neurosci*, *12*, 171. doi: 10.3389/fncel.2018.00171
- Gan, W. B. et Lichtman, J. W. (1998). Synaptic segregation at the developing neuromuscular junction. *Science*, *282*(5393), 1508-1511.
- Garratt, A. N., Britsch, S. et Birchmeier, C. (2000). Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays*, *22*(11), 987-996. doi: 10.1002/1521-1878(200011)22:11<987::AID-BIES5>3.0.CO;2-5



- Gautam, M., Noakes, P. G., Moscoso, L., Rupp, F., Scheller, R. H., Merlie, J. P. et Sanes, J. R. (1996). Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*, 85(4), 525-535.
- Gautam, M., Noakes, P. G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G. C., Sanes, J. R. et Merlie, J. P. (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*, 377(6546), 232-236. doi: 10.1038/377232a0
- Georgiou, J. et Charlton, M. P. (1999). Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia*, 27(2), 101-109.
- Georgiou, J., Robitaille, R. et Charlton, M. P. (1999). Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci*, 19(10), 3836-3846.
- Ginsborg, B. L. et Hirst, G. D. (1972). The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J Physiol*, 224(3), 629-645.
- Glazner, G. W., Yadav, K., Fitzgerald, S., Coven, E., Breneman, D. E. et Nelson, P. G. (1997). Cholinergic stimulation increases thrombin activity and gene expression in cultured mouse muscle. *Brain Res Dev Brain Res*, 99(2), 148-154.
- Goodearl, A. D., Yee, A. G., Sandrock, A. W., Jr., Corfas, G. et Fischbach, G. D. (1995). ARIA is concentrated in the synaptic basal lamina of the developing chick neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 130(6), 1423-1434.
- Haimovich, B., Bonilla, E., Casadei, J. et Barchi, R. (1984). Immunocytochemical localization of the mammalian voltage-dependent sodium channel using polyclonal antibodies against the purified protein. *J Neurosci*, 4(9), 2259-2268.
- Han, Y., Kaeser, P. S., Sudhof, T. C. et Schneggenburger, R. (2011). RIM determines Ca(2)+ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron*, 69(2), 304-316. doi: 10.1016/j.neuron.2010.12.014
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. New York,: Wiley.
- Hesser, B. A., Henschel, O. et Witzemann, V. (2006). Synapse disassembly and formation of new synapses in postnatal muscle upon conditional inactivation of MuSK. *Mol Cell Neurosci*, 31(3), 470-480. doi: 10.1016/j.mcn.2005.10.020
- Heuser, J. (1981). Preparing biological samples for stereomicroscopy by the quick-freeze, deep-etch, rotary-replication technique. *Methods Cell Biol*, 22, 97-122.
- Heuser, J. E. et Reese, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 57(2), 315-344.
- Hirokawa, N., Sobue, K., Kanda, K., Harada, A. et Yorifuji, H. (1989). The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin I. *J Cell Biol*, 108(1), 111-126.
- Hodgkin, A. L. et Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117(4), 500-544.
- Hubel, D. H. et Wiesel, T. N. (1965). Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J Neurophysiol*, 28(6), 1041-1059. doi: 10.1152/jn.1965.28.6.1041
- Huijbers, M. G., Zhang, W., Klooster, R., Niks, E. H., Friese, M. B., Straasheijm, K. R., . . . Verschuuren, J. J. (2013). MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(51), 20783-20788. doi: 10.1073/pnas.1313944110

- Hume, R. I., Role, L. W. et Fischbach, G. D. (1983). Acetylcholine release from growth cones detected with patches of acetylcholine receptor-rich membranes. *Nature*, 305(5935), 632-634.
- Hunter, D. D., Shah, V., Merlie, J. P. et Sanes, J. R. (1989). A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature*, 338(6212), 229-234. doi: 10.1038/338229a0
- Hurtado, E., Cilleros, V., Nadal, L., Simo, A., Obis, T., Garcia, N., . . . Tomas, J. (2017). Muscle Contraction Regulates BDNF/TrkB Signaling to Modulate Synaptic Function through Presynaptic cPKCalpha and cPKCbeta. *Front Mol Neurosci*, 10, 147. doi: 10.3389/fnmol.2017.00147
- Jacobson, C., Cote, P. D., Rossi, S. G., Rotundo, R. L. et Carbonetto, S. (2001). The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J Cell Biol*, 152(3), 435-450.
- Jahromi, B. S., Robitaille, R. et Charlton, M. P. (1992). Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron*, 8(6), 1069-1077.
- Je, H. S., Yang, F., Ji, Y., Nagappan, G., Hempstead, B. L. et Lu, B. (2012). Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(39), 15924-15929. doi: 10.1073/pnas.1207767109
- Je, H. S., Yang, F., Ji, Y., Potluri, S., Fu, X. Q., Luo, Z. G., . . . Lu, B. (2013). ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions. *J Neurosci*, 33(24), 9957-9962. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0163-13.2013
- Jennings, C. (1994). Developmental neurobiology. Death of a synapse. *Nature*, 372(6506), 498-499. doi: 10.1038/372498a0
- Jing, L., Lefebvre, J. L., Gordon, L. R. et Granato, M. (2009). Wnt signals organize synaptic prepattern and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor. *Neuron*, 61(5), 721-733. doi: 10.1016/j.neuron.2008.12.025
- Juranek, J., Mukherjee, K., Rickmann, M., Martens, H., Calka, J., Sudhof, T. C. et Jahn, R. (2006). Differential expression of active zone proteins in neuromuscular junctions suggests functional diversification. *Eur J Neurosci*, 24(11), 3043-3052. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05183.x
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A. et Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of neural science*. (5<sup>e</sup> éd.). New York: McGraw-Hill Medical.
- Katz, B. (1969). *The release of neural transmitter substances*. Springfield.
- Katz, B. et Miledi, R. (1965a). The Effect of Calcium on Acetylcholine Release from Motor Nerve Terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 161, 496-503.
- Katz, B. et Miledi, R. (1965b). Propagation of Electric Activity in Motor Nerve Terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 161, 453-482.
- Katz, B. et Miledi, R. (1967). The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol*, 189(3), 535-544.
- Katz, B. et Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol*, 195(2), 481-492.
- Katz, B. et Miledi, R. (1969). Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *J Physiol*, 203(3), 689-706.

- Katz, E., Protti, D. A., Ferro, P. A., Rosato Siri, M. D. et Uchitel, O. D. (1997). Effects of Ca<sup>2+</sup> channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. *Br J Pharmacol*, 121(8), 1531-1540. doi: 10.1038/sj.bjp.0701290
- Keller-Peck, C. R., Feng, G., Sanes, J. R., Yan, Q., Lichtman, J. W. et Snider, W. D. (2001). Glial cell line-derived neurotrophic factor administration in postnatal life results in motor unit enlargement and continuous synaptic remodeling at the neuromuscular junction. *J Neurosci*, 21(16), 6136-6146.
- Kelly, A. M. et Zacks, S. I. (1969). The fine structure of motor endplate morphogenesis. *J Cell Biol*, 42(1), 154-169.
- Kim, C. H. et Lisman, J. E. (1999). A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *J Neurosci*, 19(11), 4314-4324.
- Kim, N. et Burden, S. J. (2008). MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nat Neurosci*, 11(1), 19-27. doi: 10.1038/nn2026
- Kim, N., Stiegler, A. L., Cameron, T. O., Hallock, P. T., Gomez, A. M., Huang, J. H., . . . Burden, S. J. (2008). Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell*, 135(2), 334-342. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.002
- Knight, D., Tolley, L. K., Kim, D. K., Lavidis, N. A. et Noakes, P. G. (2003). Functional analysis of neurotransmission at beta2-laminin deficient terminals. *J Physiol*, 546(Pt 3), 789-800.
- Ko, C. P. (1985). Formation of the active zone at developing neuromuscular junctions in larval and adult bullfrogs. *J Neurocytol*, 14(3), 487-512.
- Ko, C. P. (1987). A lectin, peanut agglutinin, as a probe for the extracellular matrix in living neuromuscular junctions. *J Neurocytol*, 16(4), 567-576.
- Ko, C. P. et Chen, L. (1996). Synaptic remodeling revealed by repeated in vivo observations and electron microscopy of identified frog neuromuscular junctions. *J Neurosci*, 16(5), 1780-1790.
- Ko, C. P. et Robitaille, R. (2015). Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(10), a020503. doi: 10.1101/cshperspect.a020503
- Kong, X. C., Barzaghi, P. et Ruegg, M. A. (2004). Inhibition of synapse assembly in mammalian muscle in vivo by RNA interference. *EMBO Rep*, 5(2), 183-188. doi: 10.1038/sj.embor.7400065
- Kopp, D. M., Perkel, D. J. et Balice-Gordon, R. J. (2000). Disparity in neurotransmitter release probability among competing inputs during neuromuscular synapse elimination. *J Neurosci*, 20(23), 8771-8779.
- Krejci, E., Thomine, S., Boschetti, N., Legay, C., Sketelj, J. et Massoulie, J. (1997). The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J Biol Chem*, 272(36), 22840-22847.
- Kuffler, S. W. et Yoshikami, D. (1975). The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J Physiol*, 251(2), 465-482.
- Kúla 3D Ltd. (n.d.). Learn How to Free-View Stereoscopic Images. Repéré à <https://www.kula3d.com/how-to-use-the-cross-eyed-method>
- Li, Y., Camp, S., Rachinsky, T. L., Getman, D. et Taylor, P. (1991). Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J Biol Chem*, 266(34), 23083-23090.

- Li, Z. et Sheng, M. (2003). Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(11), 833-841. doi: 10.1038/nrm1242
- Lin, W., Burgess, R. W., Dominguez, B., Pfaff, S. L., Sanes, J. R. et Lee, K. F. (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature*, 410(6832), 1057-1064. doi: 10.1038/35074025
- Linden, D. C., Jerian, S. M. et Letinsky, M. S. (1988). Neuromuscular junction development in the cutaneous pectoris muscle of *Rana catesbeiana*. *Exp Neurol*, 99(3), 735-760.
- Long, J. B. et Van Vactor, D. (2013). Embryonic and larval neural connectivity: progressive changes in synapse form and function at the neuromuscular junction mediated by cytoskeletal regulation. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2(6), 747-765. doi: 10.1002/wdev.114
- Love, F. M. et Thompson, W. J. (1998). Schwann cells proliferate at rat neuromuscular junctions during development and regeneration. *J Neurosci*, 18(22), 9376-9385.
- Lubischer, J. L. et Bebinger, D. M. (1999). Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction. *J Neurosci*, 19(24), RC46.
- Lukas, R. J., Morimoto, H., Hanley, M. R. et Bennett, E. L. (1981). Radiolabeled alpha-bungarotoxin derivatives: kinetic interaction with nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry*, 20(26), 7373-7378.
- Lupa, M. T. et Hall, Z. W. (1989). Progressive restriction of synaptic vesicle protein to the nerve terminal during development of the neuromuscular junction. *J Neurosci*, 9(11), 3937-3945.
- Magchielse, T. et Meeter, E. (1986). The effect of neuronal activity on the competitive elimination of neuromuscular junctions in tissue culture. *Brain Res*, 390(2), 211-220.
- Magleby, K. L. et Zengel, J. E. (1976a). Augmentation: A process that acts to increase transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 257(2), 449-470.
- Magleby, K. L. et Zengel, J. E. (1976b). Long term changes in augmentation, potentiation, and depression of transmitter release as a function of repeated synaptic activity at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 257(2), 471-494.
- Magleby, K. L. et Zengel, J. E. (1982). A quantitative description of stimulation-induced changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Gen Physiol*, 80(4), 613-638.
- Major, L. A., Hegedus, J., Weber, D. J., Gordon, T. et Jones, K. E. (2007). Method for counting motor units in mice and validation using a mathematical model. *J Neurophysiol*, 97(2), 1846-1856. doi: 10.1152/jn.00904.2006
- Martin, A. R. (1994). Amplification of neuromuscular transmission by postjunctional folds. *Proc Biol Sci*, 258(1353), 321-326.
- McMahan, U. J. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 55, 407-418.
- Meissner, G. (2017). The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *J Gen Physiol*, 149(12), 1065-1089. doi: 10.1085/jgp.201711878
- Menon, K. P., Carrillo, R. A. et Zinn, K. (2013). Development and plasticity of the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2(5), 647-670. doi: 10.1002/wdev.108
- Meunier, F. A., Nguyen, T. H., Colasante, C., Luo, F., Sullivan, R. K., Lavidis, N. A., . . . Schiavo, G. (2010). Sustained synaptic-vesicle recycling by bulk endocytosis

- contributes to the maintenance of high-rate neurotransmitter release stimulated by glycerotoxin. *J Cell Sci*, 123(Pt 7), 1131-1140. doi: 10.1242/jcs.049296
- Miledi, R., Molenaar, P. C. et Polak, R. L. (1983). Electrophysiological and chemical determination of acetylcholine release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 334, 245-254.
- Miledi, R. et Slater, C. R. (1968a). Electrophysiology and electron-microscopy of rat neuromuscular junctions after nerve degeneration. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 169(1016), 289-306.
- Miledi, R. et Slater, C. R. (1968b). Some mitochondrial changes in denervated muscle. *J Cell Sci*, 3(1), 49-54.
- Miller, T. M. et Heuser, J. E. (1984). Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 98(2), 685-698.
- Mochida, S. (2015). *Presynaptic terminals*. Tokyo: Springer.
- Motulsky, H. J. et Brown, R. E. (2006). Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics*, 7, 123. doi: 10.1186/1471-2105-7-123
- Nagwaney, S., Harlow, M. L., Jung, J. H., Szule, J. A., Ress, D., Xu, J., . . . McMahan, U. J. (2009). Macromolecular connections of active zone material to docked synaptic vesicles and presynaptic membrane at neuromuscular junctions of mouse. *J Comp Neurol*, 513(5), 457-468. doi: 10.1002/cne.21975
- Neher, E. et Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*, 59(6), 861-872. doi: 10.1016/j.neuron.2008.08.019
- Nelson, P. G., Fields, R. D., Yu, C. et Liu, Y. (1993). Synapse elimination from the mouse neuromuscular junction in vitro: a non-Hebbian activity-dependent process. *J Neurobiol*, 24(11), 1517-1530. doi: 10.1002/neu.480241106
- Ngo, S. T., Cole, R. N., Sunn, N., Phillips, W. D. et Noakes, P. G. (2012). Neuregulin-1 potentiates agrin-induced acetylcholine receptor clustering through muscle-specific kinase phosphorylation. *J Cell Sci*, 125(Pt 6), 1531-1543. doi: 10.1242/jcs.095109
- Nguyen, Q. T., Parsadanian, A. S., Snider, W. D. et Lichtman, J. W. (1998). Hyperinnervation of neuromuscular junctions caused by GDNF overexpression in muscle. *Science*, 279(5357), 1725-1729.
- Nicholls, D. G. (2002). Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(11), 1372-1381.
- Nishimune, H. (2012a). Active zones of mammalian neuromuscular junctions: formation, density, and aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1274, 24-32. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06836.x
- Nishimune, H. (2012b). Molecular mechanism of active zone organization at vertebrate neuromuscular junctions. *Mol Neurobiol*, 45(1), 1-16. doi: 10.1007/s12035-011-8216-y
- Nishimune, H., Sanes, J. R. et Carlson, S. S. (2004). A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature*, 432(7017), 580-587. doi: 10.1038/nature03112
- Nishimune, H., Valdez, G., Jarad, G., Moulson, C. L., Muller, U., Miner, J. H. et Sanes, J. R. (2008). Laminins promote postsynaptic maturation by an autocrine mechanism at the neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 182(6), 1201-1215. doi: 10.1083/jcb.200805095

- Noakes, P. G., Gautam, M., Mudd, J., Sanes, J. R. et Merlie, J. P. (1995). Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature*, 374(6519), 258-262. doi: 10.1038/374258a0
- O'Brien, R. A., Ostberg, A. J. et Vrbova, G. (1978). Observations on the elimination of polyneuronal innervation in developing mammalian skeletal muscle. *J Physiol*, 282, 571-582.
- Palay, S. L. et Palade, G. E. (1955). The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol*, 1(1), 69-88.
- Pang, Z. P., Shin, O. H., Meyer, A. C., Rosenmund, C. et Sudhof, T. C. (2006). A gain-of-function mutation in synaptotagmin-1 reveals a critical role of Ca<sup>2+</sup>-dependent soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex binding in synaptic exocytosis. *J Neurosci*, 26(48), 12556-12565. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3804-06.2006
- Panzer, J. A., Song, Y. et Balice-Gordon, R. J. (2006). In vivo imaging of preferential motor axon outgrowth to and synaptogenesis at prepatterned acetylcholine receptor clusters in embryonic zebrafish skeletal muscle. *J Neurosci*, 26(3), 934-947. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3656-05.2006
- Patton, B. L., Chiu, A. Y. et Sanes, J. R. (1998). Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft. *Nature*, 393(6686), 698-701. doi: 10.1038/31502
- Patton, B. L., Miner, J. H., Chiu, A. Y. et Sanes, J. R. (1997). Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol*, 139(6), 1507-1521.
- Peng, H. B. (1983). Cytoskeletal organization of the presynaptic nerve terminal and the acetylcholine receptor cluster in cell cultures. *J Cell Biol*, 97(2), 489-498.
- Personius, K. E. et Balice-Gordon, R. J. (2000). Activity-dependent editing of neuromuscular synaptic connections. *Brain Res Bull*, 53(5), 513-522.
- Personius, K. E. et Balice-Gordon, R. J. (2001). Loss of correlated motor neuron activity during synaptic competition at developing neuromuscular synapses. *Neuron*, 31(3), 395-408.
- Personius, K. E., Karnes, J. L. et Parker, S. D. (2008). NMDA receptor blockade maintains correlated motor neuron firing and delays synapse competition at developing neuromuscular junctions. *J Neurosci*, 28(36), 8983-8992. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5226-07.2008
- Personius, K. E., Slusher, B. S. et Udin, S. B. (2016). Neuromuscular NMDA Receptors Modulate Developmental Synapse Elimination. *J Neurosci*, 36(34), 8783-8789. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1181-16.2016
- Poisson, S. o.-D. (1837). *Recherches sur la probabilité des jugements en matière criminelle et en matière civile*. Paris,: Bachelier.
- Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36, 451-477. doi: 10.1146/annurev.biophys.35.040405.101936
- Protti, D. A. et Uchitel, O. D. (1993). Transmitter release and presynaptic Ca<sup>2+</sup> currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Neuroreport*, 5(3), 333-336.
- Purves, D. et Lichtman, J. W. (1980). Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science*, 210(4466), 153-157.
- Rama, S., Zbili, M. et Debanne, D. (2018). Signal propagation along the axon. *Curr Opin Neurobiol*, 51, 37-44. doi: 10.1016/j.conb.2018.02.017

- Rash, J. E., Walrond, J. P. et Morita, M. (1988). Structural and functional correlates of synaptic transmission in the vertebrate neuromuscular junction. *J Electron Microsc Tech*, 10(2), 153-185. doi: 10.1002/jemt.1060100204
- Reddy, L. V., Koirala, S., Sugiura, Y., Herrera, A. A. et Ko, C. P. (2003). Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron*, 40(3), 563-580.
- Redfern, P. A. (1970). Neuromuscular transmission in new-born rats. *J Physiol*, 209(3), 701-709.
- Redman, R. S. et Silinsky, E. M. (1994). ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J Physiol*, 477(Pt 1), 117-127.
- Reger, J. F. (1955). Electron microscopy of the motor end-plate in rat intercostal muscle. *Anat Rec*, 122(1), 1-15.
- Reger, J. F. (1958). The fine structure of neuromuscular synapses of gastrocnemii from mouse and frog. *Anat Rec*, 130(1), 7-23.
- Reist, N. E. et Smith, S. J. (1992). Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(16), 7625-7629.
- Rheuben, M. B., Autio, D. M., Xu, Y. F. et Atchison, W. D. (2004). Morphometric characterization of the neuromuscular junction of rodents intoxicated with 2,4-dithiobiuret: evidence that nerve terminal recycling processes contribute to muscle weakness. *Toxicol Appl Pharmacol*, 196(2), 266-286. doi: 10.1016/j.taap.2004.01.004
- Ribchester, R. R. et Taxt, T. (1983). Motor unit size and synaptic competition in rat lumbrical muscles reinnervated by active and inactive motor axons. *J Physiol*, 344, 89-111.
- Richards, D. A., Guatimosim, C. et Betz, W. J. (2000). Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron*, 27(3), 551-559.
- Richards, D. A., Guatimosim, C., Rizzoli, S. O. et Betz, W. J. (2003). Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron*, 39(3), 529-541.
- Richards, D. A., Rizzoli, S. O. et Betz, W. J. (2004). Effects of wortmannin and latrunculin A on slow endocytosis at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 557(Pt 1), 77-91. doi: 10.1113/jphysiol.2004.062158
- Ridge, R. M. et Betz, W. J. (1984). The effect of selective, chronic stimulation on motor unit size in developing rat muscle. *J Neurosci*, 4(10), 2614-2620.
- Rieckhof, G. E., Yoshihara, M., Guan, Z. et Littleton, J. T. (2003). Presynaptic N-type calcium channels regulate synaptic growth. *J Biol Chem*, 278(42), 41099-41108. doi: 10.1074/jbc.M306417200
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G. R. et Birchmeier, C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*, 389(6652), 725-730. doi: 10.1038/39593
- Rimer, M., Cohen, I., Lomo, T., Burden, S. J. et McMahan, U. J. (1998). Neuregulins and erbB receptors at neuromuscular junctions and at agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle. *Mol Cell Neurosci*, 12(1-2), 1-15. doi: 10.1006/mcne.1998.0695
- Rizzoli, S. O. et Betz, W. J. (2004). The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science*, 303(5666), 2037-2039. doi: 10.1126/science.1094682
- Robertson, J. D. (1956). The ultrastructure of a reptilian myoneural junction. *J Biophys Biochem Cytol*, 2(4), 381-394.

- Robertson, J. D. (1957). The ultrastructure of frog muscle spindles, motor endings and nerve fibres. *J Physiol*, 137(1), 6-8P.
- Robitaille, R. (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, R. (1998). Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron*, 21(4), 847-855.
- Robitaille, R., Adler, E. M. et Charlton, M. P. (1990). Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron*, 5(6), 773-779.
- Robitaille, R., Adler, E. M. et Charlton, M. P. (1993). Calcium channels and calcium-gated potassium channels at the frog neuromuscular junction. *J Physiol Paris*, 87(1), 15-24.
- Robitaille, R. et Charlton, M. P. (1992). Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J Neurosci*, 12(1), 297-305.
- Robitaille, R., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J. et Charlton, M. P. (1993). Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron*, 11(4), 645-655.
- Robitaille, R., Jahromi, B. S. et Charlton, M. P. (1997). Muscarinic Ca<sup>2+</sup> responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 504 ( Pt 2), 337-347.
- Robitaille, R., Thomas, S. et Charlton, M. P. (1999). Effects of adenosine on Ca<sup>2+</sup> entry in the nerve terminal of the frog neuromuscular junction. *Can J Physiol Pharmacol*, 77(9), 707-714.
- Rochon, D., Rouse, I. et Robitaille, R. (2001). Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci*, 21(11), 3819-3829.
- Rosenthal, J. L. et Taraskevich, P. S. (1977). Reduction of multi-axonal innervation at the neuromuscular junction of the rat during development. *J Physiol*, 270(2), 299-310.
- Rouse, I., St-Amour, A., Darabid, H. et Robitaille, R. (2010). Synapse-glia interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties. *Neuroscience*, 167(3), 621-632. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.02.036
- Rowley, K. L., Mantilla, C. B., Ermilov, L. G. et Sieck, G. C. (2007). Synaptic vesicle distribution and release at rat diaphragm neuromuscular junctions. *J Neurophysiol*, 98(1), 478-487. doi: 10.1152/jn.00251.2006
- Ruff, R. L. (2003). Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. *Ann N Y Acad Sci*, 998, 1-10.
- Ruiz, R., Cano, R., Casanas, J. J., Gaffield, M. A., Betz, W. J. et Tabares, L. (2011). Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J Neurosci*, 31(6), 2000-2008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011
- Saheki, Y. et De Camilli, P. (2012). Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a005645. doi: 10.1101/cshperspect.a005645
- Saito, A. et Zacks, S. I. (1969). Ultrastructure of Schwann and perineural sheaths at the mouse neuromuscular junction. *Anat Rec*, 164(4), 379-390. doi: 10.1002/ar.1091640401
- Salpeter, M. M. (1987). *The Vertebrate neuromuscular junction*. New York: Liss.
- Sandow, A. (1952). Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J Biol Med*, 25(3), 176-201.



- Sandrock, A. W., Jr., Dryer, S. E., Rosen, K. M., Gozani, S. N., Kramer, R., Theill, L. E. et Fischbach, G. D. (1997). Maintenance of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction in vivo. *Science*, 276(5312), 599-603.
- Sanes, D. H., Harris, W. A. et Reh, T. A. (2012). *Development of the nervous system* (3<sup>e</sup> éd.). doi: 9786612994203
- Sanes, J. R. et Lichtman, J. W. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci*, 22, 389-442. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.389
- Sanes, J. R. et Lichtman, J. W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci*, 2(11), 791-805. doi: 10.1038/35097557
- Searl, T. J. et Silinsky, E. M. (2006). Modulation of calcium-dependent and -independent acetylcholine release from motor nerve endings. *J Mol Neurosci*, 30(1-2), 215-218. doi: 10.1385/JMN:30:1:215
- Shupliakov, O., Low, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., . . . Brodin, L. (1997). Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science*, 276(5310), 259-263.
- Silinsky, E. M. (1980). Evidence for specific adenosine receptors at cholinergic nerve endings. *Br J Pharmacol*, 71(1), 191-194.
- Silinsky, E. M. (2004). Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J Physiol*, 558(Pt 2), 389-401. doi: 10.1113/jphysiol.2004.061457
- Silinsky, E. M. et Solsona, C. S. (1992). Calcium currents at motor nerve endings: absence of effects of adenosine receptor agonists in the frog. *J Physiol*, 457, 315-328.
- Simo, A., Cilleros-Mane, V., Just-Borras, L., Hurtado, E., Nadal, L., Tomas, M., . . . Tomas, J. (2019). nPKCepsilon Mediates SNAP-25 Phosphorylation of Ser-187 in Basal Conditions and After Synaptic Activity at the Neuromuscular Junction. *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-018-1462-5
- Singer, S. J. et Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731.
- Singhal, N. et Martin, P. T. (2011). Role of extracellular matrix proteins and their receptors in the development of the vertebrate neuromuscular junction. *Dev Neurobiol*, 71(11), 982-1005. doi: 10.1002/dneu.20953
- Slater, C. R. (2008). Reliability of neuromuscular transmission and how it is maintained. *Handb Clin Neurol*, 91, 27-101. doi: 10.1016/S0072-9752(07)01502-3
- Slater, C. R. (2015). The functional organization of motor nerve terminals. *Prog Neurobiol*, 134, 55-103. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.004
- Smith, I. W., Mikesh, M., Lee, Y. et Thompson, W. J. (2013). Terminal Schwann cells participate in the competition underlying neuromuscular synapse elimination. *J Neurosci*, 33(45), 17724-17736. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3339-13.2013
- Snider, W. D. et Lichtman, J. W. (1996). Are neurotrophins synaptotrophins? *Mol Cell Neurosci*, 7(6), 433-442. doi: 10.1006/mcne.1996.0031
- Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. et Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362(6418), 318-324. doi: 10.1038/362318a0
- Son, Y. J. et Thompson, W. J. (1995a). Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron*, 14(1), 133-141.

- Son, Y. J. et Thompson, W. J. (1995b). Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron*, 14(1), 125-132.
- Son, Y. J., Trachtenberg, J. T. et Thompson, W. J. (1996). Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci*, 19(7), 280-285. doi: 10.1016/S0166-2236(96)10032-1
- Song, J. W., Misgeld, T., Kang, H., Knecht, S., Lu, J., Cao, Y., . . . Lichtman, J. W. (2008). Lysosomal activity associated with developmental axon pruning. *J Neurosci*, 28(36), 8993-9001. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0720-08.2008
- Sorensen, J. B., Fernandez-Chacon, R., Sudhof, T. C. et Neher, E. (2003). Examining synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca<sup>2+</sup>. *J Gen Physiol*, 122(3), 265-276. doi: 10.1085/jgp.200308855
- Stent, G. S. (1973). A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(4), 997-1001.
- Stoop, R. et Poo, M. M. (1995). Potentiation of transmitter release by ciliary neurotrophic factor requires somatic signaling. *Science*, 267(5198), 695-699.
- Stoop, R. et Poo, M. M. (1996). Synaptic modulation by neurotrophic factors: differential and synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci*, 16(10), 3256-3264.
- Sudhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3), 675-690. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.022
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., . . . Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4), 831-846. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.030
- Takeuchi, A. et Takeuchi, N. (1960). On the permeability of end-plate membrane during the action of transmitter. *J Physiol*, 154, 52-67.
- Tam, S. L. et Gordon, T. (2003). Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *J Neurobiol*, 57(2), 221-234. doi: 10.1002/neu.10276
- Tang, J., Maximov, A., Shin, O. H., Dai, H., Rizo, J. et Sudhof, T. C. (2006). A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell*, 126(6), 1175-1187. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.030
- Tang, Y. et Zucker, R. S. (1997). Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron*, 18(3), 483-491.
- Tapia, J. C., Wylie, J. D., Kasthuri, N., Hayworth, K. J., Schalek, R., Berger, D. R., . . . Lichtman, J. W. (2012). Pervasive synaptic branch removal in the mammalian neuromuscular system at birth. *Neuron*, 74(5), 816-829. doi: 10.1016/j.neuron.2012.04.017
- Thompson, W. (1983). Synapse elimination in neonatal rat muscle is sensitive to pattern of muscle use. *Nature*, 302(5909), 614-616.
- Thompson, W., Kuffler, D. P. et Jansen, J. K. (1979). The effect of prolonged, reversible block of nerve impulses on the elimination of polyneuronal innervation of new-born rat skeletal muscle fibers. *Neuroscience*, 4(2), 271-281.
- Todd, K. J., Auld, D. S. et Robitaille, R. (2007). Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci*, 25(5), 1287-1296. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05385.x

- Todd, K. J., Darabid, H. et Robitaille, R. (2010). Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction. *J Neurosci*, 30(35), 11870-11882. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3165-10.2010
- Tokoro, T., Higa, S., Deguchi-Tawarada, M., Inoue, E., Kitajima, I. et Ohtsuka, T. (2007). Localization of the active zone proteins CAST, ELKS, and Piccolo at neuromuscular junctions. *Neuroreport*, 18(4), 313-316. doi: 10.1097/WNR.0b013e3280287abe
- Tremblay, E., Martineau, É. et Robitaille, R. (2017). Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model: When Motor Units Matter. *J Neurosci*, 37(37), 8901-8918. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3090-16.2017
- Turney, S. G. et Lichtman, J. W. (2012). Reversing the outcome of synapse elimination at developing neuromuscular junctions in vivo: evidence for synaptic competition and its mechanism. *PLoS Biol*, 10(6), e1001352. doi: 10.1371/journal.pbio.1001352
- Tyc, F. et Vrbova, G. (1995). Stabilisation of neuromuscular junctions by leupeptin increases motor unit size in partially denervated rat muscles. *Brain Res Dev Brain Res*, 88(2), 186-193.
- Uchitel, O. D., Protti, D. A., Sanchez, V., Cherksey, B. D., Sugimori, M. et Llinas, R. (1992). P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(8), 3330-3333.
- Urbano, F. J., Rosato-Siri, M. D. et Uchitel, O. D. (2002). Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions (Review). *Mol Membr Biol*, 19(4), 293-300. doi: 10.1080/0968768021000035087
- Valenzuela, D. M., Stitt, T. N., DiStefano, P. S., Rojas, E., Mattsson, K., Compton, D. L., . . . et al. (1995). Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron*, 15(3), 573-584.
- VanSaun, M., Herrera, A. A. et Werle, M. J. (2003). Structural alterations at the neuromuscular junctions of matrix metalloproteinase 3 null mutant mice. *J Neurocytol*, 32(9), 1129-1142. doi: 10.1023/B:NEUR.0000021907.68461.9c
- VanSaun, M., Humburg, B. C., Arnett, M. G., Pence, M. et Werle, M. J. (2007). Activation of Matrix Metalloproteinase-3 is altered at the frog neuromuscular junction following changes in synaptic activity. *Dev Neurobiol*, 67(11), 1488-1497. doi: 10.1002/dneu.20523
- VanSaun, M. et Werle, M. J. (2000). Matrix metalloproteinase-3 removes agrin from synaptic basal lamina. *J Neurobiol*, 43(2), 140-149.
- Vautrin, J. et Mambrini, J. (1989). Synaptic current between neuromuscular junction folds. *J Theor Biol*, 140(4), 479-498.
- Vock, V. M., Ponomareva, O. N. et Rimer, M. (2008). Evidence for muscle-dependent neuromuscular synaptic site determination in mammals. *J Neurosci*, 28(12), 3123-3130. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5080-07.2008
- Volterra, A., Magistretti, P. J. et Haydon, P. G. (2002). *The tripartite synapse : glia in synaptic transmission*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Wachman, E. S., Poage, R. E., Stiles, J. R., Farkas, D. L. et Meriney, S. D. (2004). Spatial Distribution of Calcium Entry Evoked by Single Action Potentials within the Presynaptic Active Zone. *J Neurosci*, 24(12), 2877-2885. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1660-03.2004

- Walsh, M. K. et Lichtman, J. W. (2003). In vivo time-lapse imaging of synaptic takeover associated with naturally occurring synapse elimination. *Neuron*, 37(1), 67-73.
- Wang, X., Li, Y., Engisch, K. L., Nakanishi, S. T., Dodson, S. E., Miller, G. W., . . . Rich, M. M. (2005). Activity-dependent presynaptic regulation of quantal size at the mammalian neuromuscular junction in vivo. *J Neurosci*, 25(2), 343-351. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3252-04.2005
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K. et Sudhof, T. C. (1997). Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, 388(6642), 593-598. doi: 10.1038/41580
- Weatherbee, S. D., Anderson, K. V. et Niswander, L. A. (2006). LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development*, 133(24), 4993-5000. doi: 10.1242/dev.02696
- Werle, M. J. et VanSaun, M. (2003). Activity dependent removal of agrin from synaptic basal lamina by matrix metalloproteinase 3. *J Neurocytol*, 32(5-8), 905-913. doi: 10.1023/B:NEUR.0000020631.69804.f5
- Westenbroek, R. E., Hoskins, L. et Catterall, W. A. (1998). Localization of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci*, 18(16), 6319-6330.
- Wiesel, T. N. et Hubel, D. H. (1965). Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *J Neurophysiol*, 28(6), 1029-1040. doi: 10.1152/jn.1965.28.6.1029
- Wood, S. J. et Slater, C. R. (1997). The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles. *J Physiol*, 500 (Pt 1), 165-176.
- Wood, S. J. et Slater, C. R. (2001). Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol*, 64(4), 393-429.
- Wu, H., Xiong, W. C. et Mei, L. (2010). To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development*, 137(7), 1017-1033. doi: 10.1242/dev.038711
- Wuerker, R. B. et Kirkpatrick, J. B. (1972). Neuronal microtubules, neurofilaments, and microfilaments. *Int Rev Cytol*, 33, 45-75.
- Wyatt, R. M. et Balice-Gordon, R. J. (2003). Activity-dependent elimination of neuromuscular synapses. *J Neurocytol*, 32(5-8), 777-794. doi: 10.1023/B:NEUR.0000020623.62043.33
- Yang, J. F., Cao, G., Koirala, S., Reddy, L. V. et Ko, C. P. (2001). Schwann cells express active agrin and enhance aggregation of acetylcholine receptors on muscle fibers. *J Neurosci*, 21(24), 9572-9584.
- Yang, X., Arber, S., William, C., Li, L., Tanabe, Y., Jessell, T. M., . . . Burden, S. J. (2001). Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron*, 30(2), 399-410.
- Yang, X., Li, W., Prescott, E. D., Burden, S. J. et Wang, J. C. (2000). DNA topoisomerase IIbeta and neural development. *Science*, 287(5450), 131-134.
- Yee, V. C., Pestronk, A., Alderson, K. et Yuan, C. M. (1988). Regional heterogeneity in the distal motor axon: three zones with distinctive intrinsic components. *J Neurocytol*, 17(5), 649-656.
- Young, S. H. et Poo, M. M. (1983). Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurones. *Nature*, 305(5935), 634-637.

- Yumoto, N., Kim, N. et Burden, S. J. (2012). Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature*, 489(7416), 438-442. doi: 10.1038/nature11348
- Zhai, R. G. et Bellen, H. J. (2004). The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda)*, 19, 262-270. doi: 10.1152/physiol.00014.2004
- Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W. C. et Mei, L. (2008). LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron*, 60(2), 285-297. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.006
- Zhang, W. et Benson, D. L. (2001). Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J Neurosci*, 21(14), 5169-5181.
- Zhou, F. Q., Waterman-Storer, C. M. et Cohan, C. S. (2002). Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *J Cell Biol*, 157(5), 839-849. doi: 10.1083/jcb.200112014
- Zimmermann, H. (1994). Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci*, 17(10), 420-426.

# Annexe I Code source du plugiciel de détermination des seuils d'intensité

```
1
2 // "Thresholding" - ImageJ Macro
3 //
4 // Author: Alexandre St-Pierre-See
5 // Copyright, May 2017
6 //
7 // The objective of this macro is to establish an unbiased threshold
8 // seperating specific signal from background and non-specific signal.
9
10 macro "Thresholding Action Tool - C0a0L18f8L818f" {
11
12 // Identify and access the selected image.
13 var img1 = getImageID();
14 selectImage(img1);
15
16 // Declare all needed variables and Initialize totalApprox to 0.
17 var min, max, range, newRange, stepNumber, increment, newIncrement, thisMax, startMax, endMax;
18 var preApprox, totalApprox, approx, preThresh, totalThresh, threshold;
19 totalApprox = 0;
20
21 // Get the min and max pixel values of the selected image.
22 getMinAndMax(min, max);
23 range = max - min;
24
25 // Present a dialog to the user asking him to select the Step number
26 // and select if image is considered to have high background or non specific labelling.
27 Dialog.create("Thresholding");
28 Dialog.addNumber("Step number", 20);
29 Dialog.addCheckbox("High background", false);
30 Dialog.show();
31
32 // Step number: Divide the range of the image pixel values in stepNumber bins of stepSize size.
33 // By default, Step number = 20.
34 stepNumber = Dialog.getNumber();
35 highBG = Dialog.getCheckbox();
36 increment = (range / stepNumber);
37 increment = floor(increment);
38
39 // Start with a clean list.
40 List.clear();
41
```

```

42
43 // Gets an approximation of the signal threshold (approx)
44 // which will serve as input for the next steps of the algorithm.
45 //
46 // This approx is the average of stepNumber initial pre-approximations.
47 //
48 // The objective of each pre-approximation:
49 //     establish what would be the threshold of the signal if all pixels between
50 //     min and thisMax were considered background.
51 //
52 // For each pre-approximation (done stepNumber times):
53 //     i) The minimum value is always the images' min pixel value.
54 //     ii) Set thisMax to min + (increment * i).
55 //         ie: If min = 0, stepSize = 60, i = 3, then: thisMax = 180
56 //     iii) Run getApprox with min, thisMax and the selected image (img1) as parameters.
57 //          See the getApprox(max, min, img) declaration lower.
58 //     iv) Add the result of this pre-approximation to all previous pre-approximations.
59 //
60 // At the end of the algorithm, the cumulative of all pre-approximation will be divided by
61 // stepNumber to establish the average approximation.
62 for (i = 1; i <= stepNumber; i++) {
63
64     // ii)
65     // If this is the last pre-approximation, set thisMax to max.
66     // If not, set thisMax to min + (increment * i).
67     if (i == stepNumber) {
68         thisMax = max;
69     }
70     else {
71         thisMax = (i * increment) + min;
72     }
73
74     // iii)
75     // Get this pre_approximation.
76     preApprox = getApprox(thisMax, min, img1);
77
78     // iv)
79     // Add result of this pre-approximation to previous ones.
80     totalApprox = totalApprox + preApprox;
81
82 }
83
84 // Once all pre-approximations are done:
85 //     Divide the cumulative pre-approximations by the number of pre-approximations
86 //     (finalApprox = average of all previous pre-approximations).
87 approx = totalApprox / stepNumber;
88
89
90
91
92
93
94

```

```

95
96 // Check if image is considered to have high background or non specific labelling.
97 if (highBG == true) {
98
99     // The image was considered to have high background or non specific labelling
100    // 1) Set the starting value to approx + ((max - approx)/2).
101    // 1) Set the ending value to max.
102    startMax = approx + ((max - approx) / 2);
103    endMax = max
104
105 }
106 else if (highBG == false) {
107
108    // The image was considered to have low background or non specific labelling.
109    // 1) Set the starting value to approx.
110    // 2) Set the ending value to approx + ((max - approx)/4).
111    startMax = approx;
112    endMax = approx + ((max - approx) / 4);
113
114 }
115
116 // 1) Calculate newRange and 2-3) establish newIncrement.
117 newRange = endMax - startMax;
118 newIncrement = (newRange / (stepNumber - 1));
119 newIncrement = floor(newIncrement);
120
121 // Establishes the threshold according to the determined approximation (approx).
122 // The procedure is essentially the same as with the determination of approx,
123 // but with the adapted starting (startMax), ending (endMax) and increment (newIncrement) values.
124 for (i = 0; i < stepNumber; i++) {
125
126    // If this is the last initial approximation, set thisMax to endMax.
127    // If not, set thisMax to start + (increment * i).
128    if (i == (stepNumber - 1)) {
129
130        thisMax = endMax;
131
132    }
133    else {
134
135        thisMax = (i * newIncrement) + startMax;
136
137    }
138
139    // 1) Get this pre_approximation
140    // 2) Add result of this pre-approximation to previous ones
141    preThresh = getApprox(thisMax, min, img1);
142    totalThresh = totalThresh + preThresh;
143
144 }
145
146 // Once all pre-thresholds are done: threshold = average of all previous pre-thresholds.
147 threshold = totalThresh / stepNumber;
148

```



```

149
150 // 1) Select initial image.
151 // 2) Duplicate it (run).
152 // 3) Set thresholds according to the determined threshold (setThreshold).
153 // 3) Record the determined threshold for bookeeping (setResult).
154 selectImage(img1);
155 var img1Title = getTitle();
156 var threshTitle = img1Title + "- Thresholded";
157 run("Duplicate...", "title=&threshTitle");
158 var newImage = getImageID();
159 selectImage(newImage);
160 setThreshold(threshold, maxAll, "raw");
161 setResult("Threshold", nResults - 1, threshold);
162
163 }
164
165 // Establishes an approximation of the signal threshold considering
166 // all pixels between min and max are background.
167 //
168 // The signal threshold approximation is the value which is two standard deviations
169 // from the background mean intensity.
170
171 function getApprox(thisMax, min, img1) {
172
173     // Declare required variables.
174     var mean, stddev, approx;
175
176     // Access the selected image, create a copy and access this copy.
177     selectImage(img1);
178     run("Duplicate...", "title=new");
179     var newImage = getImageID();
180     selectImage(newImage);
181
182     // Set the lower and upper thresholds of this copy image to min and thisMax.
183     setThreshold(min, thisMax, "raw");
184
185     // Restrict ensuing calculations to pixels within upper and lower thresholds.
186     List.setMeasurements("limit");
187
188     // Get the mean pixel value within established bounds.
189     // Get the standard deviation from the mean of pixel values within established bounds.
190     mean = List.getValue("Mean");
191     stddev = List.getValue("StdDev");
192
193     // The signal threshold approximation (approx) is considered to be anything
194     // which is over 2 standard deviations from background.
195     approx = (2 * stddev) + mean;
196
197     // Close the copy image and return approximation value.
198     close();
199     return approx;
200 }
201

```

## Annexe II Preuve: $p_n \propto \bar{p}$

$$(p_n = k\bar{p} \rightarrow p_n \propto \bar{p})$$

1.  $m = n \cdot \bar{p}$

2.  $p_n = \frac{m}{f_n} = \frac{n \cdot \bar{p}}{f_n} \rightarrow p_{n1} = \frac{n_1 \cdot \bar{p}_1}{f_{n1}}$

3.  $f_{n1} = \frac{n_1 \cdot \bar{p}_1}{p_{n1}}$

4.  $\frac{f_{n2}}{f_{n1}} = \frac{n_2}{n_1} \rightarrow f_{n2} = \frac{n_2}{n_1} \cdot f_{n1} = \frac{n_2}{n_1} \cdot \frac{n_1 \cdot \bar{p}_1}{p_{n1}}$

5.  $p_n = \frac{n \cdot \bar{p}}{f_n} \rightarrow p_{n2} = \frac{n_2 \cdot \bar{p}_2}{f_{n2}} = \frac{n_2 \cdot \bar{p}_2}{\frac{n_2 \cdot n_1 \cdot \bar{p}_1}{p_{n1}}} = \frac{n_2 \cdot \bar{p}_2 \cdot n_1 \cdot p_{n1}}{n_2 \cdot n_1 \cdot \bar{p}_1} = \frac{\bar{p}_2 \cdot p_{n1}}{\bar{p}_1}$

6.  $p_{n2} = \left(\frac{p_{n1}}{\bar{p}_1}\right) \cdot \bar{p}_2$

7.  $p_{n2} = k\bar{p}_2, = \left(\frac{p_{n1}}{\bar{p}_1}\right) \cdot \bar{p}_2, \text{ où } k = \frac{p_{n1}}{\bar{p}_1} = \frac{n_1}{f_{n1}}.$

Par définition,  $\frac{n_1}{f_{n1}}$  restera constant tant que  $n_1$  sera constant.

## **Annexe III Publication Cell Reports**

Lien vers copie en libre accès : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30463006>