

Université de Montréal

**INTERACTIONS GLUTAMATERGIQUES À LA JONCTION
NEUROMUSCULAIRE D'AMPHIBIEN**

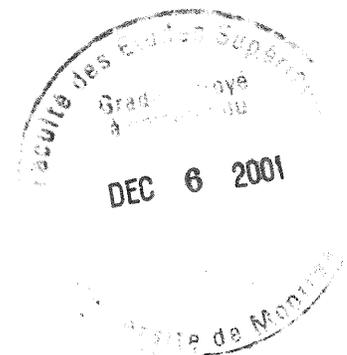
Par

Sébastien Lévesque
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

Juillet 2001

©Sébastien Lévesque, 2001



W
4
H58
2001
N.123

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**INTERACTIONS GLUTAMATERGIQUES À LA JONCTION
NEUROMUSCULAIRE D'AMPHIBIEN**

Présenté par :

Sébastien Lévesque

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Claude Lacaille

Dr Richard Robitaille

Dr Arlette Kolta

Président du jury

Directeur de recherche

Membre du jury

Mémoire accepté : Octobre 2001

RÉSUMÉ

La jonction neuromusculaire d'amphibien est reconnue pour être une synapse purement cholinergique. Par contre, des données récentes démontrent que le glutamate est présent à la JNM de vertébrés et, par le fait même, il a été proposé que le glutamate pourrait être impliqué dans la transmission synaptique.

Dans l'étude réalisée pour ce mémoire, nous avons observé que le glutamate est accumulé dans les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs), cellules gliales à cette synapse, et qu'un transporteur glutamatergique fonctionnel (GLAST) est localisé sur ces dernières. De plus, des expériences d'électrophysiologie ont démontré que le glutamate endogène réduit la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse via l'activation de récepteurs mGluRs, le tout, par des mécanismes n'affectant pas la quantité ni la durée d'entrée du Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse. L'effet du glutamate endogène s'avère être fréquence-dépendant car les antagonistes qui ont réduit le niveau de dépression synaptique à haute fréquence n'ont pas modifié la transmission synaptique lors de stimulation à basse fréquence (0.2Hz). Par conséquent, nos résultats révèlent la présence d'interactions glutamatergiques au niveau d'une synapse purement cholinergique qu'est la JNM d'amphibien. Ainsi, par sa localisation (PSCs) et par son effet sur la transmission synaptique (diminution de la libération de neurotransmetteurs), nous avons dressé un modèle des interactions glutamatergiques à la JNM où le glutamate serait responsable des interactions CSPs-synapse.

Mots clés : synapse, glie, cellule de Schwann pérисynaptique, électrophysiologie, transporteur glutamatergique, GLAST, calcium, imagerie calcique, MCPG.

SUMMARY

The vertebrate neuromuscular junction (NMJ) is purported to be a unique cholinergic synapse. However, indirect evidence shows that glutamate and glutamatergic receptors are present at this synapse. Hence, it was proposed that glutamate may be implicated in synaptic transmission at the vertebrate NMJ.

In the study presented in this thesis, we show that glutamate is accumulated in perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the NMJ, and that a functional glutamate transporter (GLAST) is also expressed on PSCs. Moreover, electrophysiological recordings showed that endogenous glutamate reduces transmitter released by the nerve terminal through the activation of metabotropic glutamate receptors (mGluR) without affecting presynaptic Ca^{2+} entry and handling. The effect of endogenous glutamate is frequency-dependant since glutamatergic receptor antagonists modulate the level of high frequency-induced depression (10Hz) but had no effect at low frequency nerve stimulation (0.2Hz). Hence, our results revealed the presence of glutamatergic interaction in a purely cholinergic synapse that is the amphibian NMJ. By its localisation (in PSCs) and by its effect on synaptic transmission (depression of transmitter release), we propose a model of glutamatergic interaction at the amphibian NMJ, whereby glutamate could mediate in part PSCs-synapse interaction.

Keywords: synapse, glia, perisynaptic Schwann cell, electrophysiology, glutamate transporter, GLAST, calcium, calcium imaging, MCPG.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ (français).....	iii
RÉSUMÉ (anglais).....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiii
DÉDICACE.....	xiv

Chapitre premier

(Introduction)

1.1 PROBLÉMATIQUE.....	1
1.2 LA SYNAPSE CHIMIQUE	5
1.2.1 La terminaison présynaptique.....	8
1.2.1.1 Vésicules synaptiques et zones actives.....	9
1.2.1.2 Récepteurs et transporteurs présynaptiques.....	11
1.2.1.3 Mécanismes de libération de neurotransmetteurs.....	12
1.2.2 L'élément postsynaptique.....	13
1.2.3 Fente synaptique.....	14
1.2.4 Les cellules gliales.....	15
1.3 LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE.....	16
1.4 LE GLUTAMATE.....	23

1.4.1 Biosynthèse du glutamate	23
1.4.1.1 Transamination.....	24
1.4.1.2 Cycle de la glutamine.....	26
1.4.2 Récepteurs glutamatergiques.....	28
1.4.2.1 Les récepteurs-canaux.....	28
1.4.2.1.1 Récepteurs NMDA.....	28
1.4.2.1.2 Récepteurs non-NMDA.....	30
1.4.2.2 Récepteurs métabotropiques.....	32
1.5 LES CELLULES GLIALES.....	34
1.5.1 La glie responsable de l'isolation des axones	35
1.5.2 La glie associée à l'intégrité et à la protection du SNC.....	36
1.5.3 La glie participant à la modulation de la transmission synaptique: Les cellules gliales pérисynaptiques.....	37
1.5.3.1 Les cellules gliales pérисynaptiques détectent l'activité synaptique.....	38
1.5.3.2 Les cellules gliales intègrent et répondent aux signaux synaptiques.....	42
1.5.3.3 Les cellules gliales pérисynaptiques modulent la transmission synaptique.....	42
1.5.4 Les cellules de Schwann pérисynaptiques à la JNM.....	44
1.5.4.1 Les cellules de Schwann pérисynaptiques détectent l'activité synaptique.....	45
1.5.4.2 Les CSPs modulent l'activité synaptique.....	49
1.5.5 Messagers gliaux potentiels à la JNM.....	49

Chapitre deuxième

MOMENTOUS GLUTAMATERGIC MODULATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION AT A PNS VERTEBRATE CHOLINERGIC SYNAPSE...	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUCTION.....	54
RESULTS.....	56
Glutamate at the amphibian NMJ.....	56
Glutamate depresses transmitter release.....	56
Endogenous glutamate modulates high frequency-induced synaptic depression.....	59
Do PSCs respond to glutamate application?.....	60
Functional glutamatergic uptake machinery at the amphibian NMJ.....	60
DISCUSSION.....	63
MATERIALS AND METHODS.....	68
FIGURES AND LEGENDS.....	73
ACKNOWLEDGEMENTS.....	81
REFERENCE LIST.....	82

Chapitre troisième

DISCUSSION GÉNÉRALE.....	87
3.1 Le glutamate à la JNM adulte: vestige de l'évolution et du développement?.....	89
3.2 Est-ce que le glutamate est impliqué dans la maturité de la JNM?	90
3.3 Est-ce que le glutamate est un transmetteur ou un modulateur de l'activité synaptique?	92
3.4 Hypothèse sur les interactions glutamatergiques à la JNM d'amphibien.	94
3.4.1 Origines potentielles de la libération de glutamate à la JNM.....	94
3.4.1.1 Est-ce que le glutamate est libéré par la terminaison nerveuse?	98
3.4.1.2 Est-ce que le glutamate est libéré par les CSPs?	100
3.4.2 Quelle est la machinerie glutamatergique impliquée dans les mécanismes glutamate-dépendants à la JNM?	101
3.4.2.1 Récepteurs non-NMDA.....	101
3.4.2.2 Récepteurs métabotropiques glutamatergiques (mGluR).....	102
3.4.2.3 Récepteurs NMDA.....	103
3.4.2.4 Un système de transporteur glutamatergique fonctionnel est présent à la JNM.	106

3.4.3 Cibles potentielles pour le glutamate libéré dans la fente synaptique.....	107
3.4.3.1 Hypothèse des récepteurs glutamatergiques présynaptiques.....	107
3.4.3.2 Hypothèse des récepteurs glutamatergiques gliaux....	108
3.4.3.3 Hypothèse des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques.....	110
3.5 Modèle préconisé des interactions glutamatergiques à la JNM d'amphibien.....	111
3.5.1. Le glutamate est un bon candidat comme messenger glial responsable des interactions CSP-synapse à la JNM.	111
3.5.2 Le glutamate active des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques.....	114
3.8 Conclusion.....	118
BIBLIOGRAPHIE	120

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre premier

Tableau 1	
Tableau comparatif des récepteurs ionotropiques glutamatergiques.....	32
Tableau 2	
Tableau comparatif entre les différents groupes de récepteurs mGluR.....	34

LISTE DES FIGURES

Chapitre premier

Figure 1	
Représentation schématique des éléments cellulaires impliqués dans la transmission synaptique au niveau d'une synapse chimique.....	6
Figure 2	
Relation anatomique entre les différents éléments cellulaires à la JNM d'amphibien.....	20
Figure 3	
Schématisation des interactions métaboliques du glutamate entre la terminaison neuronale et les astrocytes au niveau d'une synapse glutamatergique.....	25
Figure 4	
Représentation schématique du cycle de la glutamine.....	27
Figure 5	
Représentation schématique de la JNM d'amphibien.....	47

Chapitre deuxième

Figure 1	
Presence and action of glutamate at the amphibian NMJ.....	77
Figure 2	
Endogenous glutamate depresses transmitter release through mGluR receptors..	78
Figure 3	
Large glutamate concentrations are required to induce Ca ²⁺ responses in PSCs..	79
Figure 4	
The glutamate transporter GLAST is present and functional at the amphibian NMJ.....	80

Chapitre troisième

Figure 6	
Schématisation des hypothèses concernant les sources de libération de glutamate ainsi que de ces cibles.....	96
Figure 7	
Représentation schématique du modèle hypothétique des interactions glutamatergiques à la JNM.....	116

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACh :	acétylcholine
ATP :	adénosine triphosphate
CGRP :	<i>“calcitonin gene-related peptide”</i>
CSPs :	cellules de Schwann pérисynaptiques
DAG :	diacylglycérol
EPSC :	<i>excitatory postsynaptic current</i> (courant postsynaptique exciteur)
IP ₃ :	inositol-triphosphate
JNM :	jonction neuromusculaire
mGluR :	Récepteur glutamatergique métabotrope
NO :	monoxide d’azote
NOS :	NO synthase
NPY :	neuropeptide Y
SNAP :	<i>soluble NSF attachment proteins</i>
NSF :	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
PiP ₂ :	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC :	Protéine kinase C
PLC :	phospholipase C
PPM :	potentiel de plaque motrice
SNC :	système nerveux central
SNP :	système nerveux périphérique

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de recherche, le Dr Richard Robitaille, pour ses précieux conseils, son optimisme, ses encouragements ainsi que de m'avoir fait découvrir le monde passionnant des neurosciences;

Merci à mes partenaires de laboratoire pour les discussions enrichissantes et pour l'entraide collective;

Un gros merci à Lili-Naz qui a su me guider lors de mes premiers pas en recherche et à Joanne Vallée pour tous les efforts mis dans ce projet;

Merci à Daniel Cyr et Claude Gauthier pour le graphisme;

Merci à Marie Noëlle pour ses multiples encouragements;

Merci à Lisette pour sa complicité;

Merci à tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à la réussite de ma maîtrise.

À ma Maman
qui a su me donner les outils pour réussir
et
qui a toujours cru en moi

Chapitre premier

INTRODUCTION

Introduction

1.1 Problématique

Dans le système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP), il est clairement établi que les neurones sont les principaux éléments cellulaires responsables du transfert de l'information au niveau des synapses. Il existe aussi une autre catégorie de cellules, dont le nombre est de 10 à 50 fois supérieur aux neurones. Ces cellules sont les cellules gliales. Elles ont longtemps été considérées comme des cellules ne servant qu'au support physique, trophique et métabolique des neurones. Par contre, au cours de la dernière décennie, le dogme neuronal stipulant que les neurones sont les seuls éléments cellulaires participant à la transmission de l'information nerveuse au niveau d'une synapse chimique fût ébranlé. En effet, de nouvelles découvertes tendent à démontrer que les cellules gliales ont aussi une toute autre fonction des plus importantes: elles participent activement au transfert de l'information au niveau de la synapse chimique.

Les travaux de Cornell-Bell au début des années 90 ont démontré que les astrocytes, cellules gliales du SNC, répondent à l'application de neurotransmetteurs par une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (Cornell-Bell et al., 1990; Cornell-Bell and Finkbeiner, 1991; Charles et al., 1991). Ainsi, l'augmentation de Ca^{2+} localisée dans un astrocyte va induire la libération de molécules neuromodulatrices (ex. ATP) par la cellule gliale ce qui va activer des récepteurs gliaux localisés sur des astrocytes adjacents (Guthrie et al., 1999). Ceci résultera en une augmentation calcique dans la deuxième cellule qui se propagera par la suite à d'autres astrocytes

via les mêmes mécanismes générant ainsi des vagues calciques qui peuvent parcourir plusieurs dizaines de microns (Charles et al., 1991; Sneyd et al., 1994; Charles, 1998; Guthrie et al., 1999). De plus, il a été démontré que les cellules gliales possèdent de nombreux canaux ioniques (Verkhratsky and Steinhauser, 2000) et qu'elles libèrent aussi des molécules neuroactives (Martin, 1992) dont le glutamate (Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Araque et al., 1998a; Araque et al., 1998b; Araque et al., 1999a; Parpura and Haydon, 2000). En 1994, Parpura et al., (1994) ont démontré, avec des co-cultures neurones-astrocytes, qu'une augmentation de Ca^{2+} dans les astrocytes induit une libération de glutamate glial qui, à son tour, provoque une augmentation de Ca^{2+} dans les neurones adjacents. Cette première évidence démontrant que le glutamate libéré par des cellules gliales peut moduler l'activité neuronale est venue changer les concepts de base régissant la transmission synaptique. C'est ainsi qu'il a été proposé que les cellules gliales ne doivent plus être perçues comme des cellules "passives" ne servant qu'au support physique et métabolique des neurones qu'elles entourent (Robitaille, 1998; Newman and Zahs, 1998; Araque et al., 1999a; Castonguay et al., 2001; Haydon, 2001).

Au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM), les cellules gliales sont les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs). Les premières évidences démontrant que les cellules gliales répondent à la stimulation de la terminaison axonale (Jahromi et al., 1992) et qu'en retour elles modulent l'activité synaptique au niveau d'un système intact proviennent d'études réalisées à la JNM d'amphibien

(Robitaille, 1998). Il a été proposé que les CSPs sont des éléments intégrateurs et modulateurs de la fonction synaptique (Robitaille, 1998; Araque et al., 1999a; Castonguay and Robitaille, 2001) dans un modèle appelé “synapse tripartite”. Ainsi, les CSPs sont des partenaires “actifs” à la JNM tout comme les astrocytes dans le SNC (Castonguay et al., 2001; Haydon, 2001). Par contre, les messagers gliaux responsables des interactions glie-neurone à la JNM d’amphibien restent, jusqu’à ce jour, inconnus.

Bien que la JNM de vertébrés soit considérée comme une synapse purement cholinergique (Fatt and Katz, 1952), des évidences pour le moins surprenantes sont venues remettre en question ce fait établi depuis longtemps. En effet, il a été démontré que du glutamate serait présent à la JNM et qu’il serait localisé dans les CSPs ainsi qu’au niveau de la terminaison nerveuse chez le rat (Waerhaug and Ottersen, 1993). De plus, des enzymes de synthèse du glutamate (NAALADase) ainsi qu’une sous-unité de récepteurs glutamatergiques (NMDA-1) ont aussi été localisés à la JNM de rat (Berger et al., 1995a; Berger et al., 1995b; Berger and Schwab, 1996). Par conséquent, l’ensemble de ces évidences indirectes suggère que des composantes d’un système glutamatergique sont présentes à la JNM de vertébrés. Quel pourrait être le rôle du glutamate à la JNM d’amphibien? Dû à sa localisation (principalement dans les CSPs), le glutamate pourrait être un des messagers gliaux responsables des interactions CSPs-synapse d’autant plus qu’il a été démontré que les cellules de Schwann en culture ont la capacité de libérer des acides aminés excitateurs tel le glutamate (Parpura et al., 1995a; Jeftinija and

Jeftinija, 1998). Cette vision des résultats obtenus permettrait de réconcilier les résultats marginaux retrouvés dans la littérature.

Règle générale, pour déterminer si une substance peut être responsable des interactions glie-synapse, on doit démontrer que: 1. cette molécule est présente au niveau des CSPs à la JNM, 2. qu'une machinerie fonctionnelle (récepteurs, transporteurs, etc.) est localisée à la JNM et 3. que cette substance a un effet sur la transmission synaptique. **Par conséquent, le but de l'étude présentée dans ce mémoire est de déterminer si des systèmes glutamatergiques fonctionnels sont présents à la JNM d'amphibien ainsi que de définir leur implication dans la transmission synaptique.** À la lumière de nos résultats, le glutamate possède les caractéristiques requises pour être considéré comme un bon candidat responsable des interactions CSPs-synapse à la JNM d'amphibien.

Dans le cadre de cette introduction, je vais, dans un premier temps, faire un survol des différents éléments qui forment la synapse chimique tout en traitant de l'implication de chacune des composantes entrant en jeu lors de la transmission synaptique. Deuxièmement, je vais tracer un schéma de notre modèle qu'est la JNM d'amphibien. Troisièmement, je vais traiter du glutamate en temps que neurotransmetteur et finalement, je vais discuter de l'implication des cellules gliales en tant que modulateur de la fonction synaptique tout en portant une attention particulière au rôle du glutamate dans les interactions synapse-glie.

1.2 La synapse chimique

Le terme "synapse" désigne une zone de contact hautement spécialisée entre les neurones pré- et postsynaptiques où se transmet l'information véhiculée. En fait, la synapse sert à traduire un message électrique (potentiel d'action) provenant d'un neurone présynaptique et à le transformer en un message chimique (libération de neurotransmetteurs) pour finalement le reconvertir en message électrique par les neurones postsynaptiques (réponses postsynaptiques, potentiels d'action). Cette traduction de l'information véhiculée à la synapse chimique ouvre la porte à d'innombrables possibilités de modulation et de plasticité ce qui fait la complexité et la beauté du système nerveux. La synapse chimique est composée de quatre éléments (figure 1) soit: la terminaison présynaptique, la fente synaptique, l'élément postsynaptique (dendrite ou corps cellulaire ou axone ou fibre musculaire) ainsi que les cellules gliales qui l'enveloppent.

Figure 1

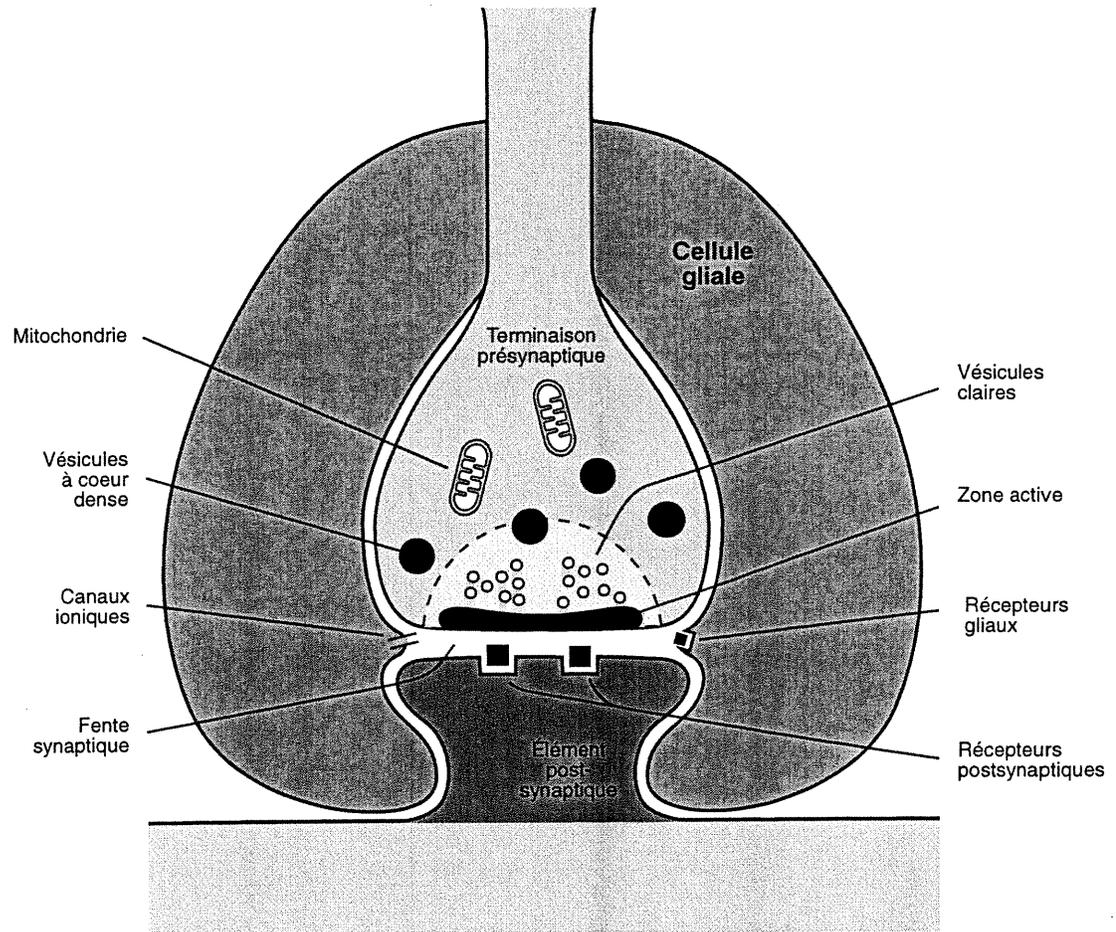


Figure 1

Représentation schématique des éléments cellulaires impliqués dans la transmission synaptique au niveau d'une synapse chimique. A, La *terminaison présynaptique* et l'*élément postsynaptique* sont enrobés par les *cellules gliales*. L'espace compris entre l'*élément présynaptique* et l'*élément postsynaptique* est la *fente synaptique*. La terminaison présynaptique peut se diviser en deux parties soit: une région possédant la machinerie nécessaire à la libération de neurotransmetteurs (*gris pâle*) et une autre région (*gris foncé*) éloignée de la membrane plasmique et qui possède plutôt la machinerie nécessaire à la synthèse des neurotransmetteurs et fournit l'énergie requise pour l'exocytose des vésicules synaptiques. Dans la première région (*gris pâle*), notons la présence de *petites vésicules claires* accolées aux sites de libération des neurotransmetteurs (*zone active*). Notons aussi que les *zones actives* sont localisés en face des *récepteurs postsynaptiques*. En ce qui a trait à la deuxième région (*gris foncé*), on y retrouve principalement des *mitochondries* responsables de fournir l'énergie nécessaire aux processus d'exocytose et à la synthèse de neurotransmetteurs. De plus, cette région possède de grosses vésicules opaques (*vésicules à cœur dense*) dispersées dans la terminaison présynaptique. Pour ce qui est des *cellules gliales*, elles émettent des prolongements près des sites de libération des neurotransmetteurs. C'est sur ces prolongements que seraient localisés les *récepteurs* et les *canaux ioniques gliaux* (Adapté de Castonguay et al., 2001).

1.2.1 La terminaison présynaptique

La terminaison axonale ou terminaison nerveuse est la partie du neurone présynaptique qui est responsable de la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Cette terminaison présynaptique est en fait une spécialisation axonale que l'on peut diviser en deux régions selon leur fonction respective: (1) une de ces régions est spécialisée dans l'exocytose des vésicules synaptiques et est située près de l'élément postsynaptique et l'autre (2) est impliquée dans les processus énergétiques et métaboliques de la terminaison synaptique et est éloignée de l'élément postsynaptique (figure 1).

1. Le rôle principale de la première région est de libérer les neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Dans cette région on retrouve des sites spécialisés pour l'exocytose des vésicules synaptiques (zones actives), de nombreux canaux ioniques dont, entre autre, les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants ainsi que deux types de vésicules synaptiques. De petites vésicules claires sont regroupées en amas juste au-dessus des zones actives tandis que de grosses vésicules opaques qui, contrairement aux petites vésicules, ne sont pas accumulées à la membrane plasmique. Notons aussi la présence, sur la terminaison présynaptique, de récepteurs ainsi que des transporteurs ayant pour fonction de moduler la libération de neurotransmetteurs.

2. La deuxième région est composée de la machinerie nécessaire au support énergétique de la terminaison nerveuse car les processus d'exocytose consomment beaucoup d'énergie. Dans le cytoplasme de cette région, on retrouve une

machinerie métabolique très efficace et par le fait même très complexe. On peut noter, entre autre, la présence de plusieurs mitochondries responsables du support énergétique nécessaire au processus de synthèse locale ainsi qu'à la libération des neurotransmetteurs. Les mitochondries sont aussi impliquées dans la biosynthèse de différents neurotransmetteurs tels l'acétylcholine et le glutamate. En plus des enzymes mitochondriales, on y retrouve aussi différentes enzymes cytoplasmiques qui sont, elles aussi, responsables de la synthèse des neurotransmetteurs (Erecinska and Silver, 1990). Notons aussi la présence de vésicules à cœur dense dans cette région.

1.2.1.1 Vésicules synaptiques et zones actives

En microscopie électronique, on peut différencier deux types de vésicules synaptiques: de petites vésicules claires ayant un diamètre d'environ 40nm ainsi que de grosses (50-90nm) vésicules opaques appelées "vésicules à cœur dense" (Klein et al., 1982; Hokfelt et al., 1984). Notons aussi la présence sur les vésicules synaptiques de nombreuses protéines (dont entre autre, la synaptobrévine et la synaptotagmine) impliquées dans les processus d'exocytose.

Les petites vésicules synaptiques renferment principalement des neurotransmetteurs tels l'acétylcholine, le glutamate, le GABA, la dopamine, etc. Ces derniers sont prêts à être libérés par exocytose dans la fente synaptique suivant l'arrivée d'un potentiel d'action (Katz and Miledi, 1967, 1970). Les petites vésicules synaptiques ne sont pas localisées au hasard dans la terminaison

neuronale. En fait, elles sont regroupées en amas à des sites hautement spécialisés pour la libération de neurotransmetteurs appelés zones actives (Heuser and Reese, 1973; Couteaux and Pecot-Dechavassine, 1974; Ceccarelli et al., 1979). En microscopie électronique, les zones actives sont caractérisées par une accumulation de petites vésicules synaptiques adjacentes à une région dense de la membrane interne de la terminaison axonale (corps dense) et elles sont localisées en face des récepteurs situés sur l'élément postsynaptique (Akert et al., 1969; Heuser and Reese, 1977). C'est au niveau des zones actives qu'est localisée la machinerie nécessaire impliquée dans les processus d'exocytose des vésicules synaptiques. Il a été démontré que les zones actives sont principalement formées de canaux calciques voltage-dépendants (Robitaille et al., 1990; Cohen et al., 1991) ainsi que d'une panoplie de protéines (syntaxine, neurexine et SNAP-25) responsables de l'attachement des vésicules à la membrane plasmique (Bennett and Scheller, 1994). Cette organisation très stricte permet d'optimiser l'utilisation du Ca^{2+} qui entre par les canaux calciques voltage-dépendants.

Contrairement aux petites vésicules claires, les vésicules à cœur dense ne sont pas regroupées à la membrane plasmique. Elles sont plutôt dispersées dans la terminaison neuronale attachées au cytosquelette d'actine et elles contiennent des neuropeptides (substance P, CGRP, etc) (Matteoli et al., 1988; Matteoli et al., 1990). Ces derniers sont impliqués dans la modulation de la transmission synaptique plutôt que dans le transfert direct de l'information entre les composantes pré- postsynaptiques (Akasu et al., 1983; Akasu et al., 1984; Akasu, 1986). Une

autre différence entre ces deux types de vésicules réside en leur habilité à libérer leur contenu dans la fente synaptique. Du fait que les vésicules à cœur dense sont éloignées des zones actives, une plus forte entrée de Ca^{2+} dans la terminaison axonale est nécessaire afin que les concentrations de Ca^{2+} , près des vésicules à cœur dense, soient assez élevées pour permettre leur libération du cytosquelette d'actine et, par le fait même, pour déclencher les mécanismes d'exocytose. Ainsi, la libération du contenu des vésicules à cœur dense sera principalement obtenue suivant des stimulations à haute fréquence (Otsuka and Konishi, 1976; Iversen et al., 1976; Go and Yaksh, 1987; Bartfai et al., 1988).

1.2.1.2 Récepteurs et transporteurs présynaptiques

En plus de la machinerie impliquée dans la libération de neurotransmetteurs, la terminaison axonale possède aussi des récepteurs dits présynaptiques. Règle générale, ces récepteurs sont liés aux protéines G (métabotropiques) et leur activation résulte en la modulation d'enzymes cytoplasmiques et/ou de canaux ioniques retrouvés à la terminaison neuronale et/ou en interférant avec les protéines responsables de la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique (Hamm, 1998; Cartmell and Schoepp, 2000). Ces systèmes d'auto-régulation (rétroactions positives et/ou négatives) auront, entre autres, pour effet de moduler la libération de neurotransmetteurs par la terminaison axonale selon l'état d'activité de la synapse (Starke et al., 1989). De plus, notons aussi la présence de transporteurs présynaptiques qui servent à recapter certains neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique. Ces systèmes de recapture permettent de

restreindre l'action des neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique ainsi que de refaire les réserves de neurotransmetteurs dans la terminaison nerveuse (Iversen, 1975; Nicholls and Attwell, 1990).

1.2.1.3 Mécanismes de libération de neurotransmetteurs

La libération de neurotransmetteurs par la terminaison présynaptique résulte d'un processus séquentiel mettant en jeu une multitude d'interactions protéiques. Dans cette section, nous allons faire un survol des différentes étapes régissant la libération de neurotransmetteurs.

1- La dépolarisation de la terminaison présynaptique, suivant l'arrivée d'un potentiel d'action, active les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants concentrés aux zones actives ce qui a pour effet d'induire une entrée massive de Ca^{2+} (Katz and Miledi, 1968; Augustine et al., 1985; Augustine et al., 1987).

2- Le Ca^{2+} entre dans la terminaison présynaptique suivant son gradient électrochimique et va, entre autre, se lier à la protéine vésiculaire synaptotagmine (DeBello et al., 1993; Littleton et al., 1993). En présence de Ca^{2+} , cette dernière va modifier sa conformation ce qui permettra à d'autres protéines vésiculaires (dont la synaptobrevine) de rentrer en contact avec des protéines localisées au niveau de la membranaire plasmique (syntaxine, neurexine et SNAP-25), le tout, aidé par un complexe cytoplasmique protéique formé, entre autre, du NSF (*N*-ethylmaleimide-sensitive factor), γ -SNAP et α -SNAP (soluble NSF attachment proteins) (Bennett

and Scheller, 1994). Ainsi, la fusion des vésicules synaptiques à la membrane plasmique de la terminaison axonale dépend d'une série d'interactions bien précise entre différentes protéines, le tout étant initié par l'entrée de Ca^{2+} dans la terminaison présynaptique.

3. Une fois que la vésicule synaptique a fusionné avec la membrane plasmique et qu'elle a libéré son contenu dans la fente synaptique, elle sera récupérée grâce à des mécanismes d'endocytose. Notons que ce dernier processus nécessite la participation de plusieurs protéines dont, entre autres, la clatrine et la dynamin (Cremona and De Camilli, 1997).

1.2.2 L'élément postsynaptique

La terminaison axonale d'un neurone présynaptique fait synapse avec l'élément postsynaptique. Différents types de contacts ont été observés dans le SNC et SNP. Règle générale, les axones présynaptiques font synapse avec les dendrites, les axones ou le corps cellulaire des neurones postsynaptiques, ou au niveau d'un organe spécifique en ce qui a trait au système nerveux autonome ou sur les fibres musculaires au niveau de la JNM. L'organisation anatomique des éléments postsynaptiques est constituée de façon à optimiser le transfert de l'information synaptique. En effet, les récepteurs nécessaires à la communication synaptique sont principalement localisés en face des zones actives de la terminaison présynaptique (Akert et al., 1969; Heuser and Reese, 1977; Robitaille et al., 1990). Au niveau des régions extra-synaptiques, la densité des récepteurs est beaucoup plus faible.

Les récepteurs localisés sur l'élément postsynaptique sont de deux types :

1- Des récepteurs-canaux qui, suite à la liaison avec leurs ligands (neurotransmetteurs) vont modifier leur conformation permettant l'ouverture d'un canal perméable aux ions. Lorsque les récepteurs-canaux sont perméables aux ions positifs (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), l'effet principal est la dépolarisation de la cellule, et subséquemment, la production d'un potentiel d'action dans la cellule postsynaptique tandis que lorsque les récepteurs-canaux activés sont perméables aux ions négatifs (Cl^-), on observera plutôt une hyperpolarisation de la cellule postsynaptique et il sera ainsi plus difficile de dépolariser suffisamment cette dernière pour générer un potentiel d'action (phénomène d'inhibition postsynaptique);

2- Des récepteurs liés aux protéines G (récepteurs métabotropiques) dont l'activation va initier une série de cascades de signalisation intracellulaire qui aura pour conséquence de moduler la réponse postsynaptique. Notons que les récepteurs métabotropiques sont souvent extra-synaptiques (Cartmell and Schoepp, 2000).

1.2.3 Fente synaptique

La fente synaptique est l'espace où sont libérés les neurotransmetteurs entre la terminaison présynaptique et l'élément postsynaptique. La largeur de cette zone est très restreinte (~50 nm) (Hall and Sanes, 1993) ce qui a pour conséquence de concentrer les neurotransmetteurs qui y sont libérés optimisant leurs probabilités de liaison avec leurs récepteurs spécifiques. De plus, la fente synaptique est aussi une zone de fin d'action de l'effet des neurotransmetteurs, car c'est au niveau de cet

espace (pour les synapses cholinergiques), que l'on retrouve différents enzymes responsables de la dégradation des neurotransmetteurs libérés (Taylor, 1991).

1.2.4 Les cellules gliales

Les cellules gliales sont présentes en très grand nombre dans le système nerveux et elles émettent des prolongements qui sont en étroit contact avec les neurones offrant des zones d'échanges privilégiées. De plus, elles sont intimement associées aux synapses et émettent des prolongements près des zones actives (Dreyer and Peper, 1974; Ventura and Harris, 1999). Il a également été démontré que les cellules gliales expriment sur leur membrane de nombreux canaux ioniques (Orkand et al., 1966; Kuffler et al., 1966; Sonnhof, 1987; Barres et al., 1989; Robitaille et al., 1996; Newman and Reichenbach, 1996; Verkhratsky et al., 1998), des récepteurs (Dani et al., 1992; Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999; Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997; Rochon et al., 2001) ainsi que des transporteurs (Kondo et al., 1995; Takahashi et al., 1997; Kojima et al., 1999). En plus de posséder cette machinerie, les cellules gliales sont impliquées dans les cycles de synthèse de certains neurotransmetteurs (Daikhin and Yudkoff, 2000), elles régulent l'homéostasie de la synapse ainsi que le pH (Deitmer and Rose, 1996) et elles captent les ions (Newman et al., 1984; Newman, 1986) et les neurotransmetteurs (Danbolt et al., 1992; Kojima et al., 1999) retrouvés dans la fente synaptique. De plus, elles sont stratégiquement bien localisées pour détecter et participer à l'activité synaptique (Araque et al., 1999a; Castonguay et al., 2001; Haydon, 2001). Par conséquent, un intérêt croissant est

apporté aux cellules gliales ainsi qu'à leurs rôles dans les interactions synapse-glie. Cet aspect sera traité plus en profondeur dans la section 1.5 de ce mémoire.

1.3 La jonction neuromusculaire

L'étude présentée dans ce mémoire a été réalisée sur la JNM du muscle *cutaneus pectoris* innervé par le nerf *pectoralis proprius* de grenouille *Rana pipiens*. En plus d'être une synapse cholinergique très bien étudiée et caractérisée, elle est facile d'accès, les éléments cellulaires impliqués dans la transmission synaptique sont facilement identifiables en microscopie optique et confocale et par le fait même, il est relativement facile d'enregistrer l'activité synaptique au niveau d'une seule synapse. En effet, la morphologie de cette dernière permet d'étudier les interactions physiologiques *in situ* au niveau d'une synapse intacte en relation avec ses cellules gliales associées. Ainsi, la JNM du muscle *cutaneus pectoris* est un excellent modèle pour étudier les interactions entre les différents éléments cellulaires impliqués dans la transmission synaptique.

Tel que représenté à la figure 2a à l'aide d'une image prise en microscopie confocale, les JNMs d'amphibien sont d'apparence fusiforme et sont recouvertes par les CSPs dont le corps cellulaire est de forme ellipsoïdale. Les JNMs s'étendent sur une longueur d'environ 400 à 500 μ m et elles sont composées de quelques branches de longueur très variable (figure 2a). Sur le schéma de la figure 2b, on peut noter la présence du nerf moteur avec le dernier segment myélinisé de l'axone. C'est au bout de ce segment non-myélinisé que l'on retrouve la terminaison

présynaptique formant une zone de contact avec la fibre musculaire. Cette zone est nommée plaque motrice et elle est l'unité fonctionnelle de la JNM. C'est au niveau de la plaque motrice que les neurotransmetteurs sont libérés dans la fente synaptique par la terminaison nerveuse et vont activer les récepteurs cholinergiques localisés sur les replis postsynaptiques de la fibre musculaire. À la JNM, les zones actives sont localisées à intervalle régulier d'environ 1micron et sont réparties sur toute la longueur de la JNM (Heuser and Reese, 1973; Dreyer et al., 1973; Peper et al., 1974). De plus, notons que la terminaison nerveuse est en partie couverte par quelques CSPs qui envoient des prolongements à proximité des zones actives (figure 2a,b,c,d) (Dreyer and Peper, 1974). Comme pour toutes les synapses chimiques du SNC, on retrouve aussi au niveau de la terminaison nerveuse de la JNM des enzymes de synthèse des neurotransmetteurs (acétylcholine), des mitochondries, un réticulum endoplasmique ainsi que des vésicules synaptiques regroupées aux zones actives.

À la JNM, l'élément postsynaptique de la synapse est une fibre musculaire. Une des particularités des fibres musculaires dans la région de la plaque motrice est la présence de replis postsynaptiques (figure 2-d). C'est à la crête de ces replis que l'on retrouve une forte concentration de récepteurs-canaux cholinergiques (AChR) tandis que les canaux ioniques tels les canaux Na^+ voltage-dépendants sont plutôt localisés dans la fosse formée par les replis postsynaptiques (Peper and McCarthy, 1972; Matthews-Bellinger and Salpeter, 1978). De plus, les récepteurs cholinergiques sur les replis postsynaptiques sont localisés en face des zones

actives (Burden et al., 1979; Robitaille et al., 1990). Cette organisation stricte permet une interaction rapide et optimale entre l'acétylcholine libérée dans la fente synaptique au niveau des zones actives avec ses récepteurs postsynaptiques (Peper and McCarthy, 1972). Ainsi, l'activation des récepteurs AChRs ouvrira le pore du canal et permettra l'entrée d'ions. Ceci résultera en la production d'un potentiel de plaque motrice (PPM).

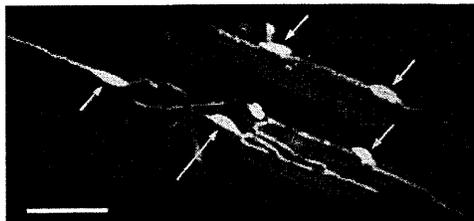
La fente synaptique de la JNM est d'environ 50 nm de largeur (Hall and Sanes, 1993). On y retrouve une membrane basale où l'acétylcholine estérase (AChE), enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine, est attachée. Cette enzyme hydrolyse l'acétylcholine libérée par la terminaison nerveuse en choline et en acétate ce qui a pour effet de terminer l'action de l'acétylcholine (Hall and Sanes, 1993). La choline sera recaptée par la terminaison nerveuse et servira à reformer les réserves d'acétylcholine.

À la JNM, les cellules gliales sont les CSPs. Contrairement aux cellules de Schwann qui recouvrent les axones des nerfs, les CSPs ne forment pas de myéline. Elles couvrent en partie la terminaison nerveuse et émettent des interdigitations localisées à proximité des sites de libération des neurotransmetteurs (Figure 2b,c,d)(Dreyer and Peper, 1974). Les récepteurs gliaux seraient fort probablement localisés sur ces interdigitations et des expériences d'immunohistochimie suggèrent que les canaux Ca^{2+} (type-L) gliaux y sont localisés (Robitaille et al., 1996). Par le fait même, les CSPs sont bien situées pour détecter la libération de

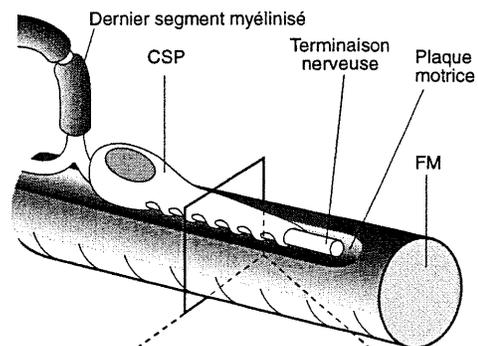
neurotransmetteurs (Jahromi et al., 1992; Georgiou et al., 1994; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1996; Robitaille et al., 1997; Georgiou et al., 1999; Rochon et al. 2001) et ainsi, elles sont stratégiquement localisées pour moduler l'activité synaptique (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001).

Figure 2

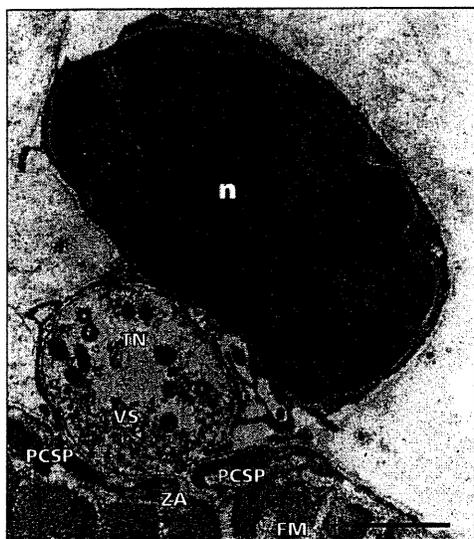
A



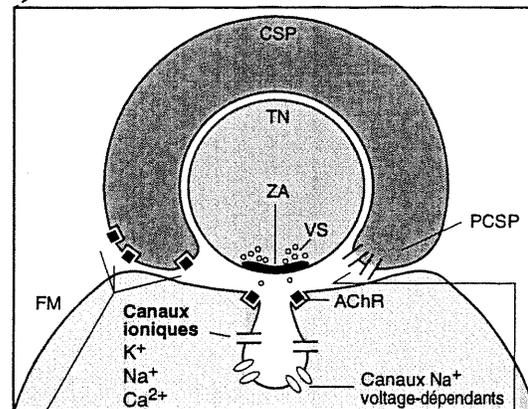
B



C



D



Récepteurs Gliaux

- ACh
- ATP
- Adenosine
- Substance P
- CGRP
- Glutamate?

Canaux ioniques

- Voltage dépendants Ca²⁺ (L-type)
- K⁺
- Na⁺
- Cl⁻

Figure 2

Relation anatomique entre les différents éléments cellulaires à la JNM d'amphibien.

A, Image prise en microscopie confocale d'une JNM permettant d'apprécier les corps cellulaires (*flèches*) de formes ellipsoïdales ainsi que des prolongements des CSPs chargés au fluo 3-AM (Adapté de Jahromi et al., 1992).

B, Représentation schématique d'une JNM d'amphibien illustrant le nerf moteur, avec son dernier segment myélinisé, à l'extrémité duquel se trouve la terminaison présynaptique, extrémité axonale spécialisée pour la libération de neurotransmetteurs. La terminaison présynaptique fait contact avec une fibre musculaire (*FM*) au niveau de la plaque motrice. Notons aussi la présence d'une *CSP* qui enrobe partiellement la terminaison nerveuse et qui émet des prolongements (*PCSP*) au niveau de la plaque motrice entourant partiellement la terminaison nerveuse en s'insérant entre celle-ci et les fibres musculaires (Adapté de Castonguay et al., 2001).

C, Image en microscopie électronique d'une coupe transverse d'une JNM illustrant une *CSP* caractérisée par son corps cellulaire occupé à 80% par son noyau (*n*) et émettant des prolongements (*PCSP*) à proximité des zones actives (*ZA*) où sont regroupées les vésicules synaptiques (*VS*). Notons aussi la présence sur les fibres musculaires (*FM*) de replis postsynaptiques localisés en face des zones actives de la terminaison nerveuse (*TN*) (Adapté de Jahromi et al., 1992).

D, Distribution des canaux et récepteurs à la JNM. Notons la présence des récepteurs cholinergiques (*AchRs*) sur la crête de replis postsynaptiques tandis que les canaux ioniques (K^+ , Na^+ et Ca^{2+}) ainsi que des canaux Na^+ voltage-dépendants localisés dans la fosse des replis postsynaptiques. C'est au niveau des prolongements des CSPs que l'on retrouve les récepteurs gliaux activés par différents neurotransmetteurs (ACh, ATP, adénosine, glutamate?) et neuropeptides (Substance P, CGRP) ainsi que des canaux ioniques (Ca^{2+} voltage-dépendant (type L), K^+ , Na^+ , Cl). VS, vésicules synaptiques. (Adapté de Castonguay et al., 2001).

1.4 Le glutamate

Le glutamate est un acide aminé ubiquitaire retrouvé chez l'organisme vivant et sa concentration dans le cerveau de mammifère est d'environ $10\mu\text{Mol/g}$ (12.5mM) (Erecinska and Silver, 1990). Cet acide aminé est dérivé du glucose et est impliqué dans plusieurs processus chimiques dont la synthèse protéique, la synthèse de neurotransmetteurs comme l'acide γ -aminobutyric (GABA) et joue aussi un rôle important dans le métabolisme énergétique cellulaire (Erecinska and Silver, 1990).

Une des grandes particularités du glutamate est son rôle de neurotransmetteur excitateur sur la transmission synaptique qui a été mis en évidence pour la première fois au niveau de la JNM des invertébrés (qui est une synapse glutamatergique) et par la suite, dans différentes synapses du SNC de mammifères (Fonnum, 1984). Dans le cadre de ce mémoire, je vais traiter du glutamate en tant que neurotransmetteur en élaborant sur les mécanismes régissant sa biosynthèse ainsi que sur les types de récepteurs glutamatergiques retrouvés dans le système nerveux.

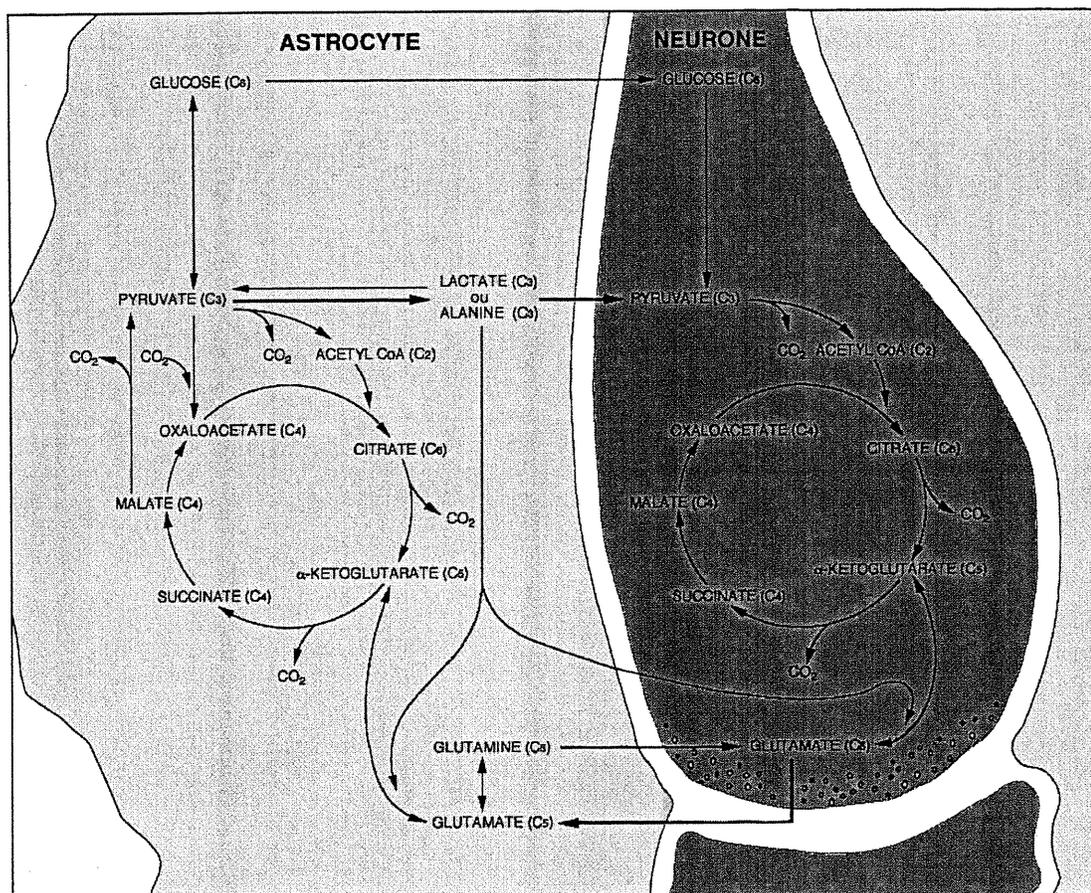
1.4.1 Biosynthèse du glutamate

Les mécanismes régissant la synthèse du glutamate dans les tissus neuronaux passent par deux voies distinctes. La première consiste en une transamination de l' α -cétoglutarate et d'un donneur d'acide aminé et l'autre via le cycle de la glutamine.

1.4.1.1 Transamination

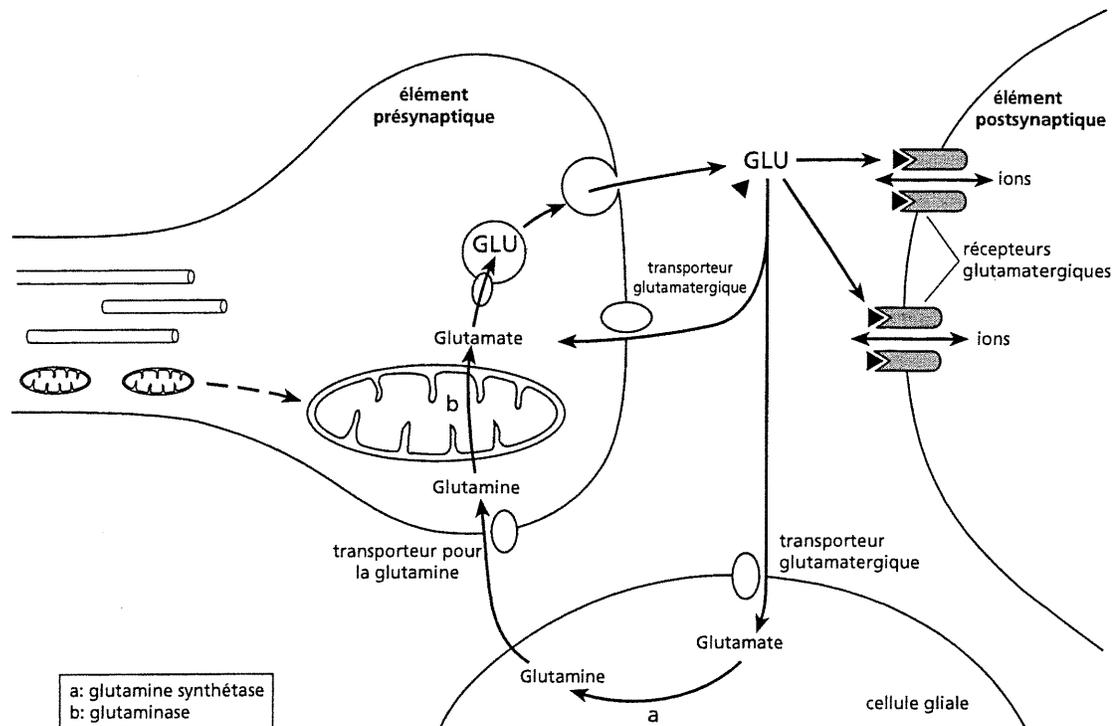
Lors de la transamination (figure 3), le glucose est d'abord converti en pyruvate via les processus de la glycolyse. Dans les neurones ainsi que dans les astrocytes, le pyruvate ainsi formé est ensuite transaminé en alanine tout en produisant de l'acétyl CoA et du CO₂. L'acétyl CoA et le CO₂ vont entrer dans le cycle de l'acide citrique pour finalement produire de l' α -cétoglutarate. Dans les astrocytes, notons que le pyruvate peut aussi entrer dans le cycle de l'acide citrique via un phénomène de condensation avec le CO₂ pour former de l'oxaloacétate grâce à une enzyme nommée pyruvate carboxylase. Ainsi, l' α -cétoglutarate résultant du cycle de l'acide citrique va subir une étape de transamination via une transaminase pour finalement former du glutamate (Erecinska and Silver, 1990; Hertz et al., 1999).

Figure 3



Schématisation des interactions métaboliques du glutamate entre la terminaison neuronale et les astrocytes au niveau d'une synapse glutamatergique. Les astrocytes ainsi que les neurones transforment le glucose (6 carbones) en pyruvate (3 carbones) via les voies glycolytiques. Le pyruvate va ensuite entrer dans le cycle de l'acide citrique ce qui résultera en la formation de glutamate (5 carbones). Dans les neurones, le glutamate sera recapté par les vésicules synaptiques et sera prêt à être libéré dans la fente synaptique par exocytose. Notons aussi la présence de la glutamine dans les astrocytes qui peut aussi être reconvertie en glutamate. Le cycle de la glutamine sera traité à la figure 4 (Adapté de (Hertz et al., 1999)).

Figure 4



Représentation schématique du cycle de la glutamine. En plus d'activer des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques, le glutamate libéré dans la fente synaptique sera recapté par les cellules gliales via des transporteurs glutamatergiques gliaux et sera transformé en glutamine par la glutamine synthétase. La glutamine ainsi formée est transportée vers les neurones par un système de transporteurs et sera hydrolysée par une glutaminase mitochondriale ce qui reformera les réserves de glutamate. Le glutamate ainsi formé va être recapté dans les vésicules synaptiques et sera prêt à être libéré de nouveau par la terminaison neuronale. Notons aussi que le glutamate peut aussi être directement recapté par la terminaison présynaptique (Adapté de Hammond and Tritsch, 1990).

1.4.2 Récepteurs glutamatergiques

De nombreux développements ont eu lieu au cours des dernières années en ce qui a trait à la caractérisation des récepteurs glutamatergiques. Ce dynamisme résulte en grande partie par l'utilisation de nouvelles techniques d'hybridation, de séquençage et de clonage mises à la disposition des chercheurs. Actuellement, il existe trois grandes familles de récepteurs glutamatergiques : deux familles de récepteurs canaux et une famille de récepteurs liés aux protéines G.

1.4.2.1 Les récepteurs-canaux

Les récepteurs-canaux se divisent en trois grandes catégories en fonction des agonistes qui les activent (tableau-1). Parmi ceux-ci, notons la présence des récepteurs activés par le N-méthyl-D-aspartate communément appelés récepteurs NMDA et des récepteurs nommés non-NMDA comprenant les récepteurs activés par l'acide kainique (récepteurs kainate) et ceux activés par l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) appelés récepteurs AMPA.

1.4.2.1.1 Récepteurs NMDA

La liaison du glutamate et/ou des agonistes des récepteurs NMDA va engendrer un changement de conformation des protéines composant le récepteur-canal ce qui a pour effet d'augmenter la conductance pour les ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . Ces récepteurs-canaux possèdent aussi un site de liaison pour la glycine qui, via des interactions allostériques, potentialise l'ouverture du canal (Johnson and Ascher, 1987; Laube et al., 1993). Une des caractéristiques importantes des récepteurs de

type NMDA est l'effet du Mg^{2+} sur la conductance du canal. En effet, la présence d'ions Mg^{2+} extracellulaires bloque le pore du canal ce qui empêche les ions d'y passer. Ainsi, lorsque le potentiel membranaire de la cellule est négatif, la conductance du canal NMDA est presque nulle dû au bloc engendré par la présence des ions Mg^{2+} . Cependant, lorsque la cellule se dépolarise et atteint des valeurs positives, l'affinité du Mg^{2+} pour le pore du canal est diminuée et la conductance du récepteur-canal augmente suivant le gradient électrochimique des ions (Nowak et al., 1984; Thomson, 1986; Mayer and Westbrook, 1987; Collingridge and Lester, 1989).

Les récepteurs NMDA sont composés principalement de deux sous-unités soit la protéine NMDA-R1 (NR1) et NMDA-R2 (NR-2). C'est la sous-unité NR1 qui est responsable de la majorité des propriétés pharmacologiques des récepteurs NMDA tel la modulation à la glycine ainsi que l'effet Mg^{2+} . Quant à la sous-unité NR2, elle se subdivise en 4 autres sous-unités distinctes (NR2A-D). Les sous-unités NR2 ne forment pas de pore fonctionnel lorsqu'elles ne sont pas exprimées avec NR1 (Monyer et al., 1992). Par contre, lorsqu'elles sont co-exprimées sous forme d'hétérodimère avec la sous-unité NR1, il y a potentialisation des réponses induites par le glutamate (Masu et al., 1993). Ainsi, c'est la composition d'hétérodimère qui confère la très grande diversité des récepteurs NMDA.

Du point de vue pharmacologique, le principal agoniste autre que le glutamate de ce type de récepteurs est le N-méthyl-D-aspartate (NMDA), d'où son

nom (tableau-1). Quant aux antagonistes, il en existe plusieurs classes ayant des modes d'action différents. L'acide 2-amino-5-phosphonopentanoïc (AP5) et l'acide (2-carboxypiperazine-4-yl) propyl-1 phosphonique (CPP) sont des antagonistes sélectifs compétitifs pour les récepteurs NMDA (Watkins and Evans, 1981). Ces derniers vont se lier aux sites de liaison des agonistes sur la partie extracellulaire du récepteur sans toutefois induire l'ouverture du canal. Un autre groupe d'antagonistes des récepteurs NMDA ne bloque que les canaux NMDA ouverts. Parmi ceux-ci, le 5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maléate (MK-801) et la phencyclidine (PCP) vont s'insérer à l'intérieur du pore du récepteur-canal de façon irréversible et ainsi empêcher l'entrée des ions, bien que le canal soit toujours ouvert (Wong et al., 1986; Davies et al., 1988). Une autre approche permettant de bloquer les récepteurs-canaux de type NMDA est de travailler en présence de forte concentration de Mg^{2+} ce qui a pour effet d'accentuer le blocage causé par ces ions divalents et ainsi, la dépolarisation de la cellule n'est plus suffisante pour expulser l'ion Mg^{2+} inséré dans le pore du canal (Nowak et al., 1984).

1.4.2.1.2 Récepteurs non-NMDA

Les récepteurs non-NMDA comprennent deux types de récepteurs selon les agonistes qui les activent (tableau-1). Il y a les récepteurs AMPA activés par l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) et par le quisqualate puis les récepteurs activés par l'acide kainique et par le domoate nommés récepteurs Kainate (Watkins and Evans, 1981). Ces deux récepteurs

(AMPA/Kainate) forment principalement la classe des récepteurs non-NMDA. Les antagonistes non-sélectifs compétitifs de ces derniers récepteurs proviennent de la famille des dihydroxyquinoxalines comprenant le 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), le 2,3-dihydro-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(f)quinoxaline (NBQX) et le 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX). Notons qu'il existe des antagonistes spécifiques pour les récepteurs AMPA (Nikam and Kornberg, 2001) mais qu'il n'y aurait pas encore d'antagonistes connus spécifiques aux récepteurs de type Kainate.

Les récepteurs de type non-NMDA sont des récepteurs-canaux voltage-indépendants perméables aux ions monovalents tels le Na^+ et K^+ . En ce qui a trait aux récepteurs AMPA, quatre types de sous-unités ont été isolés (GluR1-GluR4) et c'est l'agencement de ces dernières qui confère les caractéristiques du récepteur-canal. Lorsque les sous-unités GluR1 et/ou GluR3 sont exprimées, le glutamate induira de forts courants ioniques enregistrés au niveau du canal tandis que l'expression de GluR2 seule engendrera de faibles courants (Boulter et al., 1990; Nakanishi et al., 1990; Verdoorn et al., 1991). Le récepteur-canal peut aussi être perméable aux ions Ca^{2+} . En effet, la perméabilité du canal aux ions Ca^{2+} dépend fortement des différentes sous-unités présentes. Lorsque les sous-unités GluR1 et GluR3 sont présentes ensemble ou séparément, le canal démontre une très grande perméabilité aux ions Ca^{2+} tandis que la présence de la sous-unité GluR2 dans n'importe quelles combinaisons de sous-unités rend le canal imperméable aux ions

Ca²⁺ (Hollmann and Heinemann, 1994). C'est l'agencement des différentes sous-unités qui confère la très grande diversité de cette classe de récepteurs.

Tableau-1 *Tableau comparatif des récepteurs ionotropiques glutamatergiques*

	Agonistes	Antagonistes	Caractéristiques particulières
NMDA	NMDA PCP	AP5 MK-801 CPP	Modulé par la glycine: Sensible au Mg ²⁺
Non-NMDA AMPA	AMPA Quisqualate	CNQX DNQX	Perméabilité au Ca ²⁺ GluR2-dépendante
Kainate	Kainate Domoate	CNQX DNQX	

1.4.2.2 Récepteurs métabotropiques

La troisième famille de récepteurs glutamatergiques sont les récepteurs métabotropiques (mGluRs). Ces récepteurs sont composés de 7 domaines transmembranaires et la liaison avec leurs agonistes va induire l'activation de protéines G. Ces dernières vont interagir avec des enzymes responsables de la production de seconds messagers intracellulaires ou vont moduler l'activité de certains canaux ioniques (Conn and Pin, 1997; Hamm, 1998; Cartmell and Schoepp, 2000). Les récepteurs de type mGluR se divisent en trois grands groupes. Chacun de ces groupes peut être, à son tour, subdivisé en plusieurs sous-groupes mais dans le cadre de ce mémoire, nous n'allons nous consacrer qu'aux trois groupes principaux (Tableau-2).

Les mGluRs du groupe I (mGluR₁, mGluR₅) sont liés à l'activation de la phospholipase C (PLC) via une protéine G α_q et à l'activation de l'adénylate cyclase par une protéine G α_s (Aramori and Nakanishi, 1992). La formation d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) par la PLC résulte principalement en une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire (Streb et al., 1983). Les mGluRs de type II (mGluR₂, mGluR₃) ainsi que les mGluRs du groupe III (mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇, mGluR₈) vont, quant à eux, diminuer l'activité de l'adénylate cyclase responsable de la formation d'AMPc par une protéine G α_i (Conn and Pin, 1997). Notons aussi que la sous-unité $\beta\gamma$ des protéines G peut aussi avoir des effets physiologiques. En effet, il a été démontré que cette sous-unité peut inhiber et/ou stimuler la formation d'AMPc ainsi que moduler l'activité de certains canaux ioniques tout comme les différentes sous-unités α (Clapham and Neer, 1993). C'est la balance d'activation entre les différentes sous-unités qui détermine l'effet physiologique final. De plus, de nouvelles données démontrent que les récepteurs métabotropiques peuvent aussi initier des cascades de signalisation et moduler l'excitabilité neuronale sans induire l'activation de protéines G. En effet, il s'emblerait que l'activation de mGluRs au niveau des neurones pyramidaux de la région CA3 de l'hippocampe pourrait induire l'activité d'une protéine kinase SRC résultant en la génération d'un courant entrant lent. Ainsi, l'activation des mGluRs peut aussi résulter en l'activation de systèmes de transduction n'impliquant pas les protéines G (Heuss and Gerber, 2000).

La pharmacologie des mGluRs est très complexe et très précise. De nombreux agonistes et antagonistes spécifiques et non-spécifiques ont été élaborés au cours de la dernière décennie (Conn and Pin, 1997). Les agonistes et antagonistes les plus utilisés sont présentés dans le tableau 2.

Tableau-2 *Tableau comparatif entre les différents groupes de récepteurs mGluRs*

	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Sous-groupe	mGluR _{1,5}	mGluR _{2,3}	MGluR _{4,6,7,8}
Protéine G	α_s α_q	α_i	α_i
Effecteurs	↑ PLC ↑ adénylate cyclase	↓ adénylate cyclase	↓ adénylate cyclase
Agonistes	ACPD	ACPD	L-AP4
Antagonistes	MCPG	MCPG	CPPG

1.5 Les cellules gliales

Puisque les résultats présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans le cadre d'une étude visant à comprendre les mécanismes gliaux impliqués dans la modulation de la transmission synaptique, les prochaines sections leurs seront ainsi consacrées.

Dans le SNC, le nombre de cellules gliales est de loin supérieur au nombre de neurones. Il existe plusieurs types de cellules gliales possédant des caractéristiques et des rôles physiologiques particuliers. Ainsi, certains types de cellules gliales ont pour fonction d'isoler les axones afin d'optimiser la conduction des influx nerveux, d'autres offrent un support trophique aux neurones adjacents et d'autres ont pour fonction de moduler la transmission synaptique. Dans ce chapitre, nous allons classer les cellules gliales en trois groupes distincts: 1. la glie responsable de l'isolation des axones (oligodendrocytes et les cellules de Schwann), 2. la glie associée à l'intégrité et à la protection du SNC (astrocytes de type I et la microglie) et 3. la glie participant à la modulation du transfert de l'information au niveau de la synapse chimique que l'on nommera cellules gliales pérисynaptiques (Astrocytes de type II, les cellules de Müller, les cellules de Bergmann et les CSPs). Dans le cadre de ce mémoire, je vais mettre l'emphase sur le troisième groupe soit les cellules gliales qui participent à la modulation de la transmission synaptique.

1.5.1 La glie responsable de l'isolation des axones

Le premier groupe de cellules gliales est composé des oligodendrocytes retrouvés dans le SNC et des cellules de Schwann du SNP. Ces cellules ont la caractéristique de former une gaine de myéline qui entoure les axones permettant de bien les isoler tout en empêchant des interactions inappropriées entre les axones adjacents. Sans cette isolation, l'influx nerveux véhiculé dans un axone pourrait interférer avec l'influx d'un autre axone adjacent ce qui aurait de graves conséquences sur la propagation des informations. De plus, l'isolation des axones

permet une meilleure conduction des influx nerveux sur de longues distances et permet aussi la formation de nœuds de Ranvier (interruption de la gaine de myéline le long de l'axone). Cette structure favorise un mode de conduction de type saltatoire des influx nerveux parcourant les axones ce qui a pour effet d'optimiser la vitesse de conduction. Notons aussi la présence d'oligodendrocytes et des cellules de Schwann qui ne forment pas de gaine de myéline. Ces dernières émettent des prolongements cytoplasmiques qui entourent les axones et par conséquent, les isolent. Par contre, dans ces axones, la vitesse de conduction est réduite car l'absence de myéline ne permet pas la formation de nœud de Ranvier et ainsi, la propagation des influx nerveux ne se fait pas sous un mode de conduction saltatoire (Hof et al., 1999).

1.5.2 La glie associée à l'intégrité et à la protection du SNC

Le deuxième groupe de cellules gliales est composé des astrocytes de type 1 et de la microglie. Dans le SNC, les astrocytes sont des éléments cellulaires très bien organisés et structurés qui émettent de nombreux prolongements qui sont en connexion avec plusieurs types cellulaires dont les neurones, les cellules endothéliales, d'autres astrocytes formant un syncytium, etc. Par exemple, les astrocytes émettent des prolongements sur la paroi des vaisseaux sanguins en formant des pieds vasculaires astrocytaires ayant pour fonction de limiter sélectivement la pénétration d'éléments étrangers dans le système nerveux (Goldstein, 1988; Raub et al., 1992). On retrouve aussi dans le SNC la microglie qui a un rôle phagocytaire semblable à celui des macrophages lorsqu'elle est activée

par des facteurs impliqués dans les processus inflammatoires (Streit et al., 1988; Nakajima and Kohsaka, 1993).

1.5.3 La glie participant à la modulation de la transmission synaptique: Les cellules gliales pérисynaptiques

Le troisième groupe de cellules gliales sont celles qui sont intimement associées aux synapses, soit les cellules gliales pérисynaptiques. Ces dernières sont localisées stratégiquement et envoient des prolongements aux sites de libération des neurotransmetteurs (Dreyer and Peper, 1974; Ventura and Harris, 1999). Dans ce groupe, on retrouve principalement les astrocytes, les cellules de Müller et les cellules de Bergmann dans le SNC et les CSPs associées aux JNMs dans le SNP.

Il a été proposé que les cellules gliales pérисynaptiques sont des éléments intégrateurs et modulateurs entrant en jeu dans la transmission synaptique (Araque et al., 1999a; Castonguay et al., 2001; Haydon, 2001). Pour qu'elles puissent jouer ce rôle, les cellules gliales doivent être en mesure :

1. de détecter l'activité synaptique via une machinerie fonctionnelle et stratégiquement localisée;
2. d'intégrer et de réagir aux signaux provenant de la synapse et,
3. de moduler la transmission synaptique.

1.5.3.1 Les cellules gliales pérисynaptiques détectent l'activité synaptique

Les cellules gliales ont longtemps été considérées comme des cellules passives servant de support physique aux neurones et impliquées dans des phénomènes d'homéostasie. Par contre, cette vision fût remise en cause par la découverte de la présence de nombreux canaux ioniques localisés sur les cellules gliales (Vernadakis, 1996; Verkhratsky et al., 1998; Verkhratsky and Steinhauser, 2000). De plus, les cellules gliales expriment une grande variété de récepteurs dont la grande majorité sont liés aux protéines G, tels des récepteurs glutamatergiques (astrocytes et oligodendrocytes), GABAergiques (astrocytes, oligodendrocytes), adrénérergiques (astrocytes), cholinérergiques (astrocytes, oligodendrocytes et CSPs), purinérergiques (astrocytes, oligodendrocytes, CSPs, microglie), etc. (Verkhratsky et al., 1998). Ainsi, l'ensemble de cette machinerie gliale (canaux ioniques et récepteurs) suggère que les cellules gliales sont en mesure de détecter les changements survenant dans leur environnement immédiat.

Bien que la machinerie nécessaire soit présente sur les cellules gliales pérисynaptiques, est-ce que ces dernières sont en mesure de détecter la libération de neurotransmetteurs par la terminaison présynaptique? Dans cette optique, il a été démontré que l'application d'acides aminés excitateurs, tel le glutamate, induit des oscillations calciques dans les astrocytes. De plus, cette élévation de Ca^{2+} intracellulaire au niveau d'une cellule se propage aux astrocytes adjacents. Ce phénomène a été appelé vague calcique et l'on croit qu'il serait responsable de

l'intercommunication entre les cellules gliales formant un réseau (Cornell-Bell et al., 1990; Cornell-Bell and Finkbeiner, 1991; Charles et al., 1991). Par conséquent, l'ensemble de ces études suggère que les cellules gliales pérисynaptiques sont en mesure de détecter l'activité synaptique. Par contre, il ne s'agissait que d'évidences indirectes et à ce stade, nul ne pouvait conclure que des neurotransmetteurs libérés par la terminaison présynaptique pourraient induire une telle augmentation calcique gliale.

C'est dans cette perspective que des études ont été entreprises dans le but de déterminer si l'activité synaptique peut induire des réponses calciques dans les cellules gliales bordant la synapse. Il a été démontré, dans des cultures organotypiques de tranches d'hippocampe, que la stimulation du gyrus dentelé induit des vagues calciques dans le réseau astrocytaire de la région CA3 de l'hippocampe (Dani et al., 1992). D'autres études, réalisées dans des tranches fraîchement isolées du cortex visuel, de la région CA1 de l'hippocampe et du cervelet, démontrent que la fréquence ainsi que l'intensité des oscillations calciques enregistrées dans les cellules gliales dépendent de la fréquence et de l'intensité de stimulations des afférences neuronales (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999). Des résultats similaires ont aussi été démontrés au niveau de la JNM d'amphibien et de mammifère. En effet, la stimulation du nerf moteur induit une augmentation de Ca^{2+} dans les CSPs et le tout est aussi fréquence-dépendant (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995; Rochon et al., 2001).

Les mécanismes régissant les augmentations de Ca^{2+} dans les cellules gliales seraient en grande partie causée par l'activation de récepteurs liés aux protéines G qui, à leur tour, viendraient activer différentes cascades de messagers intracellulaires. Une de ces voies résulterait en l'activation de la phospholipase C (Kirischuk et al., 1999). Cette dernière va hydrolyser le phosphatidylinositol-1,4,5-biphosphate (PIP_2) en diacylglycerol (DAG) et en IP_3 qui activera ses récepteurs localisés sur le réticulum endoplasmique résultant en la libération massive de Ca^{2+} (Streb et al., 1983). Un autre mécanisme résultant en une augmentation de Ca^{2+} gliale serait causé via l'activation de récepteurs AMPA gliaux résultant en une dépolarisation de la cellule ce qui induirait l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Kirischuk et al., 1999). De plus, les récepteurs de type AMPA peuvent aussi être perméables aux ions Ca^{2+} si la sous-unité GluR2 est absente (Hollmann and Heinemann, 1994).

Par conséquent, l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à ce jour démontre que tous les types de cellules gliales périssynaptiques sont sensibles et détectent l'activité synaptique car : 1. elles expriment des récepteurs et sont sensibles aux principaux neurotransmetteurs de leur synapse respective; 2. elles répondent toutes par une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et 3. leurs réponses sont fréquence-dépendantes.

1.5.3.2 Les cellules gliales intègrent et répondent aux signaux synaptiques

L'activation des cellules gliales par les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique peut résulter en plusieurs événements allant de la synthèse jusqu'à la libération de neurotransmetteurs. Les premières évidences suggérant que les cellules gliales puissent libérer des substances neuromodulatrices proviennent des études réalisées chez la grenouille (Bevan et al., 1973) et chez le calmar (Villegas, 1981) qui démontrent que les cellules de Schwann localisées à la JNM peuvent synthétiser ainsi que libérer de l'acétylcholine. Depuis, de nombreuses molécules libérées par les cellules gliales ont été dénombrées. Notons parmi celles-ci le glutamate, l'ATP, les prostaglandines E_2 , le NO, différents peptides, etc. (Martin, 1992). Bien que les cellules gliales libèrent plusieurs molécules, de nombreuses études confèrent une place très importante au glutamate car la plupart des phénomènes de libération et modulation gliale sont glutamate-dépendants et que, dans le SNC, une très grande proportion de synapses sont glutamatergiques. Ainsi, le glutamate est de loin la molécule la plus étudiée jusqu'à ce jour.

En effet, il a été démontré que les astrocytes en culture (Kimelberg et al., 1990; Bezzi et al., 1998), en tranche (Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998), au niveau de la rétine (Newman and Zahs, 1998) ainsi que des cellules de Schwann en culture provenant des ganglions de la racine dorsale (Parpura et al., 1995a; Jeftinija and Jeftinija, 1998) libèrent du glutamate via des mécanismes Ca^{2+} -dépendants. Bien que la majorité des études confère un rôle important aux ions Ca^{2+} dans la libération du glutamate par les astrocytes, les mécanismes impliqués restent encore

un point controversé. En effet, Araque et al., (2000) ont démontré que la libération de glutamate par les astrocytes serait dépendante de protéines SNAREs reconnues pour leur implication dans les processus d'exocytose suggérant ainsi que le glutamate serait emmagasiné dans des vésicules synaptiques et libéré par exocytose, phénomène connu comme étant Ca^{2+} -dépendant (Parpura et al., 1995b; Araque et al., 2000). Une autre hypothèse serait que la dépolarisation de cellules gliales provoquerait le renversement de transporteurs Na^+ /glutamate provoquant ainsi la libération de glutamate (Szatkowski et al., 1990). Des mécanismes dépendants du gonflement (*swelling*) des astrocytes pourraient aussi être impliqués dans la libération de glutamate par ces derniers (Kimmelberg et al., 1990).

1.5.3.3 Les cellules gliales pérисynaptiques modulent la transmission synaptique

Le concept que les cellules gliales modulent l'activité neuronale, par la libération de messagers gliaux, provient d'études réalisées en co-culture neurones-astrocytes. En effet, il a été démontré qu'une élévation de Ca^{2+} dans les astrocytes, induite par l'application de bradykinine, provoque subséquemment une augmentation de Ca^{2+} neuronale via l'activation de récepteurs glutamatergiques (Parpura et al., 1994). Des résultats similaires en culture ont aussi été obtenus dans d'autres laboratoires (Hassinger et al., 1995; Bezzi et al., 1998).

La stimulation des cellules gliales induit une augmentation calcique gliale ce qui sera suivie par la libération de molécules neuromodulatrices dont le glutamate. Le glutamate ainsi libéré va interagir avec des récepteurs

glutamatergiques neuronaux. L'activation de récepteurs ionotropiques postsynaptiques NMDA (Parpura et al., 1994; Hassinger et al., 1995; Pasti et al., 1997; Araque et al., 1998a; Araque et al., 1998b) et non-NMDA (Hassinger et al., 1995; Kang et al., 1998; Araque et al., 1998a; Araque et al., 1998b) va générer un courant lent entrant (slow inward current) dépolarisant ainsi l'élément postsynaptique. De plus, le glutamate va aussi activer des récepteurs mGluRs présynaptiques, et dans ce cas, on peut noter une diminution dans l'amplitude des courants postsynaptiques excitateurs (EPSCs) sans qu'il y ait un changement dans l'amplitude des mini-EPSCs (mEPSCs) suggérant une diminution dans la probabilité de libération des neurotransmetteurs par la terminaison présynaptique (Araque et al., 1998a; Araque et al., 1999b).

Bien qu'il a été démontré que des concentrations physiologiques de Ca^{2+} sont suffisantes pour induire la libération de glutamate par les astrocytes et la modulation subséquente de l'activité neuronale (Parpura and Haydon, 2000), il faut interpréter ces résultats avec précaution car les cellules gliales en culture diffèrent en plusieurs points comparativement aux cellules gliales retrouvées dans des conditions *in situ* / *in vivo* (Juurink and Hertz, 1985; Barres et al., 1990; Porter and McCarthy, 1995; Duffy and MacVicar, 1995). Dans cette optique, des études ont été réalisées dans des conditions se rapprochant plus d'un environnement physiologiques et des résultats similaires ont aussi été obtenus sur des tranches de cortex visuel et de la région CA1 de l'hippocampe. Ces dernières études démontrent que la stimulation des afférences neuronales induisent des oscillations

périodiques de Ca^{2+} dans les astrocytes (fréquence- et intensité-dépendantes) accompagnées d'une augmentation de Ca^{2+} dans les neurones adjacents (Pasti et al., 1997). Une autre étude réalisée au niveau de la rétine chez le rat démontre que la propagation de vagues calciques dans les cellules gliales de la rétine résulte en la modulation du taux de décharges neuronales et que cette modulation est corrélée avec l'amplitude de l'augmentation de Ca^{2+} dans les cellules gliales (Newman and Zahs, 1998). Dans la grande majorité des études réalisées dans ces conditions, le glutamate semble être le messager glial responsable de la modulation de l'activité neuronale (Pasti et al., 1997; Newman and Zahs, 1998). Finalement, des évidences démontrant l'implication directe des cellules gliales lors de la modulation de la transmission synaptique proviennent d'études réalisées à la JNM d'amphibien, permettant l'étude des interactions synapse-glie au niveau d'une seule synapse intacte. Ces études démontrent l'implication des CSPs sur la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001).

1.5.4 Les cellules de Schwann pérисynaptiques à la JNM

Les études réalisées à la JNM, en parallèle avec les recherches réalisées au niveau du SNC, ont apporté les évidences les plus directes sur les phénomènes de modulation gliale. Par exemple, lorsque l'on démontrait que des astrocytes du SNC en culture répondaient à l'application de neurotransmetteurs exogènes, les études réalisées à la JNM démontraient qu'une stimulation nerveuse était capable d'induire des augmentations calciques dans les CSPs de façon fréquence-

dépendantes (Jahromi et al., 1992). C'est aussi à la JNM que l'on retrouve les premières évidences démontrant que l'activation des cellules gliales par la libération de neurotransmetteurs de la terminaison nerveuse peut, en retour, moduler l'activité synaptique (Robitaille, 1998). En effet, contrairement aux études réalisées en culture, la JNM est une synapse intacte (terminaison présynaptique, élément postsynaptique et cellules gliales) permettant d'étudier les interactions synapse-glie dans un système bidirectionnel (terminaison présynaptique → cellules gliales → terminaison présynaptique) d'où l'avantage de ce modèle. De plus, les études réalisées à la JNM démontrent que les phénomènes de modulation gliale sont ubiquitaires, qu'ils sont retrouvés tant au niveau du SNC qu'au niveau du SNP.

1.5.4.1 Les cellules de Schwann pérисynaptiques détectent l'activité synaptique.

Les CSPs détectent la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse car lorsque l'on bloque l'exocytose à l'aide d'une toxine (ω -conotoxine GVIA), on note une réduction marquée (~90%) dans l'amplitude des réponses calciques gliales (Jahromi et al., 1992). De plus, l'utilisation d'antagonistes spécifiques aux récepteurs cholinergiques muscariniques (Robitaille et al., 1997; Rochon et al., 2001), purinergiques (P2X, P2Y; (Robitaille, 1995)), peptidergiques (NK1; (Bourque and Robitaille, 1998)) et à l'adénosine (A₁; (Robitaille et al., 1999; Rochon et al., 2001)) réduit considérablement les réponses calciques gliales induites par la stimulation de la terminaison présynaptique.

La majorité des récepteurs retrouvés sur les CSPs sont de type métabotropique (à l'exception des P2X) (figure 5). L'activation des récepteurs canaux P2X va permettre l'influx d'ions Ca^{2+} dans les CSPs et les récepteurs P2Y, muscariniques, A_1 ainsi que NK1 vont induire une augmentation de Ca^{2+} dans les CSPs (Robitaille, 1995; Bourque and Robitaille, 1998; Robitaille et al., 1999; Rochon et al., 2001) probablement causée par l'activation d'une phospholipase C qui va hydrolyser le PIP_2 en IP_3 . L' IP_3 interagirait avec ses récepteurs localisés sur la membrane du réticulum endoplasmique ce qui induirait la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires. L'effet final de l'activation des récepteurs localisés sur les CSPs à la JNM est d'induire une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Notons que les récepteurs peptidergiques (NK1), en plus d'activer la phospholipase C, vont aussi moduler l'activité des autres récepteurs localisés sur les CSPs (Bourque and Robitaille, 1998). En effet, les récepteurs NK1 activeraient aussi une protéine kinase C (Robitaille, résultats non-publiés) ce qui aurait pour conséquence de réduire l'effet de l'activité des récepteurs purinergiques et muscariniques (Bourque and Robitaille, 1998). De plus, il a été démontré que l'activation des récepteurs muscariniques régule aussi l'expression des certains gènes. En effet, ces récepteurs induisent l'activation d'une adénylate cyclase ce qui augmente la production d'AMP cyclique dans les CSPs et prévient la formation du *glial fibrillary acidic protein* (GFAP; (Georgiou et al., 1994; Georgiou et al., 1999)). Donc, les CSPs, de concert avec l'activité synaptique, contrôlent aussi le phénotype de la JNM.

Figure 5

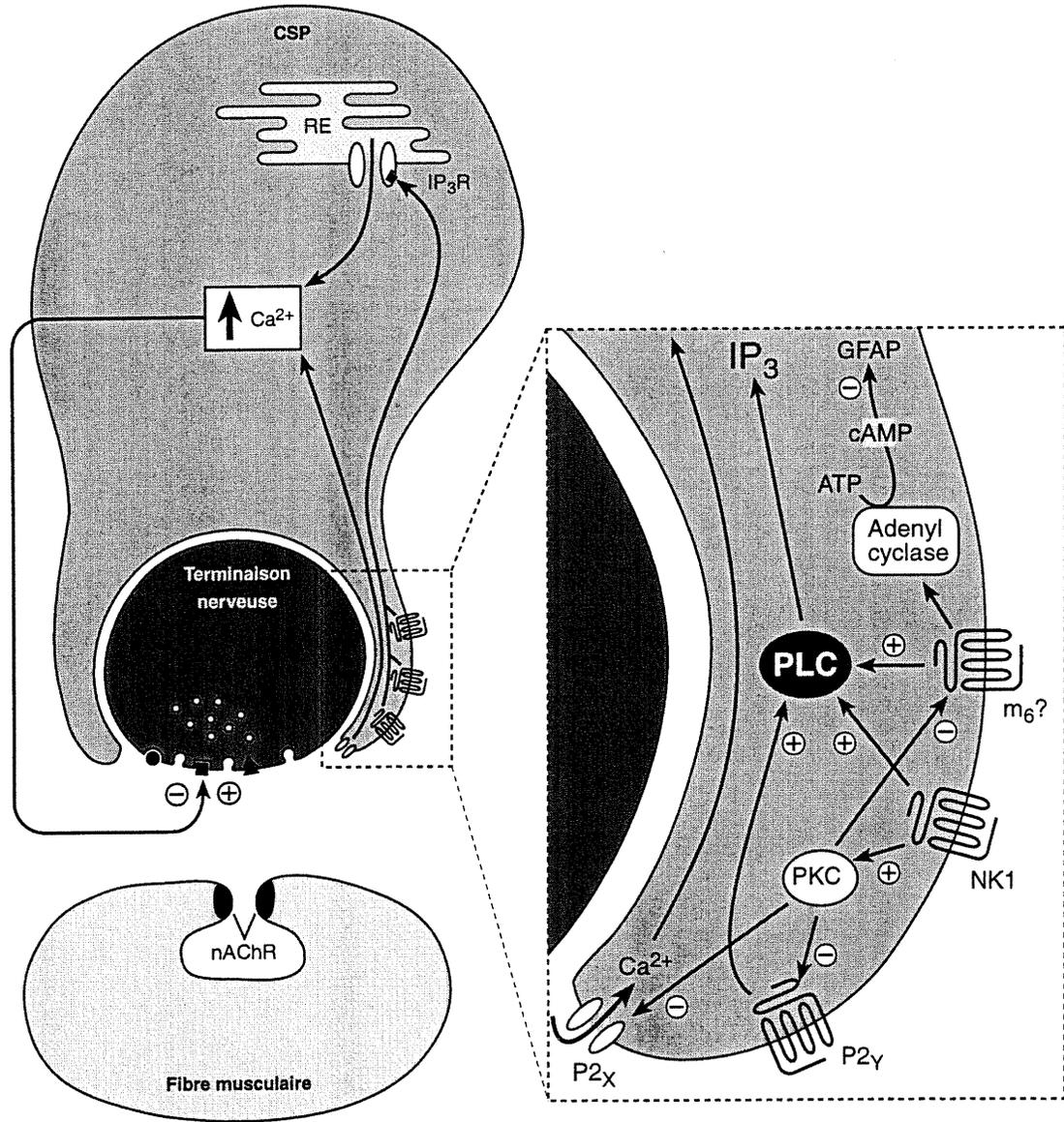


Figure 5

Représentation schématique de la JNM d'amphibien avec ses différents récepteurs localisés au niveau des prolongements des CSPs ainsi que des différentes cascades de seconds messagers intracellulaires activées par ces récepteurs. Règle générale, l'activation des récepteurs gliaux (P2X, P2Y, muscarinique, NK1) mènent à une augmentation calcique dans les CSPs. Les récepteurs-canaux P2X vont permettre l'entrée d'ions Ca^{2+} tandis que les récepteurs P2Y, NK1 et muscarinique vont plutôt activer une phospholipase C (*PLC*) qui hydrolysera le PiP_2 en IP_3 et c'est ce dernier qui ira libérer du Ca^{2+} des réserves internes de la cellule. Cette augmentation de Ca^{2+} pourrait réguler la libération de messagers gliaux qui interagiront avec la terminaison nerveuse modulant ainsi la libération de neurotransmetteurs. Notons aussi que l'activation de récepteurs muscariniques ($\text{m}_6?$) va aussi activer une adénylate cyclase qui réduira la formation de GFAP ainsi que les récepteurs NK1 qui activeront une protéine kinase C (*PKC*) diminuant ainsi l'activité de récepteurs canaux P2X, P2Y et muscarinique (Adapté de Castonguay et al., 2001).

1.5.4.2 Les CSPs modulent l'activité synaptique

En plus de détecter la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse, les CSPs modulent en retour l'activité synaptique (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001). En effet, il a été démontré que l'injection dans les CSPs d'un analogue non-hydrolysable de GTP, le GTP γ S, cause une réduction dans la libération de neurotransmetteurs par la partie terminaison nerveuse (Robitaille, 1998). De plus, la dépression synaptique induite par des stimulations à hautes fréquences est réduite suivant l'inactivation des protéines G dans les CSPs par l'injection de GDP β S (Robitaille, 1998). Ainsi, l'activation de protéines G dans les CSPs induit une réduction dans la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse modulant ainsi la transmission synaptique (Robitaille, 1998). Il a aussi été démontré qu'une augmentation de Ca²⁺ provenant des réserves intracellulaires gliales potentialise la libération de neurotransmetteurs et que le tamponnage du Ca²⁺ augmente la dépression synaptique (Castonguay and Robitaille, 2001). Ces derniers résultats suggèrent donc que les CSPs peuvent augmenter ainsi que diminuer l'efficacité synaptique à la JNM, en fonction de l'activité synaptique.

1.5.5 Messagers gliaux potentiels à la JNM

Bien que les CSPs modulent l'activité synaptique à la JNM, les messagers gliaux responsables des interactions glie-synapse restent, jusqu'à ce jour, inconnus. Dans ce mémoire, nous proposons le glutamate comme étant un candidat intéressant responsable des interactions glie-neurone à la JNM. À première vue, il

semble étrange que le glutamate puisse être impliqué dans la transmission synaptique à la JNM d'amphibien car cette synapse est reconnue comme étant purement cholinergique (Fatt and Katz, 1952). Cependant, au cours des dernières années, quelques études tendent à démontrer que le glutamate serait présent à la JNM et que certaines composantes d'un système glutamatergique pourrait aussi y être localisées.

En effet, nous et d'autres (Waerhaug and Ottersen, 1993) avons démontré que le glutamate est présent à la JNM et que cet acide aminé excitateur serait préférentiellement accumulé dans les CSPs. De plus, il a été démontré qu'une sous-unité des récepteurs NMDA (NMDA-1) ainsi qu'une enzyme, la *N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase* (NAALADase), sont localisées à la JNM de rat (Berger et al., 1995a; Berger et al., 1995b). La NAALADase a pour rôle de scinder le neuropeptide *N-acetyl-aspartyl-glutamate* (NAAG) en *N-acetyl-aspartate* et en glutamate (Slusher et al., 1990). Ainsi, ces dernières évidences suggèrent la présence d'un système glutamatergique à la JNM de vertébrés, reconnue pour être une synapse purement cholinergique. De plus, il a été démontré que les cellules de Schwann en culture provenant des ganglions de la racine dorsale chez le rat peuvent libérer des acides aminés excitateurs tel le glutamate, suite à l'application d'ATP (Jeftinija and Jeftinija, 1998) ou de bradykinin (Parpura et al., 1995a) suggérant que les CSPs de la JNM pourraient, elles aussi, libérer du glutamate.

Dans ce mémoire, nous avons effectué des expériences d'électrophysiologie, d'imagerie calcique et d'immunohistochimie dans le but de déterminer si des systèmes glutamatergiques fonctionnels sont présents à la JNM d'amphibien ainsi que de déterminer leur implication lors de la transmission synaptique. Dans le chapitre 2 de ce mémoire, nous montrons, que le glutamate est localisé dans les CSPs et que le glutamate exogène module la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse. Fait plus important, le glutamate endogène module aussi la dépression synaptique à haute fréquence via l'activation de récepteurs mGluRs. L'effet dépresseur du glutamate est fréquence-dépendant car les antagonistes glutamatergiques n'ont pas d'effets lors de stimulations à basse fréquence contrairement aux stimulations à haute fréquence. De plus, nous avons démontré que des systèmes fonctionnels de recapture de glutamate sont aussi présents à la JNM. Ainsi, l'ensemble des évidences présentées dans ce mémoire démontre la présence d'un système glutamatergique fonctionnel à la JNM d'amphibien reconnu comme étant une synapse purement cholinergique. Ainsi, en fonction des critères énoncés dans la section 1.1, le glutamate possède les caractéristiques requises pour être considéré comme un bon candidat potentiel responsable des interactions CSPs-synapse à la JNM d'amphibien.

Chapitre deuxième

**MOMENTOUS GLUTAMATERGIC MODULATION OF SYNAPTIC
TRANSMISSION AT A PNS VERTEBRATE CHOLINERGIC SYNAPSE**

(soumis à la revue Nature Neuroscience)

Submitted, July 9, 2001

**Momentous glutamatergic modulation of synaptic transmission at a PNS
vertebrate cholinergic synapse**

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

Address correspondence to: Richard Robitaille
Département de physiologie
Université de Montréal
P.O. Box 6128, Station "Centre-Ville"
Montréal, Canada
H3C 3J7
Tel #: (514) 343-6111 ext 1946
Fax #: (514) 343-2111
E-mail: richard.robitaille@umontreal.ca

ABSTRACT

The vertebrate neuromuscular junction is purported to be a unique cholinergic synapse where nicotinic receptors mediate ACh action. However, doubts have been shed on this possibility by indirect evidence suggesting that another major excitatory neurotransmitter, glutamate, might be involved in synaptic transmission at this synapse. Here we show that glutamate depresses transmitter release through the activation of non-NMDA and metabotropic receptors in a frequency-dependent manner without affecting presynaptic Ca^{2+} entry and handling. The release of endogenous glutamate mediates in part synaptic depression while glutamate transporter systems present on perisynaptic Schwann cells terminate its effects. Hence, synaptic efficacy and short-term plasticity at a single cholinergic synapse are shaped by a functional glutamatergic modulation.

INTRODUCTION

Glutamate and acetylcholine (ACh) are the most prominent excitatory neurotransmitters in vertebrate CNS and PNS, respectively. It is now well established that neurotransmitters are co-released with neuromodulators and neuropeptides at the same synapses^{1,2}. Although the vertebrate neuromuscular junction (NMJ) is purported to be a unique cholinergic synapse where ACh is the main neurotransmitter activating postsynaptic nicotinic ACh receptors³, there is some evidence that glutamate may co-exist with ACh in this synapse. For instance, the presence of glutamatergic receptors has been reported at the NMJ^{4,5} and

glutamate was found in presynaptic nerve terminals, possibly in synaptic vesicles, and also in perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the NMJ⁶. Complementary to this, biochemical evidence also indicates that glutamate may be released from cholinergic synaptosomes from cerebral cortex⁷ and from Torpedo electric organ⁸. In light of these data, it is interesting that exogenous glutamate application can modulate cholinergic synapses, as suggested by the increase of spontaneous activity at immature NMJs⁹ or in neuron/muscle co-cultures from 1-day-old *Xenopus* embryos¹⁰. Based on these observations, it was proposed that glutamate may act as a neurotransmitter at vertebrate neuromuscular synapses^{4,6,11}.

However, there is no direct evidence indicating that endogenous glutamate can regulate synaptic efficacy at the NMJ. In addition, it is unclear whether glutamate acts as a neurotransmitter mediating direct postsynaptic action, as suggested by the results of the biochemical studies^{7,8}, or if it acts as a neuromodulator that regulate the release of endogenous neurotransmitter. In this study we evaluated the role of glutamate at the classic and well characterized singly innervated cholinergic synapse, the amphibian NMJ. We report that endogenous glutamate does not act as a neurotransmitter at the amphibian NMJ, but rather that it reduces the probability of ACh release via metabotropic receptors in a frequency-dependent fashion. Moreover, functional re-uptake mechanisms shape the glutamate-mediated modulation of transmitter release and short-term synaptic depression.

RESULTS

Glutamate at the amphibian NMJ

The presence of glutamate at the amphibian NMJ was determined using immunohistochemical experiments with an antibody against glutamate¹². Its distribution was compared with staining for the lectin PNA that labels proteoglycans specifically located at the NMJ¹³. Glutamate staining (*green*) was observed in longitudinal cellular compartments (Fig. 1a) confined within PNA staining (*red*) as shown in the superimposed image (*merge*; n=5, N=2). Glutamate labeling was also observed in fibroblasts (data not shown). The main characteristics of the staining at the NMJ are that the somata of PSCs were labeled for glutamate as indicated by the presence of ellipsoidal structures confined within the PNA staining and by the punctated nature of the labeling (Fig. 1b). This staining pattern is typical of PSCs labeling¹³⁻¹⁵ suggesting that glutamate is present in PSCs at the NMJ. However, consistent with the observation of Waerhaug and Ottersen⁶, these results with confocal microscopy do not allow us to exclude the possibility that glutamate is also located in nerve terminals owing to the close proximity of the nerve terminal and the processes of PSCs. No staining was detected in muscle fibers (Fig 1a), satellite cells or in endothelial cells associated with capillaries (data not shown).

Glutamate depresses transmitter release

Effects of glutamate on synaptic transmission were monitored using intracellular recordings of end plate potentials (EPPs) evoked by nerve stimulation (0.2Hz). Brief bath application (5min) of glutamate (20 μ M) induced a sustained

reduction of EPP amplitude that occurred in two phases: an early phase that developed with a delay of 3.1 ± 0.5 min and stabilized in about 10 min, and a delayed phase that began on average 19.6 ± 2.7 min after glutamate application and stabilized in about 40 min (Fig. 1c). In the early phase, glutamate reduced EPP amplitude by $14.7 \pm 4.4\%$ (control, 4.88 ± 0.75 mV; $t=10$ min, 4.28 ± 0.83 mV, $n=9$, $P < 0.05$) and by $23.3 \pm 2.8\%$ at the delayed phase (4.18 ± 0.66 mV, $n=8$, $P < 0.001$, RM ANOVA). The glutamate-induced depression was due to a reduction in transmitter release as indicated by the lack of effect on the amplitude of miniature EPPs (MEPPs) (Fig. 1,d; control, 0.65 ± 0.07 mV, $n=6$; $t=10$ min, 0.68 ± 0.08 mV and $t=40$ min, 0.62 ± 0.09 mV, $n=3$: $P > 0.1$, RM ANOVA). However, MEPP frequency was reduced by $23.2 \pm 2.9\%$ at the early phase (control, 3.4 ± 0.7 Hz; glutamate, 2.6 ± 0.5 Hz, $n=6$, $P < 0.01$) and by $34.0 \pm 3.4\%$ at the delayed phase (2.8 ± 0.6 Hz, $n=3$, $P < 0.01$, RM ANOVA).

Glutamate depressed transmitter release without affecting overall presynaptic Ca^{2+} levels since imaging of Ca^{2+} entry in nerve terminals showed that continuous application of glutamate ($20 \mu\text{M}$) did not reduce the peak amplitude of Ca^{2+} responses induced by single nerve stimuli 15 and 35 minutes after glutamate application (control, $22.4 \pm 4.3\%$; $t=15$ min, $25.4 \pm 6.2\%$; $t=35$ min, $25.3 \pm 5.9\%$, $n=6$, $P > 0.1$, RM ANOVA). Moreover, the handling and regulation of Ca^{2+} following its entry in the presynaptic terminals appear unaffected by glutamate since Ca^{2+} response duration at 20% and at 50% of the normalized peak amplitude remained unchanged (Fig. 1e; at 20%: control, 85.0 ± 4.2 ms; $t=15$ min, 89.2 ± 4.7

ms; t=35min, 95.8 \pm 6.9 ms, n=6, P>0.1, RM ANOVA and at 50%: control, 31.3 \pm 2.1 ms; t=15min, 35.4 \pm 1.2 ms; t=35min, 35.8 \pm 3.0 ms, n=6, P>0.1, RM ANOVA). Similar results were obtained when 500 μ M glutamate was used (data not shown).

The types of receptors mediating the glutamate-induced depression of transmitter release were determined using specific antagonists. In the presence of the non-NMDA receptor antagonist CNQX (25 μ M), the effects of glutamate on EPP amplitude were delayed (Fig. 1f), suggesting that the early phase was occluded by CNQX. However, the delayed effect was still present, and EPP amplitude was reduced by 10.7 \pm 3.5% following glutamate application (control, 4.9 \pm 0.7mV, n=7; t=10min, 4.8 \pm 0.7mV, n=7; t=40, 4.4 \pm 0.7mV, n=5; P>0.1 and P<0.01 respectively, RM ANOVA). The smaller reduction at the delayed phase in comparison to control (absence of CNQX, Fig 1c) can be accounted for by the absolute reduction in EPP amplitude in the early phase. In the presence of a non-specific group I/II metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG (500 μ M), glutamate failed to decrease transmitter release at the early and delayed phases (Fig. 1g; control, 3.8 \pm 0.4mV, n=8; t=10min, 3.7 \pm 0.4mV, n=8; t=40min, 3.5 \pm 0.4mV, n=7, P>0.1, RM ANOVA). The NMDA antagonist AP5 (25 μ M) did not prevent glutamate effect (data not shown).

Importantly, CNQX and MCPG alone after 30 min, had no effect on EPP amplitude evoked at low frequency of stimulation (0.2 Hz) (Fig. 1h; for CNQX:

control, 4.3 ± 2.8 mV; after CNQX, 4.0 ± 2.4 mV, $n=7$, $P>0.1$, paired Student t-test; for MCPG: control, 4.3 ± 1.3 mV; after MCPG, 3.9 ± 1.3 mV, $n=8$, $P>0.05$, paired Student t-test) indicating that endogenous glutamate did not act as a neurotransmitter, mediating presynaptic to postsynaptic transmission. Rather, these results are more consistent with glutamate acting as a modulator at the amphibian NMJ.

Endogenous glutamate modulates high frequency-induced synaptic depression

Because exogenous glutamate application depressed transmitter release, we tested whether high frequency-induced synaptic depression was modulated by endogenous glutamate. The level of synaptic depression was determined by measuring the amplitude of the last 50 EPPs of the train of stimuli (10Hz, 90s) and compared to control EPPs. Note that similar synaptic depression could be obtained repetitively on the same preparation¹⁶. In the presence of CNQX (25 μ M) and MCPG (500 μ M), synaptic depression was significantly reduced by 26.7% as compared to control depression (Fig. 2a,d; control, $27.0 \pm 4.8\%$ and after CNQX-MCPG, $19.8 \pm 4.5\%$, $n=6$, $P<0.05$, Student paired t-test). In the presence of MCPG alone (500 μ M), high frequency synaptic depression was also significantly reduced by 20.3% as compared to control depression (Fig. 2b,d; control, $38.0 \pm 3.8\%$ and after MCPG, $30.3 \pm 3.6\%$, $n=8$, $P<0.05$, Student paired t-test) while CNQX (25 μ M) alone had no effect (Fig. 2c,d; control, $32.4 \pm 7.1\%$ and after CNQX, $32.8 \pm 9.8\%$, $n=7$, $P>0.1$, Student paired t-test). Hence, these data indicate that the

release of endogenous glutamate modulate synaptic efficacy and short term plasticity of the amphibian NMJ through the activation of mGluR receptors.

Do PSCs respond to glutamate application?

Because PSCs responded to neurotransmitters and considering that they modulate high frequency-induced depression¹⁶, we next tested whether PSCs were sensitive to glutamate by monitoring Ca^{2+} changes. Local applications of glutamate (500 μM in the micropipette, diluted ~20 times by bath perfusion) failed to induce Ca^{2+} responses in PSCs. Ca^{2+} responses were observed only when large concentrations of glutamate were used, where only half of the cells responded (7/14) with an average Ca^{2+} response of $90 \pm 21\% \Delta\text{F}/\text{F}$ for 1mM glutamate in the micropipette, while 10mM of glutamate induced Ca^{2+} responses in 15 of the 20 cells (75%) with an average response of $107 \pm 37\% \Delta\text{F}/\text{F}$ (Fig. 3). These results indicate that the sensitivity of PSCs for glutamate is much smaller than the transmitter release process, and suggest that glutamate likely does not efficiently activate PSCs during synaptic activity.

Functional glutamatergic uptake machinery at the amphibian NMJ.

To further test for the physiological relevance of the glutamatergic modulation of transmitter release, the presence of functional glutamate transporter system was studied. Labeling of the glutamate transporter GLAST-1 (*red*) was located within the boundaries of the end plate delineated by PNA staining (*green*) suggesting that the GLAST transporter is preferentially located at the NMJ (Fig. 4a;

n=17, N=2). Moreover, PSCs somata were clearly labeled. To confirm the presence of GLAST transporter in PSCs, double labeling experiments were performed using the 2A12 antibody (*green*; Fig. 4b) that labels specifically PSCs¹³. An overlap between the GLAST (*red*) and the 2A12 (*green*) labeling revealing yellow pixels would be indicative of a glial location of the GLAST transporter. On the 20 PSCs examined with the 2A12 antibody, 15 PSC somata and 17 PSC processes were stained with the GLAST transporter antibody and resulted in yellow pixels in the merged confocal images (Fig. 4b; *merge*). Interestingly, evidence was also obtained on 1 NMJ for the presence of GLAST on nerve terminals (Fig. 4c), as suggested by the lack of overlays of the GLAST and 2A12 labeling and by their close proximity. Western blot analysis revealed that the GLAST transporter antibody was specific for amphibian tissues since a single band at ~70kDa was detected (data not shown); this is similar to the value for the GLAST-1 transporter purified from rat brain (66 kDa)¹⁷.

The functionality of the glutamate transporter system was tested next by monitoring the effect of the non-specific glutamate transporter inhibitor, D,L-*threo*- β -hydroxyaspartic acid (THA)¹⁸, on transmitter release. A reduction in EPP amplitude would be indicative of glutamate accumulation, hence suggesting that the transporter removes glutamate from the synaptic cleft. Alternatively, an increase in EPP amplitude would suggest that the mechanism of glutamate release may involve the transporter system. Bath application of THA (300 μ M) reduced EPP amplitude evoked at 0.2 Hz by 16.9 \pm 4.6% (Fig. 4d; control, 7.2 \pm 1.1mV and 30min after

THA, $6.1 \pm 0.9\%$, $n=6$, $P < 0.05$, Student paired t-test) suggesting that glutamate transporter blockade resulted in glutamate accumulation in the synaptic cleft, which then caused a reduction in transmitter release.

Consistent with this observation, in the presence of THA, high frequency-induced synaptic depression (10 Hz, 90s) was significantly increased by 13.4% as compared to control depression (Fig. 4e,f; control, $26.2 \pm 8.0\%$ and after THA, $29.7 \pm 7.8\%$, $n=6$, $P < 0.05$, Student paired t-test), suggesting that the recapture of glutamate terminates its modulation of synaptic depression. In this case, the level of synaptic depression was likely underestimated since THA by itself reduced synaptic transmission evoked at 0.2 Hz, conditions in which the level of high frequency-induced depression is normally reduced¹⁹. This was directly tested by lowering extracellular Ca^{2+} concentration to mimic THA effects on transmitter release. In these conditions, synaptic depression was reduced by 31.3% in comparison to control depression (Fig. 4f), indicating that the more pronounced synaptic depression in the presence of THA was underestimated by about 30%. Thus, endogenous glutamate that modulates synaptic transmission and plasticity at the amphibian NMJ is efficiently regulated by a functional glutamate uptake machinery.

DISCUSSION

Our data suggest that endogenous glutamate modulates synaptic efficacy and plasticity at the amphibian NMJ. To our knowledge, this is the first direct evidence that activity-dependent release of endogenous glutamate from within a singly innervated cholinergic vertebrate synapse activates functional glutamate receptors, regulates synaptic depression and that glutamate levels are regulated by a transporter system that terminates its effects on transmitter release. We can rule out that glutamate originates from other glutamatergic synapses since, unlike invertebrate NMJs and CNS synaptic networks, there is no direct glutamatergic innervation at the amphibian NMJ. Hence, these results indicate that glutamate is an important modulator of this “*classical cholinergic synapse*” that is the amphibian NMJ.

Until now, glutamatergic regulation at the vertebrate NMJ was proposed mainly on anatomical evidence for the presence of receptors and enzymes^{4,5} while the only functional evidence available was that exogenously applied glutamate potentiated transmitter release at the immature NMJ^{9,10}. Interestingly, there appears to be a developmental switch in the glutamatergic regulation of transmitter release since, unlike the results at the immature NMJ, our experiments indicate that exogenous application of glutamate depressed transmitter release at the adult NMJ. Consistent with this possibility is that potentiation of spontaneous transmitter release by exogenous glutamate diminishes with the maturation of the NMJ, to

eventually disappear⁹. Together, these data suggest that the roles of glutamate are different depending of the stage of development.

Our results indicate that glutamate is not involved in the signaling between nerve terminal and muscle fibers as suggested by the observation that neither the mGluR receptor antagonist (MCPG) nor the non-NMDA receptor antagonist (CNQX) affect transmitter release even though they both significantly perturbed the action on synaptic transmission of exogenously applied glutamate. This is consistent with the well known observation that ACh receptor antagonists completely block synaptic transmission³, suggesting that glutamatergic EPPs are not produced at this synapse. Our data further suggest that glutamate does not either mediate synapse-to-glia signaling as suggested by the low sensitivity of PSCs to glutamate. Indeed, unlike glutamate, the reliability of neurotransmitters involved in synaptic transmission at this synapse (ACh and ATP) to elicit Ca²⁺ responses in PSCs is high, as indicated by the small concentrations of neurotransmitter required to induce responses (nanomolar to low micromolar range) and the easiness to evoke large Ca²⁺ responses (>150% $\Delta F/F$) in a vast majority of cells (> 95%)²⁰⁻²². Knowing that the Ca²⁺ changes in PSCs are key events triggering the regulation of synaptic transmission by these cells^{16,23}, the unreliability of glutamate to elicit Ca²⁺ elevation in PSCs suggests that it does not function as a signaling molecule necessary for PSCs activation. Hence, our data indicate that glutamate does not act as a direct activator but rather as a modulator of synaptic events.

Our results also reveal that there is a tonic release of glutamate, as indicated by the decrease in transmitter release during glutamate transport blockade by THA. However, the lack of effect of the glutamate receptor antagonists on low level of transmitter release (0.2 Hz nerve stimulation) argues that the tonic release of glutamate has no direct action, likely due to the capacity of the transporter activity to prevent glutamate from reaching the glutamatergic receptors. However, the activity-dependent glutamatergic regulation of transmitter release occurs at higher frequency of stimulation, as indicated by the observation that synaptic depression was significantly reduced in the presence of the mGluR receptor antagonist MCPG. Hence, knowing that the sensitivity of glutamate receptors²⁴⁻²⁶ and transporters²⁷ are similar, and because our results suggest that tonic release of glutamate is efficiently regulated by the transporter without activating the receptors, it is likely that the transporters are in the vicinity of the glutamate release sites, while the receptors are located likely at a further distance. This is consistent with the observation that glutamate and GLAST transporter labeling are observed in PSCs and presynaptic nerve terminals (see Fig 1a,b and Waerhaug and Ottersen⁶ for glutamate and Fig 4 for the transporter).

The effects of glutamate are presynaptic as suggested by the quantal analysis that revealed an increase in MEPP frequency without any effect on MEPP amplitude. Hence, this might suggest that glutamatergic receptors are located on the presynaptic terminal directly mediating the effects. This would be consistent with the observation that mGluR receptors are often located on presynaptic

terminals in the CNS (see Cartmell and Schoepp²⁸ for review). However, one cannot rule out the possibility that the receptors could be located on the muscle fiber, as seems to be the case for ionotropic glutamatergic receptors at the mammalian NMJ^{4,5} and that their activation could induce the production of retrograde molecule, such as nitric oxide (NO)¹¹, which was shown to depress transmitter release by the nerve terminal at the NMJ²⁹. This is of further interest since it is easily reconcilable with the possibility that the transporter system appears located at some distance from the receptors. Indeed, a postsynaptic location of mGluRs would provide sufficient space between the glutamate release sites and the transporters on the presynaptic/glia side of the synaptic cleft and the receptors on the other side to allow the transporters to re-capture glutamate before it reaches the receptors.

The release of glutamate may originate from either the PSCs or the presynaptic terminal, or both, since it is differentially accumulated in these synaptic compartments. As indicated by Waerhaug and Ottersen⁶, it remains to be confirmed whether glutamate is included in synaptic vesicles and released by exocytosis from the presynaptic terminal. However, the frequency-dependence of the modulation by endogenous glutamate is not consistent with a typical presynaptic vesicular release of glutamate. Indeed, an effect by the glutamate receptor antagonists on transmitter release at low nerve terminal activity (low frequency of motor nerve stimulation) should have been observed if glutamate, concentrated in synaptic vesicles, was released by exocytosis. One possibility

might be that the vesicular concentration of glutamate is small relative to the ACh concentration and, hence, would require the release of the content of several synaptic vesicles in a short period of time, condition induced by a train of stimuli.

An interesting alternative might be that glutamate is released by PSCs in a frequency-dependent manner. Indeed, PSCs modulate synaptic plasticity and efficacy at the amphibian NMJ, notably synaptic depression, in a frequency-dependent manner^{16,23}. This frequency-dependent glial regulation of synaptic depression is consistent with the frequency-dependence of endogenous glutamate modulation of transmitter release. Hence, in this scenario, transmitters released by the presynaptic nerve terminal (ACh, ATP) would activate receptors on PSCs that would lead to the release of glutamate and the modulation of transmitter release.

In this study we have obtained evidence for an endogenous, activity-dependent glutamate regulation of the "typical cholinergic synapse" that is the amphibian NMJ. These results open a new perspective on the synaptic modulations that occurs at this synapse and provide a mechanism that explains, in part, the phenomenon of synaptic depression, which is the main plasticity phenomenon at this synapse.

MATERIALS AND METHODS

Preparation:

Cutaneous pectoris muscles and their innervation were dissected from *Rana pipiens* frogs (Anilab, Québec, Québec; Wards, St-Catherines, Ontario and Connecticut Valley Biological Supply, Southampton, Massachusetts) and pinned into a recording chamber containing normal Ringer solution (in mM): 120 NaCl, 2 KCl, 1 NaHCO₃, 15 HEPES, 1.8 CaCl₂. The pH was adjusted at 7.2 using NaOH 5N.

Immunohistochemistry of glutamate:

Muscles were fixed in formaldehyde 4% (E.M. grade, M.E.C.A. Lab, Montréal, Québec) for 10min. Membranes were permeabilised with 0.3% Triton X-100 solution (Sigma, St-Louis, Missouri) for 45 min at room temperature and non-specific labeling was reduced by washing the muscle for 15 min in a solution of 5% casein/ 0.01% triton X-100 diluted in Ringer solution. Muscles were incubated overnight at 4°C with the primary antibody against glutamate¹² (1:500, Arnel products, New York, New York) followed by an incubation with a biotinylated anti-rabbit secondary antibody (1:500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) for 60 min at room temperature. The secondary antibody was then revealed using a FITC-coupled avidin (1:100, Vectors, Burlingame, California) incubated for 120 min at room temperature. NMJs were labeled with peanut agglutinin lectin coupled to TRITC (PNA-TRITC, Sigma, Canada) for 15 min at 22-23°C. PNA labels proteoglycan located on the extracellular matrix of PSCs at

the frog NMJ³⁰. Muscles were then mounted in a Slow-fadeTM medium (Molecular Probes, Eugene, Oregon).

Preparations were observed with a Bio-Rad MRC-600 confocal microscope equipped with a X40 oil objective (Fluor, 1.3 NA, Nikon, Japan). An argon ion laser was used for the excitation at a wavelength of 514 nm attenuated to 1% of its maximum intensity with a neutral density filter. FITC emission was detected through a bandpass filter (510-570 nm) and TRITC emission was detected through a long-pass emission filter (cut off at 600 nm). This dual wavelength configuration allowed simultaneous imaging of both labelings.

Immunohistochemistry of glutamate transporter (GLAST-1):

Muscles were fixed with formaldehyde 4% for 10 min and membranes were permeabilised in 0.3% Triton X-100 solution for 45 min. Non-specific labeling was blocked with 2% normal donkey serum (NDS; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) /0.01% triton X-100 diluted in Ringer solution for 30 min followed by an over night incubation, at 4°C, with GLAST antibody³¹ (1:250, guinea pig, Chemicon, Temecula, California). PSCs at the NMJ were revealed with the 2A12 monoclonal antibody¹³ (kindly provided by Dr C.-P. Ko, University of Southern California, USA) for 3 hours at room temperature. A biotinylated conjugated anti-guinea pig IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) and an anti-mouse IgM secondary antibody coupled to FITC (1:500, Sigma, St. Louis, Missouri) were used to reveal GLAST and 2A12 antibody

respectively. Both secondary antibodies were incubated for 60 min each at room temperature. The biotinylated guinea pig secondary antibody was revealed using Streptavidin-Texas-Red (1:500, 30 min, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania). In some experiments, PSCs staining with 2A12 was replaced with PNA coupled to FITC. Muscles were mounted in a Slow-fadeTM medium or in a prolong kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon).

Preparations were observed with a confocal microscope (Zeiss, LSM 510, Heidelberg, Germany) equipped with a X40 water immersion objective (IR-ACROPLAN 0.8W). FITC was excited at 488 nm with an argon ion laser (attenuated at 0.6-0.8% of its maximal intensity) and Texas-Red was excited at 543 nm with a helium-neon ion laser (100% intensity). FITC emission was detected through a band-pass filter (505-543 nm) and the Texas-Red emission was detected through a long-pass filter (cut off 560 nm). This configuration allowed simultaneous visualization of the stainings.

Western blot analysis

The specificity of the GLAST antibody for amphibian tissue was performed using Western blot analysis as described in ^{14,32}.

Electrophysiological recordings and Ca²⁺ imaging

Electrophysiological recordings of synaptic transmission and calcium imaging of the nerve terminals were performed as described in ^{23,29}. Ca²⁺ imaging of PSCs was performed as described in ^{20,33}.

Drugs:

L-glutamic acid was obtained from Sigma (St. Louis, Missouri). The NMDA receptor antagonist, D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5) was obtained from Tocris Cookson Inc (Ballwin, Montana), Calbiochem (San Diego, California) or RBI (Oakville, Ontario). Non-selective AMPA/Kainate antagonist (referred as non-NMDA antagonist), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), was purchased from Tocris Cookson Inc (Ballwin, Montana) or RBI (Oakville, Ontario). The non-selective group I/II mGluR antagonist (s)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine ((s)-MCPG) was obtained from Tocris Cookson Inc (Ballwin, Montana). The non-selective glutamate transporter inhibitor, DL-threo- β -hydroxyaspartic acid (THA), was purchased from Sigma/RBI (St. Louis, Missouri). Glutamate and AP5 were dissolved in distilled water while CNQX and MCPG were dissolved in NaOH 0.1N and THA in NaOH 1N. Stock solution of AP5 (10mM) and CNQX (5mM) were stored at -20°C while glutamate, MCPG and THA were prepared daily.

Statistical analysis:

One way repeated measures analysis of variance (One Way RM ANOVA) was used when more than two conditions were tested on the same cell. The P value was corrected with the Bonferroni t-test to allow multiple comparison versus a control group and were considered significant when $P < 0.05$. Student paired t-test was used to compare the effect of one drug versus its own control when experiments were performed on the same cell. The number of preparations are indicated by "N" and the number of NMJs by "n".

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1: *Presence and action of glutamate at the amphibian NMJ.* *a)* False color confocal images of glutamate labeling (glut, *green*) and of the PNA-lectin (*red*). The two images acquired simultaneously are superimposed (*merge*) to illustrate their relative distribution. Glutamate labeling is located within the region of PNA staining, suggesting that it is localized at the NMJ. Note that muscle fibers are not labeled. Scale bar: 20 μ m. *b)* Magnification of a section of the staining corresponding to glutamate antibody (*red square in a*) showing a punctated staining along processes (*arrow heads*) and an ellipsoidal labeling that corresponds to a PSC soma. This suggests that glutamate is accumulated in PSCs. Scale bar: 10 μ m. *c)* Amplitude of EPPs evoked at 0.2Hz before, during and after brief bath application of glutamate (20 μ M, 5min). Note a fast (before t=10min) and a delayed (around t=40min) reduction of EPP amplitude that persisted after glutamate removal. Inset: EPP in control and after glutamate application (40min). *d)* Randomly selected recordings of MEPPs before, at 10min and at 40min after brief bath application of glutamate (20 μ M, 5min). Note the reduction in MEPP frequency. *e)* Ca²⁺ responses elicited in the nerve terminal by single action potential and detected using the line scan mode of the confocal in control (*black*) and 35 min following glutamate application (*red*). Note that neither the amplitude nor the duration (measured at 20% and 50%) were affected by glutamate. *f)* EPP amplitude before, during and after glutamate application in the presence of the non-NMDA receptor antagonist CNQX (25 μ M). Note that the early phase of glutamate effect was abolished. *g)* EPP amplitude before, during and after glutamate application in the

presence of the non-selective group I/II mGluR antagonist MCPG (500 μ M). Note that both, the early and the delayed phase of glutamate effects were abolished in the presence of MCPG. *h*) Histogram illustrating the mean \pm SEM of the effects of CNQX and MCPG on the amplitude of EPP evoked at 0.2Hz.

Figure 2: *Endogenous glutamate depresses transmitter release through mGluR receptors.* *a*) Amplitude of EPPs (% of control) evoked by nerve stimulation at 0.2Hz (control), during (*bar*) and after high frequency nerve stimulation (10Hz, 90s) in absence (*black trace*) and in the presence (*gray trace*) of CNQX (25 μ M) and MCPG (500 μ M). Note that synaptic depression was less pronounced in the presence of CNQX and MCPG. *b*) Amplitude of EPPs (% of control) evoked by nerve stimulation at 0.2Hz (control), during (*bar*) and after high frequency nerve stimulation (10Hz, 90s) in absence (*black trace*) and in the presence of MCPG (500 μ M, *gray trace*). Note that synaptic depression was less pronounced in the presence of MCPG alone. *c*) Amplitude of EPPs (% of control) evoked by nerve stimulation at 0.2Hz (control), during (*bar*) and after high frequency nerve stimulation (10Hz, 90s) in absence (*black trace*) and in the presence of CNQX (25 μ M, *gray trace*). Note that synaptic depression remained unchanged in the presence of CNQX alone. *d*) Histogram representing the percentage of synaptic depression obtained with different glutamatergic antagonists with their respective paired controls. Asterisks (*) indicate that depression is significantly different as compared to control depression ($P < 0.05$; Student paired t-test).

Figure 3: Large glutamate concentrations are required to induce Ca^{2+} responses in PSCs. *a)* Percentage of PSCs responding to local application of 1mM (*gray*) and 10mM (*black*) of glutamate. Glutamate (500 μM) did not induce Ca^{2+} responses in PSCs. *b)* Histogram depicting the mean \pm SEM relative changes in fluorescence ($\% \Delta F/F$) elicited in PSCs by local application of 1mM (*gray*) and 10mM (*black*) of glutamate. *c)* Ca^{2+} response in PSCs induced by local application of glutamate (1mM). *Inset:* false color images of a PSC loaded with the Ca^{2+} indicator fluo 3-AM in control (1) and at the peak of the Ca^{2+} response (2). *Blue* corresponds to low levels of Ca^{2+} and *yellow* to high levels.

Figure 4: The glutamate transporter GLAST is present and functional at the amphibian NMJ. *a)* False color confocal images of the labeling of the GLAST transporter (*red*) and of the PNA-lectin staining (*green*). Images were acquired simultaneously and superimposed (*merge*) to determine their relative distribution at the NMJ. Note that GLAST transporter labeling is surrounded by PNA staining (*merge*) suggesting that GLAST is present at the NMJ. *b)* False color confocal images of the labeling of GLAST transporter (*red*) and of the PSC revealed with 2A12 antibody (*green*). Note that the two labeling patterns are similar and a large proportion of yellow pixels was observed as a result of the superposition of the two images indicating that the GLAST and the 2A12 staining are co-localized. This pattern of labeling (somata and processes) suggest that the GLAST transporter is located on PSCs at the NMJ. *c)* Side view of a NMJ labeled with 2A12 antibody (*green*) and for the GLAST transporter (*red*). Note in the merge picture that the

GLAST labeling is located below the 2A12 staining (lack of yellow pixels) suggesting the presence of GLAST in the presynaptic nerve terminal. Scale bars: 20 μ m. *d*) Amplitude of the EPPs evoked by nerve stimulation at 0.2Hz before and during bath perfusion of the non-specific glutamate transporter inhibitor THA (300 μ M). Note the reduction of EPP amplitude induced by THA. *e*) Amplitude of EPPs (% of control) evoked by nerve stimulation at 0.2Hz (control), during (*bar*) and after high frequency nerve stimulation (10Hz, 90s) in absence (*black trace*) and in the presence of THA (300 μ M, *gray trace*). Note that synaptic depression was more pronounced in the presence of THA. *f*) Histogram representing the percentage of synaptic depression obtained in the presence of THA and in 1.6mM Ca²⁺ with their respective paired controls. Asterisk (*) indicate that depression is significantly different as compared to control depression (P<0.05; Student paired t-test).

Figure 1

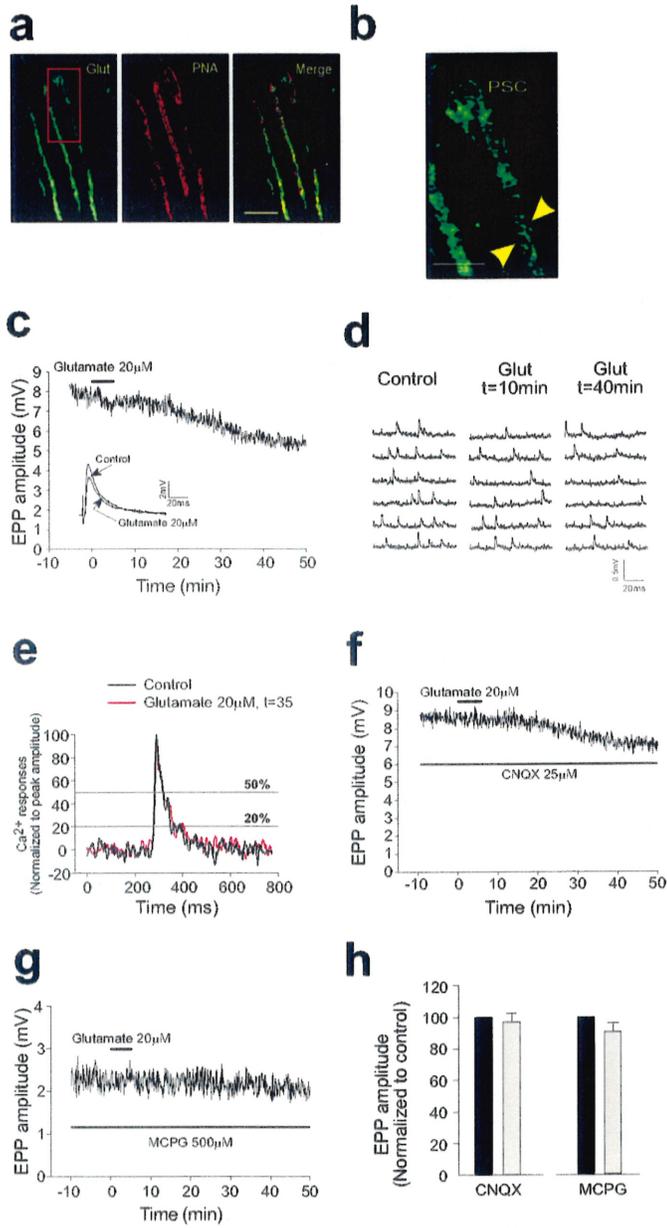


Figure 2

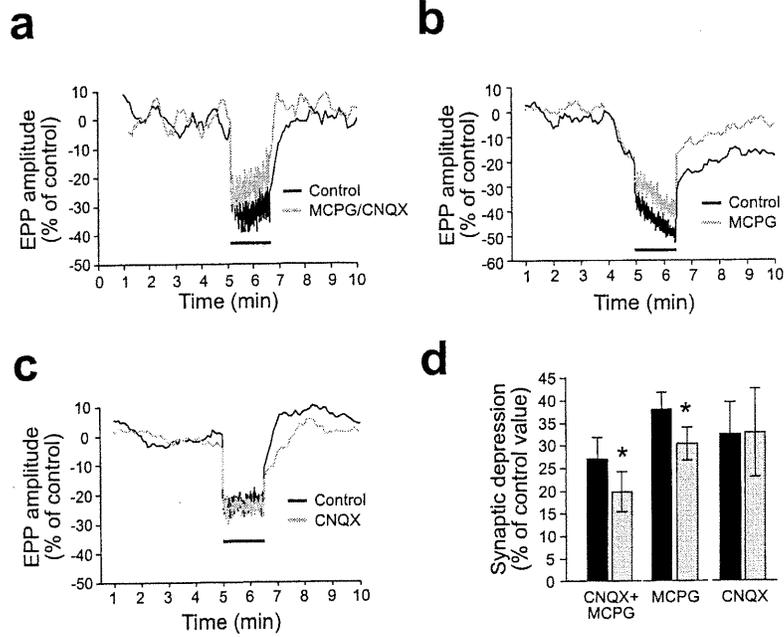


Figure 3

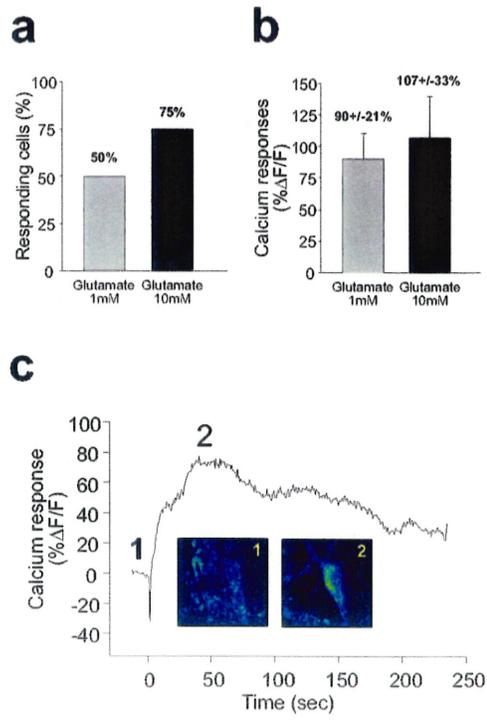
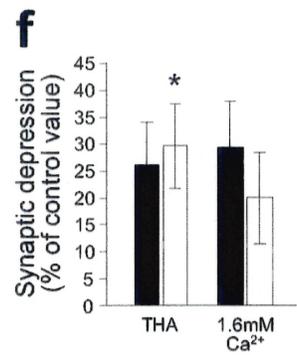
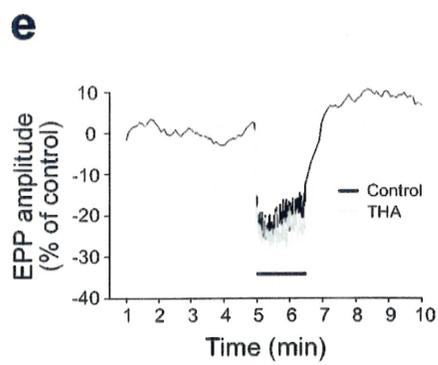
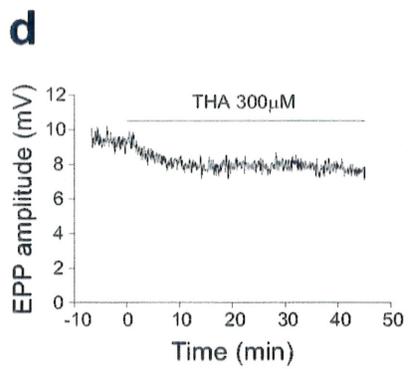
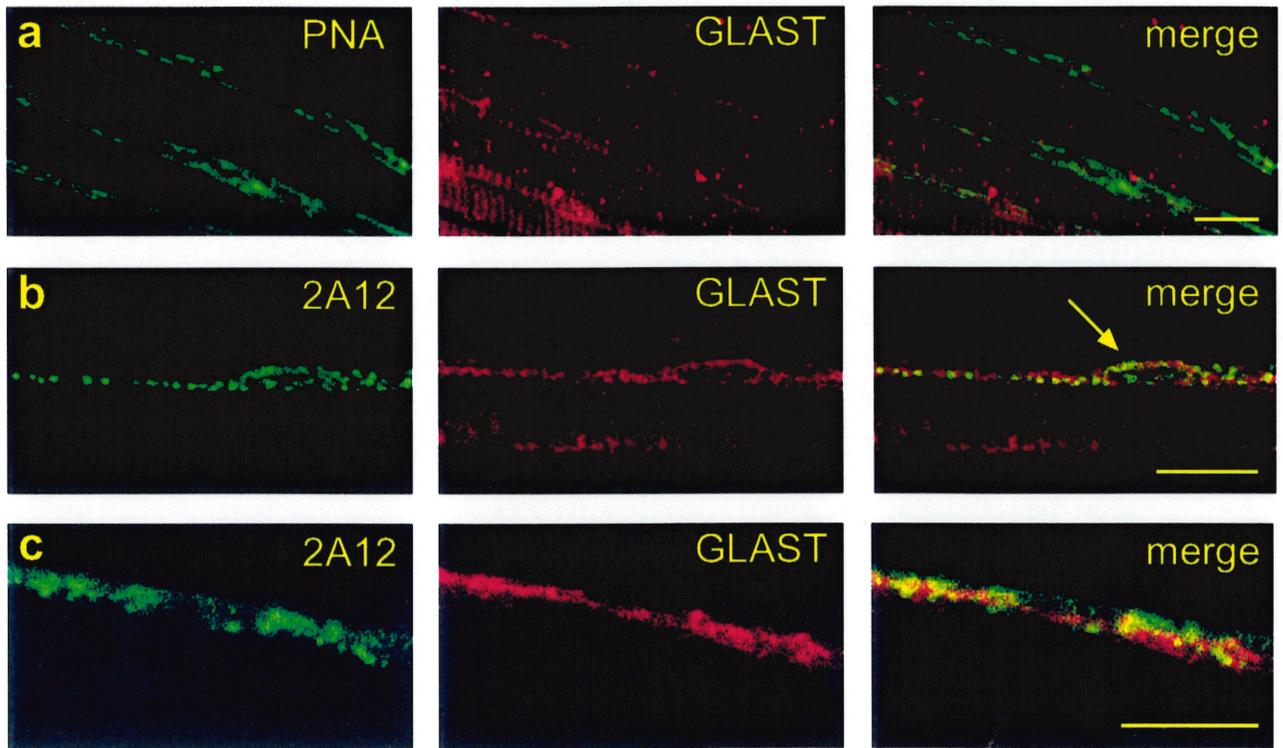


Figure 4



ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research of Canada (CIHR; Grant MT 14137) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et de l'Aide à la Recherche (FCAR; Team Grant 00ER2119) and by awards from the EJLB Research Foundation and The Alfred P. Sloan Foundation to R.R. S.L. was supported initially by a studentship from FCAR research group (FCAR-GRSNC) and is supported now by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ)-FCAR studentship. R.R. was a FRSQ Junior II Scholar and CIHR Investigator. We thank Daniel Auld for reading various versions of this manuscript and for helpful discussion. We also thank Chien-Ping Ko (University of Southern California, USA) for kindly providing the 2A12 antibody.

REFERENCE LIST

1. Matteoli, M. *et al.* Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 7366-7370 (1988).
2. Matteoli, M., Haimann, C. & De Camilli, P. Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* **37**, 271-275 (1990).
3. Fatt, P.K.B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol (Lond)* **117**, 109-128 (1952).
4. Berger, U.V., Carter, R.E. & Coyle, J.T. The immunocytochemical localization of N-acetylaspartyl glutamate, its hydrolysing enzyme NAALADase, and the NMDAR-1 receptor at a vertebrate neuromuscular junction. *Neuroscience* **64**, 847-850 (1995).
5. Grozdanovic, Z. & Gossrau, R. Co-localization of nitric oxide synthase I (NOS I) and NMDA receptor subunit 1 (NMDAR-1) at the neuromuscular junction in rat and mouse skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* **291**, 57-63 (1998).
6. Waerhaug, O. & Ottersen, O.P. Demonstration of glutamate-like immunoreactivity at rat neuromuscular junctions by quantitative electron microscopic immunocytochemistry. *Anat. Embryol. (Berl)* **188**, 501-513 (1993).

7. Docherty,M., Bradford,H.F. & Wu,J.Y. Co-release of glutamate and aspartate from cholinergic and GABAergic synaptosomes. *Nature* **330**, 64-66 (1987).
8. Vyas,S. & Bradford,H.F. Co-release of acetylcholine, glutamate and taurine from synaptosomes of Torpedo electric organ. *Neurosci. Lett.* **82**, 58-64 (1987).
9. Liou,H.C., Yang,R.S. & Fu,W.M. Potentiation of spontaneous acetylcholine release from motor nerve terminals by glutamate in *Xenopus* tadpoles. *Neuroscience* **75**, 325-331 (1996).
10. Fu,W.M., Liou,J.C., Lee,Y.H. & Liou,H.C. Potentiation of neurotransmitter release by activation of presynaptic glutamate receptors at developing neuromuscular synapses of *Xenopus*. *J. Physiol* **489 (Pt 3)**, 813-823 (1995).
11. Grozdanovic,Z. & Gossrau,R. Nitric oxide NMDA signalling in neuromuscular transmission: a missing link in motor end plate diversity and modulation [letter]. *Histochem. J.* **29**, 267-269 (1997).
12. Hepler,J.R. *et al.* Characterization of antisera to glutamate and aspartate. *J. Histochem. Cytochem.* **36**, 13-22 (1988).
13. Astrow,S.H., Qiang,H. & Ko,C.P. Perisynaptic Schwann cells at neuromuscular junctions revealed by a novel monoclonal antibody. *J. Neurocytol.* **27**, 667-681 (1998).

14. Descarries,L.M., Cai,S., Robitaille,R., Josephson,E.M. & Morest,D.K. Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J. Neurocytol.* **27**, 829-840 (1998).
15. Robitaille,R., Bourque,M.J. & Vandaele,S. Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **16**, 148-158 (1996).
16. Robitaille,R. Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* **21**, 847-855 (1998).
17. Storck,T., Schulte,S., Hofmann,K. & Stoffel,W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 10955-10959 (1992).
18. Bender,A.S., Woodbury,D.M. & White,H.S. Beta-DL-methylene-aspartate, an inhibitor of aspartate aminotransferase, potently inhibits L-glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem. Res.* **14**, 641-646 (1989).
19. Zucker,R.S. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 13-31 (1989).
20. Jahromi,B.S., Robitaille,R. & Charlton,M.P. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* **8**, 1069-1077 (1992).

21. Robitaille,R. Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **15**, 7121-7131 (1995).
22. Rochon,D., Rousse,I. & Robitaille,R. Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **21**, 3819-3829 (2001).
23. Castonguay,A. & Robitaille,R. Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. *J. Neurosci.* **21**, 1911-1922 (2001).
24. Verdoorn,T.A. & Dingledine,R. Excitatory amino acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes: agonist pharmacology. *Mol. Pharmacol.* **34**, 298-307 (1988).
25. Patneau,D.K. & Mayer,M.L. Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J. Neurosci.* **10**, 2385-2399 (1990).
26. Conn,P.J. & Pin,J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 205-237 (1997).
27. Anderson,C.M. & Swanson,R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* **32**, 1-14 (2000).
28. Cartmell,J. & Schoepp,D.D. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* **75**, 889-907 (2000).

29. Thomas,S. & Robitaille,R. Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J. Neurosci.* **21**, 1087-1095 (2001).
30. Ko,C.P. A lectin, peanut agglutinin, as a probe for the extracellular matrix in living neuromuscular junctions. *J. Neurocytol.* **16**, 567-576 (1987).
31. Suarez,I., Bodega,G. & Fernandez,B. Modulation of glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the rat cerebellum following portocaval anastomosis. *Brain Res.* **859**, 293-302 (2000).
32. Georgiou,J., Robitaille,R., Trimble,W.S. & Charlton,M.P. Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* **12**, 443-455 (1994).
33. Robitaille,R., Jahromi,B.S. & Charlton,M.P. Muscarinic Ca^{2+} responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J. Physiol (Lond)* **504 (Pt 2)**, 337-347 (1997).

Chapitre troisième

DISCUSSION GÉNÉRALE

Il est reconnu qu'il existe deux types de JNMs dans le règne animal caractérisées par les neurotransmetteurs impliqués dans la transmission synaptique. En effet, il est admis que chez les invertébrés, les JNMs sont de types glutamatergiques (Villegas, 1981; Parnas et al., 1996; DiAntonio et al., 1999) tandis que chez les vertébrés, elles sont plutôt cholinergiques (Fatt and Katz, 1952). Par contre, des données surprenantes sont récemment venues ébranler le dogme stipulant que les JNMs de vertébrés soient des synapses purement cholinergiques. En effet, il a été observé que le glutamate est présent à la JNM (Waerhaug and Ottersen, 1993) et que certaines sous-unités de récepteurs glutamatergiques (NMDAR-1) sont aussi retrouvées au niveau de la plaque motrice chez le rat (Berger et al., 1995a; Grozdanovic and Gossrau, 1998). De plus, des études réalisées en co-cultures nerf-muscle et chez le têtard démontrent que l'application de glutamate exogène module la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse (Fu et al., 1995; Liou et al., 1996). Bien que l'ensemble de ces études démontre que certaines composantes d'un système glutamatergique sont présentes à la JNM, il n'a jamais été démontré que le glutamate endogène ainsi qu'une machinerie glutamatergique fonctionnelle puissent avoir un effet sur la transmission synaptique au niveau d'une synapse cholinergique telle la JNM d'amphibien.

Dans l'étude réalisée dans le cadre de ce mémoire, nous avons démontré que non seulement le glutamate est accumulé dans les CSPs à JNM d'amphibien mais aussi qu'une machinerie glutamatergique fonctionnelle est présente. De plus, le glutamate endogène module la transmission synaptique via des mécanismes

fréquence-dépendants. Par conséquent, l'ensemble de nos résultats suggèrent que du glutamate est libéré à la JNM et que celui-ci contribue à l'efficacité et à la plasticité synaptique en fonction de l'état d'activité de la synapse. Au cours de ce chapitre, nous allons discuter des résultats obtenus pour ensuite dresser un modèle d'interactions glutamatergiques où le glutamate serait un messenger glial responsable de la modulation des interactions CSPs-synapse à la JNM d'amphibien.

3.1 Le glutamate à la JNM adulte: vestige de l'évolution et du développement?

Il a été proposé que les interactions glutamatergiques à la JNM de vertébrés seraient impliquées durant le développement et lors de la régénération des JNMs (Fu et al., 1995; Berger et al., 1995b; Liou et al., 1996; Grozdanovic and Gossrau, 1998). En effet, il est reconnu que l'activité synaptique est très importante lors du développement des synapses (Thompson, 1985; Hall and Sanes, 1993) et par le fait même, il se pourrait que le glutamate, en temps qu'acide aminé excitateur, soit impliqué dans ce phénomène. Dans cette perspective, il a été démontré que l'application de glutamate exogène sur des JNMs immatures (co-cultures nerf-muscle et chez le têtard) potentialise la libération d'ACh par la terminaison nerveuse (Fu et al., 1995; Liou et al., 1996) et que cet effet disparaît avec la maturation de la préparation (Liou et al., 1996). De ces derniers résultats, la question suivante peut être posée:

Est-ce que la présence de composantes d'un système glutamatergique retrouvée au niveau d'une JNM cholinergique mature serait tout simplement des traces vestigiales découlant de l'évolution et du développement?

À la lumière de nos résultats, il semblerait que non, car nous avons démontré que le glutamate endogène est libéré et participe activement à la modulation de l'activité synaptique à la JNM mature. De plus, lorsque nous bloquons des récepteurs ainsi que des transporteurs glutamatergiques, nous venons modifier le transfert de l'information synaptique suggérant que les systèmes glutamatergiques retrouvés à la JNM d'amphibien adulte sont pleinement fonctionnels et sont activement impliqués dans la modulation de l'activité synaptique. Nous pouvons ainsi exclure la possibilité que des composantes d'un système glutamatergique purement vestigiales se retrouvent à la JNM d'amphibien.

3.2 Est-ce que le glutamate est impliqué dans la maturité de la JNM?

Étant donné que nos résultats suggèrent que les composantes glutamatergiques retrouvées à la JNM adulte ne sont pas vestigiales, il se pourrait qu'elles soient plutôt impliquées lors de la maturation des JNMs et que le glutamate servirait à moduler l'activité synaptique, facteur important lors de l'établissement des synapses. Dans cette optique, il a été démontré que le glutamate a un effet potentialisateur sur la libération d'ACh (Fu et al., 1995; Liou et al., 1996). Par contre, nos résultats démontrent que le glutamate réduit la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse. La différence principale entre leur préparation (co-cultures nerf-muscle et JNM de têtards) et la nôtre (JNM de grenouilles adultes) est le stade de développement. En effet, il semble qu'il y aurait un changement dans l'effet glutamatergique au cours de la maturation de la JNM

passant d'un effet potentialisateur à la JNM immature à un effet dépresseur à la JNM adulte. Un tel changement dans le rôle du glutamate est d'autant plus plausible car il a été démontré que l'effet potentialisateur du glutamate disparaît au fur et à mesure que les têtards se développent (Liou et al., 1996).

Comment peut-on expliquer ce changement dans l'effet du glutamate en fonction de la maturation de la JNM? Il a été démontré que l'effet potentialisateur du glutamate retrouvé sur les JNMs immatures dépendrait de l'activation de récepteurs NMDA, kainate et AMPA (Fu et al., 1995; Liou et al., 1996). En ce qui concerne les récepteurs NMDA, nos résultats démontrent que l'effet dépresseur du glutamate exogène ne serait pas causé par l'activation de cette classe de récepteurs dû au fait que l'AP5 ne bloque pas l'effet du glutamate exogène. Ainsi, durant les processus de maturation de la JNM, il se pourrait que l'expression des récepteurs NMDA (potentialisent la libération d'ACh) survient avant l'expression des mGluRs (réduisent la libération d'ACh). Par conséquent, dans les études de Fu et al. (1995) et de Liou et al. (1996) sur des JNMs immatures, il se pourrait que les récepteurs mGluRs ne soient pas encore exprimés au stade de développement de leur préparation. Par contre, au niveau d'une JNM adulte, les récepteurs mGluRs seraient présents et leur activation viendrait masquer l'effet potentialisateur NMDA-dépendant observé chez les JNMs immatures. Inversement, il se pourrait aussi que des récepteurs NMDA fonctionnels ne soient tout simplement plus exprimés à la JNM adulte. En effet, les seules évidences de la présence de récepteurs NMDA chez l'adulte (Berger et al., 1995a) sont des évidences de sous-

unités de récepteurs NMDA (NMDAR-1). Ainsi, bien que présente, il se pourrait que l'expression de la sous-unité NMDAR-1 seule n'ait aucun effet physiologique à la JNM d'amphibien. De plus, dans les expériences réalisées sur des JNMs immatures, l'implication des CSPs dans les phénomènes synaptiques (dû à leur niveau de maturité) pourrait différer de celle observée sur les JNMs adultes et par conséquent, l'effet glutamatergique que nous observons à la JNM adulte dépendrait du fonctionnement optimal des CSPs, condition obtenue à maturité. Cette dernière hypothèse est d'autant plus attrayante car nos résultats démontrent que le glutamate est accumulé dans les CSPs.

3.3 Est-ce que le glutamate est un transmetteur ou un modulateur de l'activité synaptique?

Les travaux de Fatt et Katz (1951, 1952) ont démontré que la JNM de vertébrés est une synapse cholinergique et par conséquent, c'est l'ACh qui est le neurotransmetteur responsable des interactions entre la terminaison nerveuse et la fibre musculaire. Par contre, du fait que des composantes d'un système glutamatergique sont présentes à la JNM (Waerhaug and Ottersen, 1993; Berger et al., 1995a; Grozdanovic and Gossrau, 1998), et qu'il a été démontré que du glutamate pouvait être libéré par des synaptosomes provenant de l'organe électrique de *Torpille* (Vyas and Bradford, 1987), certains ont été jusqu'à proposer que le glutamate serait, tout comme l'ACh, un neurotransmetteur responsable des interactions pré- à postsynaptiques (Vyas and Bradford, 1987; Grozdanovic and Gossrau, 1997). Par contre, tel ne semble pas être le cas.

Nos résultats démontrent que le glutamate endogène n'a pas d'effet sur la transmission synaptique à basse fréquence car les antagonistes glutamatergiques (CNQX, MCPG) qui ont bloqué l'effet de glutamate exogène n'ont pas modifié la transmission synaptique lorsqu'ils étaient perfusés (sans glutamate) sur la préparation. Ainsi, si le glutamate endogène était un neurotransmetteur responsable des interactions entre la terminaison nerveuse et les fibres musculaires, l'ajout de ces antagonistes aurait forcément dû avoir un effet sur la transmission synaptique. De plus, nos résultats suggèrent que le glutamate n'active pas non plus les CSPs. En effet, nous avons montré que le glutamate, dans un spectre de concentration qui réduit la transmission synaptique, n'est pas capable d'induire d'augmentation calcique dans les CSPs. Seulement de fortes concentrations de glutamate induisent de faibles augmentations de Ca^{2+} indiquant que la sensibilité des CSPs pour le glutamate est très faible. Contrairement au glutamate, les CSPs sont extrêmement sensibles aux neurotransmetteurs impliqués dans la transmission synaptique. En effet, l'application de faibles concentrations (nM) d'ACh et d'ATP (principaux neurotransmetteurs la JNM) sur les CSPs induit, dans une très grande proportion (>95%), de fortes réponses calciques dans ces dernières (>150% $\Delta F/F$) (Jahromi et al., 1992). Ainsi, il serait peu probable que le glutamate soit le messenger synaptique (neurotransmetteur) responsable des augmentations de Ca^{2+} dans les CSPs. Par contre, on ne peut pas exclure totalement l'idée que l'effet du glutamate sur les CSPs passe via des cascades de signalisation Ca^{2+} -indépendante.

Appuyé par l'étude de Fatt et Katz (1952) démontrant que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs cholinergiques, tel la d-tubocurarine, bloque les réponses postsynaptiques suivant la stimulation du nerf moteur, nos résultats suggèrent donc que le glutamate ne serait pas impliqué directement dans le transfert de l'information synaptique (terminaison nerveuse vers fibre musculaire et/ou CSPs) et par le fait même, qu'il ne serait pas un activateur des événements synaptiques. Ainsi, le glutamate devrait être perçu comme un agent neuromodulateur de l'activité synaptique à la JNM.

3.4 Hypothèses sur les interactions glutamatergiques à la JNM d'amphibien.

Dans le but de déterminer les mécanismes d'action du glutamate à la JNM, plusieurs hypothèses peuvent être postulées en fonction des sources du glutamate (terminaison nerveuse et/ou PSCs) ainsi que des cibles (terminaison nerveuse, fibre musculaire, glie). Dans les prochaines sections je vais traiter des différentes possibilités en fonction de nos résultats.

3.4.1 Origines potentielles de la libération de glutamate à la JNM

Nos résultats démontrent que le glutamate serait préférentiellement localisé dans les CSPs à la JNM d'amphibien. Par contre, les techniques de marquage que nous avons utilisées ne nous permettent pas d'exclure la possibilité que le glutamate se retrouve aussi dans la terminaison nerveuse tel qu'il a été proposé par Waerhaug et Ottersen (1993) à la JNM de rat. En effet, dans cette dernière étude réalisée en microscopie électronique et en utilisant des particules d'or colloïdales

comme marqueur, il a été observé que le glutamate est localisé dans deux compartiments cellulaires à la JNM. Ainsi, après quantification, ils ont démontré que le glutamate était préférentiellement accumulé dans les CSPs ainsi que dans la terminaison nerveuse, bien que moins abondant dans cette dernière. À la lumière de ces résultats, deux hypothèses s'imposent quant à la provenance du glutamate.

Hypothèse 1 (figure 6a)

Le glutamate est libéré par la terminaison nerveuse.

Hypothèse 2 (figure 6b)

Le glutamate est libéré par les CSPs suivant leur activation préalable par un neurotransmetteur, tel l'ACh et l'ATP, libérés par la terminaison nerveuse.

Il est important de noter que ces deux hypothèses ne sont pas exclusives et que les deux scénarios peuvent être présents simultanément à la JNM.

Figure 6

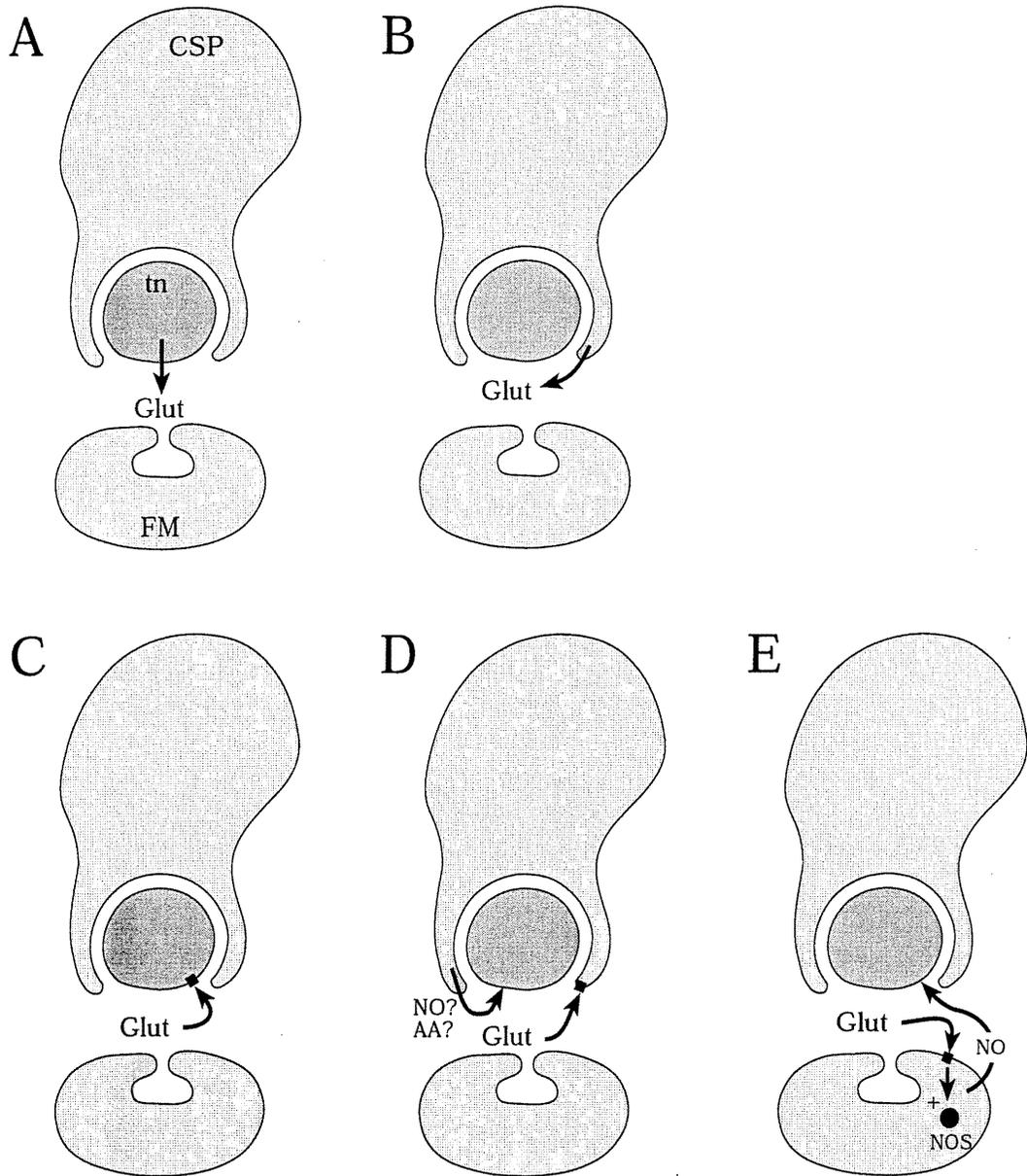


Figure 6

Schématisation des hypothèses concernant les sources de libération de glutamate (A,B) ainsi que de ses cibles (C-E). Le glutamate serait libéré dans la fente synaptique par la terminaison nerveuse (A) ou par les CSPs (B). Le glutamate ainsi libéré pourrait agir sur des récepteurs glutamatergiques présynaptiques (C), gliaux (D) ou postsynaptiques (E). Dans cette dernière hypothèse (E), les récepteurs glutamatergiques seraient co-localisés avec une NO synthase sur les fibres musculaires et leur activation par le glutamate résulterait en la production d'un messager rétrograde diffusible qu'est le NO. C'est ce dernier qui aurait un effet sur la terminaison présynaptique et qui serait responsable de la diminution de la libération de neurotransmetteurs.

3.4.1.1 Est-ce que le glutamate est libéré par la terminaison nerveuse?

Étant donné sa présence dans la terminaison nerveuse, il a été proposé que le glutamate pourrait être co-localisé et co-libéré avec l'ACh par la terminaison nerveuse (Waerhaug and Ottersen, 1993). À l'appui de cette hypothèse, il a été démontré que l'application de K^+ induit la libération de glutamate par des synaptosomes cholinergiques provenant du cortex cérébral (Docherty et al., 1987) et de l'organe électrique de *Torpille* (Vyas and Bradford, 1987). Suite à ces résultats, les auteurs ont suggéré que le glutamate pourrait être un neurotransmetteur libéré par la terminaison nerveuse et en plus, serait responsable des interactions pré- à postsynaptiques à la JNM (Docherty et al., 1987; Vyas and Bradford, 1987). Si tel était le cas, il faudrait que le glutamate soit libéré dans la fente synaptique selon les caractéristiques d'une libération de type vésiculaire et que cet acide aminé exciteur soit aussi co-localisé et co-libéré avec l'ACh dans les vésicules synaptiques.

Nos résultats ne sont pas en accord avec cette hypothèse. Nous avons démontré que l'effet modulateur du glutamate sur la transmission synaptique est fréquence-dépendant. En effet, nos résultats démontrent que la perfusion d'antagonistes glutamatergiques seuls (CNQX et MCPG, sans l'application de glutamate) n'a pas d'effet sur les réponses synaptiques évoquées par des stimulations à 0.2Hz, alors que la dépression synaptique (10Hz) est réduite en présence de MCPG ce qui suggère un effet dépresseur du glutamate endogène dans ces conditions expérimentales. Ces derniers résultats ne sont pas en accord avec

l'hypothèse d'une libération de glutamate vésiculaire par la terminaison nerveuse. En effet, dû à la libération quantique des vésicules synaptiques, on aurait forcément observé un effet du glutamate endogène sur la transmission synaptique, même à 0.2Hz, si le glutamate était co-libéré avec l'ACh. De plus, bien que le glutamate se retrouve dans la terminaison nerveuse, les techniques de marquage utilisées dans l'étude de (Waerhaug and Ottersen, 1993) ne permettent pas de déterminer si le glutamate est compartimenté et co-localisé avec l'ACh dans des vésicules synaptiques ou s'il est simplement libre dans le cytoplasme.

Par contre, le glutamate pourrait être libéré par la terminaison nerveuse via d'autres mécanismes. En effet, il se pourrait que la concentration de glutamate soit faible comparativement à la concentration d'ACh dans les vésicules synaptiques. Ainsi, la libération de plusieurs vésicules serait requise pour avoir un effet glutamatergique sur la transmission synaptique et cette condition pourrait être obtenue lors de stimulations à haute fréquence. Cependant, il faut garder en tête qu'il n'a jamais été démontré que le glutamate était co-localisé avec l'ACh dans les vésicules synaptiques à la JNM. Une autre hypothèse serait que le glutamate est libéré via des mécanismes n'impliquant pas l'exocytose de vésicules synaptiques (Jabaudon et al., 1999) comme par exemple le reversement d'un transporteur glutamatergique (Szatkowski et al., 1990).

3.4.1.2 Est-ce que le glutamate est libéré par les CSPs?

Nos résultats ainsi que ceux de Waerhaug et Ottersen (1993) suggèrent que le glutamate est préférentiellement accumulé dans les CSPs à la JNM. De plus, il a été démontré que les cellules de Schwann en culture provenant des ganglions de la racine dorsale ont la capacité de libérer des acides aminés excitateurs dont le glutamate (Parpura et al., 1995a; Jeftinija and Jeftinija, 1998) tout comme les cellules gliales du SNC (Parpura et al., 1994; Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Araque et al., 1998a; Araque et al., 1998b; Araque et al., 1999a; Parpura and Haydon, 2000). Par conséquent, notre hypothèse numéro 2 (figure 6b) est que, suivant leur activation par la libération de neurotransmetteurs (ACh, ATP) par la terminaison nerveuse, les CSPs libèrent du glutamate. Cette hypothèse est d'autant plus attirante qu'il a été démontré que les CSPs modulent l'efficacité et la plasticité synaptique en fonction de la fréquence de stimulation de la terminaison nerveuse (Robitaille, 1998). Ainsi, cette modulation fréquence-dépendante engendrée par les CSPs est en accord avec l'effet du glutamate endogène qui, lui aussi, dépend de la fréquence de stimulation du nerf moteur. De plus, nous avons démontré la présence d'un système de recapture fonctionnel (transporteur GLAST) sur les CSPs ce qui vient aussi appuyer l'hypothèse que le glutamate pourrait être libéré par les cellules gliales à la JNM. En effet, la présence d'un tel transporteur permettrait aux CSPs de refaire leur réserve de glutamate minimisant ainsi l'apport énergétique nécessaire à sa synthèse.

3.4.2 Quelle est la machinerie glutamatergique impliquée dans les mécanismes glutamate-dépendants à la JNM?

Nos résultats démontrent que l'application de glutamate exogène réduit la transmission synaptique en diminuant la probabilité de libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse suite à l'activation de récepteurs non-NMDA et/ou mGluRs. De plus, nous avons démontré que les mécanismes intracellulaires régissant cet effet dépresseur ne résultent pas en une diminution dans l'entrée de Ca^{2+} ni par une réduction de la durée d'entrée du Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse.

3.4.2.1 Récepteurs non-NMDA

Nos résultats suggèrent la présence de récepteurs non-NMDA à la JNM dû au blocage partiel par le CNQX de l'effet du glutamate exogène sur la transmission synaptique. Par contre, le CNQX n'a aucun effet lors de dépression à haute fréquence suggérant que le glutamate endogène n'active pas les récepteurs non-NMDA. Ainsi, nos résultats suggèrent que les récepteurs non-NMDA sont présents à la JNM mais qu'ils ne sont pas fonctionnels en condition physiologique. Le fait que le CNQX bloque une des composantes de l'effet du glutamate exogène est possiblement dû aux concentrations de glutamate utilisées. En effet, ces dernières seraient beaucoup plus élevées que celles que l'on pourrait retrouver lorsque l'on stimule la terminaison nerveuse d'autant plus que nous n'avons aucune évidence fonctionnelle d'un effet non-NMDA-dépendant causé par le glutamate endogène.

3.4.2.2 Récepteurs métabotropiques glutamatergiques (mGluR)

L'utilisation d'un antagoniste non-spécifique des mGluRs des groupes I et II (MCPG) bloque complètement l'effet exogène du glutamate sur la transmission synaptique et module le niveau de dépression induite à haute fréquence (10Hz). Par ailleurs, nos résultats démontrent que l'effet du glutamate a une longue durée d'action (>60min), résultats en accord avec l'hypothèse que l'effet du glutamate serait médié via l'activation de récepteurs liés aux protéines G et à la production de messagers seconds.

Dans un deuxième temps, nous avons démontré que le glutamate réduit la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse via des mécanismes n'impliquant pas directement l'entrée ni la clairance du Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse. Par conséquent, ces résultats suggèrent que les mGluRs seraient probablement de groupe II. En effet, les mGluRs de groupe I sont principalement liés à l'activation d'une PLC (Aramori and Nakanishi, 1992; Conn and Pin, 1997) et l'activation de cette dernière résulte en la formation d' IP_3 ce qui augmenterait le Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse (Streb et al., 1983). Ainsi, si les récepteurs glutamatergiques sont localisés sur la terminaison nerveuse, la présence de mGluR du groupe I est peu probable. De plus, des résultats préliminaires d'immunohistochimie réalisés à l'aide d'anticorps dirigés contre les mGluRs de groupe II démontrent que ce dernier groupe serait présent à la JNM. Par contre, aucun marquage n'est présent lorsqu'on utilise des anticorps dirigés contre les mGluRs de groupe I (Lévesque, Vallée et Robitaille; résultats non-publié). Par

conséquent, ces résultats suggèrent fortement la présence des mGluRs de groupe II à la JNM.

Bien que nous n'observons pas de modification dans l'entrée de Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse lorsque l'on stimule le nerf moteur, une note de prudence doit cependant être soulevée. En effet, les techniques d'imageries utilisées ne permettent pas de détecter de faibles variations de Ca^{2+} locales dû à l'affinité et à la mobilité de l'indicateur calcique utilisé (Calcium-green dextran). Ainsi, nos résultats nous indiquent que le glutamate n'affecte pas le niveau de Ca^{2+} global dans la terminaison nerveuse suivant la stimulation du nerf moteur.

3.4.2.3 Récepteurs NMDA

Nos résultats suggèrent que les récepteurs NMDA ne seraient pas impliqués dans l'effet dépresseur causé par le glutamate exogène puisque l'AP5, un antagoniste des récepteurs NMDA, ne bloque pas son effet.

Cependant, les résultats obtenus avec les antagonistes des récepteurs NMDA sont particuliers. En effet, la perfusion d'AP5 seule (sans ajout de glutamate), devrait augmenter l'amplitude des PPM étant donné que le glutamate réduit la libération de neurotransmetteurs ou encore n'aurait aucun effet comme le CNQX et le MCPG. De façon surprenante, en présence d'AP5, nous observons une réduction dans l'amplitude des PPM mimant ainsi l'effet du glutamate (S.L et R.R., données non-publiées). Ces résultats sont surprenants car, bien que l'AP5

“n’antagonise” pas l’effet du glutamate exogène, il a un effet marqué sur la transmission synaptique. Bien que nous ayons utilisé quatre lots d’AP5 de différents fournisseurs, nous avons obtenu les mêmes résultats. Alors, comment peut-on expliquer qu’un antagoniste glutamatergique mime l’effet du glutamate sur la transmission synaptique sans toutefois bloquer l’effet du glutamate exogène?

Il se pourrait que les récepteurs NMDA aient un effet potentialisateur (Araque et al., 1998a; Araque et al., 1998b) contrairement aux récepteurs mGluRs qui auraient un effet dépresseur sur la transmission synaptique (Araque et al., 1998a). De plus, il a été démontré que l’activation de récepteur NMDA potentialise la libération d’ACh aux JNMs immatures (co-cultures nerf-muscle et chez le têtard) (Fu et al., 1995; Liou et al., 1996) et que le seuil d’activation des récepteurs NMDA est plus bas comparativement aux autres types de récepteurs glutamatergiques (Verdoorn and Dingledine, 1988; Patneau and Mayer, 1990). Ainsi, une plus faible concentration de glutamate pourrait induire l’activation des récepteurs NMDA ayant un effet potentialisateur sur la transmission synaptique mais sans activer les autres récepteurs glutamatergiques qui ont des seuils d’activation plus élevés. Par contre, lorsque les concentrations de glutamate augmenteraient dans la fente synaptique, l’activation des récepteurs mGluRs induirait un effet dépresseur marqué sur la transmission synaptique ce qui viendrait masquer l’effet potentialisateur causé par l’activation des récepteurs NMDA. Cependant, des concentrations de glutamate beaucoup plus faibles allant de 20nM à 500nM n’ont pas potentialisées la transmission synaptique (S.L et R.R.; données

non-publiées) suggérant que cette dernière hypothèse ne serait pas impliquée dans l'effet de l'AP5.

Une autre possibilité pouvant expliquer l'effet de l'AP5 sur la transmission synaptique serait le choix de l'antagoniste utilisé. Ainsi, pour exclure cette possibilité, nous avons utilisé le MK 801 qui a un mode d'action différent de l'AP5. En effet, le MK 801 est reconnu pour bloquer irréversiblement le pore du récepteur-canal lorsqu'il est à l'état ouvert. Par contre, bien que son mode d'action est différent, le MK 801 réduit toujours la transmission synaptique tout comme l'AP5 (S.L et R.R.; données non-publiées). Puisque le MK 801 est un bloqueur du canal NMDA à l'état ouvert, nous avons refait ces expériences en présence de fortes concentrations d'ions Mg^{2+} dans le but d'empêcher l'ouverture spontanée du canal. Même dans ces conditions, le MK 801 réduit toujours la transmission synaptique (S.L et R.R.; données non-publiées). Ainsi, même si la probabilité d'ouverture du canal est très faible, le MK 801 a toujours un effet dépresseur.

Il a été démontré que les réponses au quisqualate des neurones au niveau de la région CA1 de l'hippocampe peuvent être potentialisées en présence d'AP5 (Schulte et al., 1994). Ainsi, si un tel mécanisme était présent à la JNM, l'AP5 pourrait venir sensibiliser des récepteurs non-NMDA et ainsi, les faibles concentrations de glutamate libérées de façon endogène pourraient activer cette classe de récepteurs ce qui résulterait en une réduction de l'activité synaptique. Par contre, dans ce scénario, on aurait prédit un effet dépresseur du glutamate exogène

plus grand en présence d'AP5, ce qui n'était pas le cas. De plus, un tel mécanisme ne pourrait pas venir expliquer l'effet du MK 801 puisque son mode d'action et sa structure moléculaire diffèrent complètement de celui de l'AP5. Jusqu'à présent nous n'avons pas trouvé d'explication logique sur l'effet agonistique de l'AP5 et du MK 801 sur la transmission synaptique d'autant plus que l'AP5 ne bloque pas l'effet du glutamate exogène.

3.4.2.4 Un système de transporteur glutamatergique fonctionnel est présent la la JNM.

Pour avoir un système glutamatergique pleinement fonctionnel à la JNM, l'effet physiologique du glutamate libéré dans la fente synaptique devrait être arrêté, entre autre, par sa recapture via un système de transporteur (Iversen, 1975; Nicholls and Attwell, 1990). Nos résultats suggèrent qu'un transporteur glutamatergique (GLAST) serait localisé sur les CSPs et peut-être aussi sur la terminaison nerveuse. En plus d'être présent, le système de transporteur est pleinement fonctionnel. En effet, en présence de THA, un bloqueur non-spécifique des transporteurs glutamatergiques, on peut noter une diminution dans l'amplitude des PPM à basse fréquence et une augmentation du niveau de dépression synaptique induite à haute fréquence. Ces résultats suggèrent qu'en bloquant le transporteur, on augmente la concentration de glutamate dans la fente synaptique et on enregistre une diminution dans la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse. Ainsi, les systèmes de transporteurs retrouvés à la JNM servent à recapter le glutamate libéré dans la fente synaptique et serait responsable de la fin de son effet physiologique.

3.4.3 Cibles potentielles pour le glutamate libéré dans la fente synaptique

La JNM est composée de trois types cellulaires (terminaison nerveuse, fibre musculaire et CSPs) et nos résultats peuvent être expliqués selon l'activation de chacune d'entre elle. Par conséquent, trois hypothèses concernant la cible du glutamate s'imposent. Ainsi, le glutamate pourrait agir sur :

Hypothèse 1 (figure 6c)

Des récepteurs glutamatergiques présynaptiques

Hypothèse 2 (figure 6d)

Des récepteurs glutamatergiques gliaux

Hypothèse 3 (figure 6e)

Des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques

Tout comme pour le site de libération du glutamate, notons que ces trois dernières hypothèses ne sont pas exclusives et que le glutamate pourrait agir sur plusieurs cibles simultanément.

3.4.3.1 Hypothèse des récepteurs glutamatergiques présynaptiques

Nos résultats démontrent que le glutamate réduit la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse via l'activation de récepteurs mGluRs. Par conséquent, la terminaison nerveuse serait une bonne cible potentielle pour le glutamate en exprimant des récepteurs glutamatergiques d'autant plus que les mGluRs sont souvent présynaptiques (Cartmell and Schoepp, 2000) (figure 6c).

Si les récepteurs mGluRs sont localisés sur la terminaison nerveuse, il faut nécessairement que les mécanismes résultant en la diminution de la libération de neurotransmetteurs soient Ca^{2+} -indépendants. En effet, tout en considérant les limites des techniques utilisées, nous n'avons pas observé de modification dans l'entrée ni dans la clairance du Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse lorsque l'on stimule le nerf moteur en présence de glutamate. Des mécanismes Ca^{2+} -indépendants ont récemment été observés au niveau d'une synapse sérotonergique entre la voie réticulospinale et les motoneurones de la lamproie. En effet, il a été proposé que l'activation de récepteurs métabotropiques sérotonergiques stimulerait la sous-unité $\beta\gamma$ d'une protéine G réduisant ainsi la libération de neurotransmetteurs via des mécanismes survenant après l'entrée de Ca^{2+} dans la terminaison présynaptique. Ces mécanismes agiraient directement sur la machinerie nécessaire à la fusion des vésicules synaptiques permettant l'exocytose (Blackmer et al., 2001). De plus, la sous-unité $\beta\gamma$ peut se lier à la syntaxin (Jarvis et al., 2000), le SNAP-25 et le complexe protéique SNARE (syntaxin, SNAP-25 et VAMP) (Blackmer et al., 2001) suggérant que l'activation de récepteurs métabotropiques peut réduire la libération de neurotransmetteurs sans interférer directement avec les mécanismes calciques.

3.4.3.2. Hypothèse des récepteurs glutamatergiques gliaux

Les CSPs seraient une cible potentielle pour la localisation des récepteurs glutamatergiques (figure 6d) et l'activation des CSPs par le glutamate pourrait résulter en la libération de messagers gliaux qui eux, réduiraient la libération de

neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse. Les candidats potentiels seraient le monoxyde d'azote (NO) (Descarries et al., 1998; Thomas and Robitaille, 2001) et l'acide arachidonique (communication personnelle; Pappas et Robitaille) car il a été démontré que ces deux molécules réduisent la libération de neurotransmetteurs et que leurs enzymes de synthèse se retrouvent aussi dans les CSPs.

Par contre, nos résultats démontrent que l'habilité des CSPs à répondre au glutamate est très faible car de fortes concentrations de glutamate, (>1mM) sont nécessaires pour induire des réponses calciques gliales de faible amplitude. Ceci suggère que le glutamate, à des concentrations qui réduisent la transmission synaptique, ne serait probablement pas capable d'induire des réponses calciques dans les CSPs. Par conséquent, il est peu probable que les récepteurs glutamatergiques causant la réduction dans la libération de neurotransmetteurs soient localisés sur les CSPs. Par contre, tel que mentionné précédemment, on ne peut pas exclure totalement l'idée que l'effet du glutamate sur les CSPs passe via des cascades de signalisations Ca^{2+} -indépendantes. En effet, il a déjà été montré que des neuromodulateurs tel la substance P, modulent l'activation de récepteurs gliaux sans nécessiter une augmentation de Ca^{2+} dans les CSPs (Bourque and Robitaille, 1998) suggérant que la présence de Ca^{2+} n'est pas un indicateur absolu de l'activité des CSPs.

3.4.3.3 Hypothèse des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques

Malgré que l'effet final du glutamate soit présynaptique, il est plausible que les récepteurs glutamatergiques soient localisés sur les fibres musculaires (figure 6e). En effet, les récepteurs mGluRs peuvent aussi se retrouver sur l'élément postsynaptique (Cartmell and Schoepp, 2000). De plus, des résultats préliminaires d'immunohistochimie suggèrent que les mGluRs à la JNM se retrouveraient, entre autre, au niveau des fibres musculaires (Lévesque, Vallée et Robitaille; résultats non-publiés). Par conséquent, si les récepteurs glutamatergiques sont postsynaptiques, il est nécessaire qu'un second messager rétrograde, libéré par les fibres musculaires, vienne interagir avec la terminaison nerveuse pour réduire la libération de neurotransmetteurs. À l'appui d'une telle hypothèse, il a été démontré que les fibres musculaires peuvent libérer des molécules tel le monoxide d'azote (NO) (Wang et al., 1995) et l'acide arachidonique (Harish and Poo, 1992).

L'hypothèse que le NO pourrait être un messager rétrograde libéré par les fibres musculaires est particulièrement intéressante car il a été démontré que le NO réduit la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse (Lindgren and Laird, 1994) ainsi que la dépression synaptique via des mécanismes n'impliquant pas le Ca^{2+} présynaptique (Thomas and Robitaille, 2001), tout comme le glutamate. Fait intéressant, des résultats préliminaires démontrent que l'hémoglobine, un chélateur de NO, masque l'effet de l'application de glutamate exogène (20 μ M, 5min; communication personnelle: Pinard et Robitaille) suggérant que l'effet glutamatergique pourrait impliquer la production endogène de NO. De

plus, il a été démontré qu'une NO synthase est présente sur les fibres musculaires (Grozdanovic and Gossrau, 1997) et il est intéressant de noter que l'activation de récepteurs mGluRs de la région CA3 de l'hippocampe de rat stimule la production de NO (Bhardwaj et al., 1997). Ainsi, l'activation des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques pourrait induire la production de molécules diffusibles, tel le NO. Par conséquent, il faut considérer cette voie de signalisation dans les effets dépresseurs du glutamate sur la transmission synaptique.

3.5 Modèle préconisé des interactions glutamatergiques à la JNM d'amphibien

Basé sur nos résultats, nous avons élaboré un modèle (figure 7) sur lequel seront fondées les prochaines expériences. Le modèle que nous proposons va nous permettre de tester la source, la cible ainsi que les mécanismes impliqués dans les interactions glutamatergiques à la JNM d'amphibien. Dans ce modèle nous préconisons une libération de glutamate par les CSPs qui activera des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques.

3.5.1 Le glutamate est un bon candidat comme messenger glial responsable des interactions CSP-synapse à la JNM.

Il a été démontré que les CSPs modulent l'activité synaptique à la JNM (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001). Par contre, les messagers gliaux responsables de ces interactions CSP-synapse restent jusqu'à ce jour inconnus. Ainsi, dans notre modèle, nous proposons que le glutamate serait libéré par les CSPs et, par conséquent, serait un des messagers d'origine gliale responsable

de l'effet modulateur attribué aux CSPs sur la transmission synaptique. Cette proposition est basée sur les faits suivants :

1. Le glutamate est principalement accumulé dans les CSPs;
2. Des évidences suggèrent que les cellules de Schwann en culture provenant des ganglions de la racine dorsale peuvent libérer du glutamate (Papura et al., 1995a; Jeftinija and Jeftinija, 1998);
3. L'activation des protéines G des CSPs par une injection de GTP γ S module la dépression synaptique en réduisant la libération de neurotransmetteurs (Robitaille, 1998) tout comme l'effet du glutamate tandis que l'inhibition des CSPs, causée par l'injection de GDP β S réduit la dépression synaptique (Robitaille, 1998) tout comme un antagoniste des récepteurs mGluRs (MCPG);
4. Les CSPs ne modulent pas la transmission synaptique de façon tonique (à 0.2Hz) (Robitaille, 1998) tout comme le glutamate endogène qui n'a pas d'effet synaptique à basse fréquence.

Par conséquent, l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent suggère de façon indirecte que le glutamate peut être un des messagers gliaux à la JNM d'amphibien. Ainsi, dans le modèle proposé (figure 7), la libération de neurotransmetteurs (ACh, ATP) par la terminaison nerveuse activerait des récepteurs localisés sur les CSPs ce qui résulterait en une augmentation de Ca²⁺

dans ces dernières. Bien que l'on ne connaisse pas les mécanismes régissant la libération de glutamate au niveau de la JNM, il est intéressant de noter qu'une augmentation de Ca^{2+} glial est nécessaire et suffisante pour engendrer la libération de glutamate par les astrocytes du SNC (Parpura and Haydon, 2000) suggérant ainsi un mode d'action similaire à la JNM. Ainsi, nous proposons que l'augmentation de Ca^{2+} dans les CSPs, induite par l'activité synaptique, déclencherait la libération de glutamate par ces dernières.

Pour confirmer cette hypothèse, nous devons vérifier que les CSPs libèrent du glutamate. Dans cette optique, des expériences d'imageries au glutamate ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr P. Haydon dans le but de visualiser ainsi que de quantifier la libération de glutamate à la JNM. Malheureusement, la sensibilité de détection de leur technique n'a pas permis de conclure sur cette dernière hypothèse.

Une autre série d'expériences, ayant pour but de déterminer si le glutamate peut être un messenger d'origine glial à la JNM, serait d'activer sélectivement les CSPs en injectant un analogue non-hydrolysable de GTP ($GTP\gamma S$). Il a été démontré que cette procédure induit une diminution, CSPs-dépendante, de la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse (Robitaille, 1998). Par conséquent, si les CSPs libèrent du glutamate, l'effet dépresseur du $GTP\gamma S$ devrait être masqué en présence d'un antagoniste des récepteurs glutamatergiques. Une autre série d'expériences qui pourrait être réalisée dans le but de déterminer si les

CSPs libèrent du glutamate consisterait à induire une augmentation calcique localisée dans les CSPs à l'aide de la technique de photolyse de Ca^{2+} encagé, le tout, réalisé en présence d'antagonistes glutamatergiques. Cette expérience permettrait aussi de vérifier si les cellules gliales libèrent du glutamate et permettrait aussi, si tel est le cas, de déterminer si cette libération est Ca^{2+} -dépendante. De plus, nous pourrions vérifier si du glutamate est aussi libéré par la terminaison nerveuse. En effet, en bloquant l'activation des CSPs et en leur injectant du GDP β S, si le MCPG réduit toujours la dépression synaptique induite à haute fréquence, cela suggérerait que la terminaison nerveuse libère aussi du glutamate.

3.5.2 Le glutamate active des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques

Pour poursuivre la description de notre modèle (figure 7), le glutamate libéré dans la fente synaptique par les CSPs irait activer des récepteurs mGluRs postsynaptiques et leur activation résulterait, via une protéine G, en l'activation directe de la NO synthase ou induirait une augmentation de Ca^{2+} dans la fibre musculaire. Cette augmentation de Ca^{2+} activerait ainsi une NO synthase Ca^{2+} -dépendante (Bredt and Snyder, 1992) ce qui résulterait en la formation de NO. Le NO ainsi produit par les fibres musculaires agirait comme un second messenger rétrograde diffusible qui viendrait réduire la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse. Notons aussi la possibilité que le NO ainsi produit pourrait aussi avoir un effet sur les CSPs. Par contre, pour simplifier notre modèle, nous avons écarté cette hypothèse. Ainsi, deux mécanismes d'action présynaptiques du NO seraient envisageables:

1. Le NO pourrait induire des modifications post-transcriptionnelles (ADP-ribosylation (Duman et al., 1993), S-nitrosylation (Lipton et al., 1993)) sur des protéines impliquées dans les mécanismes d'endo- et d'exocytose (Meffert et al., 1994; Meffert et al., 1996) modulant ainsi la probabilité de la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse via des mécanismes fréquence-dépendants (Thomas and Robitaille, 2001).

2. L'effet dépresseur du NO sur la transmission synaptique pourrait aussi être médié par la production de GMPc dans la terminaison neuronale via l'activation d'une guanylate cyclase (Schmidt et al., 1993) ce qui aurait pour effet de réduire la probabilité de libération de neurotransmetteurs (Thomas and Robitaille, 2001).

Par contre, nous sommes bien conscients que cette dernière hypothèse n'est pas exclusive et que la terminaison nerveuse pourrait aussi exprimer des récepteurs mGluRs (figure 7). Dans cette hypothèse, le glutamate pourrait aussi activer des mGluRs présynaptiques (probablement de groupe II) et via ses protéines G, activerait, tout comme le NO, une guanylate cyclase et/ou agirait directement avec des protéines responsables de la fusion des vésicules à la membrane de la terminaison nerveuse. Dans tous ces cas, l'effet final du glutamate est présynaptique et résulte en une réduction de la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse. De plus, le glutamate libéré dans la fente synaptique serait recapté par les CSPs qui expriment un transporteur glutamatergique (GLAST).

Figure 7

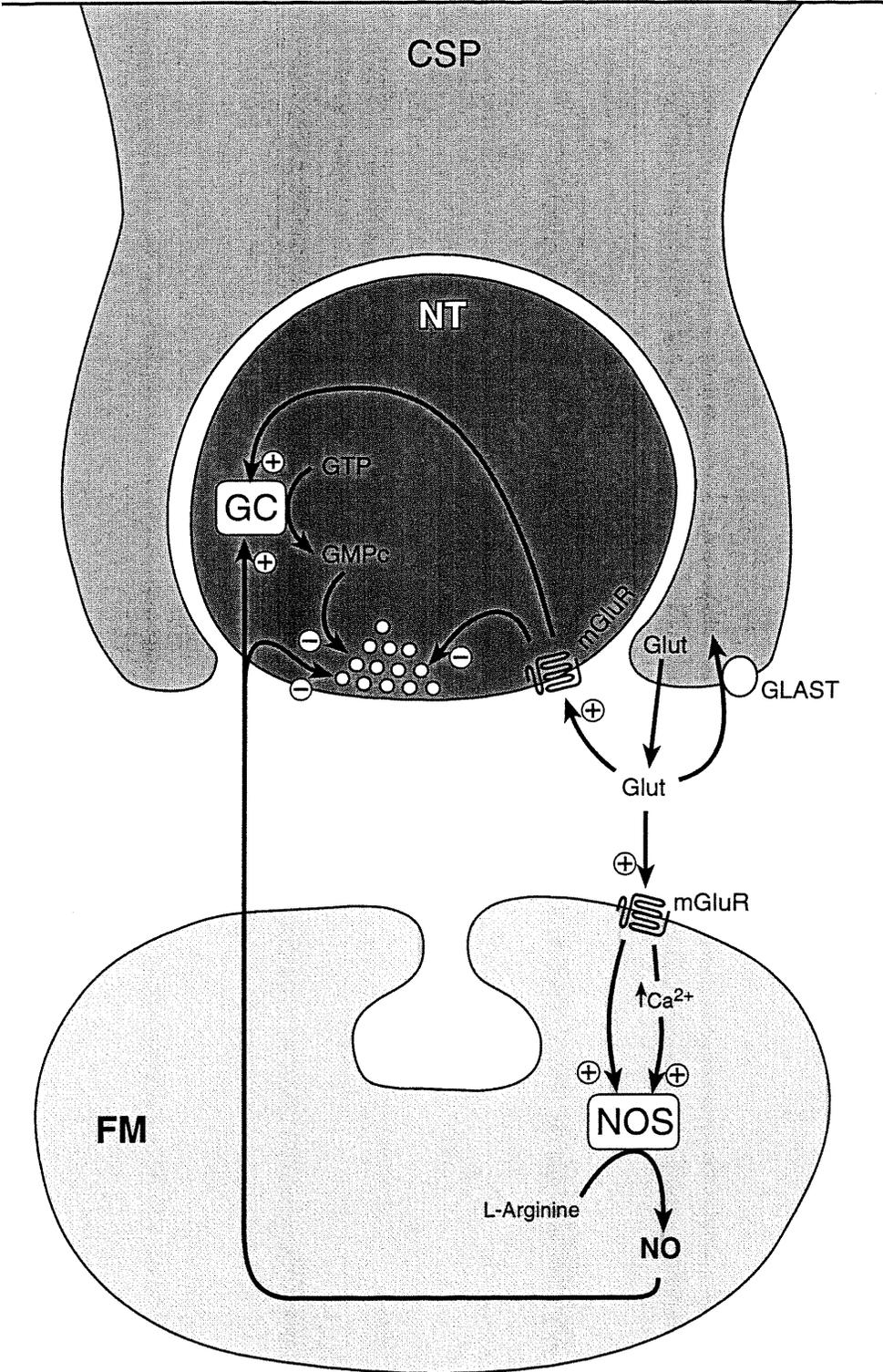


Figure 7

Représentation schématique du modèle hypothétique des interactions glutamatergiques à la JNM. La libération de neurotransmetteurs (ACh, ATP, adénosine, Substance P) par la terminaison nerveuse activerait leur récepteurs gliaux respectifs ce qui induirait une augmentation de Ca^{2+} dans les CSPs. Cette augmentation de Ca^{2+} gliale induira à son tour la libération de glutamate par les CSPs. Le glutamate libéré va activer des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques (mGluR) ce qui résultera en une activation d'une NO synthase (NOS) localisée dans les fibres musculaires. L'activation de cette dernière se ferait directement par des interactions entre la NOS et les protéines G des mGluRs ou par une augmentation de Ca^{2+} postsynaptique résultant de l'activation des récepteurs mGluRs. Le NO ainsi formé agira à titre de messenger rétrograde qui ira réduire la libération de neurotransmetteurs par la terminaison nerveuse. L'effet présynaptique dépresseur du NO pourrait passer via deux voies: 1. Action directe avec des protéines responsables de l'exocytose de neurotransmetteurs ou via l'activation d'une guanylate cyclase ce qui augmenterait la production de GMPc. Notons aussi la possibilité d'avoir une voie parallèle présynaptique pour l'action du glutamate. En effet, en plus d'activer ses récepteurs postsynaptiques, le glutamate pourrait aussi se lier à des mGluRs présynaptiques ce qui résulterait en l'activation de la guanylate cyclase tout comme le NO. L'activation de mGluRs présynaptiques pourrait aussi intervenir directement avec les protéines responsables de l'exocytose des neurotransmetteurs. Finalement, l'effet du glutamate sur la transmission synaptique serait arrêté par sa recapture grâce à un système de transporteur glutamatergique localisé sur les CSPs.

3.8 Conclusion

Dans cette étude, nous avons démontré que le glutamate ainsi que les composantes d'un système glutamatergique sont présents à la JNM d'amphibien, une synapse reconnue comme étant purement cholinergique. En plus d'être présents, nous sommes les premiers à démontrer que cette machinerie glutamatergique est pleinement fonctionnelle et que le glutamate endogène module l'efficacité ainsi que la plasticité synaptique à la JNM adulte. Basé sur nos résultats, nous avons proposé un modèle d'interactions glutamatergiques en tenant compte des trois composantes principales retrouvées à la JNM (terminaison nerveuse, fibre musculaire et CSPs) et grâce à ce modèle, il nous sera maintenant possible de tester l'hypothèse que le glutamate pourrait être un des messagers gliaux responsables des interactions CSPs-synapse à la JNM d'amphibien.

SOURCES DOCUMENTAIRES

BIBLIOGRAPHIE

1. Akasu T (1986) The effects of substance P on neuromuscular transmission in the frog. *Neurosci Res* 3: 275-284.
2. Akasu T, Kojima M, Koketsu K (1983) Substance P modulates the sensitivity of the nicotinic receptor in amphibian cholinergic transmission. *Br J Pharmacol* 80: 123-131.
3. Akasu T, Ohta Y, Koketsu K (1984) Neuropeptides facilitate the desensitization of nicotinic acetylcholine- receptor in frog skeletal muscle endplate. *Brain Res* 290: 342-347.
4. Akert K, Moor H, Pfenninger K, Sandri C (1969) Contributions of new impregnation methods and freeze etching to the problems of synaptic fine structure. *Prog Brain Res* 31: 223-240.
5. Aramori I, Nakanishi S (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8: 757-765.
6. Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20: 666-673.
7. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998a) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10: 2129-2142.

8. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999a) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22: 208-215.
9. Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998b) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18: 6822-6829.
10. Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1999b) Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can J Physiol Pharmacol* 77: 699-706.
11. Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ (1985) Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid. *J Physiol* 367: 163-181.
12. Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ (1987) Calcium action in synaptic transmitter release. *Annu Rev Neurosci* 10: 633-693.
13. Barres BA, Chun LL, Corey DP (1989) Glial and neuronal forms of the voltage-dependent sodium channel: characteristics and cell-type distribution. *Neuron* 2: 1375-1388.
14. Barres BA, Koroshetz WJ, Swartz KJ, Chun LL, Corey DP (1990) Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron* 4: 507-524.
15. Bartfai T, Iverfeldt K, Fisone G, Serfozo P (1988) Regulation of the release of coexisting neurotransmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 28: 285-310.

16. Bennett MK, Scheller RH (1994) A molecular description of synaptic vesicle membrane trafficking. *Annu Rev Biochem* 63: 63-100.
17. Berger UV, Carter RE, Coyle JT (1995a) The immunocytochemical localization of N-acetylaspartyl glutamate, its hydrolysing enzyme NAALADase, and the NMDAR-1 receptor at a vertebrate neuromuscular junction. *Neuroscience* 64: 847-850.
18. Berger UV, Carter RE, McKee M, Coyle JT (1995b) N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase is expressed by non-myelinating Schwann cells in the peripheral nervous system. *J Neurocytol* 24: 99-109.
19. Berger UV, Schwab ME (1996) N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase may be involved in axon-Schwann cell signalling. *J Neurocytol* 25: 499-512.
20. Bevan S, Miledi R, Grampp W (1973) Induced transmitter release from Schwann cells and its suppression by actinomycin D. *Nat New Biol* 241: 85-86.
21. 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.
22. Bhardwaj A, Northington FJ, Martin LJ, Hanley DF, Traystman RJ, Koehler RC (1997) Characterization of metabotropic glutamate receptor-mediated nitric oxide production in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 153-160.

23. Blackmer T, Larsen EC, Takahashi M, Martin TF, Alford S, Hamm HE (2001) G protein betagamma subunit-mediated presynaptic inhibition: regulation of exocytotic fusion downstream of Ca^{2+} entry. *Science* 292: 293-297.
24. Boulter J, Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Hartley M, Deneris E, Maron C, Heinemann S (1990) Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science* 249: 1033-1037.
25. Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 512 (Pt 1): 197-209.
26. Bredt DS, Snyder SH (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8: 3-11.
27. Burden SJ, Sargent PB, McMahan UJ (1979) Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at original synaptic sites in the absence of the nerve. *J Cell Biol* 82: 412-425.
28. Cartmell J, Schoepp DD (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* 75: 889-907.
29. Castonguay A, Lévesque S, and Robitaille R (2001) Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog. Brain Res.* 132: 237-250. In Press.

30. Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca^{2+} internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21: 1911-1922.
31. Ceccarelli B, Grohovaz F, Hurlbut WP (1979) Freeze-fracture studies of frog neuromuscular junctions during intense release of neurotransmitter. I. Effects of black widow spider venom and Ca^{2+} -free solutions on the structure of the active zone. *J Cell Biol* 81: 163-177.
32. Charles A (1998) Intercellular calcium waves in glia. *Glia* 24: 39-49.
33. Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6: 983-992.
34. Clapham DE, Neer EJ (1993) New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365: 403-406.
35. Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258: 1498-1501.
36. Cohen MW, Jones OT, Angelides KJ (1991) Distribution of Ca^{2+} channels on frog motor nerve terminals revealed by fluorescent omega-conotoxin. *J Neurosci* 11: 1032-1039.
37. Collingridge GL, Lester RA (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41: 143-210.

38. Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-237.
39. Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM (1991) Ca^{2+} waves in astrocytes. *Cell Calcium* 12: 185-204.
40. 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.
41. Couteaux R, Pecot-Dechavassine M (1974) Specialized areas of presynaptic membranes. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 278: 291-293.
42. Cremona O, De Camilli P (1997) Synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 7: 323-330.
43. Daikhin Y, Yudkoff M (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 130: 1026S-1031S.
44. Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI (1992) An $[Na^+ + K^+]$ coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51: 295-310.
45. Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8: 429-440.

46. Davies SN, Martin D, Millar JD, Aram JA, Church J, Lodge D (1988) Differences in results from in vivo and in vitro studies on the use-dependency of N-methylaspartate antagonism by MK-801 and other phencyclidine receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 145: 141-151.
47. DeBello WM, Betz H, Augustine GJ (1993) Synaptotagmin and neurotransmitter release. *Cell* 74: 947-950.
48. Deitmer JW, Rose CR (1996) pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol* 48: 73-103.
49. Dennis SC, Lai JC, Clark JB (1977) Comparative studies on glutamate metabolism in synaptic and non-synaptic rat brain mitochondria. *Biochem J* 164: 727-736.
50. Descarries LM, Cai S, Robitaille R, Josephson EM, Morest DK (1998) Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J Neurocytol* 27: 829-840.
51. DiAntonio A, Petersen SA, Heckmann M, Goodman CS (1999) Glutamate receptor expression regulates quantal size and quantal content at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* 19: 3023-3032.
52. Disbrow JK, Gershten MJ, Ruth JA (1982) Uptake of L-[3H] glutamic acid by crude and purified synaptic vesicles from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 1221-1227.

53. Docherty M, Bradford HF, Wu JY (1987) Co-release of glutamate and aspartate from cholinergic and GABAergic synaptosomes. *Nature* 330: 64-66.
54. Dreyer F, Peper K (1974) A monolayer preparation of innervated skeletal muscle fibres of the m. cutaneus pectoris of the frog. *Pflugers Arch* 348: 257-262.
55. Dreyer F, Peper K, Akert K, Sandri C, Moor H (1973) Ultrastructure of the "active zone" in the frog neuromuscular junction. *Brain Res* 62: 373-380.
56. Duffy S, MacVicar BA (1995) Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *J Neurosci* 15: 5535-5550.
57. Duman RS, Terwilliger RZ, Nestler EJ (1993) Alterations in nitric oxide-stimulated endogenous ADP-ribosylation associated with long-term potentiation in rat hippocampus. *J Neurochem* 61: 1542-1545.
58. Erecinska M, Silver IA (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 35: 245-296.
59. Fatt P, Katz B (1951) An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *Journal of Physiology* 115: 320-370.
60. Fatt P, Katz B (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol (Lond)* 117: 109-128.
61. Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42: 1-11.

62. Fu WM, Liou JC, Lee YH, Liou HC (1995) Potentiation of neurotransmitter release by activation of presynaptic glutamate receptors at developing neuromuscular synapses of *Xenopus*. *J Physiol* 489 (Pt 3): 813-823.
63. Georgiou J, Robitaille R, Charlton MP (1999) Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci* 19: 3836-3846.
64. Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP (1994) Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12: 443-455.
65. Go VL, Yaksh TL (1987) Release of substance P from the cat spinal cord. *J Physiol* 391: 141-167.
66. Goldstein GW (1988) Endothelial cell-astrocyte interactions. A cellular model of the blood- brain barrier. *Ann N Y Acad Sci* 529: 31-39.
67. 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.
68. Grozdanovic Z, Gossrau R (1997) Nitric oxide NMDA signalling in neuromuscular transmission: a missing link in motor end plate diversity and modulation [letter]. *Histochem J* 29: 267-269.
69. Grozdanovic Z, Gossrau R (1998) Co-localization of nitric oxide synthase I (NOS I) and NMDA receptor subunit 1 (NMDAR-1) at the neuromuscular junction in rat and mouse skeletal muscle. *Cell Tissue Res* 291: 57-63.

70. Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19: 520-528.
71. Hall ZW, Sanes JR (1993) Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* 72 Suppl: 99-121.
72. Hamm HE (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273: 669-672.
73. Hammond C, Tritsch D (1990) Les neurotransmetteurs. In: *Neurobiologie cellulaire* (Doin, ed), pp 329-364. Paris: Hammond,C; Tritsch,D.
74. Harish OE, Poo MM (1992) Retrograde modulation at developing neuromuscular synapses: involvement of G protein and arachidonic acid cascade. *Neuron* 9: 1201-1209.
75. 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 waves. *J Neurobiol* 28: 159-170.
76. Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2: 185-193.
77. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 57: 417-428.

78. Heuser JE, Reese TS (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57: 315-344.
79. Heuser JE, Reese TS (1977) Structure of the synapse. In: *HANDBOOK OF PHYSIOLOGY* (Brookhart JM, Mountcastle VB, Kandel ER, Geiger SR, eds), pp 261-xx. Bethesda, Maryland: American Physiological Society.
80. Heuss C, Gerber U (2000) G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 23: 469-475.
81. Hof PR, Trapp BD, Vellis J, Claudio L, Colman DR (1999) The cellular components of nervous tissue. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds), pp 41-70. San Diego: Academic Press.
82. Hokfelt T, Johansson O, Goldstein M (1984) Chemical anatomy of the brain. *Science* 225: 1326-1334.
83. Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.
84. Iversen LL (1975) Uptake processes for biogenic amines. In: *Handbook of Psychopharmacology* pp 381-442. New York: Plenum Publishing Corp.
85. Iversen LL, Jessell T, Kanazawa I (1976) Release and metabolism of substance P in rat hypothalamus. *Nature* 264: 81-83.

86. Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8733-8738.
87. Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8: 1069-1077.
88. Jarvis SE, Magga JM, Beedle AM, Braun JE, Zamponi GW (2000) G protein modulation of N-type calcium channels is facilitated by physical interactions between syntaxin 1A and Gbetagamma. *J Biol Chem* 275: 6388-6394.
89. Jeftinija SD, Jeftinija KV (1998) ATP stimulates release of excitatory amino acids from cultured Schwann cells. *Neuroscience* 82: 927-934.
90. Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325: 529-531.
91. Juurlink BH, Hertz L (1985) Plasticity of astrocytes in primary cultures: an experimental tool and a reason for methodological caution. *Dev Neurosci* 7: 263-277.
92. Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1: 683-692.
93. Katz B, Miledi R (1967) The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol* 189: 535-544.

94. Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195: 481-492.
95. Katz B, Miledi R (1970) Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J Physiol* 207: 789-801.
96. Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA (1990) Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 10: 1583-1591.
97. Kirischuk S, Kirchhoff F, Matyash V, Kettenmann H, Verkhratsky A (1999) Glutamate-triggered calcium signalling in mouse bergmann glial cells in situ: role of inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated intracellular calcium release. *Neuroscience* 92: 1051-1059.
98. Klein RL, Wilson SP, Dzielak DJ, Yang WH, Viveros OH (1982) Opioid peptides and noradrenaline co-exist in large dense-cored vesicles from sympathetic nerve. *Neuroscience* 7: 2255-2261.
99. Kojima S, Nakamura T, Nidaira T, Nakamura K, Ooashi N, Ito E, Watase K, Tanaka K, Wada K, Kudo Y, Miyakawa H (1999) Optical detection of synaptically induced glutamate transport in hippocampal slices. *J Neurosci* 19: 2580-2588.
100. Kondo K, Hashimoto H, Kitanaka J, Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T, Baba A (1995) Expression of glutamate transporters in cultured glial cells. *Neurosci Lett* 188: 140-142.

101. Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK (1966) Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29: 768-787.
102. Laube B, Kuryatov A, Kuhse J, Betz H (1993) Glycine-glutamate interactions at the NMDA receptor: role of cysteine residues. *FEBS Lett* 335: 331-334.
103. Lindgren CA, Laird MV (1994) Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *Neuroreport* 5: 2205-2208.
104. Liou HC, Yang RS, Fu WM (1996) Potentiation of spontaneous acetylcholine release from motor nerve terminals by glutamate in *Xenopus* tadpoles. *Neuroscience* 75: 325-331.
105. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632.
106. Littleton JT, Stern M, Schulze K, Perin M, Bellen HJ (1993) Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca^{2+} -activated neurotransmitter release. *Cell* 74: 1125-1134.
107. Martin DL (1992) Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5: 81-94.

108. Masu M, Nakajima Y, Moriyoshi K, Ishii T, Akazawa C, Nakanashi S (1993) Molecular characterization of NMDA and metabotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci* 707: 153-164.
109. Matteoli M, Haimann C, De Camilli P (1990) Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 37: 271-275.
110. Matteoli M, Haimann C, Torri-Tarelli F, Polak JM, Ceccarelli B, De Camilli P (1988) Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7366-7370.
111. Matthews-Bellinger J, Salpeter MM (1978) Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications. *J Physiol* 279: 197-213.
112. Mayer ML, Westbrook GL (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol* 394: 501-527.
113. Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H (1996) Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions. *Neuron* 16: 1229-1236.
114. Meffert MK, Premack BA, Schulman H (1994) Nitric oxide stimulates Ca(2+)-independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12: 1235-1244.

115. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256: 1217-1221.
116. Nakajima K, Kohsaka S (1993) Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci Res* 17: 187-203.
117. Nakanishi N, Shneider NA, Axel R (1990) A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* 5: 569-581.
118. Newman E, Reichenbach A (1996) The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19: 307-312.
119. Newman EA (1986) High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science* 233: 453-454.
120. Newman EA, Frambach DA, Odette LL (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K^+ siphoning. *Science* 225: 1174-1175.
121. Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18: 4022-4028.
122. Nicholls D, Attwell D (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 11: 462-468.
123. Nikam SS, Kornberg BE (2001) AMPA receptor antagonists. *Curr Med Chem* 8: 155-170.

124. Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161: 303-310.
125. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-465.
126. 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.
127. Otsuka M, Konishi S (1976) Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. *Nature* 264: 83-84.
128. Parnas I, Dudel J, Parnas H, Ravin R (1996) Glutamate depresses release by activating non-conventional glutamate receptors at crayfish nerve terminals. *Eur J Neurosci* 8: 116-126.
129. Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling [see comments]. *Nature* 369: 744-747.
130. Parpura V, Fang Y, Basarsky T, Jahn R, Haydon PG (1995b) Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Lett* 377: 489-492.

131. Parpura V, Haydon PG (2000) From the Cover: Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8629-8634.
132. Parpura V, Liu F, Jeftinija KV, Haydon PG, Jeftinija SD (1995a) Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from Schwann cells. *J Neurosci* 15: 5831-5839.
133. 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.
134. Patneau DK, Mayer ML (1990) Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci* 10: 2385-2399.
135. Peper K, Dreyer F, Sandri C, Akert K, Moor H (1974) Structure and ultrastructure of the frog motor endplate. A freeze-etching study. *Cell Tissue Res* 149: 437-455.
136. Peper K, McCarthy KD (1972) Distribution of acetylcholine receptors in the vicinity of nerve terminals on skeletal muscle of the frog. *Proc R Soc Lond* 181: 431-440.
137. Porter JT, McCarthy KD (1995) Adenosine receptors modulate $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal astrocytes in situ. *J Neurochem* 65: 1515-1523.

138. Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16: 5073-5081.
139. Raub TJ, Kuentzel SL, Sawada GA (1992) Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp Cell Res* 199: 330-340.
140. 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.
141. Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21: 847-855.
142. Robitaille R, Adler EM, Charlton MP (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5: 773-779.
143. Robitaille R, Bourque MJ, Vandaele S (1996) Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 16: 148-158.
144. 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 (Lond)* 504 (Pt 2): 337-347.

145. Robitaille R, Thomas S, Charlton MP (1999) Effects of adenosine on Ca^{2+} entry in the nerve terminal of the frog neuromuscular junction. *Can J Physiol Pharmacol* 77: 707-714.
146. Rochon D, Rouse I, Robitaille R (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21: 3819-3829.
147. Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178: 153-175.
148. Schulte MK, Roon RJ, Chalmers DJ, Sunter DC, Koerner JF (1994) Utilization of the resolved L-isomer of 2-amino-6-phosphohexanoic acid (L-AP6) as a selective agonist for a quisqualate-sensitized site in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Res* 649: 203-207.
149. Shioi J, Naito S, Ueda T (1989) Glutamate uptake into synaptic vesicles of bovine cerebral cortex and electrochemical potential difference of proton across the membrane. *Biochem J* 258: 499-504.
150. Slusher BS, Robinson MB, Tsai G, Simmons ML, Richards SS, Coyle JT (1990) Rat brain N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity. Purification and immunologic characterization. *J Biol Chem* 265: 21297-21301.
151. Sneyd J, Charles AC, Sanderson MJ (1994) A model for the propagation of intercellular calcium waves. *Am J Physiol* 266: C293-C302.

152. Sonnhof U (1987) Single voltage-dependent K^+ and Cl^- channels in cultured rat astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 1043-1050.
153. Starke K, Gothert M, Kilbinger H (1989) Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* 69: 864-989.
154. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983) Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306: 67-69.
155. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1: 301-307.
156. Szatkowski M, Barbour B, Attwell D (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348: 443-446.
157. Tabb JS, Kish PE, Van Dyke R, Ueda T (1992) Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem* 267: 15412-15418.
158. Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M, Attwell D (1997) The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J Exp Biol* 200 (Pt 2): 401-409.
159. Taylor P (1991) The cholinesterases. *J Biol Chem* 266: 4025-4028.

160. Thomas S, Robitaille R (2001) Differential Frequency-Dependent Regulation of Transmitter Release by Endogenous Nitric Oxide at the Amphibian Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* 21: 1087-1095.
161. Thompson WJ (1985) Activity and synapse elimination at the neuromuscular junction. *Cell Mol Neurobiol* 5: 167-182.
162. Thomson AM (1986) A magnesium-sensitive post-synaptic potential in rat cerebral cortex resembles neuronal responses to N-methylaspartate. *J Physiol* 370: 531-549.
163. Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19: 6897-6906.
164. Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252: 1715-1718.
165. Verdoorn TA, Dingledine R (1988) Excitatory amino acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes: agonist pharmacology. *Mol Pharmacol* 34: 298-307.
166. Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78: 99-141.
167. Verkhratsky A, Steinhauser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 380-412.

168. Vernadakis A (1996) Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 49: 185-214.
169. Villegas J (1981) Axon/Schwann-cell relationships in the giant nerve fibre of the squid. *J Exp Biol* 95: 135-151.
170. Vyas S, Bradford HF (1987) Co-release of acetylcholine, glutamate and taurine from synaptosomes of Torpedo electric organ. *Neurosci Lett* 82: 58-64.
171. Waerhaug O, Ottersen OP (1993) Demonstration of glutamate-like immunoreactivity at rat neuromuscular junctions by quantitative electron microscopic immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)* 188: 501-513.
172. Wang T, Xie Z, Lu B (1995) Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature* 374: 262-266.
173. Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21: 165-204.
174. Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL (1986) The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7104-7108.