

2m11.2827.11

Université de Montréal

**INTERACTIONS SYNAPSE-GLIE À LA JONCTION
NEUROMUSCULAIRE DE MAMMIFÈRE**

par

Danielle ROCHON
Département de physiologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences neurologiques

Septembre 2000

© Danielle ROCHON, 2000



W
4
N58
2001
15.016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**INTERACTIONS SYNAPSE-GLIE À LA JONCTION
NEUROMUSCULAIRE DE MAMMIFÈRE**

présenté par :
Danielle ROCHON

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Vincent CASTELLUCCI
Richard ROBITAILLE
Rhoda KENIGSBERG

président du jury
directeur de recherche
membre du jury

Mémoire accepté le -- 2000

SOMMAIRE

Malgré les rôles critiques des cellules de Schwann périssynaptiques (CSPs) de régulation et de stabilisation des terminaisons nerveuses et aussi d'induction et de guidage de croissance axonale dans les muscles à la jonction neuromusculaire (JNM) de mammifère, leurs interactions avec les éléments synaptiques à cette synapse ne sont pas connues. Le but de cette étude était donc de caractériser les propriétés des CSPs *in situ*, en évaluant, à l'aide de la microscopie confocale, les changements des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire. Une élévation du Ca^{2+} intracellulaire des CSPs fut induite par la stimulation du nerf moteur et cette élévation fut grandement réduite par le blocage de la libération de neurotransmetteur. De plus, l'application locale d'acétylcholine (ACh) a généré des réponses calciques qui furent bloquées par l'atropine, un antagoniste muscarinique. Alors que l'application de l'agoniste muscarinique muscarine, a également généré des réponses calciques. L'antagoniste nicotinique α -bungarotoxine n'avait aucun effet sur les réponses calciques induites par l'ACh. L'application locale du co-transmetteur ATP a induit des réponses calciques qui ne furent pas affectées par la suramine, un antagoniste P_2 alors que l'application locale d'adénosine a induit des réponses calciques qui furent réduites de façon considérable à la suite de l'addition de CPT, un antagoniste A_1 . Cependant, la présence de l'antagoniste A_1 dans la solution de perfusion n'a pas bloqué les réponses induites par l'ATP. Les réponses calciques évoquées par la stimulation du nerf moteur furent réduites en présence de l'antagoniste A_1 alors que le blocage des récepteurs cholinergiques avec l'atropine a presque entièrement éliminé ces réponses. Donc, les CSPs à la JNM de mammifère répondent à la libération de neurotransmetteur via l'activation des récepteurs muscariniques et des récepteurs purinergiques de type A_1 .

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
REMERCIEMENTS.....	x
DÉDICACE.....	xi

Chapitre premier

1.1 PROBLÉMATIQUE.....	1
1.2 LES CELLULES GLIALES.....	3
1.2.1 Les cellules gliales du SNC.....	3
1.2.2 Les cellules gliales du SNP et leur origine embryonnaire.....	5
1.3 LES RÉCEPTEURS GLIAUX.....	8
1.3.1 Le récepteur cholinergique et les mécanismes cellulaires associés... 8	
1.3.2 Historique de la muscarine.....	11
1.3.3 Les récepteurs purinergiques.....	12
1.4 LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE.....	14
1.4.1 Description anatomique du muscle.....	15
1.4.2 Description anatomique de la JNM de mammifère.....	17
1.5 LES INTERACTIONS SYNAPSE-GLIE.....	20
1.6 PROJET.....	22

Chapitre deuxième

SYNAPSE-GLIA INTERACTIONS AT THE MAMMALIAN NEUROMUSCULAR JUNCTION.....	24
SUMMARY.....	25
INTRODUCTION.....	26
MATERIALS AND METHODS.....	28
Nerve-muscle preparation.....	28
Calcium imaging of mammalian PSCs.....	28
Drug applications.....	29
Stimulation of the motor nerve.....	29
Immunocytochemistry.....	30
Statistics.....	30
RESULTS.....	31
Identification of PSCs at the mammalian NMJ.....	31
Nerve-evoked Ca ²⁺ reponses in perisynaptic Schwann cells.....	32
Is transmitter release required to elicit a Ca ²⁺ response?.....	33
Can ACh trigger Ca ²⁺ responses at the mammalian NMJ?.....	34
Muscarinic receptors mediate ACh effects.....	35
Can ATP and adenosine trigger Ca ²⁺ response at the mammalian NMJ?.....	37
Are purinergic receptors present on PSCs?.....	38
Endogenous ACh and adenosine mediate nerve-evoked Ca ²⁺ response in PSCs.....	39
DISCUSSION.....	40
REFERENCES.....	48
FIGURE LEGENDS.....	55

Chapitre troisième

DISCUSSION GÉNÉRALE.....	67
3.1 CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES.....	70
3.1.1 <i>Levator auris longus</i> ; une préparation idéale.....	70
3.1.2 Identification des CSPs de mammifère.....	70
3.2 IDENTIFICATION DES RÉCEPTEURS EXPRIMÉS PAR LES CSPs À LA JNM DE MAMMIFÈRE.....	73
3.2.1 Le récepteur cholinergique.....	73
3.2.2 Le récepteur purinergique.....	76
3.3 L'IMPLICATION FONCTIONNELLE DE LA PRÉSENCE DE CES RÉCEPTEURS.....	79
3.4 LES INTERACTIONS SYNAPSE-GLIE.....	79
3.4.1 Les interactions synapse-glie dans le SNC.....	80
3.4.2 Les interactions synapse-glie dans le SNP.....	81
BIBLIOGRAPHIE COMPLÉMENTAIRE.....	83

LISTE DES TABLEAUX*Chapitre premier*

TABLEAU 1	Les sous-types des récepteurs muscariniques.....	10
------------------	--	----

Chapitre deuxième

TABLE 1	Comparison of the properties of PSCs at the mammalian and amphibian NMJs.....	59
----------------	---	----

Chapitre troisième

TABLEAU 2	Comparaison des caractéristiques des cellules de Schwann périssynaptiques à la JNM de mammifère et à la JNM d'amphibien.....	78
------------------	--	----

LISTE DES FIGURES

Chapitre premier

- FIGURE 1** Les différentes étapes de différenciation cellulaire impliquées dans la génération des cellules de Schwann..... 7
- FIGURE 2** Représentation schématique du muscle *levator auris longus* de souris..... 16
- FIGURE 3** Représentation schématique des éléments synaptiques des JNMs de grenouille et de souris..... 19

Chapitre deuxième

- FIGURE 1** Identification of PSCs at the mammalian NMJ..... 60
- FIGURE 2** Nerve-evoked Ca^{2+} responses in PSCs..... 61
- FIGURE 3** Ca^{2+} responses of PSCs to local application of ACh..... 62
- FIGURE 4** Ca^{2+} responses of PSCs to local application of muscarine..... 63
- FIGURE 5** Ca^{2+} responses of PSCs to local application of ATP and adenosine.... 64
- FIGURE 6** Ca^{2+} responses of PSCs to local application of ATP and adenosine in presence of purinergic antagonists..... 65
- FIGURE 7** Nerve-evoked Ca^{2+} responses in PSCs in presence of atropine and CPT..66

Chapitre troisième

- FIGURE 1** Visualisation de la répartition des jonctions neuromusculaires sur le muscle *levator auris longus* de souris à l'aide d'un marquage à l'acétylcholinestérase (selon le procédé de Karnovsky et Roots).....72

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α-BuTx :	α -bungarotoxine
ACh :	acétylcholine
CSPs :	cellules de Schwann périssynaptiques
JNM :	jonction neuromusculaire
NT :	neurotransmetteur
SNC :	système nerveux central
SNP :	système nerveux périphérique

REMERCIEMENTS

Merci à mon directeur de recherche Richard Robitaille pour son dévouement, ses précieux conseils et son support.

Merci à tous ceux qui ont collaboré à mon projet, par leur savoir ou leur aide technique.

Merci à Lili, pour ses conseils et sa gentillesse...

Merci à Jonathan pour nos discussions passionnantes sur la recherche et pour ses précieux encouragements.

À mon petit papa adoré,
mon plus bel exemple
de persévérance...

Chapitre premier

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 PROBLÉMATIQUE

L'ensemble du tissu nerveux, qu'il s'agisse du système nerveux périphérique (SNP) ou central (SNC), est constitué de deux catégories principales de cellules. Les prestigieux neurones et les cellules gliales. Bien entendu, tous s'accordent pour reconnaître la supériorité numérique des cellules gliales. En effet, elles sont 10 à 50 fois plus nombreuses que les neurones dans le SNC des vertébrés. Il en est tout autrement en ce qui concerne leurs rôles fonctionnels. À ce niveau, la supériorité des cellules gliales sur les neurones s'éclipse puisque selon la définition classique, les cellules gliales sont celles associées aux neurones, assurant leur nutrition, leur soutien, leur défense et la synthèse de myéline. Cependant, l'émergence de nouvelles informations suggère une réalité bien différente. À la lumière d'évidences récentes, les cellules gliales sortent finalement de l'ombre...

Effectivement, ces nouvelles données suggèrent l'implication des cellules gliales dans la modulation de l'activité neuronale et de la transmission synaptique. Du point de vue anatomique, elles sont bien désignées pour des rôles aussi importants que ceux précédemment mentionnés. En effet, elles sont intimement associées aux neurones et à leurs axones. De plus, les cellules gliales possèdent des récepteurs aux neurotransmetteurs (NTs) (MacVicar et al., 1989; Cornell-Bell et al., 1990; Barres, 1991; Georgiou et al., 1994) ainsi que des canaux ioniques (Barres et al., 1990; Ritchie, 1992; Robitaille et al., 1996). Donc elles disposent d'atouts essentiels leur permettant de répondre aux signaux synaptiques. D'ailleurs, certaines études ont effectivement démontré que les cellules gliales sont capables de détecter la libération de NTs, ce phénomène se traduisant par une élévation du calcium intracellulaire au niveau de la

cellule gliale (Cornell-Bell et al., 1990; Jahromi et al., 1992; Robitaille et al., 1996; Newman et Zahs, 1997). Donc des réponses calciques gliales sont générées par la libération de NT.

Mais ce n'est pas tout, les cellules gliales sont aussi capables d'exercer un rôle de modulation directe sur les neurones avoisinants en modifiant la concentration du calcium cytoplasmique de ceux-ci (Nedergaard, 1994). Des expériences récentes réalisées en utilisant des milieux de culture ont démontré que les neurones en développement forment des synapses inefficaces et que les signaux gliaux sont requis pour permettre à ces synapses de devenir complètement fonctionnelles (Pfrieger et Barres, 1997). Alors en culture, les cellules gliales participent donc à la conversation; elles ne se contentent pas seulement d'écouter mais elles savent répondre. Mais comment se présente la situation *in situ*? Des évidences convaincantes d'une participation active des cellules gliales dans la modulation de la transmission synaptique ont été obtenues en utilisant comme modèle une préparation synaptique classique, relativement intacte; la jonction neuromusculaire (JNM) de grenouille (Robitaille, 1998). Malgré leurs rôles critiques de régulation et de stabilisation des terminaisons nerveuses et aussi d'induction et de guidage de croissance axonale dans les muscles (Son et Thompson, 1995), les caractéristiques des cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs) de mammifère, cellules gliales du SNP, ne sont pas connues.

Il est important d'établir un parallèle entre les travaux réalisés à la JNM d'amphibien et la situation à la JNM de mammifère. En effet, il est essentiel de démystifier le phénomène de modulation de la transmission synaptique par les CSPs et de montrer qu'il ne s'agit pas d'un phénomène que l'on retrouve strictement à la JNM de

grenouille à cause de ses propriétés intrinsèques mais plutôt d'un phénomène commun et partagé par la majorité des synapses chimiques.

La première partie de cette introduction générale sera consacrée à la revue des différents types de cellules gliales, leur origine et aussi à la description des récepteurs gliaux. Ensuite, il sera question du modèle de la JNM d'amphibien et de la JNM de mammifère. Puis, un rappel des connaissances actuelles sur les interactions synapse-glie nous permettant de mieux comprendre les rôles des CSPs sera effectué. Finalement, un bref rappel du projet permettra au lecteur de garder en mémoire les objectifs de cette étude.

1.2 LES CELLULES GLIALES

1.2.1 Les cellules gliales du SNC

Il existe plusieurs types de cellules gliales. Au niveau du SNC des vertébrés, nous distinguons les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et les cellules microgliales. Les oligodendrocytes forment les gaines de myéline phospholipidiques isolantes autour des axones des neurones du SNC (McLaurin et Yong, 1995). Les cellules épendymaires bordent les alvéoles internes du cerveau et de la moelle épinière favorisant ainsi la circulation du liquide céphalo-rachidien (Del Bigio, 1995) tandis que les cellules microgliales dérivent du tissu hématopoiétique et au niveau fonctionnel, elles ressemblent aux macrophages (Nakajima et Kohsaka, 1993). Quant aux astrocytes, ce sont les cellules gliales les plus abondantes et les plus énigmatiques. Nous savons que ces cellules jouent un rôle important dans le guidage lors du développement du système nerveux et dans le contrôle de l'environnement chimique et ionique des neurones.

Cependant, diverses observations anatomiques, physiologiques et neurochimiques ont permis l'émergence d'hypothèses concernant un rôle plus direct et une implication plus active des astrocytes au niveau du traitement de l'information nerveuse (Orkand et al., 1966; Trachtenberg et Pollen, 1970; Vernadakis, 1988; Kimelberg et Norenberg, 1989; Barres, 1991).

Effectivement, plusieurs études récentes ont montré que les astrocytes sont impliqués de façon active et jouent des rôles dynamiques. Voici quelques exemples de l'implication active des astrocytes. **La libération de NT (glutamate, ATP) par les astrocytes en culture** (Parpura et al., 1994; Bezzi, 1998; Guthrie et al., 1999). Cette libération de NT est conséquente d'une élévation calcique dans les astrocytes causée par la bradykinine ou la coactivation des récepteurs glutamatergiques (AMPA et ACPD). Les astrocytes isolés à partir de l'hippocampe et du cortex visuel de même que les cellules de Schwann du SNP possèdent cette propriété de libération de glutamate calcium-dépendante, ce qui suggère que cette propriété n'est pas exclusive aux cellules gliales du SNC. **L'élévation de la concentration calcique dans les astrocytes en culture susceptible de produire des réponses neuronales** (Parpura et al., 1994; Hassinger et al., 1995). Dans ce cas-ci, le glutamate libéré des astrocytes provoque une augmentation calcique neuronale via les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Les astrocytes régulent donc les niveaux de calcium neuronaux via la relâche calcium-dépendante de glutamate. **La régulation de la transmission synaptique** (Araque et al., 1998). Une réduction dans la magnitude de la transmission synaptique induite par les potentiels d'action suite à la stimulation d'astrocytes fut détectée sans aucun effet sur l'amplitude des potentiels synaptiques miniatures (Araque et al., 1998). Mais nous

savons maintenant que cette modulation de la transmission synaptique par les cellules gliales n'est pas une propriété exclusive des synapses du SNC. Voyons maintenant une description des cellules gliales du SNP.

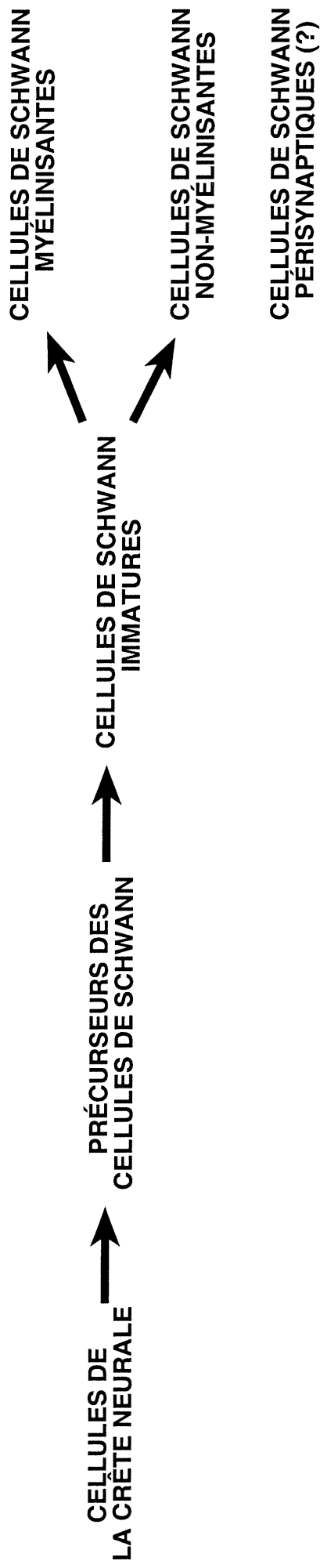
1.2.2 Les cellules gliales du SNP et leur origine embryonnaire

Au niveau du SNP, les cellules gliales sont les cellules de Schwann. Il en existe plusieurs types. Nous distinguons les cellules de Schwann myélinisantes qui sont impliquées dans la formation des gaines de myéline isolantes autour des axones et aussi les cellules de Schwann non myélinisantes. De plus, il y a les cellules de Schwann périssynaptiques, celles qui font l'objet de cette étude, souvent désignées comme les cellules télogliales dans la littérature. Celles-ci sont aussi non-myélinisantes.

La majorité des cellules de Schwann des nerfs adultes originent de la crête neurale (Le Douarin et al., 1991; Jessen et Mirsky, 1992; Anderson 1993). La crête neurale consiste en une petite population de cellules qui se détachent du côté dorsal du tube neural lors de sa fermeture. Rapidement, les cellules se dispersent, migrent, prolifèrent et se différencient pour former une impressionnante variété cellulaire incluant les neurones, les cellules gliales, les cellules pigmentaires, le cartilage et les cellules musculaires (Le Douarin et Smith, 1988; Weston, 1991). La génération des cellules de Schwann à partir de la crête neurale implique quelques étapes de différenciation cellulaire qui furent récemment clarifiées afin d'établir un modèle relativement simple de lignée cellulaire des cellules de Schwann chez le rat et la souris (Jessen et Mirsky, 1998). Les cellules de la crête neurale doivent subir trois transitions développementales importantes avant d'atteindre le stade de cellules de Schwann matures. Il y a d'abord la formation des

précurseurs des cellules de Schwann à partir des cellules de la crête, ensuite la formation des cellules de Schwann immatures à partir des précurseurs précédemment formés et finalement la génération irréversible postnatale des cellules de Schwann myélinisantes et non-myélinisantes (figure 1). Des signaux axonaux impliquant des neurégulines sont d'importants régulateurs de ces événements cellulaires, en particulier de la survie, prolifération et différenciation des précurseurs des cellules de Schwann. L'identification des facteurs de transcription possiblement impliqués dans les transitions développementales observées se précise de plus en plus. Ceux-ci incluent Oct-6, Krox-20 et Pax-3 mais aussi des membres de la famille HLH ("helix-loop-helix") et Sox-10 (Jessen et Mirsky, 1998). Quant aux CSPs (les cellules d'intérêt de cette étude), souvent désignées par le terme télégliose (cellules de Schwann terminales associées aux terminaisons nerveuses motrices), il n'existe encore aucune certitude quant à leur origine. En effet, il est impossible d'affirmer si oui ou non les CSPs proviennent elles aussi des précurseurs des cellules de Schwann car il n'existe aucune évidence à cet effet. Si cela s'avère le cas, les CSPs pourraient alors tout simplement résulter d'une spécialisation particulière des cellules de Schwann non-myélinisantes.

FIGURE 1



LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE IMPLIQUÉES DANS LA GÉNÉRATION DES CELLULES DE SCHWANN

(ADAPTÉ DE JESSEN ET MIRSKY (1998))

1.3 LES RÉCEPTEURS GLIAUX

Afin de mieux comprendre le rôle des cellules gliales à la synapse, il est essentiel de caractériser de façon aussi précise que possible les récepteurs cellulaires exprimés par ces cellules gliales. En effet, les récepteurs exprimés sont une indication majeure du rôle fonctionnel potentiel de la cellule puisque les récepteurs régulent l'activité de celle-ci. Il est donc possible, lorsque les récepteurs sont connus et bien caractérisés, d'attribuer certaines fonctions, certains rôles à la cellule étudiée. Les cellules gliales possèdent différents types de récepteurs pour différents NTs (Hamprecht, 1986; Cornell-Bell et al., 1990; Barres, 1991).

À la JNM de grenouille, les CSPs expriment des récepteurs cholinergiques de type muscarinique ne correspondant à aucun des cinq sous-types connus (Robitaille, Jahromi et Charlton, 1997) et des récepteurs purinergiques de différents types (A₁, P_{2x}, P_{2y}) (Robitaille, 1995). Cependant, à la JNM de souris cette caractérisation n'est pas connue. Voyons maintenant quelques détails concernant ces différents récepteurs.

1.3.1 Le récepteur cholinergique et les mécanismes cellulaires associés

Le récepteur cholinergique est d'une extrême importance au niveau de la CSP car les réponses calciques gliales obtenues suite à l'activité synaptique évoquée sont générées principalement par la libération de NT (Jahromi et al., 1992) et l'acétylcholine (ACh) est le NT majeur libéré au niveau des JNMs de muscles squelettiques durant l'activité synaptique. Des récepteurs cholinergiques et des réponses cellulaires variés aux agonistes de l'ACh, en particulier des variations au niveau du calcium intracellulaire, furent identifiés au niveau des cellules gliales. Notons qu'à la JNM de grenouille, les

réponses calciques des CSPs évoquées par l'ACh sont principalement dues à la libération de calcium des réserves intracellulaires (Jahromi et al., 1992). Il existe deux classes principales de récepteurs cholinergiques; nicotinique et muscarinique. Voyons d'abord les récepteurs nicotiniques. Ce sont des canaux cationiques dont l'ouverture est contrôlée par l'ACh. Il existe deux types de récepteurs nicotiniques; musculaire et neuronal. Ces récepteurs sont des molécules importantes dans la transmission cholinergique nicotinique dans plusieurs aires du SNC et dans le SNP (Clementi et al., 2000). Les récepteurs nicotiniques musculaires des oiseaux et des mammifères sont des pentaoligomères constitués de quatre sous-unités différentes ($\alpha_2\beta$, $\gamma\delta$ ou $\alpha_2\beta$, $\epsilon\delta$). Les récepteurs nicotiniques neuronaux sont formés par deux types de sous-unités (α et β) ou sont des pentahomomères (récepteurs neuronaux α_7). Il semblerait que la structure pentaoligomérique soit la principale caractéristique de tous les récepteurs nicotiniques, musculaires autant que neuronaux (Utkin et al., 2000). Nous savons que les CSPs ont très peu sinon aucun récepteur nicotinique car les résultats immunocytochimiques obtenus avec la bungarotoxine fluorescente (α -BuTx) démontrent que les CSPs ne sont pas marquées par la toxine (Anderson et Cohen, 1974; Robitaille, Adler et Charlton, 1990). De plus, les antagonistes des récepteurs nicotiniques, qu'ils soient de type musculaire ou neuronal, n'ont aucun effet sur les réponses calciques évoquées par l'application locale d'ACh. Donc l'intérêt se porte sur les récepteurs de type muscarinique. Ceux-ci appartiennent à la superfamille des récepteurs liés à une protéine G et il existe au moins cinq différents sous-types M_1 - M_5 (Fukuda, Kubo, Akida, Maeda, Mishina et Numa, 1987). Les récepteurs cholinergiques muscariniques sont associés à différents seconds messagers intracellulaires et protéines

G, qui modulent les réserves de calcium intracellulaires et aussi certains canaux Ca^{2+} , K^+ , et Cl^- (Hulme et al., 1990). Le tableau suivant résume les connaissances actuelles à propos des cinq sous-types M_1 - M_5 ;

TABLEAU 1

Les sous-types de récepteurs muscariniques

	SOUS-TYPES				
	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5
PROTÉINE G	q/11	i/o	q/11	i/o	q/11
MESSAGERS SECONDS	PLC IP_3 /DAG Ca^{2+} /PKC	AC(-)	PLC IP_3 /DAG Ca^{2+} /PKC	AC(-)	PLC IP_3 /DAG Ca^{2+} /PKC
LOCALISATION	Cerveau (cortex et hippocampe) Glandes Ganglion sympatique	Cœur Muscle lisse	Muscle lisse Glandes Cerveau	Striatum	Substance noire
RÉPONSES FONCTIONNELLES	Inhibition du courant M	Canaux K^+	Contraction du muscle lisse	Inhibition des canaux Ca^{2+}	

DAG, diacylglycerol; IP_3 , inositol 1,4,5-triphosphate; PKC, protéine kinase; PLC, phospholipase C; AC, adénylate cyclase. Les réponses fonctionnelles indiquées sont les principales, d'autres réponses furent aussi suggérées.

[ADAPTÉ DE CAULFIELD ET BIRDSALL, 1998]

Le type associé aux CSPs d'amphibien n'est pas l'un des cinq sous-types connus. Effectivement, les réponses calciques induites par la muscarine sont résistantes aux antagonistes muscariniques au niveau des CSPs à la JNM de grenouille (Robitaille et al., 1997). Voyons, dans la section suivante, une brève historique de la muscarine, histoire de connaître l'origine de cette substance d'intérêt.

1.3.1.1 Historique de la muscarine

La muscarine est une substance alcaloïde toxique de certains champignons vénéneux. De muscaria (amanita) “amanite tue-mouches”, d’où est extrait ce poison. Par définition, un alcaloïde est le nom générique de substances d’origine végétale à caractère basique marqué, comportant une ou plusieurs fonctions amines, et le plus souvent très toxiques à l’état pur. Les premières études scientifiques de ce champignon furent réalisées par Schmiedeberg et Koppe en 1869. Ils ont montré que des extraits de ce champignon pouvaient ralentir et même à de hautes concentrations arrêter le battement du cœur de grenouille. Ils ont purifié l’extrait en utilisant les méthodes disponibles à cette époque et ont obtenu un sel autochloride cristallin. Le composé obtenu fut nommé muscarine. Ils ont utilisé cette préparation afin d’en étudier la pharmacologie. Ils ont noté qu’en plus de son action sur le cœur, la muscarine avait de nombreux effets; contraction du muscle lisse de l’estomac et de l’intestin, stimulation de la sécrétion des larmes et de la salive, constriction de la pupille, etc... Néanmoins, la chimie de la muscarine demeura plutôt obscure puisque la synthèse de muscarine synthétique par Schmiedeberg et Harnack en 1877 que l’on croyait analogue à la muscarine naturelle possédait en fait une activité nicotinique considérable tel que montré par Dale, plusieurs années plus tard (1914). Les premières indications de l’existence de différents sous-types pour le récepteur muscarinique furent les actions cardiosélectives de la gallamine (Riker et Wescoe, 1951). Par la suite, Barlow et al. (1976) ont démontré les différences significatives au niveau des propriétés pharmacologiques des récepteurs muscariniques iléal et atrial. L’introduction de la pirenzepine, une drogue utilisée dans le traitement des ulcères gastriques, a joué un rôle

majeur dans la détermination de l'existence des sous-types des récepteurs muscariniques. Effectivement, la sélectivité de liaison (Hammer et al., 1980) de cette drogue et des études fonctionnelles (Brown et al., 1980) ont apporté une explication de sa sélectivité *in vivo*. Un avancement significatif des connaissances des fonctions et rôles potentiels des récepteurs muscariniques et de leurs sous-types fut réalisé par le clonage de cinq gènes de mammifère codant pour les récepteurs muscariniques (Bonner et al., 1987).

1.3.2 Les récepteurs purinergiques

En plus de l'ACh, une concentration élevée d'ATP est aussi libérée lors de la transmission synaptique (Smith, 1991; Zimmermann, 1994). Au-delà de son rôle au niveau de l'apport d'énergie, l'implication de l'ATP dans la communication intercellulaire au niveau de différents systèmes du SNC et du SNP fut aussi proposé (Sneddon et Burnstock, 1984; Lindgren et Smith, 1987; El-Moatassim et al., 1992; Zimmermann, 1994). Il a été démontré que l'ATP cause une élévation du Ca^{2+} intracellulaire (O'Connor et al., 1991) soit en libérant le Ca^{2+} des réserves intracellulaires soit en régulant l'entrée de calcium. À la JNM de grenouille, l'application locale d'ATP sur les CSPs induit la relâche de Ca^{2+} des réserves intracellulaires (Jahromi et al., 1992). Il existe deux classes de récepteurs purinergiques. La classification, réalisée par Burnstock en 1978, est basée sur la sélectivité à l'adénosine (récepteurs P_1) et à l'ATP (récepteurs P_2). Voyons d'abord l'adénosine. Les récepteurs à l'adénosine sont impliqués dans la modulation des niveaux

intracellulaires de l'adénosine 3c,5c-cyclique monophosphate (cAMP) et furent initialement subdivisés en deux catégories, soit A_1 et A_2 , selon leur habileté à respectivement inhiber ou faciliter l'adénylate cyclase et aussi selon leurs interactions avec différentes drogues (Van Calker et al., 1979; Londos et al., 1980). La classe A_2 fut ensuite divisée en deux sous-types tel que proposé par Daly et al. (1983) et ce, basé sur la découverte des récepteurs A_2 à haute affinité dans le striatum du rat et des récepteurs A_2 à basse affinité à travers le cerveau, ces deux sous-types ayant la propriété commune d'activer l'adénylate cyclase. Ces sous-types à haute et basse affinité furent désignés respectivement comme A_{2A} et A_{2B} (Bruns et al., 1986). Récemment, l'utilisation des méthodes de clonage moléculaire a permis de valider la classification anticipée (A_1 , A_{2A} , A_{2B}) et de découvrir l'existence du sous-type A_3 (Collis et Hourani, 1993). Donc d'un point de vue moléculaire, il existe quatre groupes principaux de récepteurs à l'adénosine; les récepteurs A_1 , A_{2A} , A_{2B} et A_3 . Et d'un point de vue pharmacologique, il en existe trois; A_1 , A_2 et A_3 . Les CSPs de la JNM d'amphibien exprime le sous-type A_1 .

Les récepteurs à l'ATP sont subdivisés en cinq groupes; P_{2X} , P_{2T} , P_{2Z} sont perméables à plusieurs ions incluant le calcium alors que les récepteurs P_{2Y} et P_{2U} sont responsables de la relâche de Ca^{2+} des réserves intracellulaires via le système de protéine G (Burnstock, 1990; O'Connor et al., 1991). Les deux classes majeures sont les P_{2X} , des récepteurs ionotropiques et les P_{2Y} , ces derniers sont couplés aux protéines G. Les récepteurs P_{2X} contiennent des canaux cationiques non-sélectifs et sont susceptibles de jouer un rôle dans la transmission synaptique rapide. Il existe sept sous-

types de récepteurs P_{2X} (P_{2X1-7}). Tous ces sous-types sont distribués dans le SNC. Quant aux P_{2Y} , ils sont possiblement impliqués dans la modulation de l'efficacité synaptique. Il existe aussi sept sous-types de récepteurs P_{2Y} (P_{2Y1-7}). Tel que mentionné plus haut, les CSPs de grenouille expriment des récepteurs à l'ATP de type P_{2X} et P_{2Y} .

1.4 LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

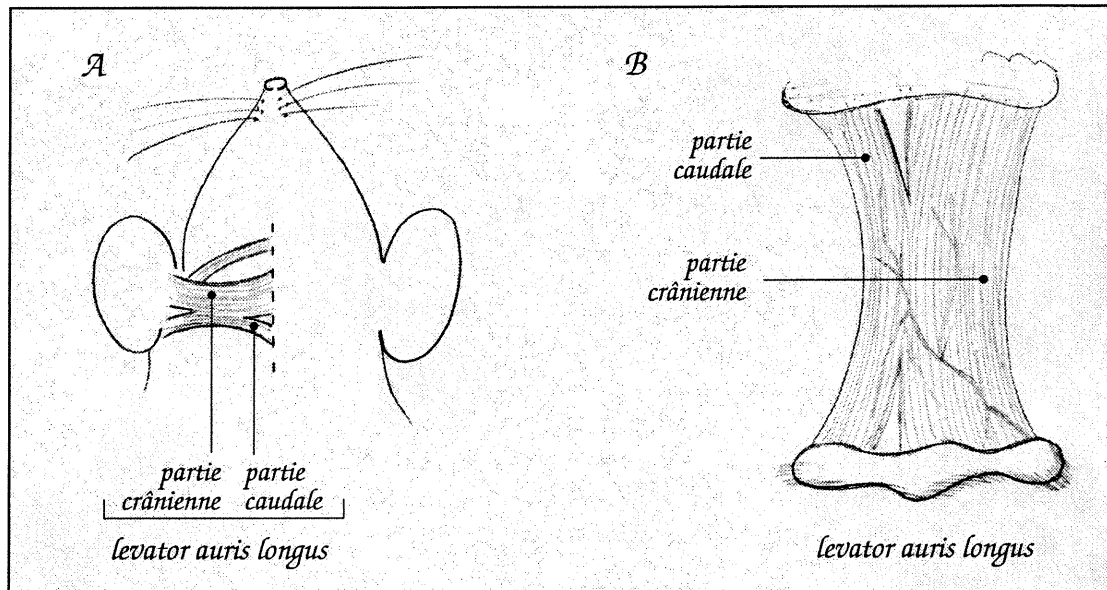
La jonction neuromusculaire en tant que modèle d'étude est un excellent choix parce qu'elle offre l'avantage d'une relation anatomique intacte et simplifiée entre les trois éléments synaptiques présents à cette jonction, soit: l'élément présynaptique, l'élément postsynaptique et la cellule gliale. Il est important de préserver la préparation intacte puisque nous étudions les interactions entre les différents éléments. Donc, la JNM représente un modèle très simple et bien adapté aux études des interactions synapse-glie *in situ*. Cette préparation permet l'étude de ces interactions dans un contexte simplifié, différent de celui associé aux études effectuées dans les réseaux complexes du SNC. De plus, l'utilisation de ce modèle nous assure que les propriétés fonctionnelles des cellules sont préservées contrairement aux études en milieux de culture où il est impossible de s'en assurer. D'ailleurs, un exemple intéressant suggérant justement qu'il existe une différence entre les caractéristiques des récepteurs des cellules gliales en culture comparativement à la caractérisation réalisée *in situ* est souligné dans l'étude sur les récepteurs muscariniques (Robitaille et al., 1997). Effectivement, il est mentionné que l'évidence montrant que la sensibilité aux antagonistes est grandement modifiée suivant la dénervation suggère que les

caractéristiques des récepteurs des cellules gliales en culture ne sont peut-être pas comparables à celles normalement présentes *in situ*.

1.4.1 Description anatomique du muscle

La JNM de souris est un modèle simple et facile d'accès. Nous avons utilisé le muscle *levator auris longus* (figure 2) de la souris CD1 (22-24g). Nous avons choisi ce muscle pour sa localisation superficielle et son extrême minceur (trois à quatre couches de fibres musculaires) qui facilite l'étude en microscopie confocale. Ce muscle est constitué de deux parties distinctes soit crânienne et caudale. La partie crânienne provient des épines des quatre premières vertèbres cervicales et s'étend jusqu'à son insertion à la partie antérieure de la base du pavillon auriculaire. Quant à la partie caudale, elle est issue des épines des quatrième et cinquième vertèbres cervicales et s'étend de façon presque parallèle à la partie crânienne et s'insère dans la partie postérieure de la base du pavillon auriculaire. Le muscle *levator auris longus* est innervé par la branche auriculaire postérieure du nerf facial (VII) et la vascularisation est assurée par l'artère auriculaire postérieure. La chirurgie implique le prélèvement du muscle entier ce qui permet une isolation de la synapse tout en conservant une relation anatomique intacte entre les trois composantes synaptiques c'est-à-dire la fibre musculaire, la terminaison nerveuse et la cellule gliale.

FIGURE 2



REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU MUSCLE *LEVATOR AURIS LONGUS* DE SOURIS.

A) Croquis illustrant la disposition et l'orientation du muscle *levator auris longus* sur la tête de l'animal. Le muscle s'étend de l'oreille jusqu'à la ligne médiane du crâne et bien que ceci ne soit pas illustré, le muscle se retrouve aussi du côté droit, en symétrie avec celui de gauche. Il est à noter que c'est un muscle très superficiel. En effet, on le retrouve directement sous la peau en dessous d'une mince couche de fascia (feuillet de tissu conjonctif).

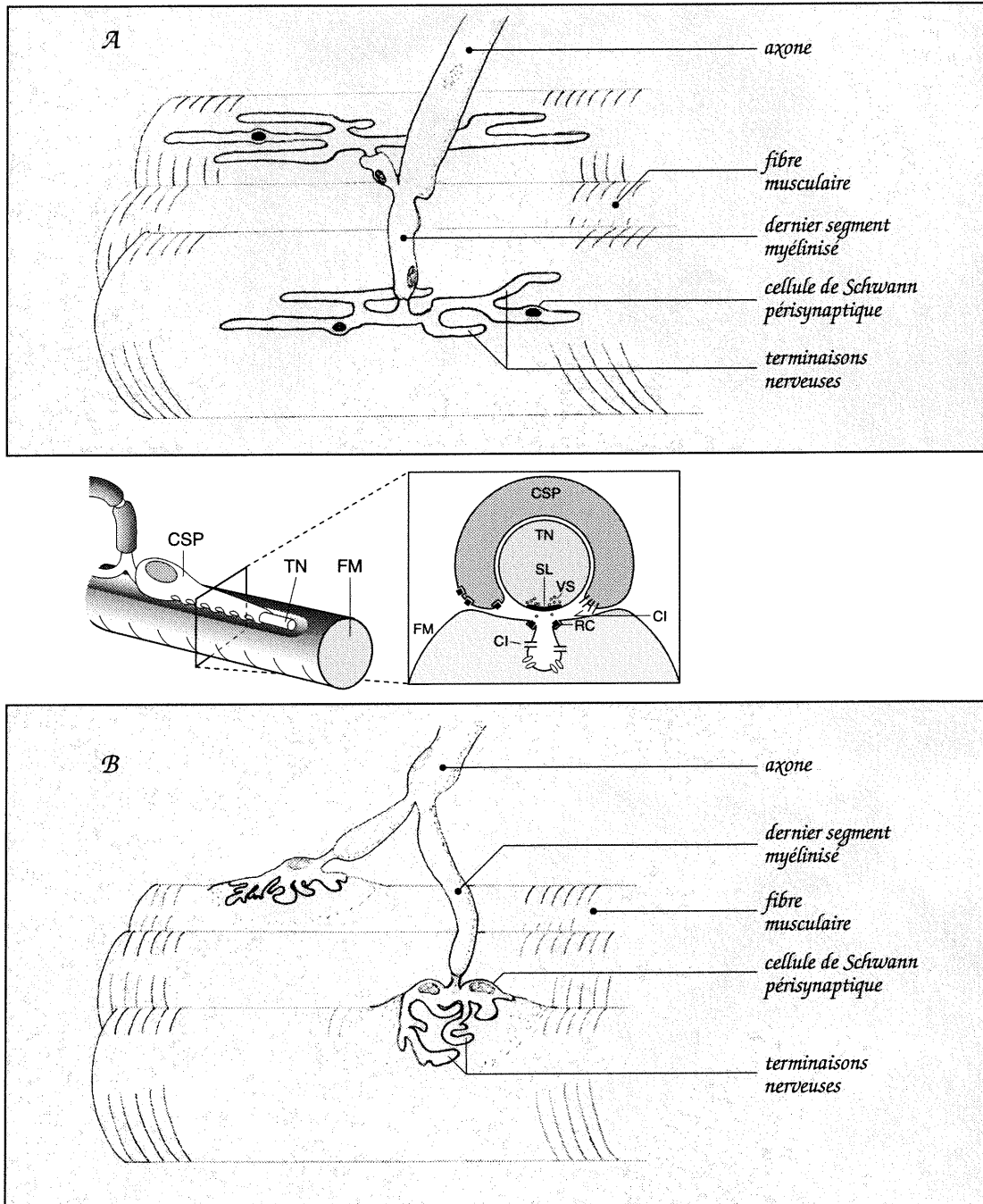
B) Croquis illustrant le muscle suite à la dissection. Afin de conserver celui-ci intact, il est essentiel de préserver une partie de chacune des extrémités, c'est-à-dire, une partie des tissus de l'oreille ainsi que des tissus au niveau de l'insertion crânienne.

1.4.2 Description anatomique de la jonction neuromusculaire de mammifère

La JNM de souris est composée de trois éléments synaptiques importants. En effet, il y a l'élément présynaptique, l'élément postsynaptique et la cellule gliale. L'unité présynaptique est constituée de l'une des nombreuses terminaisons nerveuses issue de l'axone moteur. Plusieurs vésicules synaptiques sont associées avec des régions spécialisées de la membrane présynaptique. Ces régions, que l'on nomme "zones actives" sont les sites de libération du NT et occupent une position stratégique par rapport à l'élément postsynaptique. En effet, l'unité postsynaptique, constituée de la membrane plasmique d'une fibre musculaire squelettique, se retrouve intimement apposée à l'unité présynaptique et les récepteurs cholinergiques présents sont situés vis-à-vis les zones actives, au niveau de la crête des replis postsynaptiques. Entre ces deux éléments se trouve la fente synaptique ainsi que la lame basale, qui est en fait la matrice extracellulaire qui s'insinue dans cette fente synaptique et dans les replis postsynaptiques. Les cellules de Schwann non myélinisantes que nous qualifions de cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs) (aussi nommées cellules de Schwann terminales) constituent le troisième élément de cette triade. Il y a toujours quelques CSPs à chaque jonction (environ deux à trois), et celles-ci recouvrent la terminaison nerveuse (figure 3). La présence des cellules de Schwann est confirmée par celle de leurs corps cellulaires de forme ellipsoïdale et disposés en "grappe" au-dessus de la terminaison.

Notons ici une différence anatomique entre la JNM de grenouille et la JNM de souris. Chez la grenouille, les CSPs sont orientées dans un axe parallèle à celui des fibres musculaires. De plus, à la JNM d'amphibien, les CSPs émettent des prolongements autour de la terminaison nerveuse. Ces prolongements se retrouvent dans le voisinage immédiat des sites de libération de NTs, c'est-à-dire les zones actives. À la JNM de souris, ces prolongements n'existent pas. Chez la souris, les JNMs sont plus compactes et on peut distinguer un renflement caractéristique absent à la JNM d'amphibien.

FIGURE 3



REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES ÉLÉMENTS SYNAPTIQUES DES JNMs DE GRENOUILLE ET DE SOURIS.

A) Schéma d'une JNM de grenouille illustrant les différents éléments synaptiques. Notons la forme allongée, fusiforme et l'orientation parallèle à l'axe de la fibre musculaire de la JNM de grenouille. Notons aussi la disposition des cellules de Schwann le long de la jonction. Il y a environ 4 à 5 CSPs par jonction.

B) Schéma d'une JNM de souris illustrant les différents éléments synaptiques. Notons que chez la souris la JNM se distingue par un renflement caractéristique et la disposition en "grappe" des cellules de Schwann. La JNM n'est pas allongée et comporte environ 2 à 3 CSPs par jonction. CSP: cellule de Schwann périssynaptique; TN: terminaison nerveuse; FM: fibre musculaire; CI: canaux ioniques; SL: site de libération; VS: vésicules synaptiques; RC: récepteurs cholinergiques.

1.5 LES INTERACTIONS SYNAPSE-GLIE

Les interactions synapse-glie sont importantes au niveau de la régulation de l'activité des neurones et des cellules gliales. Ces interactions impliquent la signalisation via l'activation des récepteurs, la signalisation via les variations de Ca^{2+} intracellulaire, et les modifications activité-dépendante au niveau de la relation anatomique neurone-glie. La présence des cellules gliales est déterminante dans la synaptogénèse, dans la modulation de contacts synaptiques complètement fonctionnels et aussi dans la plasticité synaptique.

Dans le SNC, les exemples d'interactions synapse-glie sont nombreux. Il y a les études réalisées en milieux de culture. Par exemple, celle de Smith (1998) qui montre l'implication des cellules gliales au niveau de la synaptogénèse et de l'augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique. Ces effets ne sont pas secondaires à une hausse de la survie neuronale mais impliquent probablement des changements dans les niveaux d'activité synaptique et la sécrétion d'un facteur glial. De même, dans les préparations plus intactes comme les tranches d'hippocampe, les interactions synapse-glie sont mises en évidence par des études qui ont montré le rôle potentiel des astrocytes dans le contrôle de la transmission synaptique et de la plasticité (Kang et al., 1998; Araque et al., 1998). Aussi, Newman et Zahs (1998) ont montré que la stimulation mécanique des astrocytes de la rétine et des cellules de Müller, dans le but de provoquer une vague calcique entre ces cellules, a généré la modulation de l'excitation induite par la lumière des cellules ganglionnaires. Tel que souligné par les

quelques exemples ci-haut, les interactions synapse-glie représentent un phénomène répandu dans le SNC puisqu'observé dans plusieurs types de préparations issues de différentes régions du SNC.

La modulation de la transmission synaptique induite par les cellules gliales n'existe pas seulement dans le SNC. Effectivement, les CSPs du SNP possèdent également cette propriété tel que démontré par la réduction dans la libération de neurotransmetteur suite à la microinjection d'un analogue non-hydrolysable du GTP, le GTP γ S, dans les CSPs à la JNM d'amphibien (Robitaille, 1998). La dépression typique de la transmission synaptique neuromusculaire causée par la stimulation à haute fréquence de l'axone fut empêchée par l'inactivation du système de protéine G dans la cellule de Schwann, inactivation consécutive à l'injection de GDP β S. Ces données suggèrent que durant la stimulation à haute fréquence, un signal indéfini est transmis de la terminaison nerveuse présynaptique à la cellule de Schwann associée, ce qui provoque par un phénomène de "feedback", l'inhibition de la neurotransmission entre la terminaison nerveuse et le muscle.

Donc, non seulement est-il question d'interactions synapse-glie tel que démontré par la capacité des CSPs à la JNM d'amphibien à détecter la libération de NT (Jahromi et al., 1992) mais l'exemple ci-haut nous permet d'introduire le concept d'interactions glie-synapse, plus précisément de boucle de rétroaction synapse-glie-synapse.

1.6 PROJET

Diverses données suggèrent que les cellules gliales jouent un rôle important dans la régulation de la fonction synaptique. Ces données nous indiquent que les interactions synapse-glie ne dépendent pas des propriétés intrinsèques d'une préparation en particulier mais sont, au contraire, très répandues.

Le but de notre étude était de caractériser les propriétés fonctionnelles des CSPs à la JNM de mammifère. Par le fait même, cela nous a permis de déterminer si les CSPs à cette jonction possèdent, de la même manière que les CSPs d'amphibien, les caractéristiques fonctionnelles nous permettant d'affirmer que ces cellules sont impliquées de façon active à la synapse. Nous voulions donc établir la similarité, en comparant (de façon indirecte) deux synapses équivalentes, du phénomène d'interaction synapse-glie mais aussi les différences montrant ainsi la capacité d'adaptation des cellules gliales. Car bien que le phénomène d'interactions synapse-glie semble universel, il se caractérise par une certaine hétérogénéité des caractéristiques des cellules gliales dans la mesure où les propriétés des cellules diffèrent d'une région à l'autre, d'une préparation à l'autre.

Ce travail visait donc l'amélioration de notre compréhension du rôle des cellules gliales dans la fonction synaptique et des caractéristiques du phénomène d'interaction synapse-glie de façon à mieux saisir les mécanismes sous-jacents à ce phénomène important.

Chapitre deuxième

**SYNAPSE-GLIA INTERACTIONS AT THE MAMMALIAN
NEUROMUSCULAR JUNCTION**

**SYNAPSE-GLIA INTERACTIONS AT THE
MAMMALIAN NEUROMUSCULAR JUNCTION**

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

Running: Synapse-glia interactions at the mammalian NMJ

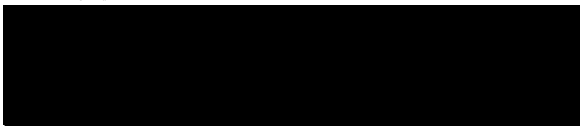
Number of pages: 33

Number of figures: 7 figures

Number of tables: 0

Total number of words in; Abstract, 238; Introduction, 500; Discussion, 1502.

Address for correspondence: Richard Robitaille
Département de physiologie
Université de Montréal
P.O. Box 6128, Station "Centre-Ville"
Montréal, Canada
H3C 3J7



SUMMARY

Even though perisynaptic Schwann cells (PSCs) play critical roles in regulating and stabilizing nerve terminals at the mammalian neuromuscular junction (NMJ), their interactions with the synaptic elements at this synapse are not known. Therefore, the goal of this study was to characterize their properties *in situ*, by monitoring changes in intracellular Ca^{2+} since the activity of PSCs are governed by the relationship with the synapse and its activity. Motor nerve stimulation induced an increase in intracellular Ca^{2+} in PSCs and this increase was greatly reduced when transmitter release was blocked. Furthermore, local application of acetylcholine induced Ca^{2+} responses that were blocked by muscarinic antagonist atropine and mimicked by the muscarinic agonist muscarine. The nicotinic antagonist α -bungarotoxin (α -BuTx) had no effect on Ca^{2+} responses induced by acetylcholine. Local application of the co-transmitter ATP induced Ca^{2+} responses that were not affected by the P2 antagonist suramin while local application of adenosine induced Ca^{2+} responses that were greatly reduced when the A1 receptor antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) was added. However, the presence of the A1 antagonist in the perfusate did not block responses induced by ATP. Ca^{2+} responses evoked by stimulation of the motor nerve were reduced in the presence of the A1 antagonist CPT while the blockade of acetylcholine receptors with atropine almost completely abolished them. Hence, PSCs at the mammalian NMJ respond to the release of neurotransmitter induced by stimulation of the motor nerve through the activation of muscarinic and adenosine A1 receptors.

Keywords : adenosine, acetylcholine, Ca^{2+} , perisynaptic Schwann cell, transmitter release, neuromuscular junction, synapse-glia interactions

For years, glial cells were thought to provide only structural and trophic support to neurons and synapses. However, there is now clear evidence that a dynamic, bidirectional interaction between glia and neurons exists. Indeed, not only glial cells are modulated by nerve-evoked transmitter release but they are able, in return, to modulate neuronal activity (Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994; Pfrieger and Barres, 1997; Newman and Zahs, 1998; Robitaille, 1998; Bezzi et al., 1998).

The vertebrate neuromuscular junction (NMJ) is an interesting preparation to study synapse-glia interactions owing to its simplicity and preserved anatomical relationship. The glial cells at this synapse, the perisynaptic Schwann cells (PSCs) (also called 'terminal' Schwann cells) have been well studied at the amphibian NMJ and shown to detect synaptic activity as revealed by an elevation in intracellular calcium (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995). PSCs possess purinergic and muscarinic receptors as well as NK-1 receptors for substance P (Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997; Bourque and Robitaille, 1998) and their activity is governed by these receptors (Georgiou et al., 1994; Bourque and Robitaille, 1998; Georgiou et al., 1999). Moreover, as a consequence of synaptic activity, PSCs modulate the efficacy of the synapse by regulating transmitter release (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2000).

PSCs also modulate nerve growth and synapse maintenance. Although recent evidence has been obtained at the amphibian NMJ (Chen and Ko, 1994; Astrow et al., 1998) the largest body of evidence has been obtained at the mammalian NMJ. For instance, processes extended by PSCs following denervation influence the regrowth of motor axons to the muscles and their guidance back to denervated NMJs (Son et al., 1996). Furthermore, immunocytochemical markers specific for Schwann cells, synapses

and motor axons were used to show that motor axons appear to navigate along the processes extended by the PSCs from the damaged nerve endings (Son and Thompson, 1995a,b). However, unlike the amphibian NMJ, very little is known about PSCs at the mammalian NMJ where, in fact, no evidence of direct modulation of synaptic activity is available and where the properties are not characterized. Moreover, although synapse-glia interactions appear a common phenomenon at chemical synapses (Araque et al., 1999), it is still unclear how much the properties of these interactions differ between related synapses. Hence, this study aimed to characterize PSCs properties at the mammalian NMJ in order to determine functional similarities and differences with the properties of the amphibian NMJ.

We report that PSCs at the mammalian NMJ respond to the release of neurotransmitters induced by stimulation of the motor nerve and that the activation of muscarinic receptors is necessary for their activation during synaptic activity. However, the role of the purinergic receptors of PSCs of the mammalian NMJ differ where A1 adenosine receptors, but not P2 receptors, contribute to the activation of PSCs. Hence, these results indicate that synapse-glia interactions are present at chemical synapses *in situ* and that these interactions are governed by specialized features related to the synapse glial cells are associated with.

MATERIALS AND METHODS

Nerve-muscle preparation

Experiments were performed at room temperature on *levator auris longus* nerve-muscle preparations dissected from CD1 mice (22-24g; supplied from Charles River). Muscles were removed under deep anesthesia (midazolam and hypnorm dissolved in water). The normal Ringer's solution contained (in mM): 124 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose. A 0 Ca²⁺/5mM Mg²⁺ physiological solution contained (in mM) : 124 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 5 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose.

Calcium imaging of mammalian PSCs

Muscles were incubated for 90 minutes at room temperature in a physiological solution saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ and containing 20 μM fluo-3 AM (Molecular Probes, Eugene, OR; Tsien, 1989), 0.02% pluronic acid (Molecular Probes) and 0.5% dimethyl sulfoxide (Sigma). Muscles were then pinned down in a recording chamber coated with Sylgard. Partial chelation of heavy metal ions was achieved using 20 μM tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN; Molecular Probes) to limit binding of these ions to fluo-3. Changes in fluorescence intensity were monitored using a BioRad 600 laser scanning confocal microscope equipped with an argon ion laser. The 488 nm laser line was attenuated to 1% intensity and a long pass filter with cutoff at 515 nm was used to detect the emitted fluorescence. A 40X water immersion lens was used (Olympus, 0.75NA; Tokyo, Japan). Surface NMJs were located using transmitted light microscopy. The intensity of fluorescence (F) was measured over the area of the

PSCs cell body, and the relative changes in fluorescence intensity were expressed as :

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

Drug applications

ATP, adenosine, muscarine, acetylcholine (20 μM) were dissolved in the same saline as that in the recording chamber. Drugs were applied directly by micropressure (5-10 PSI) to selected cells with a micropipette using a Picospritzer II (pulse duration; 200 ms). The micropipette was positioned near the PSC somata under visual control at high magnification (40X water immersion objective). There was no increase in fluorescence when Ringer solution was applied alone. For the Ca^{2+} -free / 5 mM Mg^{2+} experiments, preparations were perfused in the modified physiological solution for 25-30 min prior to the experiments. Some antagonists (α -bungarotoxin, ω -conotoxin MVIIC) were applied directly in the recording chamber in a closed bath while suramin, 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) and atropin were applied by bath perfusion.

Stimulation of the motor nerve

Nerve-muscle preparations were processed for fluo-3 AM loading as described above. Stimulation of the distal end of the cut motor nerve (50 Hz, 30 sec) was achieved using a suction electrode. To prevent muscle contractions evoked by transmitter release, cholinergic receptors were blocked with α -bungarotoxin (α -BuTx; 20 μM ; Molecular Probes, Eugene, OR). Preparations were allowed to rest for 20-25 min between trains of stimuli when several trains were performed on the same preparation.

Immunocytochemistry

After some experiments, muscles were fixed using 4% paraformaldehyde for 10 min and rinsed for at least 30 min in three changes of Ringer's solution. Muscles were then permeabilized in -20°C methanol for 6 min, washed again in Ringer's for 30 min, and non-specific staining was blocked using Ringer's containing 0.3% Triton X-100 and 0.2% dry milk. Muscles were incubated overnight at room temperature with a rabbit antibody solution raised against cow S-100 (Dako) prepared in the solution indicated above (dilution 1 :400). After incubation in the primary antibody, muscles were rinsed in three changes of Ringer's for 30 min and incubated in secondary antibody for 1 hr at room temperature. The secondary antibody was an anti-rabbit conjugated to biotin-SP (Jackson 1 :500) and avidin FITC (1:100; for 2 hours). Finally, muscles were rinsed for 10-15 min in Slowfade antifade reagent (Molecular Probes). Preparations were mounted onto glass slides in Slowfade antifade under a coverslip. Images of the same NMJs studied for Ca²⁺ imaging were collected under immersion oil with a 40X lens (Nikon), using the Bio-Rad 600 confocal microscope.

Statistics

A Student paired t test was used when a treatment was performed on the same cell (control vs drug) and an Anova was used for comparison between different groups. Both tests were used at a confidence level of 95.0% ($\alpha=0.05$).

RESULTS

Identification of PSCs at the mammalian NMJ.

The validity of the study of synapse-glia interactions at the mammalian NMJ relies on our ability to identify PSCs. However, unlike PSCs at the frog NMJ, mammalian PSCs are not so easily recognized in bright field illumination. Mammalian NMJs have an oval shape and are more compact than amphibian NMJs. They terminate in a slight elevation of the muscle fiber, just after the myelin sheath where the nerve terminal is twisted into a compact junction (Salpeter, 1987). The identification of PSCs was achieved based on these characteristics.

We first confirmed that these criteria of identification were reliable by labeling PSCs using an antibody against the calcium binding protein S-100 which is used as a general marker for Schwann cells (Son and Thompson, 1995). First, cells identified by transmitted light were loaded with the permeant fluorescent Ca^{2+} indicator fluo-3 AM (Figure 1A) and a local application of muscarine increased Ca^{2+} fluorescence in the PSC cell body (Figure 1B) which subsequently decreased back to baseline (data not shown). The nerve-muscle preparation was then processed for immunohistochemistry and the presence of S-100 revealed. The same NMJ was then found and an image of S-100 labeling taken using the confocal microscope. As shown in Figure 1C, the same cells identified as PSCs corresponding to our criteria and that showed a Ca^{2+} response induced by muscarine were labeled also by S-100. This indicates that they were Schwann cells at the NMJ, and hence, that the criteria used to identify PSCs were appropriate. Other Schwann cells that were not loaded with the fluorescent indicator are also labelled by the S-100 antibody (Figure 1C).

Nerve-evoked Ca²⁺ responses in perisynaptic Schwann cells.

The key element in the establishment of synapse-glia interactions is that perisynaptic glial cells are sensitive to synaptic activity and detect transmitter release (Araque et al., 1999; Castonguay et al., 2000). In order to establish the sensitivity of PSCs to synaptic transmission, changes in intracellular Ca²⁺ in PSCs were monitored during the release of transmitter induced by repetitive stimulation of the motor nerve. As shown in Figure 2A, a train of stimuli (50 Hz, 30 sec) triggered an increase in fluorescence. This was observed in all PSCs tested (n = 10) with a mean of 157±15% ΔF/F (Figure 2D). This elevation in intracellular Ca²⁺ occurred, on average, with an onset of 1.5 s after the beginning of the stimulation and the time to reach the maximum amplitude was 15 ± 2s. Ca²⁺ responses decayed to baseline in 82.2 ± 12 s after the interruption of nerve stimulation. In addition, in all PSCs studied, the initial Ca²⁺ response was always followed by a second smaller elevation that occurred after a partial recovery of the initial response. Nerve stimulation at lower frequencies (10, 15 or 25) resulted in smaller Ca²⁺ responses than the ones obtained with stimulation at 50 Hz (data not shown). As seen in Figure 2A, a second train of stimuli given 20 minutes following the first one (break in the x-axis) hardly elicited a Ca²⁺ response. The mean amplitude of the response was only 14±15% ΔF/F (n=5). These results indicate that PSCs detect and are sensitive to synaptic activity. In contrast to the PSCs, no Ca²⁺ responses were detected from the myelinating Schwann cells present at the last myelinated segment of the motor nerve (data not shown).

Is transmitter release required to elicit Ca²⁺ responses?

The response of PSCs to synaptic activity could be due to an increase of extracellular K⁺ ions during high frequency stimulation that would depolarize the cell and open voltage-gated Ca²⁺ channels (MacVicar, 1984; Newman, 1986; Barres et al., 1990; Robitaille et al., 1996) or to the release of neurotransmitters (Jahromi et al., 1992; Reist et al., 1992; Robitaille, 1995). To distinguish between the two possibilities, the Ca²⁺-dependent release of neurotransmitters was prevented by blocking the Ca²⁺ channels that trigger this process. If transmitter release is required to elicit Ca²⁺ responses observed in PSCs, these should be reduced in the presence of the Ca²⁺ channel blocker. However, the Ca²⁺ responses in PSCs should remain unchanged if they are caused by K⁺ accumulation. Transmitter release was blocked using the toxin ω -conotoxin MVIIC (ω -CgTx), which binds irreversibly to Q-type Ca²⁺ channel. It was used at concentrations known to completely block evoked transmitter release at the mouse NMJ (Katz et al., 1997) without altering K⁺ accumulation around the PSCs. After blockade of transmitter release by ω -CgTx (1 μ M), the nerve-evoked Ca²⁺ signal in PSCs was on average $9 \pm 2\% \Delta F/F$ (n=6; Figure 2C). This represents a reduction of 94% in the size of the Ca²⁺ responses in comparison to the ones obtained in the absence of ω -CgTx (Figure 2D). Thus, substances released by the nerve terminal during evoked activity are necessary for the induction of Ca²⁺ responses in PSCs, suggesting that PSCs are sensitive to transmitters released during synaptic activity.

Can ACh trigger Ca²⁺ responses at the mammalian NMJ?

Our data indicate that neurotransmitter substances released during synaptic activity are necessary to elicit Ca²⁺ response in PSCs. As primary candidates, ACh and ATP appear particularly important since ACh is the main neurotransmitter at this synapse and that ATP is co-released at equi-molar concentration (Silinsky, 1975; Smith, 1991). If substances such as the cotransmitters ATP and ACh released by the active nerve terminal induce PSC Ca²⁺ signals, then application of these substances alone should mimic the effects induced by stimulation of the motor nerve.

The ability of PSCs to respond to ACh applied locally was examined first. ACh was applied directly by micropressure (5-10 PSI) to selected PSCs. As shown in Figure 3A, local application of ACh (20 μ M) induced a Ca²⁺ response in all PSCs tested ($350 \pm 18\%$ $\Delta F/F$; $n=10$). Since the Ca²⁺ response obtained by stimulation of the motor nerve decreased during consecutive trains of stimuli (Figure 2A), we wondered whether the Ca²⁺ responses induced by local applications of ACh would also be susceptible to rundown. Indeed, a second application of ACh evoked responses that were significantly smaller than the first ones ($249 \pm 19\%$ $\Delta F/F$ vs $357 \pm 30\%$ $\Delta F/F$ for control; $n=5$; $p=0.0006$, Student paired t-test; Figure 3A, break in the x-axis).

We next investigated whether the rise in intracellular Ca²⁺ triggered by ACh was due to an entry of extracellular Ca²⁺ or due to the release from intracellular stores. To distinguish between the two possibilities, extracellular Ca²⁺ was removed and replaced by a 5 mM Mg²⁺ physiological solution and the ability of PSCs to respond to locally applied ACh was tested again. As shown in Figure 3B, on all PSCs tested, Ca²⁺ responses were elicited by a local application of ACh in 0 Ca²⁺/5 Mg²⁺ 20 min after a

first application in normal Ca^{2+} indicating that ACh induced the release of Ca^{2+} from internal stores. Surprisingly, the size of Ca^{2+} responses induced by ACh in 0 $\text{Ca}^{2+}/5 \text{Mg}^{2+}$ was significantly larger than the size of the responses obtained in the presence of extracellular Ca^{2+} ($421 \pm 15\% \Delta\text{F}/\text{F}$ vs $343 \pm 22\% \Delta\text{F}/\text{F}$ for control; $n=5$; $p=0.001$, Student paired t-test; Figure 3B). This indicates that, although the contribution of internal stores is essential for the induction of Ca^{2+} responses by ACh, the presence of extracellular Ca^{2+} down-regulates the activation of the release of Ca^{2+} from internal stores by ACh.

Muscarinic receptors mediate ACh effects.

For a better understanding of the role of glial cells at the synapse, it is necessary to characterize further the cellular receptors and functions of these glial cells. To determine the type of cholinergic receptors involved, we first used an antagonist of the nicotinic ACh receptors (AChRs). If Ca^{2+} responses to ACh were caused by nicotinic AChRs, they should be blocked by the nicotinic cholinergic antagonist α -BuTx. To test the effectiveness of α -BuTx (20 μM), preparations were perfused with the antagonist for at least 30 min prior to local application of ACh on PSCs was performed. The ability of PSCs to respond to ACh was not affected by the presence of α -BuTx. Indeed, Ca^{2+} responses to ACh were still obtained in the presence of the toxin in all cells tested and the size of the Ca^{2+} responses ($317 \pm 13\% \Delta\text{F}/\text{F}$; $n=5$) was not significantly different from the control responses (Figure 4E).

The lack of effect of nicotinic antagonist suggests that PSC AChRs are not nicotinic but rather, that the Ca^{2+} response induced by ACh was likely due to the activation of muscarinic receptors. If this were the case, muscarinic antagonists such as

atropine should prevent Ca^{2+} responses to ACh. As shown in Figure 4E, the presence of atropine prevented the production of Ca^{2+} responses by ACh in all cells tested ($n=5$). The mean size of the responses was only $14\pm 6\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$, which is significantly smaller than the responses obtained from the same cells by a first application of ACh (One way ANOVA, $p = 0.001$).

We next investigated the ability of the muscarinic agonist muscarine to evoke Ca^{2+} responses. Local application of muscarine ($20\ \mu\text{M}$) induced a Ca^{2+} response in all cells on which it was applied ($n=15$) with a mean amplitude of $275\pm 43\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ (Figure 4A). Similar to our observation using ACh, a second application of muscarine caused Ca^{2+} elevations that were significantly smaller than ones obtained with a first application ($150\pm 12\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$; $n=9$; $p=0.02$, Student paired t-test; Figure 4A).

If indeed ACh-induced Ca^{2+} responses are solely mediated by muscarinic receptors, muscarine-induced Ca^{2+} responses in PSCs should also be mediated by internal stores with a regulation by extracellular Ca^{2+} . This was tested by measuring Ca^{2+} responses in the absence of external Ca^{2+} where muscles were perfused with $0\text{mM}\ \text{Ca}^{2+}/\ 5\text{mM}\ \text{Mg}^{2+}$ for 30 min. In these conditions, application of muscarine ($20\ \mu\text{M}$) evoked Ca^{2+} responses that were significantly larger ($360\pm 30\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$; $n=6$; $p=0.003$, Student paired t-test; figure 4B) than the responses obtained upon a first application on the same cell in the presence of Ca^{2+} . These results indicate that, similarly to ACh-mediated Ca^{2+} responses, Ca^{2+} responses induced by muscarine were due to the release of Ca^{2+} from internal stores and regulated by extracellular Ca^{2+} . As a whole, these data indicate that AChRs of the mammalian PSCs are of the muscarinic type.

Can ATP and adenosine trigger Ca²⁺ responses at the mammalian NMJ?

Glial cells also express purinergic receptors. At the frog NMJ, application of ATP on PSCs induces the release of Ca²⁺ from internal stores (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995) due to the activation of P_{2X} and P_{2Y} receptors (Robitaille, 1995). To examine the involvement of endogenous purines in the modulation of mammalian PSCs *in situ*, and test whether ATP and adenosine can activate PSCs, changes in intracellular Ca²⁺ induced by local application of ATP and adenosine were monitored.

ATP (20μM) induced Ca²⁺ responses in all PSCs tested (299±30% ΔF/F; n=41; Figure 5A) while local applications of adenosine (20μM) resulted in a rise of fluorescence of 441±51% ΔF/F also in all PSCs tested (n=19; Figure 5C). A second application of ATP evoked responses that were significantly smaller than the first response (207±30% ΔF/F vs 246±38% ΔF/F for control; n=8; p=0.0004; Figure 5A). Similarly, a second application of adenosine evoked responses that were significantly smaller than the first response (314±52% ΔF/F vs 450±77% ΔF/F; n=11; p=0.0004, Student paired t-test; figure 5C).

In most glial cells (Salter and Hicks, 1994), including PSCs at the amphibian NMJ (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995), purinergic agonists elicit an elevation in intracellular Ca²⁺ that involves the release of Ca²⁺ from internal stores. This possibility was tested by replacing extracellular Ca²⁺ ions by Mg²⁺ (5 mM). As shown in Figure 5B, Ca²⁺ responses induced by local application of ATP still induced Ca²⁺ responses in all mammalian PSCs tested even in the absence of Ca²⁺ in the solution, pointing toward a critical role of Ca²⁺ internal stores in the production of the Ca²⁺ responses. On average, the amplitude of the Ca²⁺ responses was 461±98% ΔF/F. However, similarly to

ACh-induced Ca^{2+} responses, local application of ATP in absence of extracellular Ca^{2+} evoked Ca^{2+} responses that were significantly larger than the ones evoked by a first application of ATP on the same cells ($273 \pm 42\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ for control; $n=11$; $p=0.02$, Student paired t-test; Figure 5B). In a similar fashion, adenosine also caused Ca^{2+} responses in absence of external Ca^{2+} that were significantly larger than those obtained in the presence of Ca^{2+} ($497 \pm 72\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ vs $428 \pm 65\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$; $n=8$; $p=0.001$, Student paired t-test; Figure 5D). These results indicate that PSCs at the mammalian NMJ detect adenosine and ATP and that these substances induce the release of Ca^{2+} from internal stores via a mechanism that is negatively regulated by external Ca^{2+} .

Are purinergic receptors present on PSCs?

To verify the presence of adenosine and ATP receptors on the mammalian PSCs, the ability of these agonists to evoke Ca^{2+} responses in PSCs was tested in the presence of antagonists for P2 and P1 receptors. Suramin, a non-selective P2 receptor antagonist was first tested. Ca^{2+} responses induced by ATP should be abolished in the presence of this antagonist if they are mediated by the activation of P2 receptors. However, Ca^{2+} responses were still induced by local applications of ATP (20 μM) ($289 \pm 34\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$; $n=6$; Figure 6A) and the average amplitude of the responses was not significantly different from responses evoked by the same cells prior to application of the antagonist (Student paired t test, $p = 0.239$). It is unlikely that the lack of effect was due to the inability of suramin to block P2 receptors since the same solution blocked ATP-induced responses at PSCs of amphibian NMJs. Hence, this result suggest that ATP raised intracellular Ca^{2+} by mechanisms that do not activate specific P2 receptors.

Unlike ATP-induced Ca^{2+} responses, Ca^{2+} responses evoked by adenosine were almost completely abolished in the presence of CPT (10 μM), an A1 receptor antagonist ($32\pm 6\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$; $n=5$; Figure 6B). This value was significantly smaller than the responses obtained on the same cells prior to the application of the antagonist in the perfusate (Student paired t test, $p = 0.001$). This suggests that the adenosine-induced Ca^{2+} responses were mediated by the activation of A1 receptors.

Ecto-enzymes present in the synaptic cleft (Salter et al., 1993; Ziganshin, 1993) will cause the dephosphorylation of ATP and lead to adenosine formation. Since adenosine appears as an active substance at the mammalian NMJ, it is possible that the Ca^{2+} responses evoked by local applications of ATP were due to the indirect action of adenosine on A1 receptors. This possibility was tested by applying locally ATP in the presence of CPT. However, the presence of CPT (10 - 20 μM) did not block the Ca^{2+} responses induced by ATP, suggesting that the action of ATP was not mediated by an indirect activation of A1 receptors.

Endogenous ACh and adenosine mediate nerve-evoked Ca^{2+} responses in PSCs.

Our results indicate that functional muscarinic and A1 adenosine receptors are present on PSCs of the mammalian NMJ. We next wondered whether ACh and adenosine released by the presynaptic terminal during synaptic activity could mediate the activation of PSCs and the triggering of the nerve stimulation-evoked Ca^{2+} responses in PSCs. Since nerve-evoked Ca^{2+} responses decrease during consecutive trains of stimuli (see Figure 2A), the effects of the two different blockers on nerve-evoked Ca^{2+} responses were tested on different preparations and each preparation was stimulated only once.

Since ACh is the major neurotransmitter released at skeletal NMJs during synaptic activity, we examined first the impact of blockade of ACh receptors on nerve-evoked Ca^{2+} responses. The blockade of ACh receptors with atropine (20 mM) greatly reduced the amplitude of Ca^{2+} responses induced by stimulation of the motor nerve to $33 \pm 3\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ ($n=5$; Figure 7A). This value is significantly smaller than the one obtained in the absence of atropine ($157 \pm 15\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$; One Way ANOVA, $p < 0.05$) indicating that the activation of ACh receptors was necessary for optimal Ca^{2+} responses and, hence, activation of PSCs during synaptic transmission.

We next tested the impact the A1 antagonist CPT would have on Ca^{2+} responses evoked by stimulation of the motor nerve. As shown in Figure 7B, Ca^{2+} responses were reduced to $98 \pm 6\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ ($n=6$; Figure 7B) in the presence of CPT. Although the reduction in the size of Ca^{2+} responses was more modest than the effect of the muscarinic antagonist, the size of the Ca^{2+} responses was significantly smaller than the control ones (One way ANOVA, $p < 0.05$). This indicates that adenosine receptors probably modulate the Ca^{2+} responses induced by nerve evoked transmitter release.

DISCUSSION

We present here direct evidence that mammalian PSCs *in situ* respond to the release of neurotransmitters induced by stimulation of the motor nerve as indicated by an elevation of intracellular Ca^{2+} level. This elevation originated mainly from the release of Ca^{2+} from internal stores and muscarinic and adenosine A1 receptors are the main two receptor systems involved in the communication between the nerve terminal and the PSCs. Furthermore, extracellular Ca^{2+} negatively affects the ability of PSCs to

respond to neurotransmitters. It is concluded that, like glial cells at other synapses, synapse-glia interactions are also taking place at the mammalian NMJ but with particularities associated with this synapse.

Cholinergic receptor on the mammalian PSCs.

When expressed by glial cells, including the PSCs of the amphibian NMJ (Robitaille et al., 1997), cholinergic receptors have always been determined to be of the muscarinic type, mainly linked to internal Ca^{2+} stores regulated by an inositol 1,4,5-triphosphate receptor (Hamprecht, 1986). Here we show that PSCs of the mammalian NMJ are no exception and that the cholinergic receptors are of the muscarinic type as indicated by the lack of effects of nicotinic antagonists and by the ability of muscarine to induce Ca^{2+} responses while atropine blocked the ACh-induced responses. The blockade of Ca^{2+} responses by the non-specific muscarinic antagonist atropine also indicates that PSCs of the mammalian NMJ, unlike PSCs of the amphibian NMJ (Robitaille et al., 1997), resemble other glial cells in which the muscarinic receptors are classified as one of the five known subtypes (Robitaille et al., 1997). Moreover, muscarinic-dependent Ca^{2+} responses in glial cells also share another characteristic, that is, the rundown of the response upon repetitive applications of the agonists (Dave et al., 1991; Jahromi et al., 1992; Robitaille et al., 1997).

Although mammalian and amphibian PSCs share a number of properties, there are a few major functional differences. First, the type of muscarinic receptor present is different. Indeed, PSCs of the amphibian NMJ lack sensitivity to general muscarinic antagonists in particular to atropine while we showed in this study that mammalian

PSCs were atropine-sensitive. Second, the molecular machinery associated with the muscarinic receptors of mammalian PSCs differs from the one associated with receptors found on the frog PSCs, as indicated by oscillations in Ca^{2+} responses evoked by muscarine and by stimulation of the motor nerve suggesting a calcium-induced/calcium-release phenomenon. These oscillations are not observed at PSCs of the amphibian NMJ (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997). Moreover, the release of Ca^{2+} from internal stores in mammalian PSCs appears negatively regulated by external Ca^{2+} since Ca^{2+} responses in PSCs were largely increased when external Ca^{2+} was replaced by Mg^{2+} . These two differences are likely to have major impacts on the functions of PSCs. On one hand, different types of receptors are likely to have different regulatory actions resulting in the production of different second messengers. On the other hand, the different Ca^{2+} activation of PSCs would likely result in the induction of different Ca^{2+} -dependent mechanisms. Hence, although they show fundamental synapse-glia interactions, amphibian and mammalian NMJs differ in the properties of these interactions.

Purinergic receptors on the mammalian PSCs.

It is now established that ATP is released during synaptic transmission (Smith, 1991; Zimmermann, 1994) and is involved in intercellular signaling in various systems (Sneddon and Burnstock, 1984; Benham, 1989; Salter and Hicks, 1994; Zimmermann, 1994; Lyons et al., 1995). Adenosine and ATP receptors are widely distributed (Burnstock, 1990; Salter et al., 1993) and are present on several types of glial cells such as cultured astrocytes (Lai and Wong, 1991; Salter and Hicks, 1994), glioma cells

(Chueh et al., 1994), microglial cells (Walz et al., 1993) and glial cells of the rat optic nerve (Kriegler and Chiu, 1993). Moreover, ATP appears necessary for the spread of Ca^{2+} waves in a syncytium of astrocytes (Guthrie et al., 1999).

The results of the present study suggest that PSCs possess adenosine receptors of A1 type as indicated by the blockade of adenosine-induced Ca^{2+} responses by CPT, an A1 receptor antagonist. However, and somewhat unexpectedly, Ca^{2+} responses induced by local applications of ATP were not blocked by suramin, a non-specific P2 receptor antagonist indicating that the effects observed with ATP were not due to the activation of P2 receptors. Similar to our results, purinergic receptors are also found on amphibian PSCs. However, at the frog NMJ, in addition to adenosine receptor of the A1 subtype, ATP receptors (P_{2X} , P_{2Y}) are also found (Robitaille, 1995) as indicated by the ability of specific P_{2X} and P_{2Y} agonists to elicit Ca^{2+} responses in PSCs and by the complete and reversible block by suramin of ATP-induced responses (Robitaille, 1995). At the mammalian PSCs, adenosine released during synaptic activity triggers Ca^{2+} responses as indicated by the substantial reduction by CPT of Ca^{2+} responses elicited by nerve stimulation. However, at the amphibian NMJ, ATP released during synaptic transmission activates PSCs while endogenous adenosine had no apparent effect on nerve-evoked Ca^{2+} responses.

Owing to the presence of ecto-ATPases (Zimmermann, 1992, 1994), one possibility might have been that ATP-induced responses were due to the indirect activation of adenosine receptors as a consequence of ATP degradation into adenosine. However, our results are not consistent with this possibility since ATP-induced Ca^{2+} responses persisted even in the presence of the adenosine receptor antagonist. Another

possibility might be that ATP acted via ectoprotein-kinases since they are known to be located on the surface of several cells (Zimmermann, 1994) and that they require the presence of Mg^{2+} ions (Ehrlich et al., 1986), conditions in which our experiments were performed.

Glial cells detect neuronal activity and synaptic transmission.

Glial cells at CNS synapses detect the release of neurotransmitters induced by neuronal activity (Porter and McCarthy, 1996, 1997; Carmignoto et al., 1998; Grosche et al., 1999). This phenomenon is not an emergent property of a complex multicellular network since similar results were obtained at the frog NMJ where PSCs detect, and are modulated by, synaptic activity generated by a single synapse (Jahromi et al., 1992; Georgiou et al., 1994, 1999; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997; Bourque and Robitaille, 1998).

The data presented here demonstrate that mammalian PSCs can also detect synaptic activity and that a Ca^{2+} -dependent cascade of events is triggered. This observation is consistent with the properties reported for all other synapses where synapse-glia interactions have been studied (Araque et al., 1999; Castonguay et al., 2000). Indeed, synaptic activity will trigger an elevation of intracellular Ca^{2+} in PSCs as a result of internal stores activation. Moreover, this activation is frequency-dependent and is regulated by the main neurotransmitters present at the synapse regulating G-protein-coupled receptors. Hence, the results obtained at the mouse NMJ further support the concept that synapse-glia interactions are ubiquitous at chemical synapses where glial processes are present.

Because synapse-glia interactions are dependent upon the release of neurotransmitters by chemical synapses (Araque et al., 1999; Castonguay et al., 2000), it is expected that the activity of perisynaptic glial cells be governed by the main neurotransmitters found at the synapses they are associated with. In the present study, it is shown that PSCs activation requires the release of neurotransmitter as shown by the blockade of transmitter release with ω -CgTx MVIIC. In particular, ACh released during synaptic transmission modulates the activity of the PSCs since Ca^{2+} responses were almost completely abolished in the presence of the muscarinic receptor antagonist atropine. Consistent with this observation and similarly to ACh-induced Ca^{2+} responses, we found that Ca^{2+} responses induced by evoked transmitter release also showed a pronounced rundown when elicited by repetitive trains of stimuli. This property was also present at PSCs of the amphibian NMJ (Jahromi et al., 1992).

Functional differences of mammalian and amphibian PSCs.

Although mammalian and amphibian PSCs share a number of properties, there are a few major functional differences (Table 1). First, the type of receptors present are different. Indeed, PSCs of the amphibian NMJ lack sensitivity to general muscarinic antagonists in particular to atropine while we showed in this study that mammalian PSCs were atropine-sensitive. Moreover, the purinergic receptors are also different since amphibian PSCs also possess two ATP receptor subtypes (P_{2X} , P_{2Y}) in addition to A1 receptors (Robitaille, 1995). Moreover, the contribution of purinergic receptors in the activation of PSCs differs since mouse PSCs are regulated by A1 receptors during synaptic activity while the amphibian PSCs are activated by ATP receptors. The second

major difference resides in the molecular machinery associated with the receptors. Indeed, oscillations in Ca^{2+} responses evoked by muscarine and by stimulation of the motor nerve are observed in mammalian PSCs but not at amphibian PSCs (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997). Moreover, the Ca^{2+} responses are negatively regulated by external Ca^{2+} at mammalian but not at amphibian PSCs. The presence of these oscillations and the negative regulation by external Ca^{2+} are consistent with a calcium-dependent/calcium-release phenomenon that would only be present in mammalian PSCs. This negative Ca^{2+} regulation may contribute to the more pronounced rundown observed at mammalian PSCs. These differences will have major impacts on PSCs functions since different types of receptors will have different regulatory actions resulting in the production of different second messengers. Also, the different Ca^{2+} regulation in PSCs will result in the induction of different Ca^{2+} -dependent mechanisms. Hence, although amphibian and mammalian NMJs show fundamental synapse-glia interactions, the properties of these interactions differ.

Properties of synapse-glia interactions as a function of synapse identity.

Our results show that mammalian PSCs are equipped with various receptors to detect the release of neurotransmitters and, hence, allowing synapse-glia interactions. The data presented in this study reveal the existence of an important common phenomenon concerning synapse-glia interactions. Indeed, the comparison between the synapse-glia interactions at the mammalian and amphibian NMJs reveals that similar events are occurring at both synapses. However, for glial cells to be effective synaptic and neuronal modulators, it is essential that they possess specific characteristics in order

to be adapted to the synaptic environments they are associated with (Keyser and Pellmar, 1997). Consistent with this possibility, the present study also reveals that there are important functional differences in the type of receptors present and in the responsiveness of the PSCs. Hence, we propose that, although synapse-glia interaction is a common phenomenon at chemical synapses associated with glial cells, the nature and the extend of the interactions will be fine-tuned according to the properties and function of the synapse they are associated with. Because perisynaptic glial cells are involved in the modulation of synaptic transmission (Parpura et al., 1994; Robitaille, 1998; Araque et al., 1999; Castonguay et al., 2000), there involvement in the regulation of synaptic functions will be tuned according to their functional properties and, hence, adjusted to their synaptic environment.

REFERENCES

- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Astrow SH, Qiang H, Ko CP (1998) Perisynaptic Schwann cells at neuromuscular junctions revealed by a novel monoclonal antibody. *J Neurocytol* 27:667-681.
- Barres BA, Chun LL, Corey DP (1990) Ion channels in vertebrate glia. *Annu Rev Neurosci* 13:441-474.
- Benham CD (1989) ATP activated channels gate calcium entry in single smooth muscle cells dissociated from rabbit ear artery. *J Physiol (Lond)* 419:689-701.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391: 281-285.
- Bourque M-J, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (London)* 512:197-209.
- Burnstock G (1990) Purinergic mechanisms. *Am. N.Y. Acad Sci* 603:1-17.

Carmignoto G, Pasti L, Pozzan T (1998) On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes in situ. *J Neurosci* 18:4637-4645.

Castonguay A, Robitaille R (2000) Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial internal stores at the neuromuscular synapse. In revision in *J Neurosci*.

Castonguay A, Lévesque L, Robitaille R (2000) Glial cells as active partners in synaptic function. In Press, *Prog Brain Res*.

Chen L, Ko CP (1994) Extension of synaptic extracellular matrix during nerve terminal sprouting in living frog neuromuscular junctions. *J Neurosci* 14(2) :796-808.

Chueh S-H, Hsu L-S, Song S (1994) Two distinct ATP signaling mechanisms in differentiated neuroblastoma X glioma hybrid NG108-15 cells. *Mol Pharmacol* 45:532-539.

Dave V, Gordon GW, McCarthy KD (1991) Cerebral type 2 astroglia are heterogenous with respect to their ability to respond to neuroligands linked to calcium mobilization. *Glia* 4:440-447.

Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP (1994) Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12:443-455.

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

Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomain for neuron-glia interaction : parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2 :139-143.

Hamprecht B (1986) Astroglia cells in culture: receptors and cyclic nucleotides. In *Astrocytes*, S. Fedoroff and A. Vernadakis, eds. (Orlando, Florida : Academic Press, Inc.), 261-294.

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

Keyser DO, Pellmar TC (1997) Regional differences in glial cell modulation of synaptic transmission. *Hippocampus* 7:73-77.

Kriegler S, Chiu SY (1993) Calcium signaling of glial cells along mammalian axons. *J Neurosci* 13: 4229-4245.

Lai K-M, Wong PCL (1991) Metabolism of extracellular adenine nucleotides by cultured rat brain astrocytes. *J Neurochem* 57: 1510-1515.

Lyons SA, Morell P, McCarthy KD (1995) Schwann cell ATP-mediated calcium increases in vitro and in situ are dependent on contact with neurons. *Glia* 13: 27-38.

MacVicar BA (1984) Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226: 1345-1347.

Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.

Newman EA (1986) Regional specialization of the membrane of retinal glial cells and its importance to K⁺ spatial buffering. *Ann N Y Acad Sci* 481:273-286.

Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18(11):4022-4028.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369: 744-747.

Pfrieger FW, Barres BA (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277(5332):1684-1687.

Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16 :5073-5081.

Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51 :439-455.

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

Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 26: 847-855.

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

Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP (1997) Muscarinic Ca^{2+} responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 504.2:337-347.

Salpeter MM (1987) The vertebrate neuromuscular junction. Editor, Miriam M. Salpeter, New York: Liss.

Salter MW, De Koninck Y, Henry JL (1993) Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41: 125-156.

Salter MW, Hicks JL (1994) ATP-evoked increases in intracellular calcium in neurons and glia from the dorsal spinal cord. *J Neurosci* 14: 1563-1575.

Smith DO (1991) Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat. *J Physiol* 432: 343-354.

Sneddon P, Burnstock G (1984) ATP as a cotransmitter in rat tail artery. *Eur J Pharmacol* 106: 149-152.

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

Son Y-J, Thompson WJ (1995b) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14: 133-141.

Son Y-J, Trachtenberg JT, Thompson WJ (1996) Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci* 19(7): 280-285.

Tsien RY (1989) Fluorescent probes of cell signaling. *Ann Rev Neurosci* 12: 227-253.

Ziganshin AU, Hoyle CH, Bo X, Lambrecht G, Mutschler E, Baumert HG, Burnstock G (1993) PPADS selectively antagonizes P2X-purinoceptor-mediated responses in the rabbit urinary bladder. *Br J Pharmacol* 110: 1491-1495.

Zimmermann H (1994) Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci* 17: 420-426.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: *Identification of PSCs at the mammalian NMJ.*

A) False color image of a mammalian NMJ loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator fluo-3 AM. Blue indicates a low level of Ca^{2+} and red a high level. Two PSCs (arrows) at rest before local application of muscarine. **B)** The same PSCs as in A, after application of muscarine (20 μM). Note the rise in fluorescence induced by muscarine. **C)** Labeling of PSCs of the same NMJ with anti-S100, a calcium binding protein used as a general marker for Schwann cells. Note that the two cells that responded to muscarine were also labelled by the S100 antibody. Scale bar, 20 μm .

FIGURE 2: *Nerve-evoked Ca^{2+} responses in PSCs.*

Ca^{2+} responses obtained using the fluorescent Ca^{2+} indicator fluo-3 AM and monitored using a Bio-Rad 600 confocal microscope. Blue indicates low level of calcium, red high level. **A)** Changes in fluorescence ($\% \Delta F/F$) before, during (bar), and after motor nerve stimulation (50 Hz, 30 sec). Note that relative increase in Ca^{2+} fluorescence to a second train of stimuli applied 20 minutes later (break in the x-axis) was much reduced. **B)** Ca^{2+} response in the same PSC as in A, before (1), during (2-3-4) and after (5) transmitter release induced by repetitive stimulation of the motor nerve (50Hz, 30 sec). The corresponding time at which each image was taken is illustrated on the graph in A with the corresponding number of the figure above. **C)** Changes in fluorescence ($\% \Delta F/F$) before, during (bar), and after motor nerve stimulation (50Hz, 30 sec) in the presence of ω -conotoxin MVIIC. Note that the increase in intensity of the fluorescence was strongly reduced when transmitter release was blocked by ω -conotoxin MVIIC

(1 μ M), a Q-type Ca^{2+} blocker. Different preparation than A. **D)** Mean \pm S.E.M. of amplitude of Ca^{2+} responses in PSCs elicited by nerve stimulation in the absence and in the presence of ω -conotoxin MVIIC. ($p=0.001$, Student paired t-test).

FIGURE 3: Ca^{2+} responses of PSCs to local application of ACh.

A) Changes in fluorescence over time caused by the local application of ACh (20 μ M) for 200 ms in normal physiological solution. Application of ACh caused a Ca^{2+} response in all PSCs studied. A second application 20 min later (break in the x-axis) induced smaller changes in fluorescence. **B)** Changes in fluorescence caused by the local application of ACh (200 ms) in the presence (solid line) and in the absence (dashed line) of external Ca^{2+} for the same PSCs. Ca^{2+} was replaced by 5mM Mg^{2+} . Note that ACh application induced larger changes in fluorescence in the absence of external Ca^{2+} . **C)** Mean \pm S.E.M. of relative changes in Ca^{2+} responses induced by a first and a second application of ACh (20 μ M) and for application of ACh in absence of external Ca^{2+} .

FIGURE 4: Ca^{2+} responses of PSCs to local application of muscarine.

A) Changes in fluorescence over time caused by the local application of muscarine (20 μ M) for 200 ms in normal physiological solution. Application of muscarine caused a Ca^{2+} response in all PSCs studied. A second application 20 min later (break in the x-axis) induced smaller changes in fluorescence. **B)** Changes in fluorescence caused by the local application of muscarine (200 ms) in the presence (solid line) and in the absence (dashed line) of external Ca^{2+} for the same PSCs. Ca^{2+} was replaced by 5 mM Mg^{2+} . Note that muscarine induced larger changes in fluorescence in the absence of

external Ca^{2+} . **C)** Changes in fluorescence caused by the local application of acetylcholine (200 ms) in the presence of α -BuTx (20 μM). The increase in intensity of the fluorescence induced by the local application of ACh was unaffected by α -BuTx. **D)** Comparison of mean \pm S.E.M. of Ca^{2+} responses induced by a first and a second application of muscarine (left) and application of muscarine in presence and absence of external Ca^{2+} (right). **E)** Comparison of mean \pm S.E.M. of Ca^{2+} responses induced by ACh alone, in the presence of α -BuTx and in the presence of atropine.

FIGURE 5: Ca^{2+} responses of PSCs to local application of ATP and adenosine.

A) Changes in fluorescence over time caused by the local application of ATP (20 μM) for 200 ms in normal physiological solution. Application of ATP caused a Ca^{2+} response in all PSCs studied. A second application 20 min later (break in the x-axis) induced smaller changes in fluorescence. **B)** Changes in fluorescence caused by the local application of ATP (200 ms) in the presence (solid line) and in the absence (dashed line) of external Ca^{2+} for the same PSCs. Note that ATP induced larger changes in fluorescence in the absence of external Ca^{2+} . **C)** Changes in fluorescence over time caused by the local application of adenosine (20 μM) for 200 ms in normal physiological solution. Application of adenosine caused a Ca^{2+} response in all PSCs studied. A second application 20 min later (break in the x-axis) induced smaller changes in fluorescence. **D)** Changes in fluorescence caused by the local application of adenosine in the presence (solid line) and in the absence (dashed line) of external Ca^{2+} for the same PSCs. Note that adenosine induced larger changes in fluorescence in the absence of external Ca^{2+} . **E)** Comparison of mean \pm S.E.M. of Ca^{2+} responses induced by a first

and a second application of ATP (left) and the application of ATP in the presence and in the absence of external Ca^{2+} (right). **F)** Comparison of mean \pm S.E.M. of Ca^{2+} responses induced by a first and a second application of adenosine (left) and application of adenosine in the presence and in the absence of external Ca^{2+} (right).

FIGURE 6: *Ca^{2+} responses of PSCs to local application of ATP and adenosine in presence of purinergic antagonists.*

A) Changes in fluorescence caused by the local application of ATP before and after (break in the x-axis) a 20 min perfusion with suramin ($100\mu\text{M}$), a nonspecific P2 antagonist. Note that the increase in intensity of the fluorescence induced by the local application of ATP was unaffected by the presence of suramin, **B)** Changes in fluorescence caused by the local application of adenosine before and after a 20 min perfusion with CPT ($10\mu\text{M}$).

FIGURE 7: *Nerve-evoked Ca^{2+} responses in PSCs in presence of atropine and CPT.*

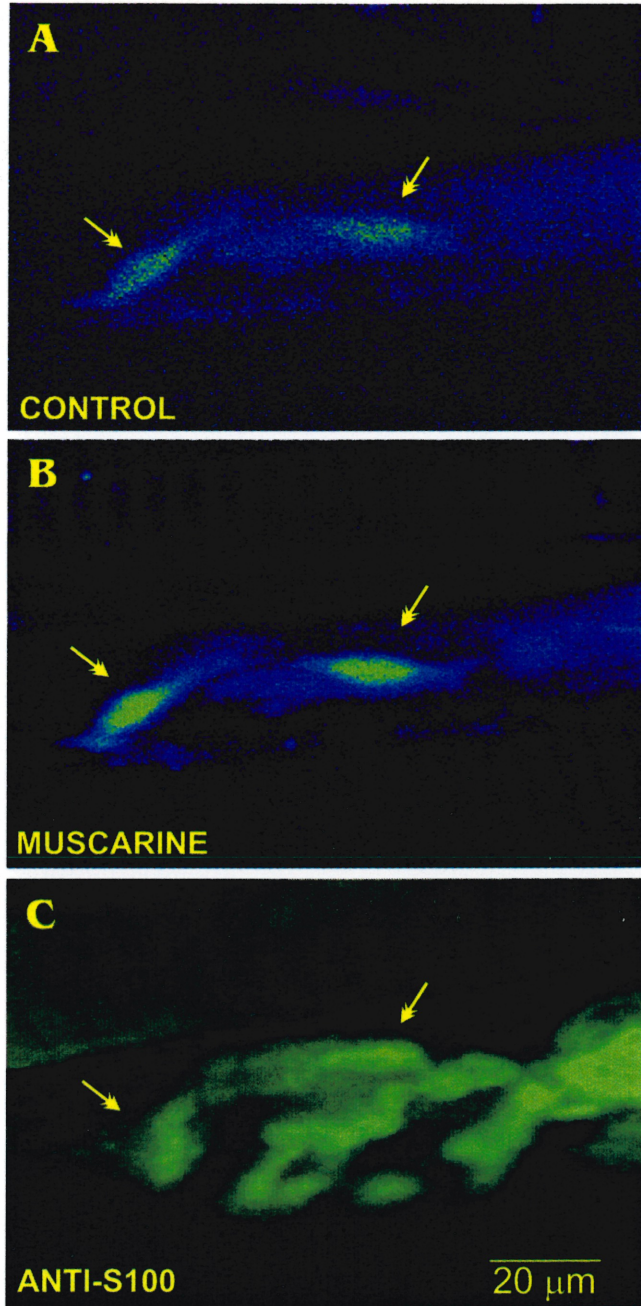
A) Changes in fluorescence of a PSC before, during (bar) and after repetitive motor nerve stimulation (50Hz, 30 sec) following 20 min perfusion with atropine ($20\mu\text{M}$), a muscarinic antagonist. The grey zone illustrates the mean \pm S.E.M. of nerve-evoked Ca^{2+} responses obtained in absence of any antagonists. **B)** Changes in fluorescence of a PSC before, during (bar) and after repetitive motor nerve stimulation (50Hz, 30 sec) following 20 min perfusion with CPT ($10\mu\text{M}$), an A1 antagonist. The grey zone illustrates the mean \pm S.E.M. of nerve-evoked Ca^{2+} responses obtained in absence of any antagonists.

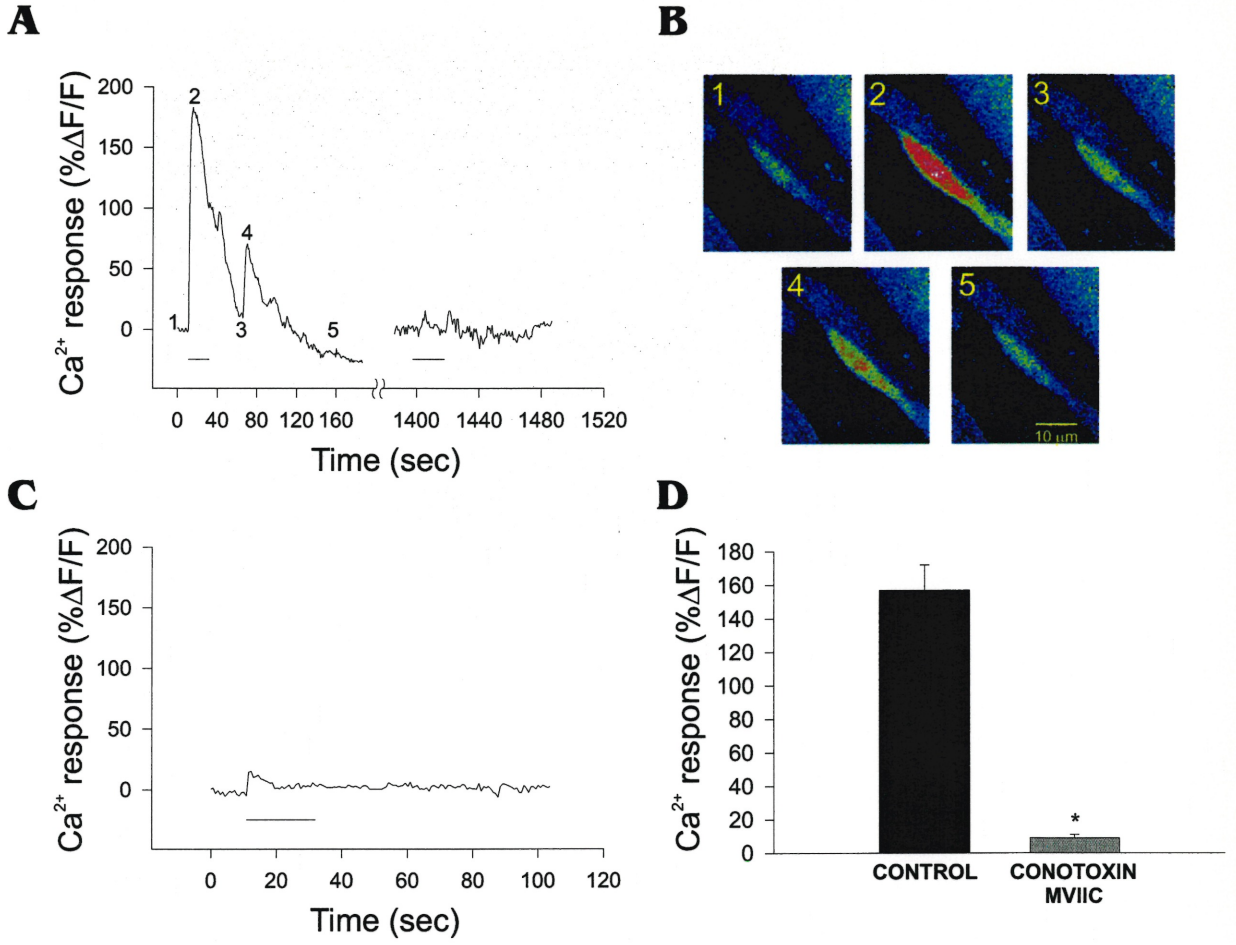
TABLE 1

Comparison of the properties of PSCs at the mammalian and amphibian NMJs

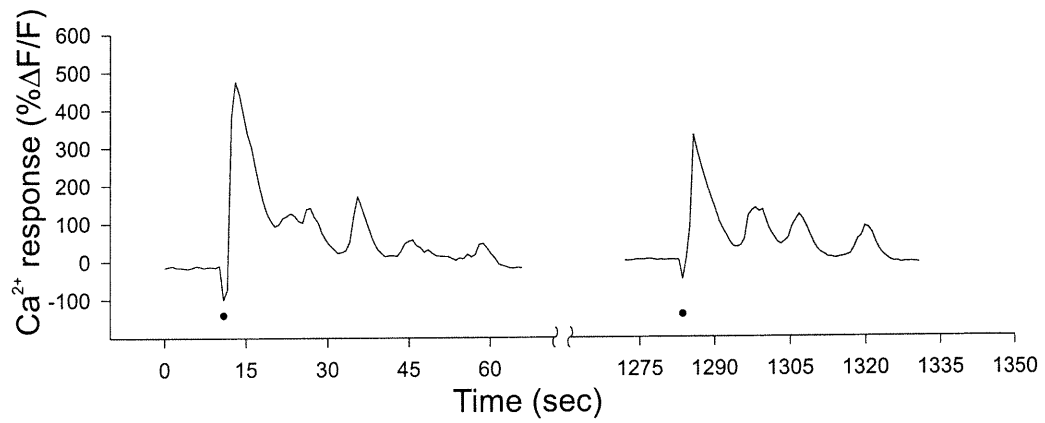
	<i>Cholinergic receptors</i>	<i>Adenosine receptors</i>	<i>ATP receptors</i>	<i>Ca²⁺ mechanisms</i>	<i>Ca²⁺ regulation</i>	<i>Oscillation</i>	<i>Rundown</i>
Mouse NMJ	Muscarinic	A ₁	No	Internal stores	Negative regulation	Yes	Very steep
Frog NMJ	Muscarinic not M1-M5	A ₁	P2 _x P2 _y	Internal stores IP ₃ R	No	No	Gradual

Comparison of the functional similarities and differences of mouse and frog PSCs concerning the type of receptors, Ca²⁺ regulatory mechanisms and responses to synaptic transmission evoked by nerve stimulation.

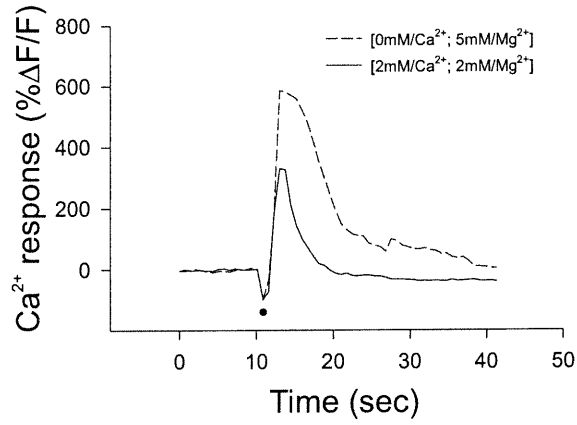




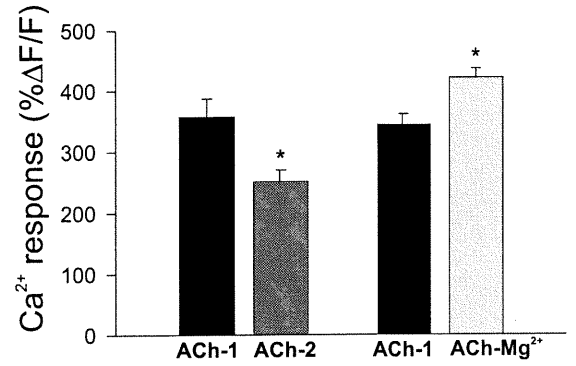
A

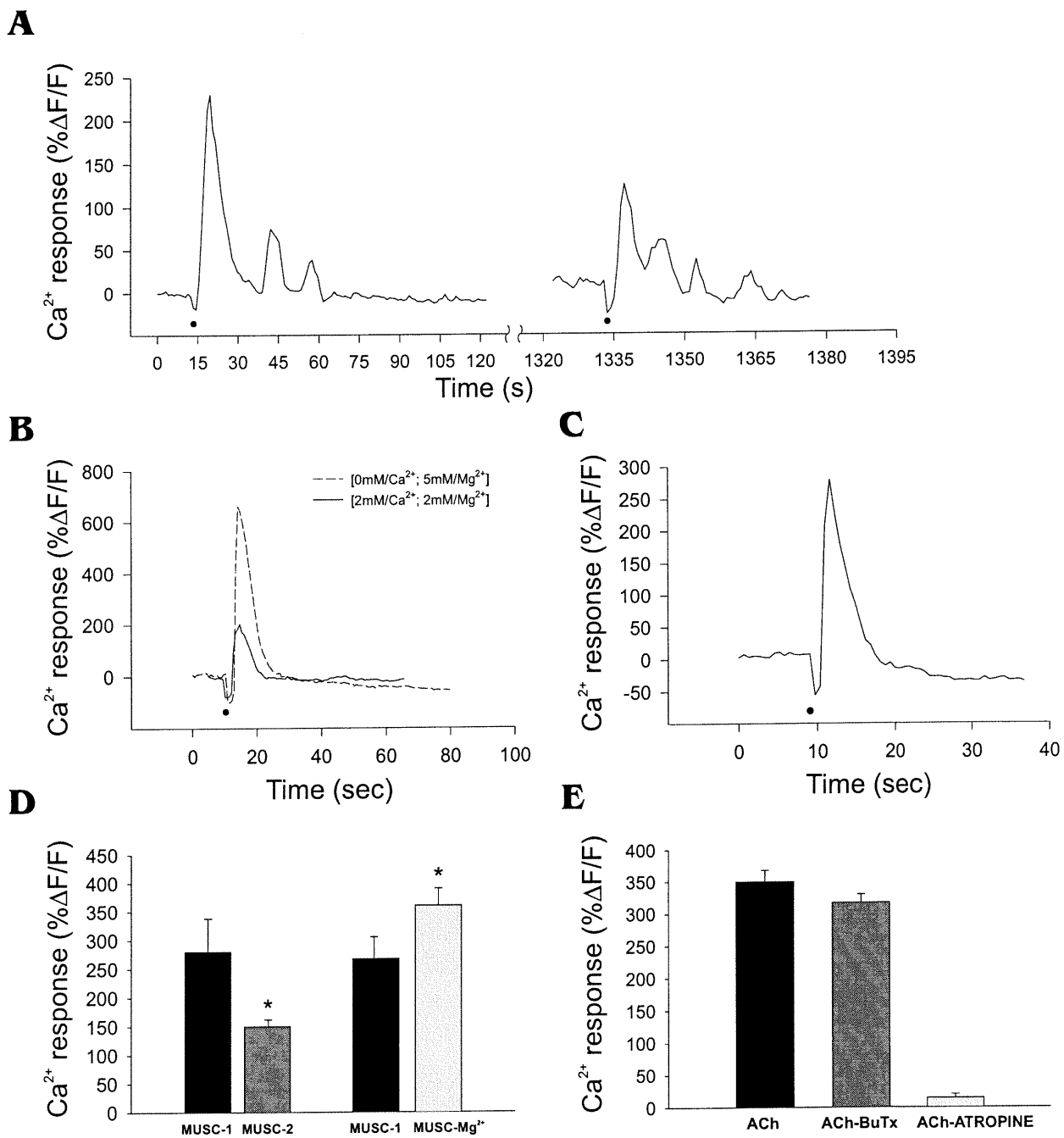


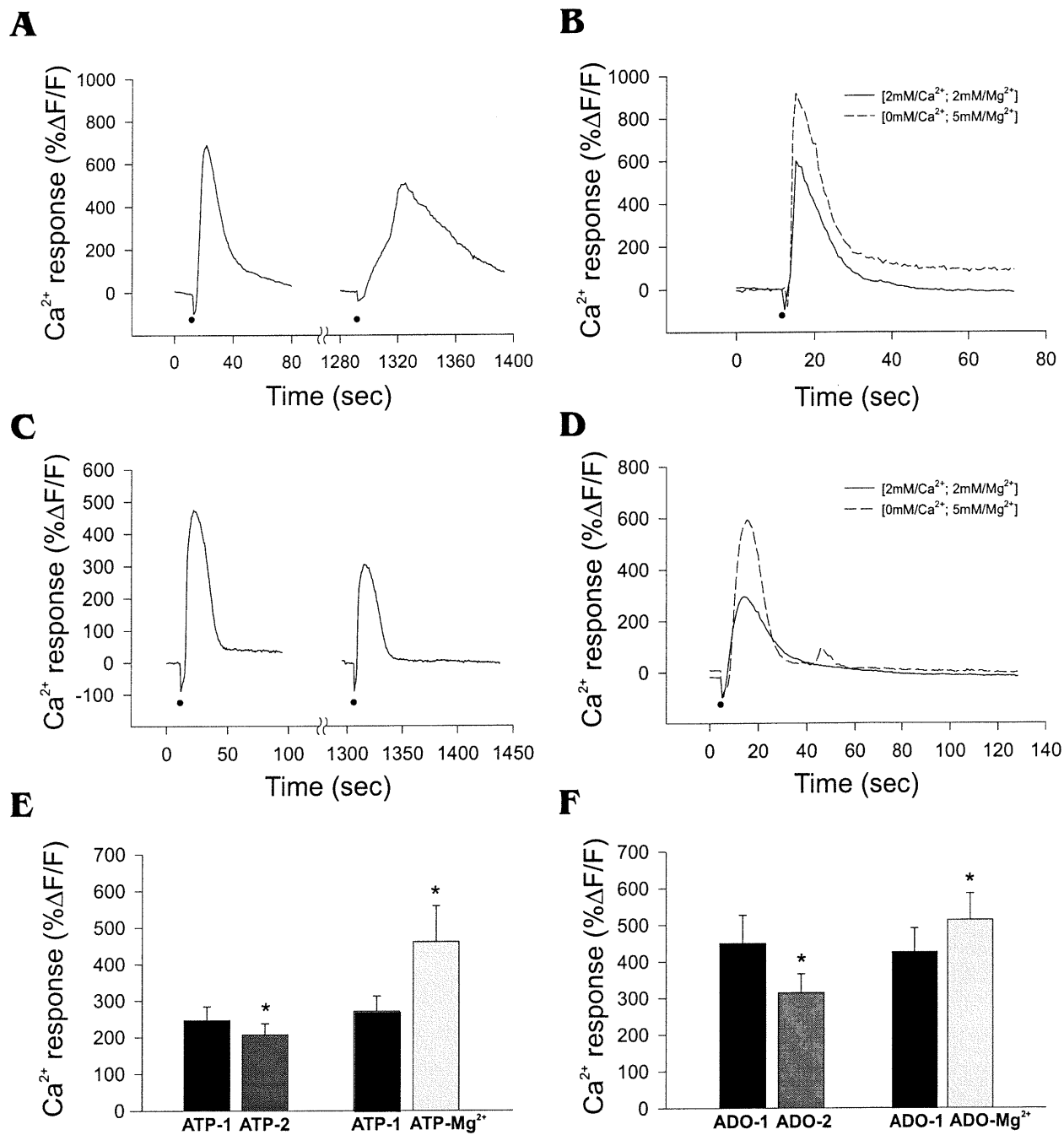
B



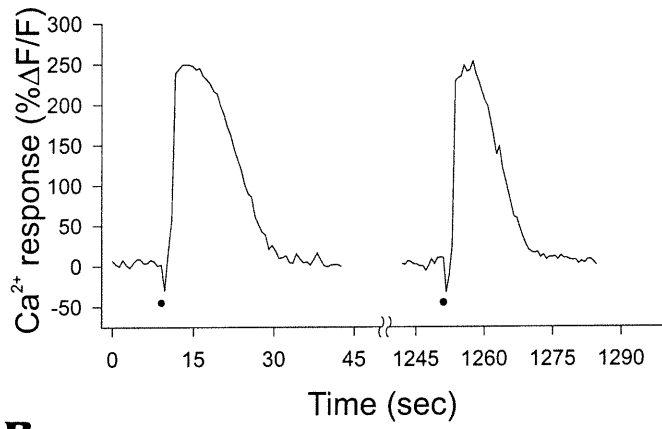
C



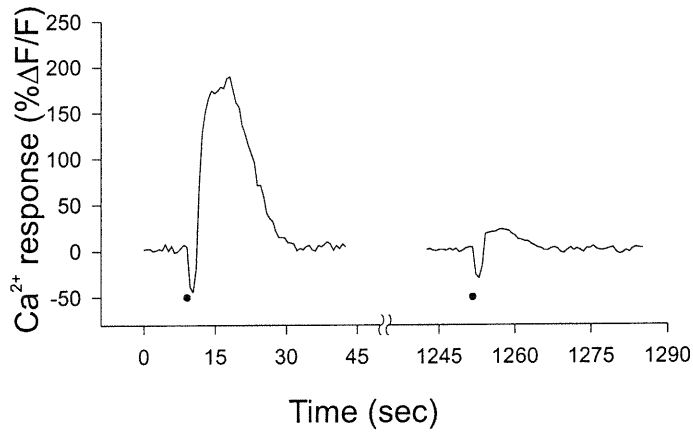




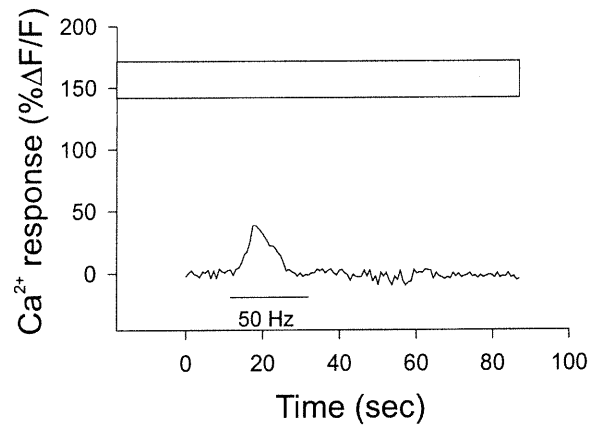
A



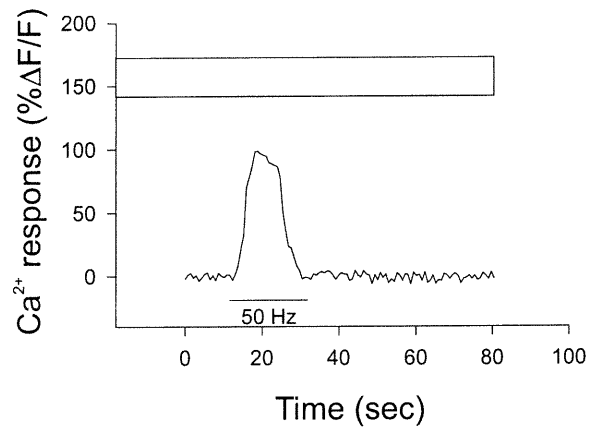
B



A



B



Chapitre troisième

DISCUSSION GÉNÉRALE

Plusieurs évidences, autant dans le SNC que dans le SNP, démontrent l'implication active des cellules gliales au niveau de la synapse. En effet, nos connaissances actuelles à ce sujet permettent l'émergence d'une nouvelle vision de la synapse et de la cellule gliale. Celle-ci, longtemps considérée comme un élément secondaire, occupe maintenant une position importante en tant qu'élément modulateur et selon l'avis de plusieurs, il est maintenant possible de parler d'un partenariat actif entre synapses et cellules gliales. D'ailleurs, le terme désigné par Araque et ses collaborateurs (1999) exprime bien la nouvelle situation des cellules gliales. En effet, ceux-ci réfèrent à la synapse « tripartite », désignant ainsi la cellule gliale comme un élément actif à la synapse, avec bien entendu, la terminaison présynaptique et la cellule postsynaptique.

Les évidences obtenues concernent différents aspects de la relation synapse-glie. Par exemple, dans le SNC, les études menées jusqu'à présent nous permettent de mieux comprendre le rôle potentiel des astrocytes au niveau du contrôle de la transmission synaptique et de la plasticité. De même, dans le SNP, les études réalisées par différents laboratoires dont le nôtre, permettent d'éclaircir le rôle des CSPs à la synapse. L'étude que nous avons réalisée à la JNM de mammifère, en utilisant une nouvelle préparation pour l'étude des interactions synapse-glie (le muscle *levator auris longus* de souris), constitue un apport important en ce qui concerne l'étude de ces interactions. Effectivement, nos données sont tout à fait en accord avec le concept de cellule gliale en tant qu'élément actif à la synapse, ce qui vient appuyer les données déjà obtenues à ce sujet. De plus, soulignons la double contribution de notre projet à l'approfondissement des connaissances actuelles des interactions synapse-glie.

Premièrement, ce travail visait la caractérisation des propriétés fonctionnelles des CSPs à la JNM de mammifère. Cette étude s'avère importante au niveau de la caractérisation de ces propriétés à la JNM de mammifère, puisqu'elles sont inconnues malgré les rôles importants de ces cellules dans la fonction synaptique. Cette caractérisation a permis de confirmer l'existence des interactions synapse-glie à cette jonction fournissant ainsi une évidence supplémentaire concernant l'étendue de ce phénomène.

Deuxièmement, cette étude a permis la comparaison de la situation entre deux synapses équivalentes, c'est-à-dire deux JNMs issues de modèles différents. En effet, il est important d'étudier l'implication des cellules gliales au niveau de synapses équivalentes afin de mieux comprendre le phénomène d'interaction existant entre les neurones et les cellules gliales. Alors cette étude est bien entendu comparative dans la mesure où elle permet de déceler similitudes et différences entre deux synapses équivalentes, ce qui nous informe sur la capacité d'adaptation des cellules gliales selon la synapse avec laquelle elles sont associées. Cette étude a démontré que les CSPs à la JNM de mammifère sont capables via l'activation des récepteurs de type muscarinique et purinergique (adénosine, sous-type A1) de détecter la libération de NT induite par la stimulation du nerf moteur. Notre discussion portera donc sur quatre points essentiels;

1. l'aspect méthodologique de l'étude
2. l'identification des récepteurs présents
3. l'implication fonctionnelle de la présence de ces récepteurs
4. les interactions synapse-glie

3.1 CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES

3.1.1 *Levator auris longus*; une préparation idéale

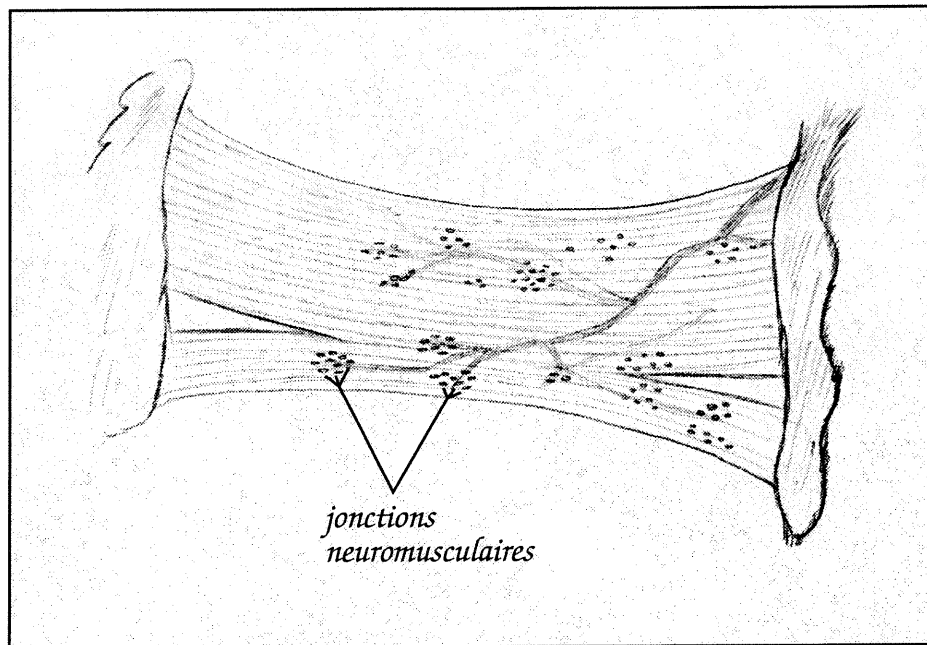
Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé une préparation très peu utilisée, donc peu connue. Nous avons choisi le muscle *levator auris longus* de souris pour sa localisation superficielle, sa minceur et la présence de nombreuses JNMs de surface. Ces critères sont importants, voir essentiels, pour les expériences en imagerie calcique afin de faciliter l'isolement du muscle et de bien visualiser les JNMs, d'où l'intérêt de ce choix. La minceur de ce muscle nous permet de mieux voir les JNMs. Donc, il a fallu mettre au point une méthode particulière afin d'isoler la préparation de façon à préserver la relation anatomique entre les différents éléments synaptiques intacte. La chirurgie qu'implique le retrait de ce muscle est rapide et relativement facile ce qui constitue un avantage au niveau de la préservation de la bonne santé de la préparation. Donc le muscle *levator auris longus* possède les qualités essentielles et s'avère une préparation idéale pour des expériences d'imagerie tel que réalisées lors de cette étude.

3.1.2 Identification des CSPs de mammifère

Puisque la validité de cette étude repose sur l'identification correcte des CSPs, il a fallu tout d'abord vérifier si nos critères d'identification de ces cellules étaient fiables. En effet, contrairement aux CSPs à la JNM de grenouille, les CSPs de mammifère sont difficiles à reconnaître en lumière transmise car bien que la préparation nous permettait de bien visualiser les JNMs, l'identification des CSPs était plus difficile due aux caractéristiques particulières des CSPs de mammifère. Ces critères d'identification étaient les suivants; CSPs disposées en « grappe » à la JNM, renflement caractéristique de la JNM de mammifère, identification du dernier segment myélinisé de l'axone

indiquant la proximité de la JNM. Donc dans un premier temps, dans le but de se familiariser avec la préparation et de visualiser la répartition des JNMs sur le muscle de souris, nous avons effectué un marquage à l'acétylcholinestérase (figure 1). Cette enzyme est impliquée dans l'hydrolyse de l'ACh et est liée à la lame basale synaptique. Sa localisation fait de son marquage un bon outil afin de repérer la distribution des JNMs. Puis ensuite, nous avons utilisé le marquage avec la protéine S100, une protéine de liaison au calcium utilisée en tant que marqueur général des cellules de Schwann (Son and Thompson, 1995). La comparaison des résultats obtenus en imagerie calcique, c'est-à-dire en utilisant l'indicateur fluorescent fluo-3 AM, avec les résultats du marquage d'une même jonction montrant que les cellules étudiées en imagerie sont bien des CSPs a permis de confirmer l'exactitude de nos méthodes d'identification.

FIGURE 1



VISUALISATION DE LA RÉPARTITION DES JONCTIONS NEUROMUSCULAIRES SUR LE MUSCLE *LEVATOR AURIS LONGUS* DE SOURIS À L'AIDE D'UN MARQUAGE À L'ACÉTYLCHOLINESTÉRISE (SELON LE PROCÉDÉ DE KARNOVSKY ET ROOTS).

Tel qu'illustré par le croquis ci-haut, le marquage à l'acétylcholinestérase (AChE) permet de visualiser les JNMs. L'AChE, l'enzyme impliquée dans l'hydrolyse de l'acétylcholine [Acétylcholine $\xrightarrow{\text{AChE}}$ choline + acétate] est liée à la lame basale synaptique (matrice extracellulaire qui se retrouve au niveau de la fente synaptique et des replis postsynaptiques du muscle; McMahan et al., 1978). La localisation de cette enzyme fait de son marquage un outil appréciable afin de repérer la distribution des JNMs.

3.2 IDENTIFICATION DES RÉCEPTEURS EXPRIMÉS PAR LES CSPs À LA JNM DE MAMMIFÈRE

Notre étude a révélé la présence de deux types de récepteurs importants au niveau de la CSP à la JNM de mammifère. En effet, il s'agit du récepteur cholinergique de type muscarinique et du récepteur purinergique de type A1 (adénosine). La comparaison de nos résultats avec les connaissances actuelles de la JNM d'amphibien permet de constater qu'il existe une grande similarité entre les deux jonctions quant aux récepteurs exprimés et aux mécanismes impliqués. Cependant, il faut aussi noter quelques différences importantes qui seront discutées plus loin.

3.2.1 Le récepteur cholinergique

Les récepteurs cholinergiques exprimés par les cellules gliales sont principalement muscariniques, classifiés comme l'un des cinq sous-types connus, et sont en majorité liés aux réserves calciques régulées par un récepteur de type IP₃ (1,4,5-triphosphate) (Hamprecht, 1986). À la JNM de souris, les caractéristiques des réponses calciques observées indiquent que le récepteur cholinergique est aussi de type muscarinique. Or, la présence d'un récepteur cholinergique sur la CSP de mammifère s'avère un indice révélateur du rôle modulateur potentiel des CSPs à la synapse. Effectivement, l'ACh est le principal neurotransmetteur à la JNM. Il est donc primordial pour les CSPs de posséder des récepteurs cholinergiques à l'intérieur d'un système qui, justement, est lui-même cholinergique. Ceci permet de relier l'habileté des CSPs à détecter l'activité de la synapse et à manifester des réponses calciques via l'activation de récepteurs cholinergiques à une capacité d'interaction synapse-glie. D'ailleurs, nous observons le même phénomène dans le SNC, où les astrocytes expriment des récepteurs

glutamatergiques ce qui s'accorde parfaitement avec le fait que le NT principal soit le glutamate.

Bien que les CSPs de mammifère et d'amphibien partagent un certain nombre de propriétés, il y a quelques différences fonctionnelles majeures. Tout d'abord, les récepteurs muscariniques sont aussi exprimés par les CSPs à la JNM d'amphibien (Robitaille et al., 1997). Cependant, les sous-types impliqués sont différents. En effet, l'insensibilité des CSPs aux antagonistes muscariniques, en particulier à l'atropine, est une propriété jusqu'à maintenant exclusive des CSPs de grenouille, contrairement aux CSPs de mammifère où l'atropine bloque les réponses générées par l'application d'ACh. De plus, la machinerie moléculaire associée avec les récepteurs muscariniques des CSPs de mammifère diffère de celle associée aux CSPs de grenouille, tel qu'indiqué par les oscillations des réponses calciques évoquées par la muscarine et la stimulation du nerf moteur. À la JNM d'amphibien, ces oscillations sont inexistantes (Robitaille et al., 1997). Cette observation s'avère très intéressante puisqu'elle suggère l'existence et l'implication de mécanismes calciques différents, par exemple, le phénomène de relâche de calcium induite par le calcium (calcium-induced-calcium-release), et possiblement, la présence de différents seconds messagers liés à différents récepteurs.

De plus, la libération du Ca^{2+} intracellulaire des réserves dans les CSPs de mammifère semble régulée de façon négative par le Ca^{2+} extracellulaire étant donné que les réponses calciques dans les CSPs étaient considérablement augmentées lorsque le Ca^{2+} était remplacé par le Mg^{2+} dans la solution physiologique. Ces différences sont susceptibles d'avoir un impact majeur au niveau des fonctions des CSPs. Effectivement, différents types de récepteurs possèdent des actions régulatrices différentes résultant en la production de différents seconds messagers. Donc, bien que nous observons la

présence d'interactions synapse-glie dans les deux cas, les JNMs de mammifère et d'amphibien diffèrent dans les propriétés de ces interactions.

Les données obtenues à la JNM d'amphibien ainsi que dans le SNC, plus précisément au niveau de l'hippocampe semblent suggérer que l'activation gliale est fréquence-dépendante. Effectivement, à la JNM d'amphibien, des études effectuées dans notre laboratoire ont montré que l'injection de GDP β S dans les CSPs n'affecte pas la magnitude des courants de plaque motrice lorsque les axones sont stimulés à basse fréquence (0.2 Hz). Cependant, lorsque les axones sont stimulés à 10Hz, une fréquence suffisante pour causer une élévation dans les CSPs (Jahromi et al., 1992), les courants de plaque motrice sont affectés (Robitaille, 1998). Dans les tranches d'hippocampe, les potentiels d'action uniques ne génèrent pas d'élévation calcique dans les astrocytes (Pasti et al., 1997; Porter et McCarthy, 1996) alors que la stimulation à plus haute fréquence induit des réponses calciques dans les astrocytes (Pasti et al., 1997). Notre étude suggère que l'activation gliale est un phénomène dépendant de la fréquence. En effet, l'amplitude des réponses induites par la stimulation du nerf moteur est proportionnelle à la fréquence de stimulation. Donc plus la fréquence utilisée est basse plus l'amplitude de la réponse calcique diminue. Par ailleurs, il est impossible d'obtenir une réponse calcique lors d'une seconde stimulation de la même préparation. Chez la grenouille, le même phénomène de «rundown» est observé, cependant, des réponses sont obtenues à la deuxième et même troisième stimulation quoique de plus faible amplitude. Cette différence entre les deux jonctions implique probablement un mécanisme sous-jacent responsable de cette forme de régulation.

L'activation gliale nécessite la libération de neurotransmetteur tel que montré par le blocage de cette libération avec l' ω -conotoxin. Ceci est une indication claire que les CSPs sont capables de détecter l'activité synaptique. Cette habileté à détecter la relâche de neurotransmetteur nous amène à proposer l'implication des CSPs de mammifère dans la modulation de la transmission synaptique. Tel que démontré par notre étude, la libération endogène d'ACh durant la transmission synaptique module l'activité des CSPs puisque les réponses calciques furent presque complètement abolies en bloquant les récepteurs muscariniques avec de l'atropine.

3.2.2 Le récepteur purinergique

Les récepteurs à l'ATP et à l'adénosine sont largement répandus (Burnstock, 1990; Schwabe et al., 1991; Salter et al., 1993). Ils sont exprimés par plusieurs types de cellules gliales comme par exemple les astrocytes en culture (Neary et al., 1988; Lai and Wong, 1991; Kastritsis et al., 1992; Salter and Hicks, 1994), les oligodendrocytes (Meghji et al., 1989), les cellules microgliales (Walz et al., 1994) et les cellules gliales du nerf optique chez le rat (Kriegler and Chiu, 1993).

Les résultats de cette étude montrent que les CSPs de mammifère possèdent aussi des récepteurs purinergiques. Les récepteurs identifiés sont de type adénosine et de sous-type A1. Les récepteurs A1 sont classifiés ainsi selon leur habileté à inhiber l'adénylate cyclase et aussi selon les interactions connues avec différentes drogues (Linden, 1991). Les CSPs de grenouille expriment aussi des récepteurs purinergiques. Cependant, en plus des récepteurs à l'adénosine A1, ces cellules expriment aussi des récepteurs à l'ATP de sous-types P_{2x} et P_{2y} . En effet, chez la grenouille les réponses calciques

induites par l'application d'ATP sont complètement bloquées par la suramine, un antagoniste des récepteurs P2 (Robitaille, 1995) alors que chez le mammifère, la suramine n'a aucun effet. Voyons deux explications possibles pour l'insensibilité à la suramine observée au niveau des CSPs de mammifère. Tout d'abord, il est possible que les effets observés suite à l'application d'ATP soient dus à l'action de l'adénosine puisqu'il y a présence d'ecto-enzymes dans la fente synaptique (Lai et Wong, 1991; Ziganshin et al., 1993) susceptibles de déphosphoryler l'ATP, produisant ainsi de l'adénosine. La deuxième explication implique l'action de l'ATP via les ectoprotéine-kinases qui sont localisées à la surface de plusieurs cellules et qui exigent la présence des ions Mg^{2+} . En guise de résumé, le tableau de la page suivante indique les similitudes et les différences des JNMs de mammifère et d'amphibien.

TABLEAU 2

Comparaison des caractéristiques des cellules de Schwann périssynaptiques
à la JNM de mammifère et à la JNM d'amphibien.

	<i>levator auris longus</i> de souris (CD1)	<i>cutaneus pectoris</i> de grenouille (Rana Pipiens)
<p><u>RÉCEPTEURS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ cholinergiques ▪ purinergiques <ul style="list-style-type: none"> P₁ P₂ 	<p>muscariniques (atropine-sensible) (type ?)</p> <p>A₁ non détectés</p>	<p>muscariniques (atropine-insensible) (aucun des 5 types connus)</p> <p>A₁ P_{2X}, P_{2Y}</p>
<p>MÉCANISMES CELLULAIRES DE L'ÉLEVATION DE Ca²⁺</p>	<p>contribution des réserves intracellulaires de Ca²⁺ (récepteur inconnu)</p>	<p>contribution des réserves intracellulaires de Ca²⁺ (récepteur IP₃)</p>
<p>RÉGULATION PAR LE Ca²⁺ EXTRA- CELLULAIRE</p>	<p>oui</p>	<p>non</p>
<p>OSCILLATIONS DES RÉPONSES CALCIQUES</p>	<p>oui</p>	<p>non</p>
<p>RÉSULTATS OBTENUS SUITE À PLUSIEURS STIMULATIONS</p>	<p>« rundown » (très marqué dès la 2^e stimulation)</p>	<p>« rundown » (progressif, très marqué à la 3^e ou 4^e stimulation)</p>

3.3 IMPLICATION FONCTIONNELLE DE LA PRÉSENCE DE CES RÉCEPTEURS SUR LES CSPs DE MAMMIFÈRE

Un élément essentiel à la création du concept de cellules gliales en tant qu'éléments actifs à la synapse fut l'apport d'évidences pour la présence de récepteurs fonctionnels exprimés par les cellules gliales (Kimelberg 1995, Shao et McCarthy, 1995; Vernadakis, 1996; Verkhratsky et al., 1998; Verkhratsky et Steinhaüser, 2000). Les cellules gliales possèdent des récepteurs pour la plupart des neurotransmetteurs, incluant des récepteurs métabotropiques, GABAergiques, adrénérgiques, purinergiques, cholinergiques et sérotoninergiques. De plus, des récepteurs pour différents peptides incluant la substance P sont aussi exprimés.

La conséquence évidente de la présence de récepteurs sur les CSPs de mammifère de même que sur les autres types de cellules gliales est l'habileté qui en résulte de détecter l'activité de la synapse. La présence de multiple types de récepteurs indique différentes façons de contribuer à la régulation des CSPs. Par exemple, une observation récente suggère que l'ATP et l'adénosine ne sont pas impliqués dans la régulation des CSPs de la même manière que les récepteurs muscariniques le sont. En effet, les récepteurs muscariniques ont la propriété de pouvoir empêcher l'uprégulation du GFAP au niveau des CSPs de grenouille induite par l'interruption de l'activité synaptique (Georgiou et al., 1994, 1999).

3.4 LES INTERACTIONS SYNAPSE-GLIE

Notre étude constitue un élément important au niveau du concept qui identifie les cellules gliales comme des composants essentiels en tant que partenaires actifs à la synapse chimique. En effet, la caractérisation des propriétés fonctionnelles des CSPs à la

JNM de mammifère réalisée lors de cette étude, nous a permis une comparaison directe avec les données existantes à la JNM d'amphibien et de conclure que le phénomène observé *in situ* à la JNM de grenouille n'est pas exclusif et dépendant des propriétés intrinsèques de cette jonction en particulier, mais bien un phénomène qui s'applique aux synapses chimiques en général.

3.4.1 Les interactions synapse-glie dans le SNC

Plusieurs évidences indiquent que dans le SNC, les cellules gliales sont capables de détecter la relâche de neurotransmetteur induite par l'activité synaptique. En effet, mentionnons en guise d'exemple quelques-uns des travaux effectués par différents laboratoires. Plusieurs travaux ont montré les effets de l'activité synaptique sur les astrocytes de l'hippocampe (Dani et al., 1992; Porter et McCarthy, 1996, 1997; Pasti et al., 1997; Latour et al., 2000). Notons aussi les travaux effectués sur les cellules de Bergmann où il est question de l'existence de micro-domaines pour les interactions entre les neurones et les cellules gliales (Grosche et al., 1999). Mais en plus de cette habileté à détecter l'activité de la synapse, d'autres évidences récentes suggèrent un rôle de modulation de l'activité synaptique pour les cellules gliales du SNC. L'utilisation de modèle *in vitro* de co-culture de neurones et de cellules gliales a permis de démontrer la modulation de l'activité synaptique causée par l'élévation calcique observée dans les astrocytes en culture (Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994; Hassinger et al., 1995; Araque et al., 1999) et la modulation de l'efficacité synaptique (Pfrieger et Barres, 1997). Plus récemment, certains travaux ont montré que la modulation de l'activité synaptique par les cellules gliales est un phénomène se produisant aussi dans des préparations plus

intactes comme les tranches d'hippocampe du rat (Carmignoto et al., 1998; Kang et al., 1998) et la rétine du rat (Newman et Zahs, 1998).

3.4.2 Les interactions synapse-glie dans le SNP.

Le phénomène d'interactions synapse-glie est également observé dans le SNP. Les CSPs à la JNM de grenouille détectent et sont modulées par l'activité synaptique générée par une seule synapse (Jahromi et al., 1992; Georgiou et al., 1994, 1999; Robitaille 1995; Robitaille et al., 1997).

Les données présentées dans cette étude démontrent que les CSPs de mammifère sont aussi capables de détecter l'activité synaptique et qu'une cascade d'événements Ca^{2+} -dépendante est générée. Cette observation est en accord avec les propriétés trouvées pour toutes les autres synapses où se produisent des interactions synapse-glie (Araque et al., 1999). Donc les résultats obtenus à la JNM de souris supportent le fait que les interactions synapse-glie soit un phénomène répandu et présent au niveau des synapses chimiques où se trouvent des cellules gliales.

Les données de ce projet révèlent l'existence d'un phénomène commun important concernant les interactions synapse-glie. En effet, la comparaison des ces interactions aux JNMs de mammifère et d'amphibien montrent que des événements similaires se produisent aux deux synapses. Cependant, pour que les cellules gliales soient des modulateurs synaptiques efficaces, il est essentiel qu'elles possèdent des caractéristiques spécifiques de façon à être bien adaptées à l'environnement synaptique avec lequel elles sont associées (Keyser et Pellmar, 1997). Donc nous proposons que bien que les interactions synapse-glie soit un phénomène commun aux synapses chimiques associées

avec des cellules gliales, la nature et les caractéristiques des interactions seront ajustées de façon à s'accorder aux propriétés et à la fonction de la synapse impliquée.

BIBLIOGRAPHIE COMPLÉMENTAIRE

Anderson DJ (1993) Cell and molecular biology of neural crest lineage diversification. *Curr Opin Neurobiol* 1 :8-13.

Anderson MJ, Cohen MW (1974) Fluorescent staining of acetylcholine receptors in vertebrate skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 237 :385-400.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998) Glutamate-dependent modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10(6):2129-2142.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.

Barlow RB, Berry KJ, Glenton PAM, Nikolau NM, Soh KS (1976) A comparison of affinity constants for muscarine-sensitive acetylcholine receptors in guinea-pig atrial pacemaker cells at 29°C and in ileum at 29°C and 37°C. *Br J Pharmacol* 58:613-620.

Barres BA, Chun LLY, Corey DP (1990) Ion channels in vertebrate glia. *Annu Rev Neurosci* 13:441-474.

Barres BA (1991) New roles for glia. *J Neurosci* 11:3685-3694.

Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237:527-532.

Brown DA, Forward A, Marsh S (1980) Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* 71:362-364.

Bruns RF, Lu GH, Pugsley TA (1986) Characterization of the A₂ adenosine receptor labeled by [³H]NECA in rat striatal membranes. *Mol Pharmacol* 29:331-346.

Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: a Multidisciplinary Approach*, ed. by Straub RW and Bolis L, pp. 107-118, Raven Press, New York.

Burnstock G (1990) Purinergic mechanisms. *Am. N.Y. Acad Sci* 603:1-17.

Carmignoto G, Pasti L, Pozzan T (1998) On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes *in situ*. J Neurosci 18:4637-4645.

Clementi F, Fornasari D, Gotti C (2000) Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. Eur J Pharmacol 393:3-10.

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long range glial signaling. Science 247:470-473.

Daly JW, Butts-Lamb P, Padgett W (1983) Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. Cell Mol Neurobiol 3:69-80.

Dani JW, Chernjevsky A, Smith SJ (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. Neuron 8:429-440.

Del Bigio MR (1995) The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. Glia 14:1-13.

El-Moatassim C, Dubyak GR (1992) A novel pathway for the activation of phospholipase D by P_{2Z} purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. J Biol Chem 267:23663-23673.

Fukuda K, Kubo T, Akiba I, Maeda A, Mishina M, Numa S (1987) Molecular distinction between muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Nature* 327: 623-625.

Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP (1994) Synaptic regulation of glial protein expression *in vivo*. *Neuron* 12:443-455.

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

Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomains for neuron-glia interaction : parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2 :139-143.

Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MVL, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19 :520-528.

Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJM, Burgen ASV, Hulme EC (1980) Pirenzepine distinguishes between subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 283 :90-92.

Hamprecht B (1986) Astroglia cells in culture : receptors and cyclic nucleotides. In Astrocytes, S. Fedoroff and A. Vernadakis, eds. (Orlando, Florida : Academic Press, Inc.), 261-294.

Hassinger TD, Atkinson PB, Strecker GJ, Whalen LR, Dudek FE, Kossel AH, Kater SB (1995) Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium. *J Neurobiol* 28 :159-170.

Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30 :633-673.

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

Jessen KR, Mirsky R (1992) Schwann cells : early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr Opin Neurobiol* 2 :575-581.

Jessen KR, Mirsky R (1998) Origin and early development of Schwann cells. *Microsc Res Tech* 41 :393-402.

Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1 :683-692.

Kastritsis CHC, Salm AK, McCarthy K (1992) Stimulation of the P_{2Y} purinergic receptor on type I astroglia results in inositol phosphate formation and calcium mobilization. *J Neurochem* 58 :1277-1284.

Kimelberg HK, Norenberg MD (1989) Astrocytes. *Sci Am* 260 :66-72, 74, 76.

Kimelberg HK (1995) Receptors on astrocytes : what possible functions? *Neurochem Int* 26 :27-40.

Kriegler S, Chiu SY (1993) Calcium signaling of glial cells along mammalian axons. *J Neurosci* 13 :4229-4245.

Lai K-M, Wong PCL (1991) Metabolism of extracellular adenine nucleotides by cultured rat brain astrocytes. *J Neurochem* 57 :1510-1515.

Latour I, Gee CE, Robitaille R, Lacaille J-C (2000) Differential mechanisms of Ca²⁺ responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. Submitted to *Hippocampus*.

Le Douarin NM, Smith J (1988) Development of the peripheral nervous system from the neural crest. *Annu Rev Cell Biol* 4 :375-404.

Le Douarin N, Dulac C, Dupin E, Cameron-Curry P (1991) Glial cell lineages in the neural crest. *Glia* 4 :175-184.

Linden J (1991) Structure and function of A1 adenosine receptors. *FASEB J* 5 :2668-2676.

Lindgren CA, Smith DO (1987) Extracellular ATP modulates calcium uptake and transmitter release at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 7 :1567-1573.

Londos C, Cooper DM, Wolff J (1980) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 :2551-2554.

MacVicar BA, Tse FWY, Crichton SA, Kettenmann H (1989) GABA-activated Cl⁻ channels in astrocytes of hippocampal slices. *J Neurosci* 9 :3577-3583.

McLaurin JA, Yong VW (1995) Oligodendrocytes and myelin. *Neurol Clin* 13 :23-49.

Meghji P, Tuttle JB, Rubio R (1989) Adenosine formation and release by embryonic chick neurons and glia in cell culture. *J Neurochem* 53 :1852-1860.

Nakajima K, Kohsaka S (1993) Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci Res* 17 :187-203.

Neary JT, van Breemen C, Forster E, Norenberg LOB, Norenberg MD (1988) ATP stimulates calcium influx in primary astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 157 :1410-1416.

Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.

Newman EA, Zahs KR (1997) Calcium waves in retinal glial cells. *Science* 275:844-847.

Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18:4022-4028.

O'Connor SE, Dainty IA, Leff P (1991) Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol Sci* 12 :137-141.

Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29 :788-806.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994)

Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.

Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations

in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes *in situ*. *J Neurosci* 17:7817-7830.

Pfrieger FW, Barres BA (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells *in vitro*.

Science 277:1684-1687.

Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate

released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16 :5073-5081.

Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in*

vivo. *Prog Neurobiol* 51 :439-455.

Riker WF, Wescoe WC (1951) The pharmacology of flaxedil with observations on

certain analogs. *Ann NY Acad Sci* 54 :373-394.

Ritchie JM (1992) Voltage-gated ion channels in Schwann cells and glia. *Trends*

Neurosci 15 :345-351.

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

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

Robitaille R, Bourque MJ, Vandaele S (1996) Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 16:148-158.

Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP (1997) Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 504.2:337-347.

Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 26:847-855.

Salter MW, De Koninck Y, Henry JL (1993) Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41:125-156.

Salter MW, Hicks JL (1994) ATP-evoked increases in intracellular calcium in neurons and glia from the dorsal spinal cord. *J Neurosci* 14:1563-1575.

Schwabe U, Lorenzen A, Grun S (1991) Adenosine receptors in the central nervous system. *J Neural Transm* 34:149-155.

Shao Y, McCarthy KD (1995) Receptor-mediated calcium signals in astroglia: multiple receptors, common stores and all-or-nothing responses. *Cell Calcium* 17:187-196.

Smith DO (1991) Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat. *J Physiol* 432:343-354.

Smith SJ (1998) Glia help synapses form and function. *Curr Biol* 8:R158-160.

Sneddon P, Burnstock G (1984) ATP as a cotransmitter in rat tail artery. *Eur J Pharmacol* 106:149-152.

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

Son Y-J, Thompson WJ (1995b) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14:133-141.

Trachtenberg MC, Pollen DA (1970) Neuroglia: gliosis and focal epilepsy. *Science* 167:1252-1253.

Utkin Yu N, Tsetlin VI, Hucho F (2000) Structural organization of nicotinic acetylcholine receptors. *Membr Cell Biol* 13:143-164.

Van Calker D, Muller M, Hamprecht B (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33:999-1005.

Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78:99-141.

Verkhratsky A, Steinhauser C (2000) Ion channels in glia cells. *Brain Res Rev* 32:380-412.

Vernadakis A, Sakellaridis N, Mangoura D (1988) Glial cells as metabolic regulators of neurons. In: Huether G, ed. *Amino acid availability and brain function in health and disease*. Berlin Heidelberg, FRG: Springer-Verlag, 91-100.

Vernadakis A (1996) Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 49:185-214.

Walz W, Ilchner S, Ohlemeyer C, Banati R, Kettenmann H (1993) Extracellular ATP activates cation conductance and a K^+ conductance in cultured microglial cells from mouse brain. *J Neurosci* 13:4403-4411.

Weston JA (1991) The sequential segregation and fate of developmentally-restricted intermediate cell populations in the neural crest lineage. *Curr Top Dev Biol* 25:133-153.

Ziganshin AU, Hoyle CHV, Burnstock G (1994) Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. *Drug Dev Res* 32:134-146.

Zimmermann H (1994) Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci* 17:420-426.