

Université de Montréal

**Implication des cellules gliales dans la modulation de
l'activité synaptique à la jonction neuromusculaire
sénescence**

par Ayman Moustaine

Département de Neurosciences
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en neurosciences
2-530-1-1

Octobre 2018

© Ayman Moustaine, 2018

Résumé

L'affaiblissement musculaire est un processus inévitable du vieillissement qui peut sévèrement affecter la mobilité des personnes âgées, en plus d'accroître le risque de chute avec blessure. Un candidat important pouvant sous-tendre ce déclin moteur est la dégénérescence de la jonction neuromusculaire (JNM), la connexion synaptique entre le motoneurone et le muscle. Parmi les événements survenant à la JNM sénescence, la dénervation fréquente de la terminaison axonale du motoneurone couplée à des mécanismes compensatoires altérés compromettent la fonction et l'intégrité de la JNM. En plus des altérations synaptiques, des changements ont aussi été observés dans les propriétés des cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs), les cellules gliales de cette synapse. Ces changements gliaux peuvent être d'une grande importance puisque les CSPs sont reconnues pour jouer un rôle crucial à la JNM adulte en régulant la fonction, le maintien et la plasticité synaptique. Dès lors, nous avons émis l'hypothèse que les altérations fonctionnelles observées à la JNM sénescence sont en partie causées par des altérations dans la régulation gliale. Dans cette veine, nous avons d'abord caractérisé, à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques, les propriétés fonctionnelles des JNMs du muscle *levator auris longus* provenant de souris CD1 adultes (3 mois), âgées (24 mois) et très âgées (30 mois). Nous avons observé une préservation avec l'âge des propriétés de la transmission synaptique, toutefois accompagnée de profondes altérations dans la plasticité synaptique suivant des trains de stimulation à haute fréquence de l'axone moteur. Particulièrement, nous avons montré que la plasticité synaptique à long-terme est de polarité inversée autant pour les animaux âgés que très âgés, passant d'une potentialisation à une dépression synaptique avec l'âge. Pour investiguer l'implication des CSPs dans cette altération synaptique, nous avons adapté une stratégie impliquant la méthode d'électroporation de cellule unique afin de manipuler sélectivement l'activité calcique gliale tout en réalisant simultanément des enregistrements électrophysiologiques pour les souris 3 mois et 24 mois. Cette stratégie a permis de révéler que les altérations de la plasticité à long-terme semblent être médiées de manière calcium-dépendante par les CSPs. En utilisant une approche pharmacologique spécifique, nous avons montré que ces phénomènes de plasticité synaptique à long-terme sont aussi dépendants de l'activation des récepteurs à l'adénosine, qui sont des effecteurs présynaptiques de la plasticité

giale dépendante. Mis ensemble, ces résultats suggèrent qu'une dysrégulation par les CSPs semble médier de manière purine-dépendante l'affaiblissement de la JNM sénescence. Ainsi, notre étude soulève une possible implication des CSPs dans la dégénération de la JNM sénescence et met en lumière ces cellules gliales comme une cible thérapeutique potentielle pour prévenir l'affaiblissement musculaire qui touche les personnes âgées.

Mots-clés : Vieillesse, Jonction neuromusculaire, Interactions Neurone-glie, Cellules de Schwann périssynaptiques, Plasticité synaptique.

Abstract

Age-related muscle weakness is simply unavoidable, and it can severely compromise physical autonomy for elderly in addition to increase the risk of fall-related injuries. One element underlying this motor decline is the degeneration of the neuromuscular junction (NMJ), the synaptic connection between motor neuron and muscle. Amongst other age-related events, frequent denervation of the motor axon terminal coupled with impaired compensatory mechanisms compromise NMJ function and integrity. Beside the synaptic alterations, properties changes have also been observed for Perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at this synapse. These glial changes could play key role in the degenerative events happening at the senescent NMJ, since PSCs are well known to be crucial at the mature NMJ by regulating synaptic function, maintenance and plasticity. Therefore, we hypothesized that impaired NMJ function may arise in part from age-related glial dysfunction. Using electrophysiological recordings, we characterized NMJs functional properties of *levator auris longus* muscle from adult (3 months) CD1 mice, old (24 months) and very old (30 months). We observed preserved synaptic transmission properties with aging, along with profound synaptic plasticity alterations following high-frequency nerve stimulation. Particularly, we showed long-term synaptic plasticity is reversed in terms of polarity for both old and very old animals, going from synaptic potentiation to depression with age. To investigate PSCs contribution to this synaptic alteration, we adapted a strategy implicating single-cell electroporation to manipulate selectively glial calcium activity while simultaneously realizing electrophysiological recordings for 3 months and 24 months mice. This strategy revealed long-term synaptic plasticity alterations seem to be mediated in a Ca^{2+} -dependent manner by PSCs. Using a specific pharmacological approach, we then showed long-term synaptic plasticity events are also dependents upon adenosine receptors activation, which are presynaptic effectors of glial-dependent plasticity. Altogether, these results suggest PSCs dysregulation seems to mediate in a purine-dependent manner age-related NMJ weakness. Thus, our study raises the possible implication of PSCs in NMJ's age-related degeneration and it brings to light glial cells as a potential therapeutic target to prevent muscle weakness for elderly.

Keywords: Aging, Neuromuscular Junction, Neuron-glia interactions, Perisynaptic Schwann cells, Synaptic Plasticity

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures	ix
Liste des sigles	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xv
Chapitre 1 : Introduction générale	1
Préambule	1
1.1 Vieillessement normal	2
1.1.1 Vieillessement du système nerveux central.....	2
1.1.1.1 Vieillessement neuronal	3
1.1.1.1.1 Changements synaptiques	3
1.1.1.2 Vieillessement des cellules gliales	4
1.1.2 Vieillessement neuromusculaire.....	5
1.1.2.1 La sarcopénie et les changements au niveau du muscle squelettique.....	6
1.1.2.2 Altération de l'unité motrice.....	6
1.1.2.3 Hypothèse de la dégénération de la jonction neuromusculaire.....	7
1.2 La jonction neuromusculaire.....	9
1.2.1 L'élément présynaptique.....	11
1.2.1.1 La zone active	11
1.2.1.2 L'exocytose des vésicules synaptiques	12
1.2.1.3 La libération quantique	13
1.2.1.4 Les récepteurs présynaptiques	13
1.2.2 La fente synaptique	14
1.2.3 L'élément postsynaptique	15

1.2.3.1	Les récepteurs nicotiniques et la réponse postsynaptique.....	15
1.2.3.2	La contraction musculaire.....	16
1.2.4	L'élément glial : la cellule de Schwann pérисynaptique	17
1.2.4.1	Origine embryonnaire des CSPs	17
1.2.4.2	Structure et localisation stratégique	17
1.2.4.3	Détection de l'activité synaptique.....	18
1.2.4.3.1	Récepteurs gliaux.....	18
1.2.4.3.2	Excitabilité gliale	19
1.2.4.3.3	Détection de l'activité synaptique.....	19
1.2.4.3.4	Décodage de l'activité synaptique	21
1.2.4.4	Modulation de l'activité synaptique.....	21
1.2.4.4.1	Modulation de l'activité synaptique : implication gliale	21
1.2.4.4.2	Modulation de l'activité synaptique : effecteurs gliaux.....	23
1.2.4.4.3	Modulation de l'activité synaptique : Modèle de la régulation gliale	25
1.2.4.5	Maintenance et réparation de la JNM	26
1.2.4.5.1	Maintenance de l'intégrité structurale de la synapse	26
1.2.4.5.2	Réparation	27
1.2.4.6	La plasticité fonctionnelles des CSPs	28
1.2.5	La plasticité synaptique.....	29
1.2.5.1	Phénomènes de plasticité synaptique.....	29
1.2.5.1.1	Renforcement synaptique.....	30
1.2.5.1.2	Dépression synaptique	31
1.2.5.2	Médiateurs des phénomènes de plasticité synaptique.....	31
1.3	La jonction neuromusculaire sénescence	33
1.3.1	Les changements structurelles de la JNM.....	33
1.3.2	Les altérations synaptiques	35
1.3.3	Mécanismes sous-tendant la dégénérescence de la JNM sénescence.....	35
1.3.3.1	Lésion des fibres musculaires	36
1.3.3.2	Altérations des mitochondries.....	36

1.3.3.3 Altérations des facteurs trophiques et autres molécules de maintenance synaptique	37
1.3.3.4 Altération de la régulation synaptique par les CSPs.....	38
Objectifs.....	39
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	41
2.1 Animaux.....	41
2.2 Préparation nerf-muscle	41
2.3 Immunohistochimie	42
2.4 Électrophysiologie	43
2.5 Chargement des CSPs.....	46
2.6 Imagerie calcique	48
2.7 Analyse statistique	48
Chapitre 3 : Résultats	50
3.1 Le muscle LAL est un bon modèle d'étude du vieillissement neuromusculaire	50
3.2 Les évènements spontanés et le contenu quantique des JNMs du LAL sont préservés lors du vieillissement	52
3.3 La plasticité à long-terme est altérée lors du vieillissement	55
3.4 Manipulation sélective de l'activité calcique des CSPs.....	59
3.5 L'abolition de l'activité calcique des CSPs altère les phénomènes de plasticité synaptique	64
3.6 Les mécanismes purine-dépendants semblent impliqués dans l'altération des phénomènes de plasticité synaptique	74
Chapitre 4 : Discussion	81
4.1 La dysrégulation des CSPs sénescents.....	81
4.2 Conséquences possibles des altérations synaptiques sur la fonction motrice.....	85
4.3 Qu'est-ce qui sous-tend la dysrégulation de l'efficacité synaptique par les CSPs?	87
4.4 Modèle intégré de la JNM sénescence	91
4.5 Hétérogénéité des altérations associées au vieillissement normal.....	93
4.6 Ralentir l'affaiblissement musculaire	95
4.7 Une possible dysrégulation synaptique par les CSPs dans la SLA.....	100

Conclusion	101
Bibliographie.....	102

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction générale

Figure 1.1. Le motoneurone- α projette son axone par la corne ventrale de la moelle épinière pour contacter plusieurs fibres musculaires.....	9
Figure 1.2. Schéma simplifié représentant une vue transverse de la JNM.....	10
Figure 1.3. Micrographe électronique d'une JNM de grenouille	18
Figure 1.4. Mécanismes cellulaires de détection de la transmission synaptique par la CSP	20
Figure 1.5. Modèle de la modulation bidirectionnelle gliale dépendante de la plasticité synaptique de (Todd et al., 2010).....	25
Figure 1.6. Hypothèse d'une dysrégulation gliale à la JNM sénescence	39

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Figure 2.1. Roue de course en plastique (fast-trac) montée sur un igloo pour souris (Bio Serv).	41
Figure 2.2. Représentation de la préparation neuromusculaire.....	42
Figure 2.3. Paradigme de stimulation	45
Figure 2.4. Méthode d'électroporation de cellule unique pour la CSP.....	47

Chapitre 3 : Résultats

Figure 3.1. Une perte de masse musculaire et des altérations structurelles des JNMs sont observées avec le vieillissement du muscle LAL	52
Figure 3.2. L'activité spontanée et le contenu quantique ne sont pas altérées lors du vieillissement du LAL.....	54
Figure 3.3. La plasticité synaptique à long-terme de la JNM est altérée lors du vieillissement.....	58

Figure 3.4. La méthode d'électroporation de cellule unique permet de sélectivement introduire des molécules dans les CSPs sans affecter la transmission synaptique et les propriétés gliales.....	61
Figure 3.5. L'activité calcique des CSPs est abolie par le chélateur calcique BAPTA.....	65
Figure 3.6. L'effet d'une altération de l'activité calcique des CSPs sur la plasticité synaptique des JNMs de souris adulte	70
Figure 3.7. L'effet d'une altération de l'activité calcique des CSPs sur la plasticité synaptique des JNMs de souris âgée	72
Figure 3.8. L'inhibition des récepteurs A_{2A} affecte les phénomènes de plasticité synaptique	76
Figure 3.9. L'inhibition des récepteurs A₁ renverse l'altération de la plasticité à long-terme des JNMs âgées.....	78

Chapitre 4 : Discussion

Figure 4.1. Modèle simplifié d'une dysrégulation dépendante de l'âge de l'efficacité synaptique par les CSPs	85
Figure 4.2. Communication cytoplasmique entre les CSPs.....	90
Figure 4.3. Schéma intégratif de la JNM sénescence et des interactions possibles entre les altérations cellulaires	92
Figure 4.4. Représentation linéaire de chacun des enregistrements électrophysiologiques utilisés pour caractériser la plasticité synaptique de la JNM sénescence	94
Figure 4.5. La plasticité à long-terme des JNMs de souris adulte est affectée par l'exercice physique	97

Liste des sigles

ACh : Acétylcholine

ATP : Adénosine triphosphate

BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

C : Caudale

CSPs : Cellules de Schwann pérисynaptiques

EP : Exercice physique

GFAP : Protéine acide fibrillaire gliale

IP₃ : Inositol triphosphate

JNM : Jonction neuromusculaire

LAL : *Levator auris longus*

LR : Lente et résistante

nAChRs : Récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique

NO : Monoxyde d'azote

NT-3 : Neurotrophine-3

PPM : Potentiel de plaque motrice

PPMm : Potentiel de plaque motrice miniature

R : Rostrale

RC : Restriction calorique

RE : Réticulum endoplasmique

RF : Rapide et fatigable

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

RR : Rapide et résistante

SHF : Stimulation à haute fréquence

SNARE : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptor*

SNC : Système nerveux central

UM : Unité motrice

ZA : Zones actives

Liste des abréviations

Et al. : *Et alia*

*À ma famille, mes proches et mes collègues qui m'ont soutenu tout au long de mon
cheminement.*

Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer ma gratitude envers mon superviseur, le professeur Richard Robitaille, pour m'avoir permis d'entreprendre une maîtrise dans son laboratoire. J'ai toujours admiré votre professionnalisme, votre bon cœur et votre intégrité. Je vous remercie chaleureusement pour vos suggestions, votre écoute attentionnée et votre soutien durant mon parcours.

Merci Joanne Vallée pour ta générosité, tes conseils et ton précieux soutien technique qui m'ont permis de réaliser à bien mes expériences. Merci aussi pour ton écoute et ta patience sans égale durant mes périodes difficiles, je t'en suis sincèrement reconnaissant. Pareil sentiment envers Dre Arbour, merci infiniment pour toutes les suggestions et pour ton chaleureux soutien. Vous m'avez aidé à me relever et à devenir plus fort que jamais!

Merci aussi aux membres du laboratoire d'être toujours agréable à côtoyer et de me conseiller. Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude envers le Dr Darabid, Éric Martineau, Elsa Tremblay, Alexandre St-Pierre-See et Noam Krief pour leurs précieuses suggestions et leur aide. Merci à vous mes collègues et amis : Ouafa, Anna, Marco, Clare, Sébastien, Anthony, Julie, Frédéric et Sandrine. Je vous remercie aussi mes parrains, Dre Di Cristo et Dre Girouard, pour votre soutien et vos suggestions durant ma maîtrise. Je remercie infiniment le personnel de l'animalerie et particulièrement Marjolaine pour son aide avec la colonie vieillissante. Puis, un remerciement chaleureux aux fonds de la recherche en santé du Québec (FRQS), le GRSNC et la Faculté de médecine pour le soutien financier.

Je réserve mes derniers remerciements à ma famille et mes proches. Vous êtes tout pour moi et vous m'avez toujours soutenu à persévérer et à dépasser mes limites. Je vous en suis reconnaissant!

Chapitre 1 : Introduction générale

Préambule

Vieillir c'est avant tout vivre. Cependant, plusieurs changements physiologiques vont survenir lors du vieillissement et parfois mener à des répercussions marquantes sur l'autonomie des personnes âgées. En particulier, l'affaiblissement musculaire associé au vieillissement affecte même les athlètes d'élite et son étiologie est complexe. À cet effet, un nombre important d'évidences ont rapporté l'implication d'altérations de l'élément musculaire, toutefois de récentes évidences suggèrent la dégénération de la jonction neuromusculaire (JNM) comme un autre élément contributif important qui pourrait même précéder les altérations musculaires. Ainsi, le présent mémoire tentera d'éclaircir les altérations fonctionnelles de la JNM sénescence et particulièrement l'implication très peu documentée des cellules gliales associées à cette synapse. Nous introduirons d'abord le vieillissement normal du système nerveux et musculaire, avant d'aborder en détail chacune des composantes de la JNM. Cette caractérisation intégrative de la JNM permettra par la suite de mieux comprendre les altérations de la JNM sénescence et la thématique de notre présente étude.

1.1 Vieillessement normal

Le vieillissement normal touche les organismes vivants. C'est un processus dépendant du temps, multifactoriel et caractérisé par un déclin graduel de l'intégrité physiologique (Lopez-Otin et al., 2013). Parmi les atteintes fonctionnelles observées au cours du vieillissement, le déclin cognitif et l'affaiblissement musculaire sont deux phénotypes marquants chez l'humain; ils vont sévèrement affecter l'autonomie et la qualité de vie des personnes âgées. Il est reconnu que ces phénotypes du vieillissement sont les conséquences d'altérations du système nerveux et du système musculaire. Toutefois, leur étiologie et les mécanismes cellulaires sous-tendant ces déficits font encore le sujet d'investigations importantes. Nous verrons qu'un élément clef dans l'apparition de ces phénotypes est l'altération de la synapse, l'unité structurelle et fonctionnelle de la communication neuronale, mais aussi de la communication entre le neurone et le muscle (synapse appelée jonction neuromusculaire et décrite en détail à la section 1.2). Dans cette présente section, nous survolerons les différentes altérations du système nerveux, mais nous nous concentrerons spécifiquement sur le système neuromusculaire et l'affaiblissement musculaire.

1.1.1 Vieillessement du système nerveux central

Avec le vieillissement, on observe entre autres un ralentissement du traitement de l'information, une difficulté d'apprentissage et de mémorisation, ainsi que des atteintes aux capacités visuelles et auditives (Gutchess, 2014). Parallèlement à ces déficits fonctionnels, des changements structuraux majeurs sont aussi observés, telles qu'une atrophie graduelle du cerveau et une augmentation du volume ventriculaire (Jernigan et al., 2001; Scahill et al., 2003). Ces altérations du système nerveux central vont survenir à différents degrés avec l'âge et ils vont affecter de manière très variable chaque individu. Outre l'implication des atteintes microvasculaires qui ont été extensivement documentées dans un contexte de vieillissement normal et pathologique (Brown and Thore, 2011), les altérations fonctionnelles et macroscopiques du système nerveux central (SNC) sont essentiellement tributaires d'altérations des cellules neuronales et des cellules gliales.

1.1.1.1 Vieillesse neuronale

Les cellules neuronales sont considérées comme l'unité fonctionnelle du système nerveux. Ainsi, la perte de cellules neuronales ou des altérations des neurones pourraient avoir un impact sur les fonctions cérébrales. En fait, une accumulation d'évidences suggère que la perte de neurones est minimale avec l'âge et ce phénomène serait principalement observé au niveau de régions plus vulnérables du système nerveux tel que le cortex préfrontal, ou encore les pertes neuronales associées à des maladies neurodégénératives (Morrison and Hof, 1997; Peters, 2006; Maxwell et al., 2018). D'autres facteurs que la perte neuronale semblent donc impliqués dans les changements fonctionnels du système nerveux observés avec l'âge et parmi les candidats intéressants on retrouve les altérations neuronales.

Effectivement, on observe une régression de l'arbre dendritique (diminution de la longueur et du nombre d'épines dendritiques) pour certains neurones pyramidaux (Dickstein et al., 2013), une excitabilité altérée (Oh et al., 2010), une dégradation de la gaine myélinisante des axones ainsi qu'une diminution de la longueur et du diamètre totale des fibres myélinisantes (Marner et al., 2003; Hinman and Abraham, 2007). Ces altérations vont affecter la fonction neuronale, toutefois, nous nous sommes spécialement intéressés aux altérations cellulaires qui touchent la synapse puisqu'elles vont jouer un rôle très important dans les altérations cognitives et motrices (Azpurua and Eaton, 2015).

1.1.1.1.1 Changements synaptiques

Les fonctions neuronales dépendent largement de l'intégrité des synapses afin d'assurer une communication fiable au sein des circuits neuronaux. Cependant, on observe généralement avec le vieillissement une diminution du nombre de contacts synaptiques, par exemple au niveau du gyrus dentelé, et les synapses restantes présentent des propriétés altérées (Burke and Barnes, 2010; Petralia et al., 2014). Parmi ces propriétés synaptiques altérées lors du vieillissement, la potentialisation à long-terme, une forme de plasticité synaptique persistante associée au renforcement de la synapse (discutée dans la section 1.2.5.1.1), est plus difficile à induire et à maintenir dans le temps (Barnes, 2003). Alors que la dépression à long-terme, la forme de plasticité synaptique associée à l'affaiblissement synaptique (discutée dans la section 1.2.5.1.2), est plus facile à induire et se produit parfois à la place de la potentialisation. Il est important de

mentionner que ces formes de plasticité synaptique sont le substrat physiologique de la mémoire et les altérations synaptiques observées chez les animaux âgés sont très fortement corrélées avec les déficits mnésiques (Morrison and Baxter, 2012). Ainsi, les altérations synaptiques semblent être un candidat intéressant pouvant sous-tendre certaines altérations fonctionnelles du système nerveux.

Les mécanismes sous-tendant les altérations cellulaires et synaptiques lors du vieillissement sont nombreux et encore débattus (Lopez-Otin et al., 2013). Une cause proposée est un changement de l'expression des gènes neuronaux avec l'âge. Par exemple, une étude a démontré que les gènes neuronaux associés à la fonction synaptique sont les plus touchés lors du vieillissement, dont plusieurs significativement régulés à la baisse et ce, sans être associé à une perte neuronale (Loerch et al., 2008). Cette même étude a aussi montré que les changements neuronaux sont accompagnés de changements géniques importants de cellules non neuronales. Ce sont les cellules gliales, qui représentent plus de la moitié du volume du cerveau humain (Barres, 2008) et dont des altérations de l'expression génique ont aussi été observées fortement altérées au niveau cérébral (Soreq et al., 2017). Des changements gliaux pourraient contribuer à l'altération neuronale, puisque les cellules gliales jouent un rôle primordial dans la maintenance de l'intégrité neuronale et synaptique (Barres, 2008).

1.1.1.2 Vieillessement des cellules gliales

Les cellules gliales présentent des propriétés très hétérogènes pour assurer différentes fonctions cruciales au sein du système nerveux. On peut les séparer en deux grandes catégories : les cellules microgliales et les cellules macrogliales.

Les cellules microgliales assurent essentiellement une fonction de surveillance immunitaire au niveau du SNC, ainsi que de réparation et de phagocytose en cas de lésion. Les cellules macrogliales comprennent d'une part les cellules myélinisantes (oligodendrocytes au SNC et cellules de Schwann en périphérie) qui vont former la gaine de myéline enroulant l'axone des neurones, afin de faciliter la conduction nerveuse. Puis les cellules macrogliales non-myélinisantes comprennent, entre autres, les astrocytes au SNC et les cellules de Schwann périssynaptiques en périphérie qui sont toutes les deux des cellules associées à la synapse et impliquées dans plusieurs fonctions, dont le développement, le maintien et la fonction

synaptique (Auld and Robitaille, 2003). Les astrocytes vont aussi réguler l'homéostasie des ions extracellulaires, ils vont former des contacts spécialisés sur les vaisseaux sanguins pour réguler le flux sanguin cérébral tout en assurant le maintien de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique, en plus de participer activement au métabolisme neuronal et à la réponse inflammatoire en cas de dommage cérébral (Chen and Swanson, 2003; Barres, 2008).

Plusieurs altérations gliales ont été observées avec l'âge telles qu'une activation pro-inflammatoire anormale des astrocytes et une fonction de surveillance altérée des cellules microgliales (Damani et al., 2011; Liddelow et al., 2017; Clarke et al., 2018). De plus, les déficits des fonctions neuroprotectrices des cellules gliales coïncident avec les déficits neuronaux lors du vieillissement (Chinta et al., 2013). Cela mène à se poser la question : les altérations de la fonction gliale peuvent-elles contribuer aux altérations neuronales, aux altérations synaptiques et conséquemment aux altérations fonctionnelles observées avec l'âge? L'objectif du présent mémoire sera d'éclaircir cette question.

1.1.2 Vieillesse neuromusculaire

L'affaiblissement du système neuromusculaire avec l'âge est un processus inévitable qui touche même les athlètes d'élite (Faulkner et al., 2008). Elle s'exprime par des déficits des capacités motrices telles qu'une difficulté à coordonner des mouvements, des mouvements plus lents, ainsi qu'une difficulté à maintenir une démarche adéquate et l'équilibre (Seidler et al., 2010). De plus, on perd graduellement en masse et en force musculaire surtout à partir de la cinquantaine. À partir de la septantaine, près de 1% de masse musculaire squelettique et près de 3% de la force musculaire sont perdues par année (Goodpaster et al., 2006). Cette perte de contrôle moteur et de force musculaire affecte sévèrement la mobilité des personnes âgées, en plus d'augmenter considérablement le risque de chute avec blessure des aînées et le risque de mortalité (Newman et al., 2006; Landi et al., 2012). Par conséquent, il est primordial de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'affaiblissement musculaire afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles qui permettront d'intervenir et d'améliorer la qualité de vie des personnes âgées. C'est pourquoi les prochaines sections porteront sur les altérations associées à l'âge et pouvant expliquer l'affaiblissement musculaire.

1.1.2.1 La sarcopénie et les changements au niveau du muscle squelettique

Les muscles squelettiques sont composés de milliers de fibres musculaires (Heckman and Enoka, 2012). Toutefois, ce nombre ainsi que la taille des fibres musculaires diminuent considérablement avec l'âge. Ces changements contribuent à la perte de masse musculaire associée au vieillissement et qui, lorsqu'elle est accompagnée d'une perte de fonction musculaire, est définie comme la sarcopénie (Nair, 2005). Cette perte de masse musculaire est-elle entièrement responsable de l'affaiblissement musculaire?

En fait, la perte de masse musculaire avec l'âge ne permet pas d'expliquer intégralement la perte de force musculaire (Goodpaster et al., 2006). En plus, un déclin de la force musculaire est observé avant une perte significative de masse musculaire et la force musculaire continue à décliner avec l'âge même lorsque la masse musculaire est maintenue stable par l'exercice (Hughes et al., 2001; Hepple and Rice, 2016). Ensemble, ces évidences suggèrent l'implication d'autres composantes dans l'affaiblissement musculaire. Par exemple, des altérations des fibres musculaires pouvant affecter la fonction contractile ont été identifiées, telles qu'une diminution de la synthèse des protéines musculaires et des altérations considérables des mitochondries (Nair, 2005). Néanmoins, une autre composante importante dans l'affaiblissement musculaire implique plutôt l'innervation musculaire (Gonzalez-Freire et al., 2014; Rudolf et al., 2014; Hepple and Rice, 2016).

1.1.2.2 Altération de l'unité motrice

Chacune des fibres musculaires est normalement innervée par la terminaison axonale d'un seul motoneurone et ce même motoneurone peut innerver plusieurs fibres musculaires (Heckman and Enoka, 2012). Ainsi, le motoneurone et les fibres musculaires qu'il innerve est appelé l'unité motrice (UM), de Liddell et Sherrington (1925). C'est l'unité de base du contrôle nerveux des muscles squelettiques. Lorsqu'un motoneurone génère un potentiel d'action, il active toutes les fibres musculaires qu'il innerve pour générer une force musculaire qui correspond à la force de l'UM. Ainsi lors d'une activité physique, la force musculaire générée par un muscle va dépendre du nombre d'UMs recrutées et de leur fréquence de décharge (Kandel, 2013). Ce recrutement des UMs va suivre un ordre particulier qui dépend essentiellement de la taille du corps cellulaire du motoneurone, où les petits motoneurones sont

recrutés en premier (Henneman, 1957). Cet ordre de recrutement prend tout son sens lorsqu'on considère l'hétérogénéité de propriétés physiologiques des UMs, qui peuvent être séparées en 3 groupes : les unités à contraction rapide et sensibles à la fatigue (RF); les unités à contraction rapide et résistantes à la fatigue (RR); les unités à contraction lente et résistante à la fatigue (LR) (Burke et al., 1973). Ainsi, les motoneurones de petite taille constituent les UMs lentes pour générer une faible force soutenue et inversement les UMs rapides sont recrutées plus tardivement pour générer une force plus importante, mais de courte durée. De plus, les propriétés contractiles de l'unité motrice sont associées aux propriétés des fibres musculaires, qu'on peut classer par histochimie selon le type de chaînes lourdes de myosine exprimées (I, IIa, IIb et IIx) (Heckman and Enoka, 2012). Les unités motrices RF sont associées aux fibres musculaires de type IIb et IIx, les unités RR vont être associées aux fibres de type IIa, alors que les unités motrices de type LR sont associées aux fibres lentes de type I.

Les UMs vont considérablement se remodeler lors du vieillissement. Notamment, le nombre d'UMs diminue avec l'âge et de manière très abrupte après la septantaine chez l'humain (Campbell et al., 1973; McNeil et al., 2005). Les fibres musculaires de type II (des UMs de type rapides) vont être les plus affectées (Einsiedel and Luff, 1992; Kung et al., 2014), alors les UMs restantes (souvent de type lentes) vont s'élargir, c'est-à-dire que les motoneurones vont innover encore plus de fibres musculaires et parfois des fibres de propriétés contractiles différentes (Deschenes, 2011). Au point de vue fonctionnel, ce remodelage des UMs est associé à une perte de stabilité motrice et de contrôle moteur. De plus, ce remodelage des UMs et surtout l'atteinte des UMs à contraction rapide, est directement lié à la perte de force musculaire observée chez les personnes âgées (Deschenes, 2011; Hepple and Rice, 2016). Ces changements de l'UM sont fortement attribués à l'instabilité de la jonction neuromusculaire (JNM) (Gonzalez-Freire et al., 2014; Hepple and Rice, 2016).

1.1.2.3 Hypothèse de la dégénération de la jonction neuromusculaire

La JNM est le contact synaptique entre le motoneurone spinal et la fibre musculaire. Ainsi, une atteinte importante de cet élément de communication neurone-muscle affecterait directement les capacités motrices. Or, plusieurs études ont observé un remodelage structurel important de la JNM et une maintenance du contact synaptique altérée lors du vieillissement, en

particulier plusieurs fibres musculaires n'étaient plus toutes innervées (Banker et al., 1983; Deschenes et al., 2010; Valdez et al., 2010; Chai et al., 2011). En plus, les mécanismes de réparation permettant de reformer le contact synaptique pour les fibres musculaires dénervées sont altérés avec l'âge (Deschenes, 2011; Kawabuchi et al., 2011; Kang and Lichtman, 2013). Ces changements synaptiques peuvent sous-tendre les altérations de l'UM. En effet, la dénervation fonctionnelle des fibres musculaires peut mener, de manière causale, à l'atrophie et la perte de fibre musculaire (Deschenes et al., 2010; Hepple and Rice, 2016), mais aussi à l'atteinte de l'intégrité du motoneurone. De plus, des changements de la JNM sont observés avant l'atrophie musculaire (Deschenes et al., 2010) et en absence de perte et d'atrophie des motoneurons spinaux (Chai et al., 2011).

Considérant que les altérations de la JNM précèdent et peuvent sous-tendre les altérations de l'UM et des capacités motrices, l'hypothèse d'une dégénération de la JNM a été proposée pour expliquer l'affaiblissement musculaire (Gonzalez-Freire et al., 2014; Rudolf et al., 2014). Ainsi, l'étude des altérations de la JNM semble cruciale pour comprendre les mécanismes sous-tendant l'affaiblissement musculaire et la sarcopénie. Pour le reste du chapitre, nous allons d'abord présenter intégralement la JNM (section 1.2) puis les changements qui surviennent à la JNM sénescence (section 3).

1.2 La jonction neuromusculaire

La JNM est une composante cruciale pour le contrôle moteur et l'exécution de mouvements volontaires puisqu'elle est la dernière connexion provenant du système nerveux permettant d'initier la contraction des muscles squelettiques. Située au niveau du système nerveux périphérique, la JNM est une synapse chimique reliant le motoneurone spinal et le muscle. Elle est composée de trois éléments essentiels : soit la terminaison axonale d'un motoneurone séparée par la fente synaptique d'une région spécialisée de la fibre musculaire nommée plaque motrice et des cellules gliales non-myélinisantes recouvrant la terminaison axonale nommées cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs).

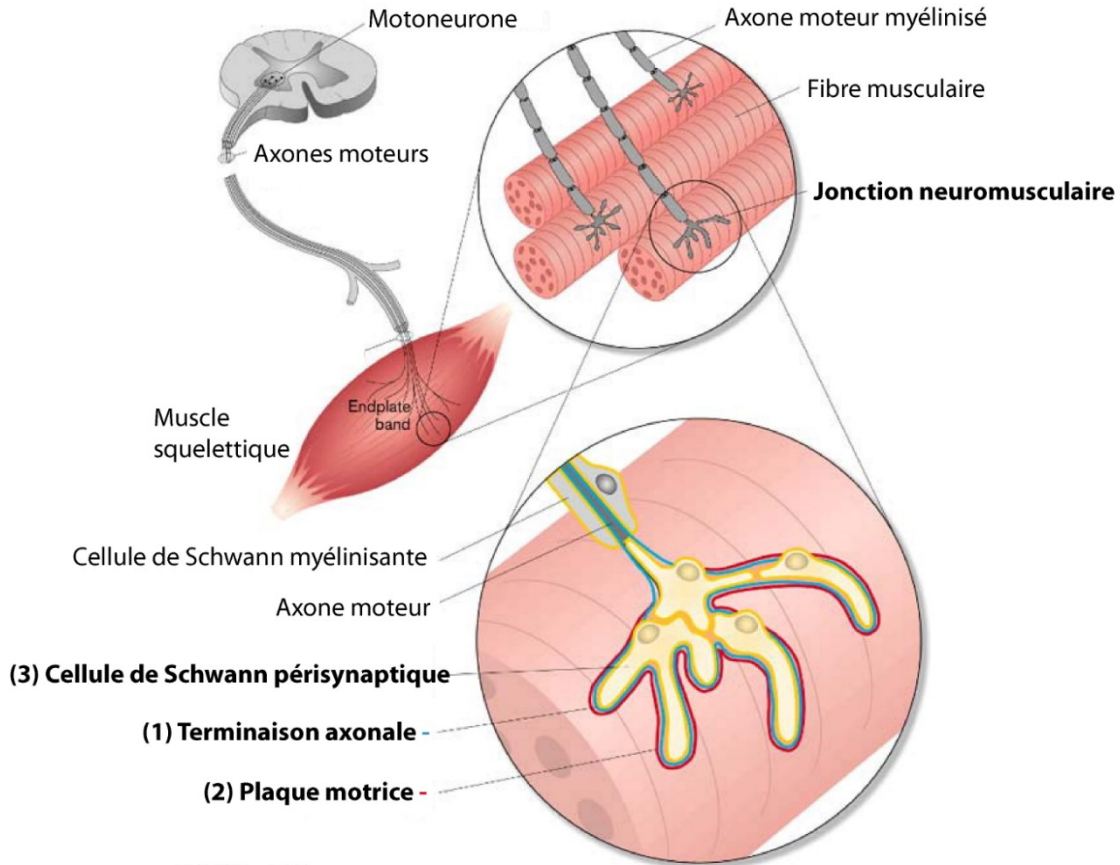


Figure 1.1. Le motoneurone- α projette son axone par la corne ventrale de la moelle épinière pour contacter plusieurs fibres musculaires. Adaptée de (Balice-Gordon, 1996) avec les droits d'auteur et de reproduction obtenues de Elsevier.

Le concept classique de la synapse implique la communication entre un élément présynaptique et postsynaptique. Toutefois, depuis les deux dernières décennies, une accumulation d'évidences, et tout particulièrement les travaux portant sur les CSPs, ont suggéré une participation active des cellules gliales dans la transmission synaptique et ont mené au concept de la 'synapse tripartite' (Araque et al., 1999; Auld and Robitaille, 2003). Ce dernier concept est fondamental pour comprendre de manière intégrative la JNM. Ainsi, dans cette présente section, nous aborderons en détail la terminaison axonale du motoneurone (élément présynaptique), la fente synaptique, la plaque motrice (élément postsynaptique) et la cellule de Schwann pérисynaptique (élément glial) de la JNM mature.

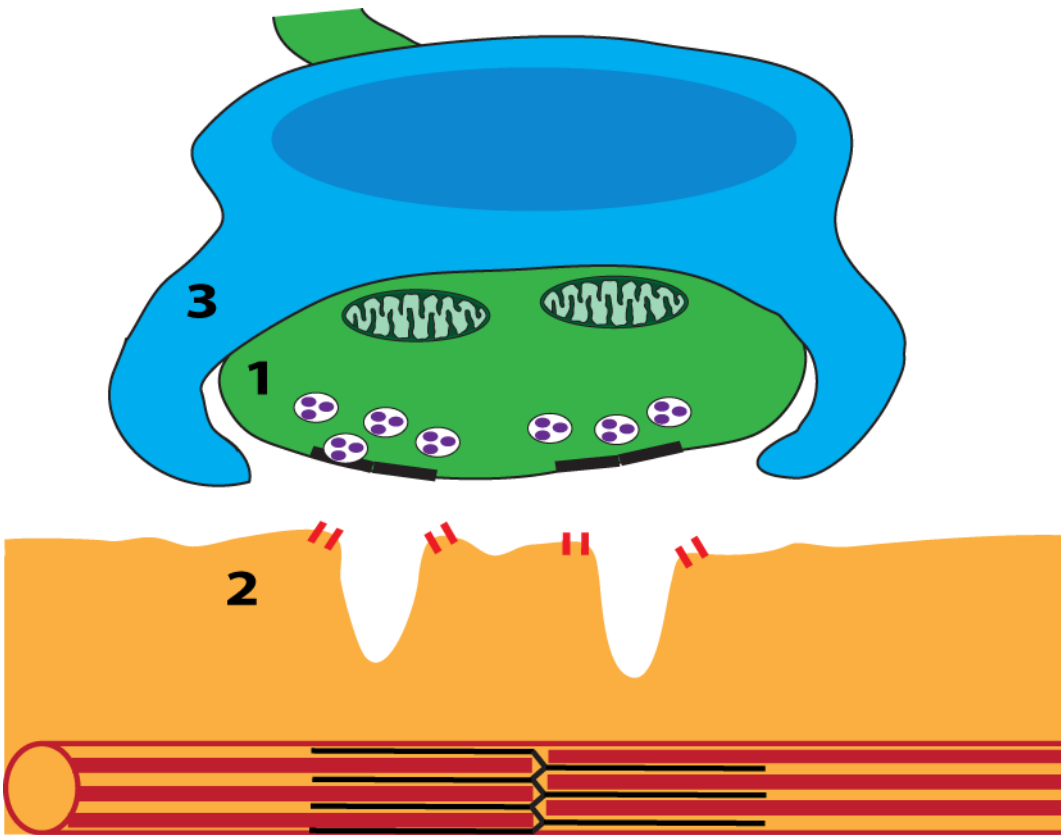


Figure 1.2. Schéma simplifié représentant une vue transverse de la JNM. On observe les trois éléments synaptiques soient la terminaison axonale (1), la plaque motrice (2) et la CSP (3).

1.2.1 L'élément présynaptique

La JNM est une structure hautement spécialisée qui permet le relai de l'information nerveuse vers l'élément musculaire. Notamment, l'axone du motoneurone se modifie structurellement pour contacter la fibre musculaire, en perdant sa couverture myélinisante et en formant plusieurs ramifications qui vont se juxtaposer à la plaque motrice. Ces fines terminaisons axonales constituent l'élément présynaptique de la JNM, pour lequel on distingue par microscopie électronique deux régions typiques : une région cytoplasmique riche en mitochondries, ainsi qu'une région dense en protéines membranaires et en vésicules synaptiques (Birks et al., 1960a; Couteaux and Pecot-Dechavassine, 1970). Ces régions sont parfaitement adaptées pour permettre la libération de molécules chimiques appelées neurotransmetteurs, le message neuronal, vers des récepteurs postsynaptiques présents sur le muscle, et ce, suite à l'arrivée d'un potentiel d'action du motoneurone. Plus précisément, la forte présence de mitochondries permet de répondre aux processus très énergivores de la libération de neurotransmetteurs, en plus de jouer un rôle dans l'homéostasie calcique (section 1.2.5.1.1) de l'élément présynaptique (David and Barrett, 2000). Puis, les mécanismes d'emmagasinement, de relâche et de recyclage des vésicules synaptiques contenant des neurotransmetteurs vont être hautement régulés par une machinerie complexe de protéines retrouvées dans la région dense en protéines membranaires et en vésicules synaptiques, afin de permettre une communication fiable (Slater, 2015).

1.2.1.1 La zone active

Les molécules d'acétylcholine (ACh), le principal neurotransmetteur de la JNM, sont empaquetés dans des vésicules synaptiques au niveau de l'élément présynaptique et ces vésicules synaptiques sont libérées par exocytose spécifiquement au niveau de régions membranaires denses en électrons appelées zones actives (ZAs) (Couteaux and Pecot-Dechavassine, 1970; Zefirov et al., 1995). La principale fonction de la ZA est d'enclencher les processus calcium-dépendants de la libération de neurotransmetteurs à l'arrivée d'un potentiel d'action (Sudhof, 2012). Ainsi, on retrouve une densité importante de canaux calciques dépendants du voltage à la ZA, qui vont être organisés en deux rangées parallèles et vont précisément faire face aux récepteurs postsynaptiques (Robitaille et al., 1990; Nishimune,

2012). Cette organisation particulière des éléments de la ZA est en partie possible grâce à des protéines d'échafaudages telles que Bassoon et Piccolo (Gundelfinger et al., 2015). Au niveau cytoplasmique et à proximité de la ZA, on retrouve un regroupement de vésicules synaptiques remplies de neurotransmetteurs, dont quelques-unes directement attachées sur la ZA par des protéines d'échafaudages et prêtes à être larguées.

Une panoplie de protéines membranaires et vésiculaires est impliquée dans les processus d'exocytose des vésicules synaptiques. On notera la protéine vésiculaire synaptobrevine en complément avec les protéines de la terminaison axonale syntaxine et SNAP-25, qui vont former le complexe de protéines SNARE (de l'anglais, *Soluble NSF Attachment Protein REceptor*). Ce complexe prépare les vésicules synaptiques avant leur largage dans la fente synaptique, en plus de participer au processus d'exocytose (Slater, 2015). Une autre protéine vésiculaire, la synaptotagmine, comporte des domaines de liaison pour le calcium (Ca^{2+}) et cette protéine s'associe avec le complexe SNARE pour médier le processus d'exocytose en présence de Ca^{2+} .

Cette relation de proximité au niveau de la ZA entre les différentes protéines de la machinerie d'exocytose, les canaux calciques voltage-dépendants et les vésicules synaptiques est primordiale pour permettre à l'élément présynaptique de libérer des neurotransmetteurs de manière rapide et fiable. En effet, l'arrivée d'un potentiel d'action du motoneurone à l'élément présynaptique permet l'entrée locale de Ca^{2+} , stratégiquement localisée pour déclencher fidèlement les processus d'exocytose calcium-dépendant, et ce, de manière très rapide ($< 1\text{ms}$) et synchrone au niveau des ZAs (Slater, 2015).

1.2.1.2 L'exocytose des vésicules synaptiques

Pour résumer les mécanismes menant à la libération de neurotransmetteurs, (1) la dépolarisation du motoneurone peut générer un potentiel d'action qui se propage jusqu'aux terminaisons axonales. (2) Cette dépolarisation présynaptique active des canaux calciques dépendants du voltage de type Cav 2, afin de permettre une entrée de Ca^{2+} localisée au niveau des ZAs (Robitaille et al., 1990; Urbano et al., 2003). (3) Cette entrée calcique va agir sur la synaptotagmine associée au complexe SNARE, qui lorsque liée au Ca^{2+} entraîne la fusion des

vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique. (4) La fusion mène ultimement au relâchement des neurotransmetteurs.

À la JNM, chaque vésicule synaptique contient environ 5000 à 10 000 molécules d'ACh, ainsi que des molécules d'adénosine triphosphate (ATP) qui vont être toutes les deux relâchées dans la fente synaptique (Kuffler and Yoshikami, 1975; Silinsky and Redman, 1996; Slater, 2015).

1.2.1.3 La libération quantique

Del Castillo et Katz ont proposé que la libération de neurotransmetteurs soit une libération quantique, c'est-à-dire que le nombre de neurotransmetteurs relâché à la ZA est un multiple de la plus petite libération de neurotransmetteurs possibles, aussi nommée "quantum" (Del Castillo and Katz, 1954). Ce quantum correspondrait à la libération du contenu en neurotransmetteurs d'une seule vésicule synaptique. En effet, leurs travaux pionniers ont été réalisés sur la JNM de grenouille où ils ont observé des réponses postsynaptiques de très faible amplitude qu'ils ont nommée potentiel de plaque motrice miniature (PPMm). Les PPMms surviennent de manière spontanée (en absence de potentiel d'action) et ils correspondent à une libération non synchronisée de vésicules synaptiques. Alors que la libération évoquée par l'arrivée d'un potentiel d'action du motoneurone implique plutôt l'entrée locale de Ca^{2+} au niveau des ZAs, ce qui permet la synchronisation des processus d'exocytose des vésicules synaptiques et une libération importante de neurotransmetteurs pour produire une réponse postsynaptique appelée potentiel de plaque motrice (PPM) (Del Castillo and Katz, 1954; Slater, 2015). Le PPM (décrit particulièrement à la section 1.2.3.1) correspond à la libération d'un multiple entier de quanta ou vésicules synaptiques (près de 20 à 200 pour le vertébré) et ce nombre de vésicules synaptiques relâchées est défini comme le contenu quantique (Slater, 2015).

1.2.1.4 Les récepteurs présynaptiques

Des récepteurs sont aussi présents sur l'élément présynaptique et leur activation peut généralement influencer la probabilité de relâche des vésicules synaptiques. Ces récepteurs sont appelés autorécepteurs lorsqu'ils répondent aux molécules relâchées par l'élément

présynaptique. Notamment, à la JNM, on retrouve des autorécepteurs qui vont répondre à l'ACh ou aux purines (ATP ou adénosine) pour augmenter ou diminuer la transmission synaptique. Nous verrons plus tard que plusieurs autres mécanismes vont aussi réguler la transmission synaptique et ils seront particulièrement décrits dans la section 1.2.5 de la plasticité synaptique.

Parmi les autorécepteurs qui répondent à l'ACh, les récepteurs de type muscarinique M1 et M2 sont respectivement impliqués dans l'augmentation et l'inhibition de l'activité synaptique dont les effecteurs sont les canaux calciques Cav 2.1 (Santafe et al., 2003). Une autre étude suggère que les récepteurs M2 soient aussi essentiels dans la maintenance de la structure synaptique (Wright et al., 2009). Étonnamment, cette même étude propose que la terminaison axonale n'exprime que le récepteur de type M2, alors que le récepteur M1 serait plutôt exprimé par l'élément musculaire et les cellules de Schwann pérисynaptiques (Wright et al., 2009).

Des autorécepteurs aux purines sont aussi présents sur l'élément présynaptique, notamment les récepteurs présynaptiques à l'adénosine A₁ et A_{2A} (Garcia et al., 2013). En effet, l'ATP relâchée est convertie en adénosine par des ectonucléotidases et peut agir sur des récepteurs A_{2A} pour induire une augmentation de la transmission synaptique et/ou sur les récepteurs A₁ pour diminuer la transmission synaptique (Correia-de-Sa et al., 1996; Todd and Robitaille, 2006; Pousinha et al., 2012). De plus, des récepteurs sensibles à l'ATP de type P_{2X7} sont présents sur la terminaison axonale et leur activation augmente la transmission synaptique (Moores et al., 2005; Todd and Robitaille, 2006).

1.2.2 La fente synaptique

La terminaison axonale du motoneurone et la plaque motrice sont séparées par un espace d'environ 50 nm qu'on appelle la fente synaptique et où sont libérés les neurotransmetteurs. La fente synaptique est composée d'une matrice extracellulaire de protéines qui forment la lame basale, entre autres le collagène, la fibronectine et la laminine (Nishimune and Shigemoto, 2018). Cette matrice de protéines joue des fonctions essentielles dans l'organisation et le maintien du contact synaptique (Nishimune and Shigemoto, 2018). Par exemple, la laminine β 2 est essentielle pour la formation du contact pré-postsynaptique et une infiltration anormale de prolongements gliaux dans la fente synaptique par les CSPs est observée chez des souris mutantes β 2^{-/-} (Patton et al., 1998; Rogers and Nishimune, 2017).

Outre le rôle de maintenance synaptique de la lame basale, la fente synaptique dispose également de propriétés essentielles pour assurer une transmission synaptique efficace. Effectivement, on retrouve une riche concentration d'acétylcholinestérase liée au collagène de la lame basale, une puissante enzyme qui catalyse l'hydrolyse des molécules d'ACh en acétate et en choline (Colovic et al., 2013; Slater, 2015). Étant donné que les molécules d'ACh doivent diffuser à travers la fente synaptique pour atteindre l'élément postsynaptique, la principale fonction de l'acétylcholinestérase est de mettre fin, et de manière rapide, à la transmission synaptique. Cette propriété permet de préserver la nature du message transmis par l'élément présynaptique.

1.2.3 L'élément postsynaptique

L'élément postsynaptique de la JNM est responsable de traduire le message neuronal pour initier la cascade de la contraction musculaire. Il correspond à la plaque motrice, une région spécialisée de la fibre musculaire qui a la forme d'un "bretzel" chez le modèle murin. La plaque motrice n'occupe qu'une infime partie de la fibre musculaire (environ 0.1%) et sa taille corrèle normalement avec celle de la fibre musculaire (Kuno et al., 1971; Balice-Gordon et al., 1990; Liu and Chakkalakal, 2018). La plaque motrice est structurellement caractérisée par des invaginations de la fibre musculaire formant des replis jonctionnels dont la crête est fortement concentrée en récepteurs à l'ACh de type nicotinique (nAChRs), alors que les creux sont riches en canaux sodiques voltage-dépendants (Sanes and Lichtman, 1999; Nishimune and Shigemoto, 2018). Tout comme pour la ZA, l'organisation des nAChRs est hautement régulée par une panoplie de protéines d'ancrage, de protéines d'échafaudage et de protéines de signalisation afin d'assurer une communication rapide et fiable (Hughes et al., 2006).

1.2.3.1 Les récepteurs nicotiques et la réponse postsynaptique

Les molécules d'ACh relâchées par l'élément présynaptique diffuse dans la fente synaptique et se lie aux nAChRs. Les nAChRs sont des récepteurs ionotropes perméables aux ions Na^+ et K^+ lorsque liée à l'ACh (agoniste endogène), mais aussi en présence de nicotine (un agoniste exogène). Ainsi, l'ACh entraîne leur ouverture par un changement de conformation, puis il s'ensuit un influx important d'ions sodiques et une dépolarisation de la membrane

postsynaptique. Cette dépolarisation membranaire est très importante lors d'une libération synchronisée de neurotransmetteurs (évoquée par un potentiel d'action) et elle correspond à la réponse postsynaptique qu'on appelle aussi PPM. Outre les concentrations ioniques, le PPM est essentiellement influencé par le nombre de récepteurs nicotiques "activés" en même temps. Par conséquent, le PPM sera fortement influencé par le nombre de neurotransmetteurs relâchés, le nombre de nAChRs, l'activité de l'acétylcholinestérase, mais aussi de manière importante par le lien de proximité entre la libération des neurotransmetteurs et les récepteurs postsynaptiques.

De plus, le PPM est généralement beaucoup plus important que ce qui est nécessaire pour activer les canaux sodiques voltage-dépendants situés au creux des replis et initier la cascade de contraction musculaire. En effet, le facteur de sécurité, qui correspond à la mesure de l'excès de neurotransmetteurs libérés, est très élevé pour la JNM de mammifère adulte (~ 3 à 5 fois ce qui est nécessaire) (Wood and Slater, 2001). Cette propriété de sureté est essentielle pour le contrôle moteur puisqu'elle assure une fidélité de transmission synaptique où chaque potentiel d'action du motoneurone induit un potentiel d'action musculaire, et jusqu'à un certain point même lors de bouffées d'activités du motoneurone (Heckman and Enoka, 2012).

1.2.3.2 La contraction musculaire

L'aboutissement de la transmission synaptique à la JNM est d'initier la cascade de contraction de la fibre musculaire. On peut résumer cette cascade comme suit : le PPM active les canaux sodiques voltage-dépendant retrouvés dans le creux des replis; ce qui enclenche un potentiel d'action se propageant à travers la fibre musculaire et atteignant les tubules transverses riches en canaux calciques voltage-dépendants; cela provoque l'ouverture des canaux et l'entrée de Ca^{2+} ; ce qui va activer des récepteurs à la ryanodine sur le réticulum sarcoplasmique, responsable de son ouverture et de la relâche importante de Ca^{2+} qui se lie et modifie le complexe tropomyosine/actine afin d'exposer la myosine au filament d'actine; le groupement de l'adénosine diphosphate et du phosphate inorganique initialement liés à la myosine sont relâchés et produit le glissement des filaments d'actine ce qui induit la contraction musculaire (Liu and Chakkalal, 2018).

1.2.4 L'élément glial : la cellule de Schwann périssynaptique

Les CSPs sont des cellules gliales dont les prolongements recouvrent intimement la terminaison axonale du motoneurone (Birks et al., 1960a) et l'étendue de la JNM (Ko and Robitaille, 2015). On retrouve environ 3 à 5 CSPs à la JNM de mammifères ou de grenouille et ce nombre semble positivement corrélérer avec la taille de la plaque motrice (Love and Thompson, 1998; Lubischer and Bebinger, 1999; Ko and Robitaille, 2015). Par définition, les CSPs ne forment pas de myéline et ne sont pas présentes sur l'axone comme les cellules de Schwann myélinisantes. Ces cellules gliales vont plutôt adopter des propriétés et des fonctions adaptées à leur environnement, la synapse (Ko and Robitaille, 2015). Les CSPs, présentes à la JNM depuis le stade embryonnaire (Barik et al., 2016), persistent encore chez l'animal âgé et sont également préservées chez les amphibiens et chez les mammifères, dont l'humain. Ainsi, quels rôles importants jouent ces cellules gliales à l'intégrité de la synapse neuromusculaire pour être aussi bien conservées? J'aborderai dans les sections qui suivent l'origine des CSPs, leurs localisations stratégiques, ainsi que leurs propriétés et leurs fonctions multiples qui font de ces cellules un partenaire actif de la synapse tripartite qu'est la JNM.

1.2.4.1 Origine embryonnaire des CSPs

L'origine des CSPs n'a pas été aussi bien documentée que celles des cellules de Schwann myélinisantes, mais il est suggéré que tous les types de cellules de Schwann dérivent de la crête neuronale (Jessen and Mirsky, 2005). Pendant la formation de la JNM, des cellules précurseuses des CSPs migrent conjointement avec la terminaison axonale et prolifèrent à la synapse pendant la maturation de la JNM pour former des CSPs (Love and Thompson, 1998). Certaines cellules maintiendraient une capacité de prolifération, et ce, même à la JNM adulte où une prolifération a été observée en réponse à la réinnervation du contact synaptique (Love and Thompson, 1998).

1.2.4.2 Structure et localisation stratégique

Les CSPs s'accolent sur la terminaison axonale avec des fins prolongements gliaux qui l'embrasse presque complètement en laissant l'espace synaptique libre et sans contacter la fibre musculaire (Birks et al., 1960a). À la JNM de grenouille, les CSPs vont aussi présenter des protrusions, un peu comme des "doigts", qui s'intercalent au niveau de la fente synaptique à

proximité de l'élément présynaptique et postsynaptique (Birks et al., 1960a). Ainsi, les prolongements gliaux des CSPs sont positionnés dans une région "extra-synaptique" (voir Figure 1.3), sans obstruer la transmission synaptique et en excellente position pour détecter la libération de neurotransmetteurs.

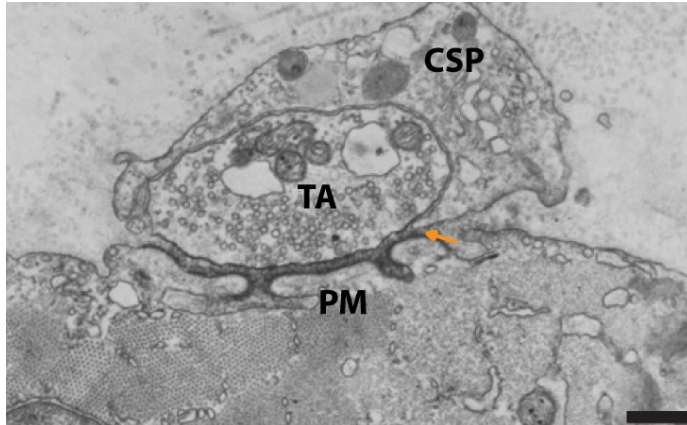


Figure 1.3. Micrographe électronique d'une JNM de grenouille. On observe l'organisation particulière de la CSP avec la terminaison axonale (TA) et la plaque motrice (PM). Noter le prolongement glial (flèche orange) à proximité des régions de communication synaptique. Échelle =

500 nm. Figure adaptée et modifiée de (Burden et al., 1979) avec les droits de reproduction à des fins non commerciales conformément à la licence Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0).

1.2.4.3 Détection de l'activité synaptique

Pour être considérées comme un partenaire actif de la synapse, les cellules gliales doivent être en mesure de détecter l'activité synaptique et en retour pouvoir la moduler. À la JNM, les CSPs vont présenter plusieurs propriétés fonctionnelles leur permettant de détecter et de décoder l'activité synaptique.

1.2.4.3.1 Récepteurs gliaux

Notamment pour être en mesure d'interagir avec l'environnement synaptique, on s'attendrait à retrouver sur les CSPs des récepteurs sensibles spécialement aux molécules relâchées pendant la communication synaptique de la JNM.

C'est effectivement le cas puisqu'on retrouve des récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique présents sur les CSPs (Georgiou et al., 1999) et plus précisément les récepteurs de sous-type M1, M3 et M5 (Wright et al., 2009). En contrepartie, l'ATP relâché par la terminaison axonale est détectée par les récepteurs purinergiques P₂X et P₂Y des CSPs, ainsi

que des récepteurs A1 gliales lorsqu'hydrolysé en adénosine (Robitaille, 1995; Rochon et al., 2001). On retrouve aussi des récepteurs peptidiques sur les CSPs, du moins à la JNM de grenouille, on retrouve un récepteur similaire au NK-1 puisqu'elles sont sensibles à des neuromodulateurs telle que la substance P (Bourque and Robitaille, 1998). Des récepteurs pour les neurotrophines, des molécules modulatrices de la fonction et la survie neuronale, sont aussi présents sur les CSPs (Todd et al., 2007). En somme, ces récepteurs gliaux, de la même manière pour les astrocytes au SNC, sont en grande partie des récepteurs métabotropes (Araque et al., 2014; Ko and Robitaille, 2015). Ces récepteurs gliaux sont en général d'une grande affinité pour leur ligand puisqu'ils permettent d'enclencher une réponse amplifiée avec seulement une faible concentration de neurotransmetteurs (Araque et al., 2014).

1.2.4.3.2 Excitabilité gliale

Les cellules gliales présentent des propriétés particulières d'excitabilité, différentes des cellules neuronales. L'activité des cellules gliales associées à la synapse ne dépend pas de propriétés électriques comme les neurones et elles n'ont pas la capacité d'évoquer des potentiels d'action. Plutôt, l'excitabilité des cellules gliales est essentiellement reflétée par leur activité calcique et les processus gliaux vont en partie dépendre de mécanismes biochimiques Ca^{2+} -dépendants (Araque et al., 2014; Ko and Robitaille, 2015). Ainsi, l'activation des récepteurs gliaux est souvent reflétée par l'activité calcique gliale.

1.2.4.3.3 Détection de l'activité synaptique

Nous avons précédemment vu que les fins prolongements gliaux sont stratégiquement localisés près de la région synaptique, en plus d'être dotées d'une gamme de récepteurs sensibles aux molécules synaptiques. Ces propriétés vont permettre à la CSP de détecter l'activité synaptique qui sera reflétée par leur excitabilité calcique. En effet, les progrès technologiques sur les indicateurs calciques ont permis des avancées importantes sur les interactions neurone-glie (Ko and Robitaille, 2015), dont plusieurs pionnières sur les CSPs ont été réalisées dans le laboratoire du Dr. Charlton Milton. Notamment, ils ont découvert que les CSPs répondent à une forte activité synaptique par une élévation calcique (Jahromi et al., 1992). Cette élévation calcique est abolie lorsque la transmission synaptique est bloquée; elle peut être mimée par l'application locale de molécules sécrétées par la terminaison axonale (ACh et ATP) et ne

dépend pas du Ca^{2+} extracellulaire (Jahromi et al., 1992). Ainsi, ces observations démontrent que les CSPs répondent à l'activité synaptique par une élévation calcique provenant des réserves internes et via l'activation principalement des récepteurs gliaux de type muscarinique et purinergique. Cette détection de l'activité synaptique par les récepteurs purinergiques et/ou muscariniques est commune à travers les CSPs de différentes espèces et elle a été observée pendant la formation de la JNM, à la JNM mature et même à la JNM sénescence (Ko and Robitaille, 2015).

Toutefois, quel mécanisme cellulaire est responsable de cette élévation calcique des CSPs lors de la détection de l'activité synaptique? En fait, on retrouve des récepteurs ionotropes P_2X sur les CSPs, qui lorsqu'activés vont permettre l'ouverture de canaux calciques de type $\text{CaV} 1.2$ (Robitaille, 1995). Cette entrée calcique ne constitue qu'une infime partie de la réponse calcique (Jahromi et al., 1992), mais il est suggéré qu'elle soit davantage sollicitée par les CSPs présentes sur des fibres à contraction lente (Rousse et al., 2010). L'élévation calcique serait plutôt médiée par des cascades de signalisation impliquant les protéines G, puisque les récepteurs gliaux sont principalement de type métabotrope et que l'élévation calcique des CSPs est très sensible à la toxine pertussique (Robitaille, 1998; Ko and Robitaille, 2015), une puissante toxine qui altère les protéines G_i (Mangmool and Kurose, 2011). Les mécanismes suggérés par Castonguay et Robitaille (2001) pour expliquer l'élévation calcique des CSPs sont illustrés à la Figure 1.4.

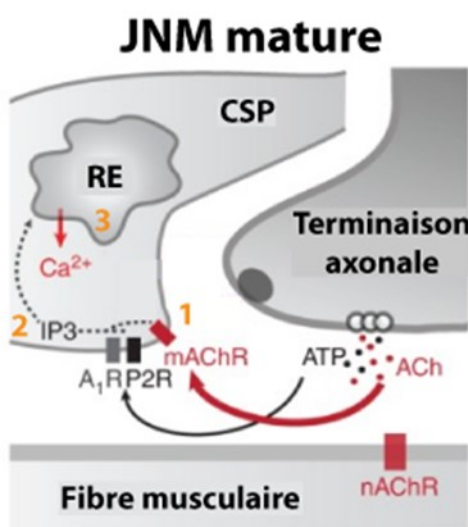


Figure 1.4. Mécanismes cellulaires de détection de la transmission synaptique par la CSP. 1, Une forte activité synaptique active les récepteurs métabotropes des CSPs. 2, Ceci enclenche la cascade des protéines G et mène à la production d'inositol triphosphate (IP_3) par la phospholipase C. 3, L' IP_3 se lie aux récepteurs à IP_3 sur le réticulum endoplasmique (RE) et permet la libération de Ca^{2+} au niveau cytoplasmique. Le Ca^{2+} libéré active des mécanismes gliaux calcium-dépendants tel que la libération de molécules par les CSPs et il est

éventuellement récupéré par des pompes Ca^{2+} -ATPase (Castonguay and Robitaille, 2001).
Figure adaptée de (Ko and Robitaille, 2015).

1.2.4.3.4 Décodage de l'activité synaptique

La fréquence de décharges des motoneurones et leur patron d'activation sont très variées, avec des bouffées d'activités d'environ quelques Hz à plus de 100 Hz, ce qui permet une variété de patrons d'activité synaptique (Slater, 2015). Ainsi, les CSPs arrivent-elles à décoder ces changements de patron d'activité afin d'interagir adéquatement selon le contexte synaptique? Les résultats obtenus par Todd et al. (2010) ont permis en partie de répondre à ces questions. Ils ont observé que différents paradigmes de stimulation entraînent différentes signatures de réponse calcique par les CSPs. Notamment, une stimulation continue du nerf moteur est associée à une seule grosse réponse calcique des CSPs, alors qu'une stimulation par bouffée du nerf moteur est associée à une réponse calcique des CSPs de plus petite taille et de forme oscillatoire. Ces observations suggèrent que les CSPs répondent différemment selon l'activité synaptique, donc qu'elles ont la capacité à décoder différents patrons d'activité synaptique (Todd et al., 2010).

1.2.4.4 Modulation de l'activité synaptique

Suivant la détection de l'activité synaptique, les cellules gliales vont en retour réguler l'activité synaptique. Cette participation active par les cellules gliales ajoute un niveau de processus additionnel au message synaptique.

1.2.4.4.1 Modulation de l'activité synaptique : implication gliale

On doit au laboratoire du Pr. Richard Robitaille la première observation d'une participation des CSPs dans la modulation de l'activité synaptique (Robitaille, 1998). Robitaille a développé une approche permettant de moduler l'activité gliale à la JNM de grenouille, en injectant spécifiquement dans les CSPs des molécules altérant l'activité des protéines G, afin d'influencer fortement l'activation des récepteurs gliaux et la cascade de détection de l'activité synaptique par les CSPs.

Une activation constitutive des protéines G des CSPs a produit une importante diminution de la transmission synaptique (près de 50% de changements) persistante sur plusieurs minutes. Cette observation montre qu'une activation des cellules gliales est suffisante pour influencer l'activité synaptique. Robitaille (1998) a ensuite démontré que cette activation gliale interagit avec l'élément présynaptique, en particulier sur les propriétés de libération des vésicules synaptiques, puisqu'aucun effet significatif n'a été observé sur les propriétés des événements spontanés de relâche. Ainsi, les CSPs ont la capacité de réguler l'activité synaptique, mais le font-elles de manière endogène? Robitaille (1998) a observé qu'une inhibition de l'activité gliale, par un analogue non hydrolysable du GDP, n'affecte pas la transmission synaptique basale, mais qu'elle affecte fortement un phénomène endogène de plasticité synaptique (décrit à la section 1.2.5) soit la dépression synaptique évoquée par un train de stimulation de l'innervation musculaire. Effectivement, l'abolition de l'activité gliale a réduit significativement cette dépression synaptique et l'activation constitutive des protéines G des CSPs a réduit ce phénomène de plasticité synaptique. Ainsi, les travaux de Robitaille ont démontré une participation active des CSPs au phénomène endogène de plasticité synaptique et ils ont contribué en grande partie à l'essence du concept de "synapse tripartite" (Auld and Robitaille, 2003).

Une approche similaire de manipulation gliale a été réalisée dans une autre étude, mais cette fois en altérant l'activité des CSPs à l'aide de chélateur calcique. Cette étude a démontré que l'abolition de l'activité calcique des CSPs augmente le phénomène de dépression synaptique, suggérant que les CSPs ont aussi la capacité de potentialiser la transmission synaptique (Castonguay and Robitaille, 2001). La différence observée entre ces deux études peut être expliquée par le mécanisme glial ciblé (Castonguay and Robitaille, 2001). En effet, Robitaille (1998) a ciblé l'activité des protéines G, qui englobent un grand spectre de processus gliaux et de mécanismes non Ca^{2+} -dépendant, alors que Castonguay (2001) n'a ciblé que les mécanismes Ca^{2+} -dépendants (Castonguay and Robitaille, 2001). Néanmoins, ces études ont révélé la capacité des CSPs à moduler la transmission synaptique de manière bidirectionnelle (à la hausse ou à la baisse). Cette capacité bidirectionnelle explique en partie les résultats d'une autre étude qui n'a pas observé de changement au niveau de la transmission basale et de la dépression synaptique quelques heures suivant l'ablation des CSPs (Reddy et al., 2003). Cette

dernière manipulation affectant la totalité des mécanismes gliaux altère probablement les mécanismes de modulation synaptique dans les deux directions opposées (à la hausse et à la baisse), ce qui pourrait compenser pour l'absence de la participation des CSPs.

Étant donné que les CSPs sont en mesure de décoder différents patrons d'activité synaptique, vont-elles pouvoir moduler l'activité synaptique de manière adaptative selon le contexte synaptique? Todd et al. (2010) ont observé que deux différents patrons d'activité synaptique sont associés à deux cinétiques différentes de réponses calciques des CSPs, mais aussi de manière importante à deux formes de plasticité synaptique opposées. Ils ont développé une approche en prenant avantage d'un chélateur calcique photoactivable par une lumière UV, afin d'induire ou d'abolir sélectivement l'élévation calcique des CSPs. Étonnamment, l'abolition de l'activité calcique des CSPs a renversé les phénomènes de plasticité synaptique induits par les patrons de stimulation où la potentialisation est devenue une dépression synaptique et vice-versa. Cette observation suggère que les CSPs décodent non seulement l'activité synaptique, mais que ces cellules gliales vont moduler différenciellement l'activité synaptique en fonction du contexte synaptique. Dans une autre série d'expériences, ils ont observé que la reproduction de l'élévation calcique au niveau des CSPs, en absence de patron de stimulation neuronale, était suffisante pour induire les différentes formes de plasticité synaptique. Cette activation gliale parvenait à occulter la plasticité synaptique induite par un patron de stimulation particulier (Todd et al., 2010). En somme, les travaux de Todd et al., (2010) ont démontré que la modulation de la transmission synaptique par les CSPs est bidirectionnelle et adaptative au contexte synaptique

1.2.4.4.2 Modulation de l'activité synaptique : effecteurs gliaux

Les CSPs ont la capacité de moduler l'activité synaptique et cette modulation semble cibler l'élément présynaptique (Robitaille, 1998). Ainsi, cette interaction neurone-glie devrait impliquer une libération de molécules par les CSPs pour influencer l'élément présynaptique. On appelle ces molécules des "gliotransmetteurs" et d'autres cellules gliales telles que les astrocytes libèrent aussi des gliotransmetteurs (Araque et al., 2014). Parmi les gliotransmetteurs identifiés chez les CSPs, on retrouve l'ATP, l'adénosine, le glutamate, la prostaglandine et le monoxyde d'azote (Ko and Robitaille, 2015).

Les gliotransmetteurs des CSPs vont médier certains phénomènes de plasticité synaptique par des effecteurs présynaptiques. En particulier, les purines (ATP et adénosine) ont été extensivement documentées pour leur importance au niveau des interactions neurone-glie dans le système nerveux central et l'implication des purines dans la modulation gliale par les CSPs a aussi été élégamment démontrée (Todd and Robitaille, 2006; Todd et al., 2010; Araque et al., 2014). En effet, Todd et al. (2010) ont démontré, par une approche d'activation gliale combinée à des outils pharmacologiques, que la plasticité synaptique médiée par les CSPs dépend principalement de l'activation des récepteurs présynaptiques à l'adénosine. Plus précisément, à la JNM de souris matures, la potentialisation synaptique est médiée par l'activation des récepteurs A_{2A} , alors que la dépression synaptique est médiée par l'activation des récepteurs A_1 (Todd et al., 2010). Ces récepteurs médient aussi la plasticité induite par des patrons de stimulation de la terminaison axonale et l'activation de ces récepteurs est bloquée lorsque l'activité calcique des CSPs est abolie.

1.2.4.4.3 Modulation de l'activité synaptique : Modèle de la régulation gliale

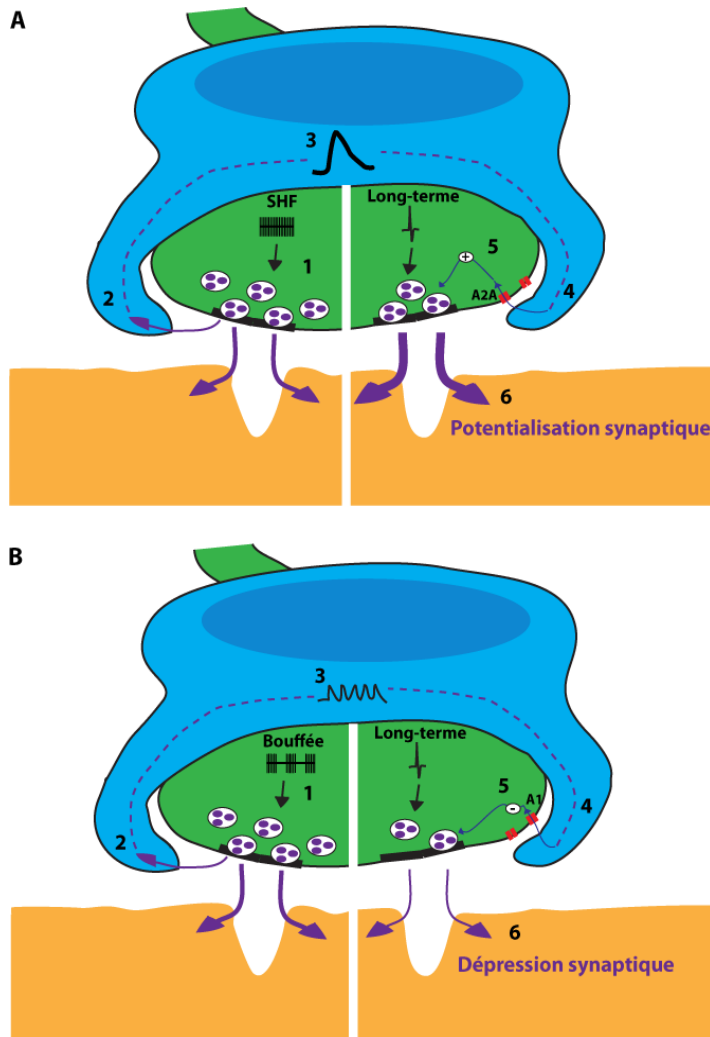


Figure 1.5. Modèle de la modulation bidirectionnelle gliale dépendante de la plasticité synaptique de (Todd et al., 2010). **A.** La libération de neurotransmetteurs évoquée par un patron de stimulation à haute fréquence (SHF) de l'axone moteur (1) est détectée par les récepteurs gliaux (2) qui répondent par une seule élévation calcique (3). Cela mène à la libération importante d'ATP gliale (4) qui est dégradée en adénosine. Cette grande quantité d'adénosine active des récepteurs présynaptiques A_{2A} médiant une augmentation de la probabilité de relâche de vésicules synaptiques (5) et à la potentialisation à long-terme de la transmission synaptique (6). **B.** La libération de neurotransmetteurs

évoquée par un patron de stimulation en bouffée de l'axone moteur (1) est détectée par les récepteurs gliaux (2) qui répondent par des élévations calciques de forme oscillatoire (3). Cela mène à une libération moins importante d'ATP gliale (4) qui est dégradée en adénosine. Cette plus faible quantité d'adénosine active préférentiellement les récepteurs présynaptiques A₁ médiant une diminution de la probabilité de relâche de vésicules synaptiques (5) et à une dépression synaptique à long-terme de la transmission synaptique (6).

1.2.4.5 Maintenance et réparation de la JNM

On retrouve une JNM pour chaque fibre musculaire de l'animal mature et ce contact synaptique doit être vigoureusement préservé durant toute la vie de l'animal. En effet, une fibre musculaire squelettique qui ne communique plus avec un motoneurone n'est plus fonctionnelle pour l'unité motrice et le contrôle moteur. Ainsi, nous verrons dans les prochaines sous-sections que les CSPs sont indispensables pour préserver la synapse neuromusculaire.

1.2.4.5.1 Maintenance de l'intégrité structurelle de la synapse

D'abord, plusieurs études ont observé une instabilité importante de la JNM en absence de CSPs. Notamment, une absence de cellules de Schwann a été observée dans un modèle de souris *ErbB2^{-/-}*, gène KO pour un récepteur à la neureguline-1 exprimé par tous les types de cellules de Schwann sans être exprimé par le motoneurone ou le muscle (Lin et al., 2000). Dans cette étude, la navigation de l'axone moteur pour contacter le muscle pendant la formation de la JNM était préservée, toutefois les contacts synaptiques formés étaient instables et l'animal perdait la vie à la naissance (Lin et al., 2000). Ces observations suggèrent que les cellules de Schwann (myélinisantes et/ou non myélinisantes) jouent fort possiblement un rôle dans le maintien du contact synaptique pendant la formation de la JNM.

Pour investiguer précisément l'implication des CSPs dans la structure et la fonction synaptique, Reddy et al. (2003) ont pris avantage de la JNM de grenouille pour lequel un anticorps spécifique à la CSP est connu, le mAb 2A12, et ils ont élégamment adapté la technique de lyse cellulaire médiée par un complément afin de sélectivement éliminer *in vivo* près de 90% des CSPs (Reddy et al., 2003). Quelques heures suivant l'ablation des CSPs à la JNM mature, la structure de l'élément pré- et postsynaptique n'était pas affectée. Une autre étude a aussi observé que l'ultrastructure de l'élément pré- et postsynaptique n'était pas affectée quelques heures après une ablation sélective des CSPs à la JNM de souris (Halstead et al., 2005). Toutefois une semaine suivant l'ablation, Reddy et al. (2003) ont observé davantage de rétraction axonale, un indicateur important de dégénération de la JNM, avec peu d'altérations de la plaque motrice. Par la suite, Reddy et al. (2003) ont évalué l'implication des CSPs au développement de la JNM. 11 jours suivants l'ablation des CSPs, ils ont observé un ralentissement de croissance de la JNM, une diminution significative de la formation de

nouvelles JNMs et une forte proportion (près de 50%) de rétraction partielle ou complète des terminaisons axonales. Ainsi, les CSPs jouent un rôle de maintenance à long-terme de l'intégrité structurelle du contact synaptique au cours du développement de la JNM et chez l'animal adulte (Reddy et al., 2003).

Les CSPs ne sont pas seulement impliquées dans la stabilité de la JNM, mais elles régulent aussi sa plasticité morphologique. En effet, la structure de la JNM de grenouille est très dynamique puisqu'elle se remodèle activement durant la vie adulte (Herrera et al., 1990) et il est suggéré que les CSPs participent à ce remodelage de la JNM (Ko and Robitaille, 2015).

1.2.4.5.2 Réparation

À l'opposé de la JNM de grenouille, la structure de la JNM de souris reste relativement stable pendant une grande partie de la vie adulte (Lichtman et al., 1987), mais ce contact synaptique peut temporairement être compromis par une lésion axonale (Son and Thompson, 1995) ou une lésion de la fibre musculaire (Rich and Lichtman, 1989). Notamment, une lésion axonale provoque initialement une rétraction de la terminaison axonale de la JNM, suivie généralement d'une réinnervation par plusieurs terminaisons axonales (polyinnervation), puis par un processus d'élimination des terminaisons supraliminaire où la terminaison axonale restante réinnerve précisément la même région initiale de la plaque motrice (Rich and Lichtman, 1989; Son and Thompson, 1995). Les CSPs vont intervenir à plusieurs étapes importantes de ce processus. D'abord, les CSPs participent à la rétraction de la terminaison axonale en agissant tout comme des phagocytes, en internalisant la terminaison en dégradation tout en conservant une proximité avec l'élément postsynaptique (Birks et al., 1960b; Duregotti et al., 2015). Les CSPs vont aussi participer activement au processus de réinnervation en élaborant des protrusions gliales en réponse à la dénervation de la JNM (Reynolds and Woolf, 1992) et ces protrusions s'interconnectent à d'autres JNMs pour former des 'ponts gliaux' afin d'initier et guider des prolongements axonaux sains vers le site de réinnervation (Son and Thompson, 1995). Ce phénomène de réinnervation se produit lors d'une dénervation partielle où plusieurs JNMs sont intacts, alors qu'une lésion totale de l'innervation d'un muscle affecte toutes les JNMs. Dans ce dernier cas, l'axone dénervé se régénère et il est guidé par les cellules de Schwann et particulièrement par les CSPs près de la JNM pour reformer un contact synaptique

avec la même fibre musculaire pré-lésionnelle (>90% du temps) (Nguyen et al., 2002; Kang et al., 2014). Tout bien considéré, cette capacité de réparation de la JNM est vitale pour maintenir le système neuromusculaire et on peut imaginer qu'une atteinte générale à l'un de ces processus autant gliaux qu'axonaux pourrait compromettre la récupération de la fonction motrice.

Comment les CSPs parviennent-elles à détecter la dénervation musculaire et à déclencher leurs processus de réparation? En fait, pendant et suivant la dénervation, l'activité synaptique diminue considérablement jusqu'à disparaître. Cette privation de l'activité synaptique est associée à une réduction de l'activation des récepteurs muscariniques gliaux et conséquemment à une expression à la hausse par les CSPs de la protéine acide fibrillaire gliale (de l'anglais, GFAP) (Georgiou et al., 1994; Georgiou et al., 1999). La GFAP est une protéine constituant les filaments intermédiaires et elle influence la motilité, la prolifération, l'extension de prolongements et la forme de la cellule gliale (Middeldorp and Hol, 2011). Son expression par les CSPs témoigne que la fonction gliale est orientée dans le but d'assurer une réparation efficace de la JNM (Ko and Robitaille, 2015). Ainsi, l'activité synaptique et particulièrement l'activation des récepteurs muscariniques gliaux vont être tributaires de l'activité réparatrice des CSPs et conséquemment de l'intégrité structurelle de la JNM.

Il est intéressant de mentionner que d'autres facteurs physiologiques liés à l'activité musculaire peuvent aussi influencer la fonction réparatrice des CSPs. Notamment, la stimulation musculaire augmente le nombre de prolongements gliaux formés, mais réduit grandement le nombre de pont gliaux formé par les CSPs en plus d'inhiber les prolongements axonaux de réinnervation (Love et al., 2003). Des résultats similaires ont aussi été observés pour des souris soumises à des exercices de courses, ce qui suggère que l'activité neuromusculaire altère aussi les processus des CSPs et la réinnervation (Tam and Gordon, 2003).

1.2.4.6 La plasticité fonctionnelles des CSPs

Pour assurer leurs multiples fonctions, les propriétés des CSPs sont aussi plastiques selon le contexte synaptique. Par exemple, Bélair et al. (2010) ont montré que l'inhibition de la transmission synaptique, à l'aide d'un blocage chronique des nAChRs, influence la sensibilité

des récepteurs gliaux muscariniques et les propriétés de la réponse calcique des CSPs évoquée par la stimulation de l'axone moteur.

De plus, certaines molécules vont moduler les propriétés des CSPs. Les neurotrophines sont connues pour être des modulateurs importants de la fonction synaptique, mais elles vont aussi moduler la sensibilité des récepteurs gliaux. Parmi celles-ci, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (en anglais, *BDNF*) et la neurotrophine-3 (NT-3) vont augmenter la réponse calcique des CSPs évoquée par la stimulation de l'axone moteur (Todd et al., 2007). Plus précisément, le *BDNF* amplifie la cascade des récepteurs purinergiques, alors que le NT-3 amplifie la cascade des récepteurs muscariniques. Outre les facteurs neurotrophiques, la substance P est un neuropeptide qui module les propriétés des CSPs (Bourque and Robitaille, 1998). Présent à la terminaison axonale de la JNM de grenouille (Matteoli et al., 1990), la substance P régule à la baisse la réponse calcique évoquée des CSPs en sensibilisant les récepteurs gliaux muscariniques (Bourque and Robitaille, 1998). En somme, les propriétés des CSPs sont plastiques par la modulation de leur signalisation purinergique/muscarinique pour s'adapter au contexte synaptique (Ko and Robitaille, 2015), mais elles vont aussi présenter différentes propriétés intrinsèques selon les propriétés de la synapse (Rousse et al., 2010).

1.2.5 La plasticité synaptique

Les premières études sur les propriétés synaptiques et de plasticité synaptique dérivent d'études extensives réalisées sur la JNM. En effet, cette synapse est dotée d'importante capacité d'adaptation et particulièrement au point de vue fonctionnel.

1.2.5.1 Phénomènes de plasticité synaptique

La transmission synaptique est un phénomène très dynamique et hautement régulé par les éléments présynaptique, postsynaptique et glial de la synapse. Par exemple, la quantité de neurotransmetteurs relâchée à l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau présynaptique peut varier activement au fil du temps. On appelle la variation de la transmission synaptique 'plasticité synaptique'. La plasticité synaptique est une propriété importante des synapses leur permettant de s'adapter dans le temps, souvent de manière activité-dépendante, par un renforcement (discuté dans la section 1.2.5.1.1) ou une dépression (discuté dans la section

1.2.5.1.2) de la transmission synaptique et elle peut prendre différentes formes qui peuvent être caractérisées selon leur déroulement temporel.

1.2.5.1.1 Renforcement synaptique

L'augmentation de la transmission synaptique ou renforcement synaptique implique différents termes et mécanismes dépendamment de leur déroulement temporel. Parmi les formes de renforcement synaptique, on distingue en ordre : la facilitation (dans les millisecondes), l'augmentation (quelques secondes), la potentialisation synaptique (30 secondes à quelques minutes) et la potentialisation à long-terme (plusieurs minutes à plusieurs jours).

La facilitation survient lorsque deux libérations évoquées de neurotransmetteurs sont séparées par un très court intervalle de l'ordre des millisecondes. Ainsi, davantage de neurotransmetteurs sont libérés pour la deuxième relâche en raison d'une présence de Ca^{2+} résiduel, ce qui augmente le niveau de Ca^{2+} présynaptique et conséquemment la probabilité de relâche de vésicules synaptiques (Katz and Miledi, 1968; Zucker and Regehr, 2002). L'augmentation et la potentialisation synaptique renforcent la synapse par des mécanismes similaires impliquant les processus de retrait du Ca^{2+} présynaptique résiduel et ces phénomènes de plasticité synaptique peuvent être générés suivant un train de stimulation présynaptique (Zucker and Regehr, 2002). L'un de ces mécanismes est associé au retrait du Ca^{2+} présynaptique réalisé par la pompe $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ et l'échangeur $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$. Lors d'une activité présynaptique importante, la concentration présynaptique de Na^+ et de Ca^{2+} est beaucoup plus importante, ce qui affecte le gradient sodique et l'efficacité de retrait du Ca^{2+} par l'échangeur. Cela mène à une présence prolongée de Ca^{2+} présynaptique et conséquemment à l'augmentation de la probabilité de relâche des vésicules synaptiques (Zucker and Regehr, 2002). Les mitochondries présynaptiques sont aussi impliquées dans l'augmentation et la potentialisation synaptique. Ces organelles vont participer au retrait du Ca^{2+} résiduel pendant une activité intense, mais elles vont par la suite libérer ce Ca^{2+} capturé, de manière prolongée, ce qui augmente la transmission synaptique (David and Barrett, 2000; Zucker and Regehr, 2002).

Toutes ces dernières formes de renforcement synaptique peuvent être regroupées dans la catégorie de plasticité synaptique à court-terme; elle est généralement médiée par la modulation des mécanismes de relâche des vésicules synaptiques et cible particulièrement les

mécanismes de régulation du Ca^{2+} présynaptique (Zucker and Regehr, 2002). Toutefois, il existe des potentialisations synaptiques à long-terme qui vont persister sur de très longues périodes (quelques heures à quelques jours). Bien que le Ca^{2+} joue aussi un rôle dans la plasticité à long-terme, cette forme de plasticité synaptique implique des mécanismes persistants telle que la modification de l'expression génique de certaines protéines synaptiques (Kandel, 2013).

1.2.5.1.2 Dépression synaptique

À l'opposé du renforcement synaptique, la dépression synaptique est la diminution de la transmission synaptique. La dépression synaptique survient pendant des trains d'activité prolongée de l'élément présynaptique et ne perdure que quelques secondes (Zucker and Regehr, 2002). La dépression synaptique est causée par la déplétion des réserves de vésicules synaptiques prêtes à être larguées. En effet, lors d'activité prolongée les processus de recyclage des vésicules synaptiques ne parviennent pas à compenser l'importante exocytose qui se produit. On peut aussi observer une forme de dépression synaptique avec un décours temporel plus important (plusieurs minutes) et elle serait en partie médiée par l'action de neuromodulateurs. Notamment, l'un de ces mécanismes d'action à la JNM de grenouille a été décortiqué par notre laboratoire et il se résume de la manière suivante : (1) du glutamate est relâché par la terminaison axonale du motoneurone lors de stimulation à haute fréquence; (2) qui active des récepteurs mGluR sur la fibre musculaire; (3) puis qui enclenche la production persistante de monoxyde d'azote (NO) par la protéine de synthèse de NO; (4) le NO diffuse vers l'élément présynaptique pour moduler à la baisse la probabilité de relâche des vésicules synaptiques (Thomas and Robitaille, 2001; Pinard and Robitaille, 2008). Un autre neuromodulateur, l'adénosine, est aussi impliqué dans la dépression synaptique persistante sur plusieurs minutes, dont celle médiée par les CSPs qui a été décrite précédemment à la section 1.2.4.4.2 (Thomas and Robitaille, 2001; Todd et al., 2010).

1.2.5.2 Médiateurs des phénomènes de plasticité synaptique

Plusieurs mécanismes intrinsèques ou extrinsèques vont médier les phénomènes de plasticité synaptique. D'abord, la plasticité synaptique de la JNM peut être médiée de manière autocrine et activité-dépendante, c'est-à-dire en fonction du patron et/ou historique de l'activité synaptique. Par exemple, l'exercice physique correspond à une augmentation importante de

l'activité neuromusculaire et il est associé à une augmentation du nombre de vésicules synaptiques relâchées à l'arrivée d'un potentiel d'action (Fahim, 1997). Une autre étude a montré qu'une stimulation chronique du nerf (activité chronique présynaptique) dans un modèle de grenouille est associée à une diminution de la transmission basale, une diminution des phénomènes de facilitation pairée et de dépression synaptique, tandis que l'augmentation synaptique suivant un train de stimuli à haute fréquence est plus importante (Belair et al., 2005). Une manipulation qui inhibe l'activité synaptique, par un blocage chronique des récepteurs nicotiniques, est plutôt associée à une diminution de plusieurs phénomènes de plasticité synaptique (Belair et al., 2010).

D'autre part, les modifications synaptiques peuvent également impliquer des interactions neurone-glie. Nous avons précédemment vu que les CSPs ont la capacité de moduler l'activité synaptique, à la hausse ou à la baisse, ce qui leur octroie un puissant contrôle sur l'efficacité synaptique et un rôle important dans les capacités d'adaptation de la JNM. En effet, plusieurs formes de plasticité synaptique à court-terme et long-terme sont médiées par ces cellules gliales. D'abord observées chez la grenouille, les CSPs peuvent influencer à la hausse ou à la baisse la dépression synaptique endogène évoquée par un train de stimulation de l'axone moteur (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001). Aussi observée chez la souris, les CSPs régulent la dépression synaptique endogène et la potentialisation synaptique endogène suivant deux patrons de stimulations différents de l'axone moteur (Todd et al., 2010). En surcroît, l'activation des mécanismes des CSPs (protéine G et/ou activité calcium-dépendante) est suffisante pour induire une dépression synaptique ou une potentialisation synaptique (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001; Todd et al., 2010).

Ainsi, les CSPs régulent une gamme de formes de plasticité synaptique et il est important de mentionner que l'ablation des CSPs induit à long-terme (plusieurs jours) un affaiblissement persistant de la transmission synaptique, suggérant une participation gliale dans la stabilité à long-terme de l'activité synaptique (Reddy et al., 2003). Les CSPs sont donc des régulateurs importants de l'activité synaptique et ces cellules gliales adaptent la transmission synaptique à la hausse ou à la baisse en fonction du contexte synaptique, toutefois qu'en est-il de cette régulation gliale dans un environnement synaptique altéré tel qu'observé lors du vieillissement normal non-pathologique?

1.3 La jonction neuromusculaire sénescence

Nous avons précédemment vu que les éléments présynaptique, postsynaptique et glial de la JNM sont hautement organisés et régulés dans le but de maintenir une transmission synaptique fiable pour le contrôle moteur. En plus, elle possède des mécanismes d'adaptation et de réparation importants pour préserver le plus possible l'efficacité de la JNM. Cependant, lors du vieillissement, on observe à la JNM des altérations des propriétés synaptiques et gliales, des altérations structurelles et même des phénomènes de dénervations fonctionnelles. Nous allons aborder en détail ces différentes altérations et tenter d'éclaircir les mécanismes qui peuvent les sous-tendre, puisqu'il est primordial de comprendre cette dégénération de la JNM qui est une cause majeure de l'affaiblissement neuromusculaire des personnes âgées (Jang and Van Remmen, 2011; Gonzalez-Freire et al., 2014).

1.3.1 Les changements structurels de la JNM

Des changements morphologiques de l'élément présynaptique et postsynaptique ont été extensivement reportés chez l'animal âgé (Fahim and Robbins, 1982; Rosenheimer, 1990; Valdez et al., 2010; Deschenes, 2011; Hepple and Rice, 2016), dont certains sont communs et phénotypiques de la JNM sénescence. Notamment pour l'élément présynaptique, on observe un amincissement de la terminaison axonale avec quelques régions anormalement gonflées et une augmentation du nombre d'embranchements. Quant à l'élément postsynaptique, les replis jonctionnels riches en nAChRs paraissent fragmentés en plusieurs petits îlots qui occupent une surface postsynaptique totale diminuée avec une moins grande densité en nAChRs. Ensemble, ces changements morphologiques vont contribuer à la dispersion du contact synaptique, mais très important, ils vont aussi être accompagnée d'une perte du couplage synaptique. En effet, certains îlots ou régions postsynaptiques vont être dépourvus d'innervation, un phénomène appelé dénervation partielle. Alors que certaines JNMs vont même paraître complètement dépourvues de leur innervation et ce phénomène est souvent observé plus tardivement dans le vieillissement (Valdez et al., 2010). Ces formes de dénervation partielle et complète vont directement compromettre le fonctionnement de la JNM. Toutefois, la relation entre ces changements morphologiques de la JNM sénescence et la perte du contact synaptique ne sont pas encore bien comprises (Deschenes, 2011; Hepple and Rice, 2016), mais quelques signes

morphologiques témoignent que des processus de réparation sont en cours chez l'animal âgé, probablement pour tenter de compenser l'instabilité du contact synaptique.

Effectivement, la terminaison axonale et les CSPs présentent parfois des prolongements à l'extérieur de la région synaptique (Valdez et al., 2010)(Krief et al., 2018; article du laboratoire en révision). Les prolongements gliaux sont des processus qui peuvent être enclenchés lorsque la fonction synaptique est altérée. Ainsi, ces prolongements peuvent permettre de former des ponts gliaux pour guider les prolongements axonaux vers la réinnervation de JNMs dégénérées. Une question importante se pose : comment se fait-il que certaines JNMs paraissent dénervées et dégénèrent alors que des mécanismes de réparation semblent persister chez l'animal âgé (Valdez et al., 2010; Jang and Van Remmen, 2011; Kang and Lichtman, 2013)? En fait, les altérations morphologiques reportées chez l'animal âgé sont en grande partie des observations à un temps précis d'un tissu fixé, alors que l'organisation et la réparation de la JNM sont des mécanismes relativement dynamiques (Rich and Lichtman, 1989; Kang and Lichtman, 2013).

Une telle question peut être répondue à l'aide d'imagerie *in vivo* des JNMs de l'animal à différents temps au cours de son vieillissement. C'est l'étude qui a été réalisée par (Balice-Gordon, 1997). Elle a observé qu'entre le 12^{ième} et le 18^{ième} mois de vie de la souris C57BL6 (un peu plus qu'à la moitié de sa longévité), les JNMs présentaient quelques altérations du contact synaptique, mais qui étaient fortement réparées et compensées. Toutefois, ces capacités de compensation étaient altérées après le 18^{ième} mois, puisque les JNMs renouvellement formées étaient moins stables et elles dégénéraient en l'espace de quelques semaines. Aussi, les JNMs semblaient beaucoup plus vulnérables à la dénervation. Entre le 24^{ième} et le 36^{ième} mois, les JNMs étaient en grande partie dénervées de manière partielle ou complète. Ainsi, les mécanismes de réparation dépendants des CSPs semblent altérés chez l'animal âgé puisqu'ils ne semblent plus être en mesure de compenser pour l'instabilité de la JNM. Nous aborderons plus en détails la fonction des CSPs avec l'âge dans une prochaine section (section 1.3.3.4).

Somme toute, tous ces changements morphologiques de la JNM couplée à l'instabilité du contact synaptique laissent présager une communication synaptique compromise.

1.3.2 Les altérations synaptiques

En considérant les atteintes structurelles de la JNM et la diminution de la densité de la ZA (Chen et al., 2012; Badawi and Nishimune, 2018), on s'attendrait à observer une diminution de la transmission synaptique. Plutôt, des études ont observé une augmentation de la taille des PPMs avec l'âge pour certains muscles, en grande partie associée à une augmentation du contenu quantique (Banker et al., 1983; Kelly and Robbins, 1983; Fahim, 1997). Cette libération plus importante de neurotransmetteurs a été proposée comme une forme de compensation qui survient avec l'âge. En effet, l'augmentation du contenu quantique semble corrélée avec la diminution du nombre de vésicules synaptiques, la diminution de la surface présynaptique et de dénervation partielle (Kelly and Robbins, 1983; Jang and Van Remmen, 2011). Malgré tout, l'amplitude du PPM diminue de manière plus importante chez l'animal âgé pour des stimulations répétées de l'axone moteur (Banker et al., 1983; Badawi and Nishimune, 2018). Donc, la neurotransmission chez l'âgée semble compenser pour de faible activité, mais elle se fatigue très rapidement lorsque les JNMs sont fortement activées telles que normalement observées durant un exercice musculaire demandant (Boyas and Guevel, 2011). De plus, des altérations des récepteurs présynaptiques ont aussi été observées. Notamment, l'activation des récepteurs à l'adénosine A_{2A} , associé au renforcement synaptique, est fortement diminuée avec l'âge, alors que l'activation des récepteurs à l'adénosine A_1 , associés à l'affaiblissement synaptique, est conservée (Pousinha et al., 2012).

En considérant le tout, la communication synaptique semble préservée, mais la JNM tend davantage à s'affaiblir et la neurotransmission se fatigue rapidement pour des activations répétées. Considérant l'impact que cela peut avoir sur la fonction motrice des personnes âgées, il est crucial d'identifier les mécanismes qui peuvent sous-tendre ces altérations de la communication synaptique, mais aussi les altérations morphologiques de la JNM.

1.3.3 Mécanismes sous-tendant la dégénérescence de la JNM sénescence

Quels mécanismes dépendants de l'âge sont responsables des altérations morphologiques et fonctionnelles de la JNM? Quelques pistes ont été proposées pour expliquer

ces altérations : les lésions des fibres musculaires, des altérations mitochondriales, des altérations des facteurs trophiques et des altérations de la régulation gliale.

1.3.3.1 Lésion des fibres musculaires

Lorsqu'une fibre musculaire dégénère, elle est régénérée ou remplacée par une autre fibre musculaire. Un indicateur important de ce phénomène est la présence de noyaux cellulaires au centre de la fibre, alors qu'ils sont normalement distribués spatialement en périphérie (Bruusgaard et al., 2003; Valdez et al., 2010). Ce phénomène de noyaux centralisés est observé 5 à 10 fois plus souvent chez l'animal âgé, suggérant que les lésions musculaires sont plus fréquentes avec l'âge et ne sont pas rares chez l'animal âgé (12-18% des fibres musculaires pour différents muscles de la jambe) (Valdez et al., 2010). Ce phénomène est important puisqu'il peut sous-tendre des changements morphologiques de la JNM. En effet, pendant la régénération de la fibre musculaire, la terminaison axonale se rétracte et un processus de réinnervation est enclenché (Rich and Lichtman, 1989). Une étude a montré qu'après la reformation du contact synaptique, la terminaison axonale présentait des changements morphologiques par rapport à sa structure initiale (Li and Thompson, 2011). Il est possible que ce remodelage présynaptique suivant la dégénération de la fibre musculaire explique celui observé chez l'animal âgé. En plus, une seule lésion musculaire lors du vieillissement est suffisante pour entraîner une fragmentation abrupte de la plaque motrice (Li et al., 2011). En somme, des lésions musculaires plus fréquentes avec l'âge sont une première piste pour expliquer le remodelage de la JNM sénescence.

1.3.3.2 Altérations des mitochondries

Les mitochondries sont une composante essentielle pour les besoins énergétiques des cellules, mais des mutations très fréquentes avec l'âge sont observées au niveau de l'ADN mitochondrial et celles-ci vont altérer leurs fonctions (Chan, 2006). Cela peut avoir un impact sur les fonctions cellulaires et particulière au niveau de la terminaison axonale où les mitochondries sont particulièrement importantes pour subvenir aux mécanismes très énergivores de la libération de neurotransmetteurs. Ces altérations mitochondriales vont aussi augmenter le niveau de dérivés réactifs à l'oxygène (de l'anglais, *ROS*), qui vont endommager

plusieurs composantes cellulaires (Chan, 2006) jusqu'à contribuer à la mort cellulaire. Ainsi, les altérations mitochondriales accompagnées des ROS peuvent toucher toutes les composantes cellulaires de la JNM et conséquemment compromettre la fonction de la JNM (Short et al., 2005; Jang and Van Remmen, 2011).

1.3.3.3 Altérations des facteurs trophiques et autres molécules de maintenance synaptique

Les interactions entre la terminaison axonale du motoneurone, la plaque motrice et les CSPs sont critiques pour le développement, le maintien et la survie de la synapse (Jang and Van Remmen, 2011), particulièrement par des échanges de facteurs trophiques. Par exemple, certaines neurotrophines tels que BDNF, NT-3 et NT-4 vont jouer un rôle important dans la maintenance des récepteurs nAChRs (Jang and Van Remmen, 2011). Un autre facteur trophique à la JNM, le GDNF, est un facteur de survie important pour le motoneurone (Henderson et al., 1994). Le GDNF peut aussi remodeler la structure synaptique avec des changements similaires à ceux observés chez l'animal âgé, en plus de promouvoir le maintien du contact synaptique (Gyorkos and Spitsbergen, 2014). L'implication des neurotrophines dans la dégénérescence de la JNM n'est pas encore bien comprise, mais les neurotrophines pourraient certainement être des candidates intéressantes (Balice-Gordon, 1997; Jang and Van Remmen, 2011).

D'autre part, l'agrine est un protéoglycane qui peut être secrété autant par la terminaison axonale que par les CSPs (Yang et al., 2001) et qui joue un rôle essentiel pour la formation de la JNM et le maintien du contact synaptique chez l'animal adulte (Samuel et al., 2012). Des altérations du clivage de l'agrine sont associées à la fragmentation de l'élément postsynaptique (Butikofer et al., 2011) et l'augmentation de l'expression de l'agrine dans un modèle de souris *Egr-1^{-/-}* entraîne des altérations fonctionnelles et morphologiques semblables à celles observées au cours du vieillissement (MacDonald et al., 2017).

Ces molécules qui promeuvent le maintien synaptique soulignent l'importance de la signalisation cellulaire entre les différents éléments de la JNM. Il est possible qu'avec l'âge plusieurs interactions à la JNM tripartite, y compris via les facteurs trophiques et d'autres molécules de maintenance, soient compromises de prime abord par des altérations intrinsèques

d'un des éléments cellulaires. Nous allons explorer les altérations de la CSP comme un candidat central dans la dégénération de la JNM.

1.3.3.4 Altération de la régulation synaptique par les CSPs

Les CSPs vont aussi présenter des changements morphologiques et fonctionnelles chez l'animal âgé. Notamment, le cytoplasme des CSPs paraît plus dense en débris cellulaires et leurs prolongements paraissent moins "fins" (Ludatscher et al., 1985). De plus, une récente étude de notre laboratoire (Krief et al., 2018; en révision) a révélé que la contribution des récepteurs gliaux muscariniques et purinergiques à la détection de l'activité synaptique était largement déséquilibrée avec une activation muscarinique diminuée. Ensemble, ces altérations gliales pourraient compromettre leur régulation synaptique.

En effet, les CSPs vont adapter leur régulation en fonction de l'environnement synaptique pour promouvoir la réparation de la JNM ou pour promouvoir la régulation de l'activité et la stabilité de la JNM (Ko and Robitaille, 2015). Or, plusieurs évidences nous laissent croire que les CSPs vont concentrer leur régulation dans la réparation de la JNM sénescence. D'abord, la présence de débris cellulaires dans les CSPs est un indicateur de processus de phagocytose, un phénomène commun lors de la réparation de la JNM (Duregotti et al., 2015). De plus, une diminution de la contribution muscarinique des CSPs est associée à une augmentation de leur expression de GFAP et à un phénotype de réparation de la JNM (Georgiou et al., 1999). En surcroît, des processus de réparation des JNMs ont été largement observés chez l'animal âgé (Balice-Gordon, 1997; Valdez et al., 2010)(Krief et al., 2018). Étonnamment, toutes ces évidences d'un phénotype de réparation de la JNM sénescence coïncident avec une instabilité du contact synaptique et à un affaiblissement de la fonction synaptique chez l'animal âgé (Jang and Van Remmen, 2011; Badawi and Nishimune, 2018). Dès lors, des altérations dans la régulation par les CSPs pourraient-elles contribuer aux altérations dans la maintenance et la fonction synaptique observées à la JNM sénescence et possiblement mener à sa dégénération?

Objectifs

Étant donné que les propriétés des CSPs sont altérées à des âges où l'intégrité de la JNM est compromise par des dénervations fonctionnelles plus fréquentes et des altérations de la fonction synaptique. Nous émettons l'hypothèse que les altérations synaptiques observées à la JNM sénescence sont en partie causées par une dysrégulation des CSPs (Figure 1.6).

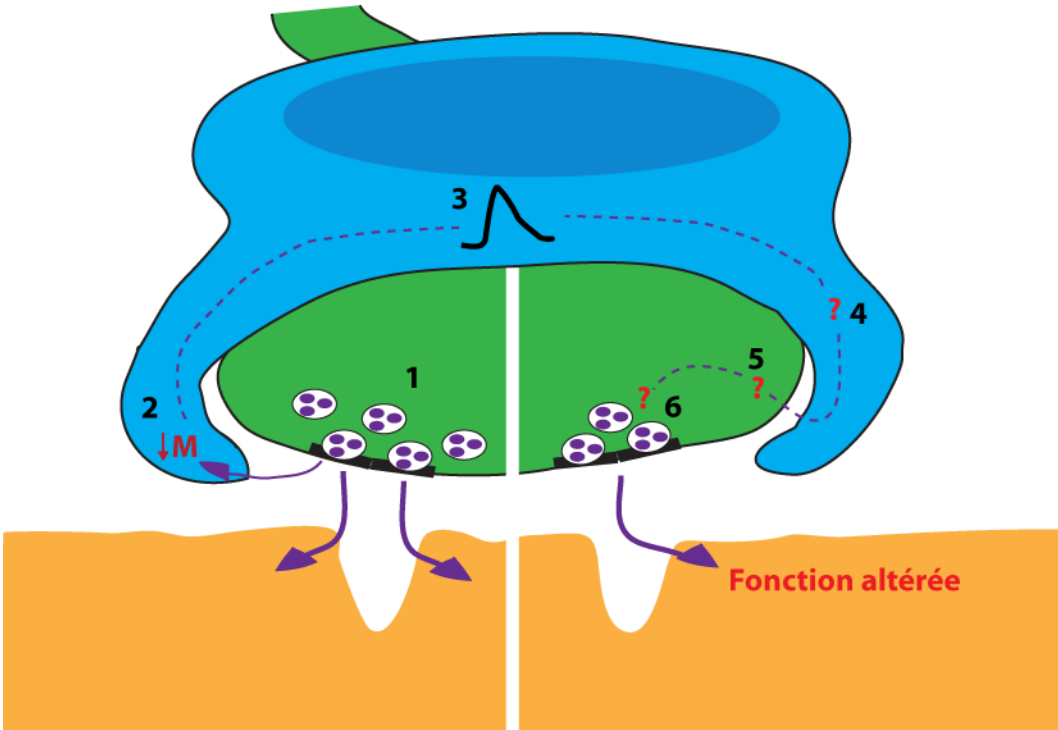


Figure 1.6. Hypothèse d'un dérèglement de la régulation gliale à la JNM sénescence. Une forte activité synaptique à la JNM âgée (1) active les récepteurs gliaux, avec une activation muscarinique (M) diminuée (2), et mène à une élévation calcique des CSPs (3) (Krief et al., 2018; en révision). Puis, cette activité calcique gliale est associée à un affaiblissement de la transmission synaptique (Krief et al., 2018; en révision). Nous avons donc émis l'hypothèse de travail que les CSPs régulaient, de manière calcium-dépendante, l'activité synaptique à la JNM sénescence (4) et l'affaiblissement de la transmission synaptique (6). De plus, cette régulation gliale à la JNM âgée serait médiée par les récepteurs présynaptiques à l'adénosine, puisqu'ils sont des effecteurs importants de la modulation gliale (Todd et al., 2010) et que des altérations de ces effecteurs ont déjà été reportées chez l'animal âgé (Pousinha et al., 2012).

Ainsi, les objectifs de notre étude étaient d'évaluer les changements des propriétés de la transmission synaptique lors du vieillissement normal et d'investiguer le rôle des CSPs dans ces altérations synaptiques. Pour ce faire, nous avons opté d'expérimenter uniquement des souris mâles pour éviter l'influence importante du sexe sur le vieillissement biologique (Austad and Fischer, 2016). Puis, notre modèle d'étude neuromusculaire a été le muscle de l'oreille *levator auris longus* (LAL) avec son innervation, puisque le LAL est un excellent modèle d'étude électrophysiologique (Angaut-Petit et al., 1987; Erzen et al., 2000) et qu'il ne devrait pas être directement sollicité lors de la locomotion de la souris. Nous avons d'autant plus validé ce modèle à l'aide de marquages immunohistochimiques des JNMs et de mesures de masses musculaires avec l'âge. Puis, nous avons essentiellement réalisé des enregistrements électrophysiologiques pour caractériser les propriétés de transmission et de plasticité synaptique. Ensuite, nous avons adapté une stratégie pour manipuler sélectivement l'activité calcique gliale afin d'identifier l'implication gliale dans les propriétés de transmission synaptiques de la JNM sénescence. Finalement, nous avons aussi voulu investiguer, à l'aide d'une approche pharmacologique, l'implication des récepteurs à l'adénosine dans les propriétés de la transmission et de plasticité synaptique dans un contexte de vieillissement.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Animaux

Toutes les expérimentations animales ont été approuvées par le comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) de l'Université de Montréal et elles ont été réalisées conformément aux normes du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Des souris mâles CD1 de 21 jours post-natal (P21) ont été commandées de *Charles River* et ces animaux ont été hébergés trois par cage avec un accès illimité à une roue de course (Figure 2.1).



Figure 2.1. Roue de course en plastique (fast-trac) montée sur un igloo pour souris (Bio Serv). Image adaptée de (Walker and Mason, 2018) avec les droits d'auteur et de reproduction obtenues de Elsevier.

Ces souris ont été maintenues dans les installations de l'Université de Montréal, dont plusieurs sur une longue période (>24mois) pour former la colonie de souris vieillissante. Les souris de la colonie vieillissante ont été pesées de manière mensuelle et toutes les souris ont été suivies régulièrement pour leur état de santé par des techniciennes animalières en coopération avec notre laboratoire. Les souris ont été sacrifiées par inhalation d'une forte dose d'isoflurane, et ce, à différents groupes d'âge expérimental : P80-100 (jeune adulte; 3M), P660-780 (âgée; 24M) et P840-930 (très âgée; 30M).

2.2 Préparation nerf-muscle

Le muscle de l'oreille, le *levator auris longus* (LAL), a été disséqué avec son innervation, puis a été maintenu et tendu par des aiguilles dans une chambre recouverte de sylgarde et remplie d'une solution physiologique oxygénée de Ringer Rees (en mM) : 110 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 11 glucose, 0.3 glutamate, 0.4 glutamine, 5 BES, 4.34 x10⁻⁷ cocarboxylase et 3.6 x 10⁻⁵ chlorure de choline. Pendant les expérimentations, la

préparation nerf-muscle a été continuellement perfusée de solution physiologique oxygénée (95% O₂, 5% CO₂) à 27-30 °C.

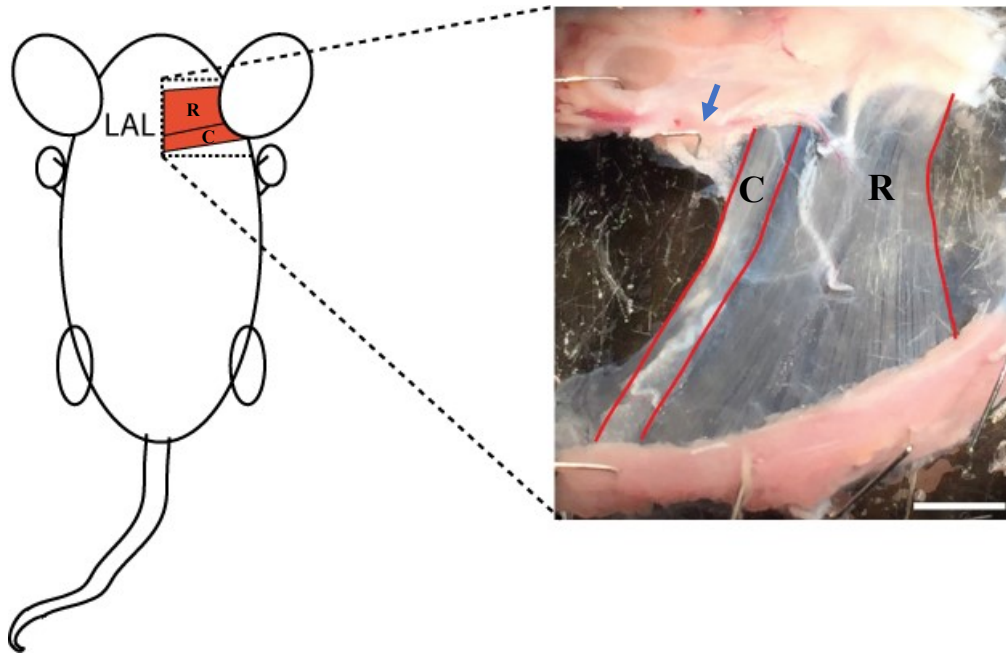


Figure 2.2. Représentation de la préparation neuromusculaire. Le muscle *levator auris longus* (LAL) composé d'une région rostrale (R) et caudale (C), a été disséqué de la souris et, à droite, maintenu par des aiguilles (flèche bleue) sur une chambre recouverte de sylgarde et remplie de solution physiologique oxygénée. Uniquement les JNMs de la région R, délimitée par les lignes rouges, ont été considérées pour les expérimentations puisqu'une différence de vulnérabilité des JNMs a déjà été observée entre la région C et R dans des conditions pathologiques (Murray et al., 2008). Échelle = 4 mm

2.3 Immunohistochimie

Suivant les expériences physiologiques, un marquage immunohistochimique des trois éléments de la JNM a été réalisé, tel que décrit ailleurs (Todd et al., 2010; Arbour et al., 2015). Les muscles ont été fixés dans une solution de 4% formaldéhyde (diluée dans du PBS) pendant 10 minutes à température pièce et ont été perméabilisés dans du méthanol 100% pendant 6 min à -20 °C. Puis, les sites de marquage non-spécifiques ont été bloqués par incubation avec 10%

de sérum d'âne normal (dilué dans du PBS contenant 0.01% Triton X-100) pendant 20 minutes. Tous les anticorps utilisés ont été dilués dans une solution PBS avec 0.01% Triton X-100 et 2% de sérum d'âne normal. Les préparations musculaires ont été incubées pour marquer les CSPs avec l'anticorps primaire de lapin anti-S100 β (1:250, Dako) pendant 2 heures à température pièce. Puis, l'axone moteur et la terminaison axonale ont été marqués en même temps par incubation des anticorps primaires anti-Neurofilament Moyen (NF-M) de poulet (1:2000, Rockland) et anti-*Synaptic Vesicle protein 2* (SV2) de souris (1:2000, DSHB) pendant 2 heures à température pièce. Par la suite, les anticorps secondaires (1:500, *Jackson Immunoresearch*) ont été incubés ensemble à température pièce : le IgG1 Alexa Fluor 488 (anti-chèvre), le IgG1 Alexa Fluor 647 (anti-lapin) et le IgY Alexa Fluor 488 (anti-poulet). Les récepteurs nicotiniques ont été marqués par incubation d'alpha-bungarotoxine couplé à de l'Alexa fluor 594 (α -Btx, 1:500) pendant 45 minutes à température pièce. Après chacune des incubations (sauf pour le blocage non-spécifique), les préparations ont été rincées avec une solution de PBS et de 0.01% Triton X-100. Les préparations ont été montées sur lame avec un agent de montage et de protection pour la fluorescence (de l'anglais *ProLong Gold antifade*, Invitrogen) contenant du DAPI, un marqueur fluorescent très spécifique à l'ADN permettant de visualiser les noyaux cellulaires. Toutes les images de marquages immunohistochimiques ont été observées par microscopie confocale (Olympus FV100) et aucune manipulation des images n'a été réalisée après leur acquisition.

2.4 Électrophysiologie

Méthode

L'innervation du muscle LAL a été aspirée à l'aide d'une électrode de succion remplie de solution saline Ringer Rees pour permettre la stimulation, notamment, des axones moteurs. L'intensité de stimulation a été ajustée de manière supraliminaire (2 fois le seuil de contraction du muscle) avec une durée d'impulsion dépolarisante de 0.1 ms. Les stimulations ont été évoquées à l'aide d'un stimulateur programmable (GRASS S88) couplé à un isolateur de stimulus (Isoflex, A.M.P.I). La contraction musculaire a été empêchée en bloquant partiellement les récepteurs nicotiniques à l'aide de D-tubocurarine hydrochloride pentahydrate (3.65-3.85 μ M, Sigma). Il est important de mentionner que le choix d'antagoniste des récepteurs

nicotiques n'a pas d'influence sur les phénomènes de plasticité synaptique à la JNM (Todd et al., 2010). Pour certaines expériences spécifiques (section événements spontanés et force synaptique), la contraction musculaire a plutôt été empêchée en perfusant une solution Ringer Rees modifiée avec une concentration faible en Ca^{2+} (1 mM) et forte en Mg^{2+} (7 mM).

Des enregistrements intracellulaires du potentiel de plaque motrice (PPM) ont été réalisés à l'aide de fines microélectrodes en verre (40-80 M Ω , remplies de 3M KCl) tirées à l'aide d'un tireur d'électrodes de modèle P-97 (Sutter instruments). Les signaux électrophysiologiques ont été captés et amplifiés (10X) à l'aide du *Neuroprobe amplifier model 1600* (A-M Systems Inc.); filtrés passe-bas (2 kHz) et amplifiés à nouveau (100X) à l'aide du *DC amplifier/filter* (Warner instruments Corp); avant d'être digitalisés par le BNC2110 (National instruments) vers le logiciel d'acquisition WinWCP (John Dempster, Université de Strathclyde, Strathclyde, Royaume-Uni). Des critères d'exclusion tel que décrit par (Tremblay et al., 2017) ont été appliqués; les enregistrements ont été rejetés lorsque le potentiel membranaire au repos de la fibre musculaire était plus dépolarisé que -65 mV et lorsque ce potentiel de repos variait de plus de 5 mV entre le début et la fin de l'expérience.

Plasticité synaptique

L'activité synaptique évoquée par la stimulation de l'innervation du LAL, qui correspond au PPM, a été évalué par des stimulations de 0.2 Hz, une fréquence qui n'a pas d'effet sur celle-ci (Todd et al., 2010). Des trains de stimulations à haute fréquence (SHF; 100 Hz pour 5 s), un patron d'activité physiologique des UMs rapides (Hennig and Lomo, 1985) tels que retrouvées pour le muscle LAL (Erzen et al., 2000), ont été utilisés pour générer des phénomènes de plasticité synaptique. Ainsi, l'étude de la plasticité synaptique a été réalisée à l'aide du paradigme de stimulation illustré et décrit dans la Figure 2.3.

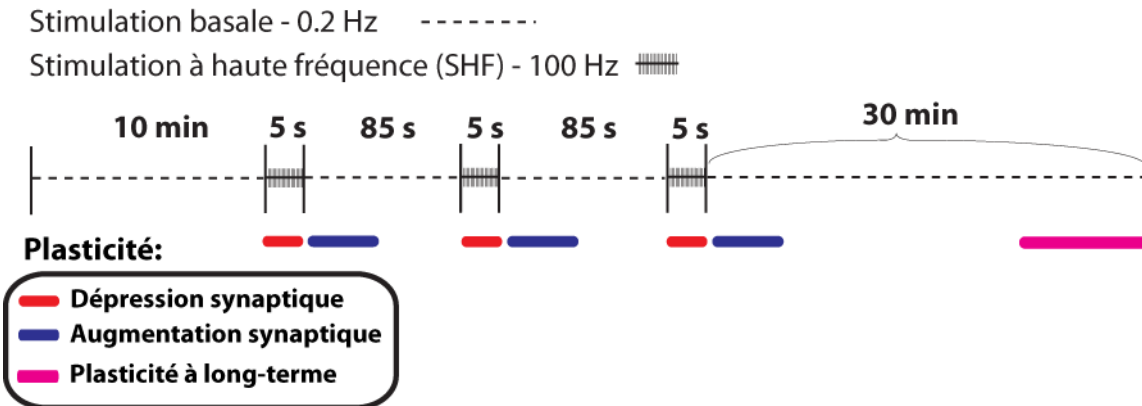


Figure 2.3. Paradigme de stimulation. Le niveau basal de la transmission synaptique a été obtenu à partir de stimulation de 0.2 Hz pendant 10 min; a été suivi par trois SHF séparées par 85 s d'enregistrement à 0.2 Hz ; puis la transmission synaptique a été évaluée sur une période de 30 à 45 min. L'amplitude des PPMs a été normalisée à partir de l'amplitude moyenne des PPMs 10 minutes avant la première SHF (amplitude basale des PPMs). La dépression synaptique (ligne rouge) a été définie comme l'amplitude moyenne des PPMs à chaque seconde durant la SHF (100 PPMs par seconde). L'augmentation synaptique (ligne bleue) a été définie comme l'amplitude moyenne des 15 premiers PPMs immédiatement après chacune des trois SHF. La plasticité synaptique à long-terme (ligne rose) a été définie comme l'amplitude moyenne des PPMs entre la 25^{ième} et la 30^{ième} minute suivant la première SHF.

Pour quelques expériences pharmacologiques, un antagoniste des récepteurs à l'adénosine A_{2A} (100 nM de SCH58261; Sigma) ou A₁ (5 nM de PSB-36; Tocris Bioscience) a été ajouté à la solution physiologique. Un agoniste des récepteurs A_{2A} (7.5nM de CGS21680; Abcam) a aussi été ajouté à la solution physiologique pour quelques expériences. Une période d'enregistrement basale de 20 min suivant l'application de l'antagoniste présynaptique a été ajoutée avant de générer les HFS, afin d'évaluer l'effet de la drogue sur la transmission basale. Les différences dans la transmission synaptique basale avec la drogue ont été calculées en comparant l'amplitude moyenne des PPMs des 5 dernières minutes avant l'application de la drogue avec l'amplitude moyenne des PPMs entre la 15^{ième} et la 20^{ième} minute suivant l'application de la drogue. Pour les changements de la transmission basale avec la technique

d'électroporation de cellule unique, les PPMs ont été enregistrés pendant au moins 10 minutes avant et 10 minutes après l'électroporation d'une ou de plusieurs CSPs à la JNM.

Évènements spontanés, évoqués et contenu quantique

Pour étudier les propriétés synaptiques, les évènements spontanés et évoqués ont été évalués à partir des méthodes décrites par (Tremblay et al., 2017). D'abord, les évènements spontanés ou potentiels de plaques motrices miniatures (PPMms) ont été enregistrés en absence de stimulation sur une période d'au moins 5 minutes. L'amplitude des PPMms a été mesurée à partir des 100 premiers évènements spontanés et la fréquence des PPMms a été calculée en divisant le nombre d'évènements spontanés observé (au moins 100 PPMms) sur la période d'observation. À la même JNM, des PPMs ont été évoqués par des stimulations pairées de 15 ms d'intervalle (0.2 Hz par paire de stimulation) sur une période de 10 à 15 min. La facilitation pairée a été calculée en divisant l'amplitude moyenne des PPMs de la deuxième stimulation sur l'amplitude moyenne des PPMs de la première stimulation (au moins 120 PPMs par stimulation). Le contenu quantique a été calculé par l'amplitude moyenne des PPMs de la première stimulation divisée (incluant les échecs) par l'amplitude moyenne des PPMms tel que décrit par (Del Castillo and Katz, 1954; Tremblay et al., 2017).

2.5 Chargement des CSPs

Électroporation à cellule unique

La méthode d'électroporation de cellule unique a été adaptée pour les CSPs (Nevian and Helmchen, 2007; Darabid et al., 2013). Des micropipettes en verre (1.0 mm OD; ~ 7 MΩ) ont été remplies d'une solution physiologique contenant l'indicateur Ca²⁺ Fluo-4 salt (800 μM; Invitrogen), l'indicateur morphologique Alexa 647 hydrazide (500 μM; Invitrogen) ou Alexa 594 hydrazide (500 μM; Invitrogen) et pour certaines expériences spécifiques des chélateurs calciques BAPTA salt (4 mM; Invitrogen). La solution des micropipettes d'électrodes a été corrigée pour respecter les concentrations normales de Ringer Rees. La micropipette a été montée sur un support à pipette muni d'une électrode de stimulation en platine et cette électrode a été connectée à un isolateur de stimulus (Isoflex, A.M.P.I). L'électrode de référence a été positionnée en contact avec la solution extracellulaire.

Les CSPs ont été localisées en lumière transmise; facilement identifiables par leur présence en couverture sur la JNM et leur forme de soma distincte. La micropipette d'électroporation a été rapprochée très près (quelques μm) d'un corps cellulaire de CSP, sans le toucher, à l'aide d'un micromanipulateur. Une à trois stimulations (impulsions négatives de forme carrée) d'une durée de 10 ms et d'une amplitude de 15 V ont été appliquées pour perméabiliser momentanément la membrane cellulaire de la CSP et permettre l'introduction de molécules (voir Figure 2.4).

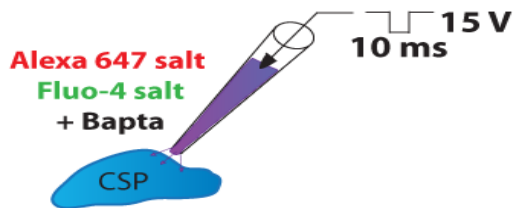


Figure 2.4. Méthode d'électroporation de cellule unique pour la CSP.

La même procédure a été appliquée pour les autres CSPs visibles de la même JNM (au minimum 2 CSPs par JNM) et les CSPs ont été laissés pour une période d'au moins 20 minutes de repos avant toute autre manipulation. Les procédures ont été surveillées par microscopie à épifluorescence et les JNMs ont été exclues lorsqu'une CSP ou un élément synaptique a été touché par la micropipette ou lorsqu'une CSP n'était plus saine (forme anormale). L'identité des CSPs a été confirmée par leur présence au-dessus des régions synaptiques (postsynaptique marquée par l' α -Btx).

Par incubation

Pour quelques expériences spécifiques, les CSPs ont été chargées d'indicateurs calciques à l'aide d'une méthode décrite ailleurs (Arbour et al., 2015). Les préparations nerf-muscle ont été incubées (2 x 45 min, à température pièce) d'une solution physiologique Rees pré-oxygénée contenant l'indicateur calcique perméable Fluo-4 AM (15 μM ; Invitrogen) et de l'acide pluronique (0.02%; Invitrogen). Les préparations ont été par la suite perfusées par une physiologique Ringer Rees oxygénée normale.

2.6 Imagerie calcique

L'activité des CSPs a été mesurée par imagerie calcique à l'aide d'un microscope Nikon E600N adapté avec un système à épifluorescence. Le filtre d'excitation passe-bande 449-499 nm (Semrock) a été utilisé pour exciter l'indicateur calcique Fluo-4, puis la fluorescence d'émission traversant un filtre passe-bande 490-540 nm (Semrock) a été détectée à l'aide d'une caméra digitale (Hamamatsu Orca). L'acquisition des images ont été réalisées à l'aide du logiciel MetaFluor (Molecular Devices), contrôlant aussi la source d'illumination spectrale Lambda XL (Sutter Instruments). L'activité calcique des CSPs a été acquise à une fréquence de 2 Hz avec un temps d'intégration de 60 ms. La fluorescence des CSPs a été analysée au niveau de leur soma et a été soustraite de la fluorescence de l'arrière-fond (fibre musculaire). Les expériences présentant un photoblanchiment ont été rejetées. Le changement de fluorescence au fil du temps ($\Delta F/F_0$) de l'indicateur calcique a été exprimé par la formule suivante :

$$\left(\frac{\text{Fluorescence} - \text{Fluorescence au repos}}{\text{Fluorescence au repos}} \right) \times 100$$

La forme des CSPs a été monitorée pour surveiller la viabilité cellulaire à l'aide d'images morphologiques de l'Alexa 594 ou 647 pendant l'électroporation et à la fin des expérimentations. Aussi, la capacité des CSPs à répondre aux agonistes a été évaluée par l'application locale d'ATP (10 μ M; Sigma) à l'aide d'une micropipette de verre (1.2 mm OD; 5-8 M Ω) dont une pression positive (20psi, 150ms) a été envoyé par un Picospritzer II (General Valve).

Pour retrouver les JNMs en immunohistochimie, la préparation a été incubée pendant 15 minutes de α -Btx (1 :150) pour marquer les plaques motrices et des images (CSPs + plaque motrice) ont été acquises, en plus de repères musculaires.

2.7 Analyse statistique

Les résultats sont présentés par la moyenne \pm l'erreur type de la moyenne. N correspond aux nombres d'animaux ou muscles et n correspond aux nombres de JNMs ou de CSPs. À moins d'être mentionné, une seule JNM a été enregistrée et conservée par muscle. Des tests de t non pairés ont été effectués pour comparer deux conditions ou groupes d'âges provenant de deux

expériences différentes. Lorsque les données n'étaient pas conformes à la normalité ou que le nombre de répliquas n'était pas suffisant pour tester la normalité, le test non paramétrique de Mann-Whitney U a été effectué. Une ANOVA avec des tests post-hoc de Tukey a été effectuée pour comparer au moins trois conditions différentes. Pour ce dernier test, lorsque la normalité des données ne pouvait être testée ou n'était pas conforme, un test de Kruskal-Willis (données non pairées) ou un test de Friedman (données pairées) a été utilisé avec des tests post-hoc de Dunn. Finalement, une correction de Bonferroni a été appliquée lorsque des données ont été réutilisées pour deux tests statistiques différents. Les analyses ont été considérées comme étant significatives avec un intervalle de confiance de 95% ($p \leq 0.05$).

Chapitre 3 : Résultats

Pour investiguer le rôle des CSPs à la JNM sénescence, nous avons d'abord confirmé la présence de phénotype du vieillissement neuromusculaire pour notre modèle d'étude, le muscle de l'oreille LAL. Puis, nous avons caractérisé les propriétés synaptiques de transmission et de plasticité à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques de JNMs de souris adultes (3M), âgées (24M) et très âgées (30M). Par la suite, nous avons adapté une méthode d'électroporation de cellule unique pour abolir spécifiquement l'activité calcique des CSPs et examiner leurs implications dans les altérations synaptiques aux JNMs de 3M et 24M. Finalement, les effecteurs présynaptiques de la modulation gliale dépendante ont été étudiés par des manipulations pharmacologiques.

3.1 Le muscle LAL est un bon modèle d'étude du vieillissement neuromusculaire

Le vieillissement est caractérisé par des changements dans la masse corporelle de l'individu et spécialement par une perte de la masse musculaire (Goodpaster et al., 2006). Par conséquent, nous avons voulu valider ces changements pour les souris CD1 et notre modèle d'étude. La Figure 3.1A montrent que les souris CD1 prennent graduellement de la masse corporelle avec l'âge, de 3 mois (42.22 ± 1.014 g; N=18) à 24 mois (52.76 ± 2.82 g; N=17), mais tendent à perdre de la masse à des stades plus avancés du vieillissement, tel qu'observé à 30 mois (47.50 ± 2.19 g; N=6). Une baisse plus tardive de la masse corporelle est généralement associée à une perte importante de la masse musculaire (Goodpaster et al., 2006). À cet effet, une perte significative de masse musculaire avec l'âge a été observée au niveau du muscle LAL (ANOVA, $p \leq 0.01$; Figure 3.1B). Notamment, ce muscle perd significativement en masse pour les souris de 24M (6.68 ± 0.56 mg, N= 11, post-test de Tukey, $p \leq 0.05$) et de 30M (5.57 ± 0.69 mg, N=6, post-test de Tukey, $p \leq 0.01$), en comparaison avec les souris de 3M (8.81 ± 0.55 mg; N=16).

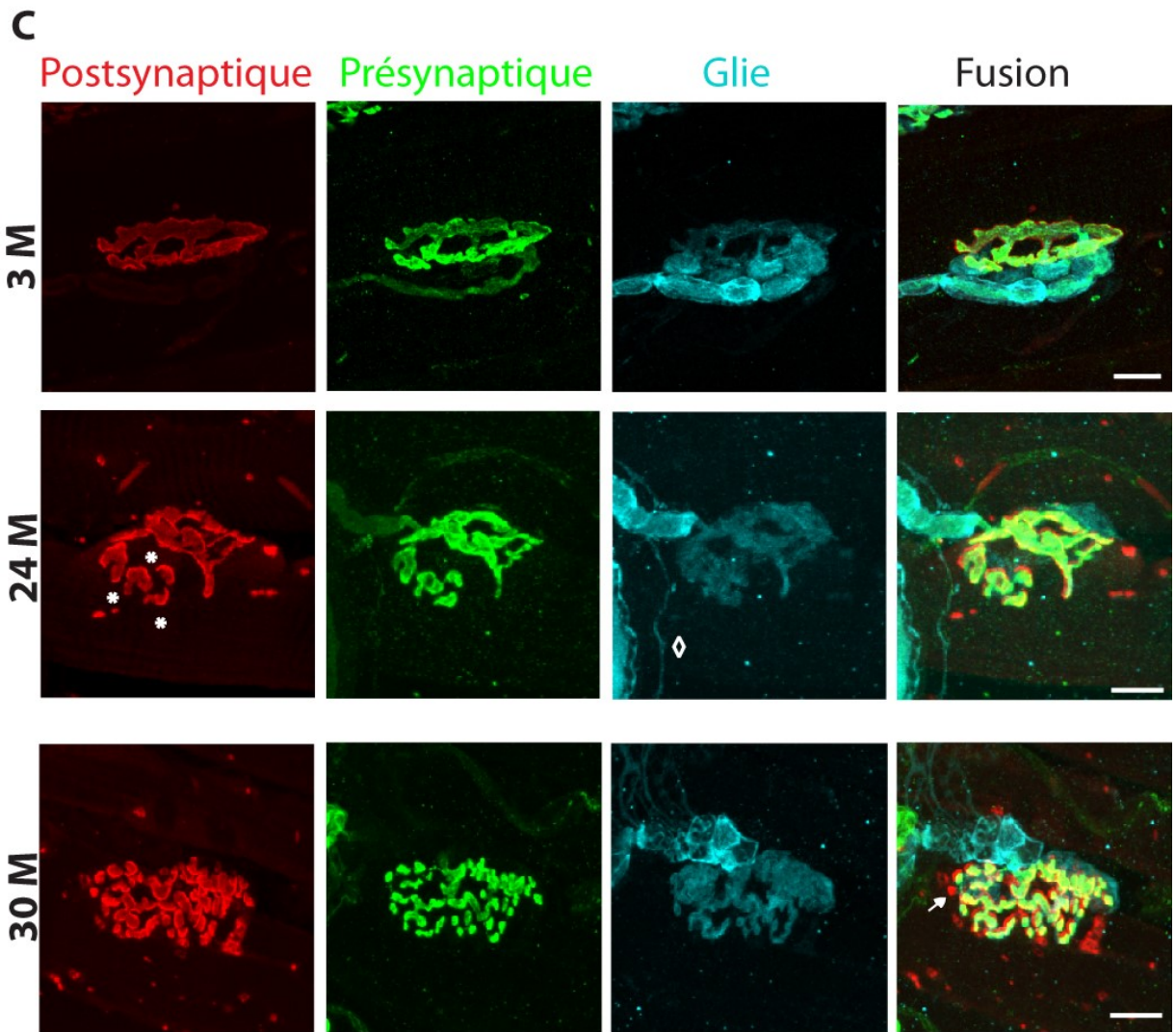
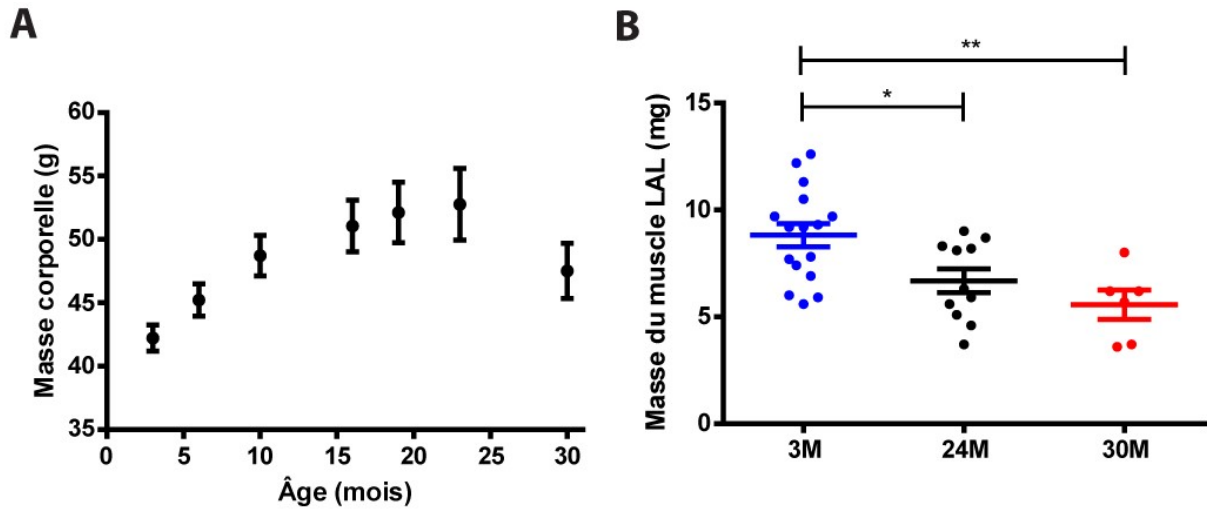


Figure 3.1. Une perte de masse musculaire et des altérations structurelles des JNMs sont observées avec le vieillissement du muscle LAL. (A) Masse corporelle des souris mâles CD1 à différents intervalles d'âge. (B) Masse du muscle LAL droit des souris 3 mois (3M), 24 mois (24M) et 30 mois (30M). (C) Images confocales de l'immunomarquage des JNMs du LAL pour les différents groupes d'âge (3M, 24M et 30M). Les trois éléments de la JNM ont été marqués soient les récepteurs postsynaptiques nicotiniques en rouge (postsynaptique; α -bungarotoxine), la terminaison axonale en vert (présynaptique; SV-2/NF-M) et les cellules de Schwann en cyan (glie; S100 β). Notez les îlots postsynaptiques (*) pour la JNM de 24M et observez la proportion importante d'îlots pour la JNM de 30M. Certains îlots vont même être dépourvus d'innervation présynaptique (flèche). Notez aussi la présence de prolongements gliaux, dans ce cas-ci de cellules de Schwann axonales (\diamond). Échelle : 10 μ m. * $p \leq 0.05$ et ** $p \leq 0.01$

Un autre phénotype marquant du vieillissement est les altérations morphologiques de la JNM (Valdez et al., 2010). Plusieurs de ces altérations ont déjà été très bien caractérisées pour le muscle LAL de souris âgées de 24 mois (Krief et al., 2018; en révision) et >30 mois (Valdez et al., 2012). Tout de même, nous avons réalisé un immunomarquage des trois éléments de la JNM pour notre modèle d'étude (3M, 24M et 30M; Figure 3.1C) afin de valider la présence de ces changements morphologiques. Tel qu'attendu, une fragmentation de la région postsynaptique en petits îlots (*) est observée à la Figure 3.1C et ce phénomène est présent sur toutes les JNMs observées de 24M et 30M. Nous avons aussi observé des prolongements gliaux (Figure 3.1C, \diamond), mais très peu de dénervation partielle (Figure 3.1C, flèche) ou totale. En considérant le tout, notre modèle d'étude récapitule certains phénotypes importants du vieillissement neuromusculaire telles que la perte de masse tant corporelle que musculaire ainsi que des altérations morphologiques des JNMs.

3.2 Les événements spontanés et le contenu quantique des JNMs du LAL sont préservés lors du vieillissement

Par la suite, nous avons caractérisé les événements synaptiques spontanés et évoqués de la JNM avec l'âge, puisqu'ils sont révélateurs de la fiabilité de la communication synaptique. Cette caractérisation a été réalisée en perfusant une solution physiologique Ringer modifiée (1 mM Ca²⁺, 7 mM Mg²⁺) et à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques intracellulaire.

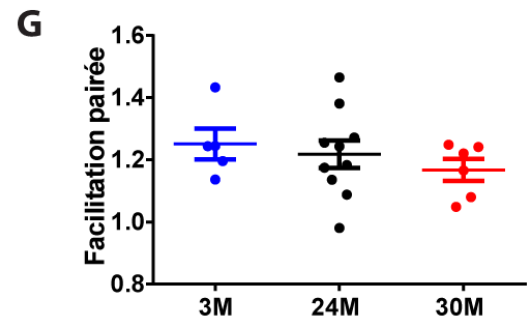
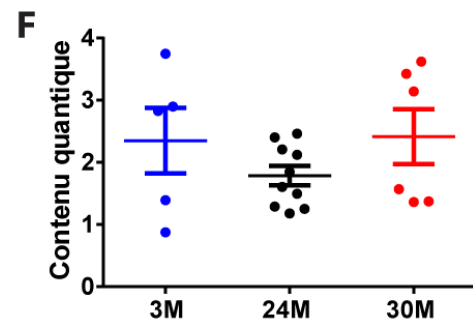
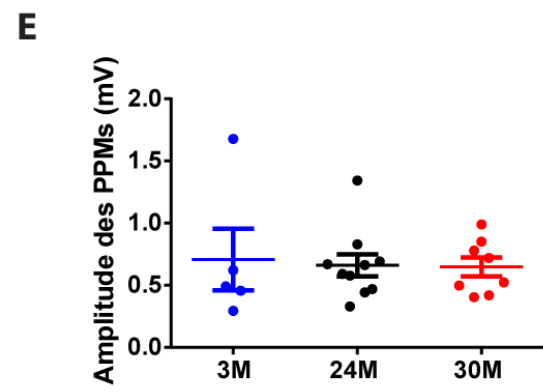
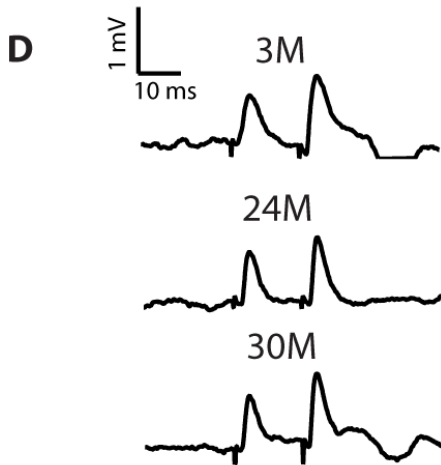
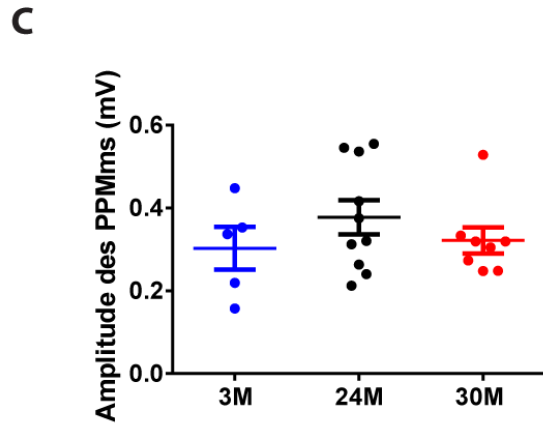
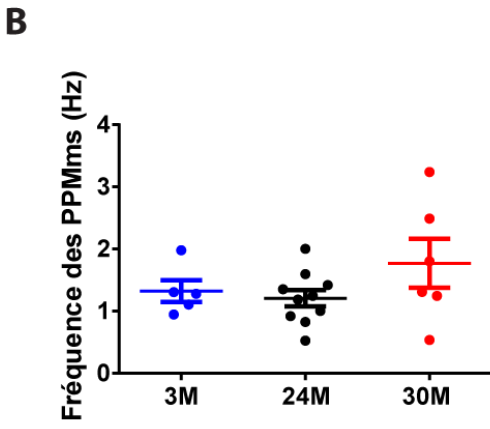
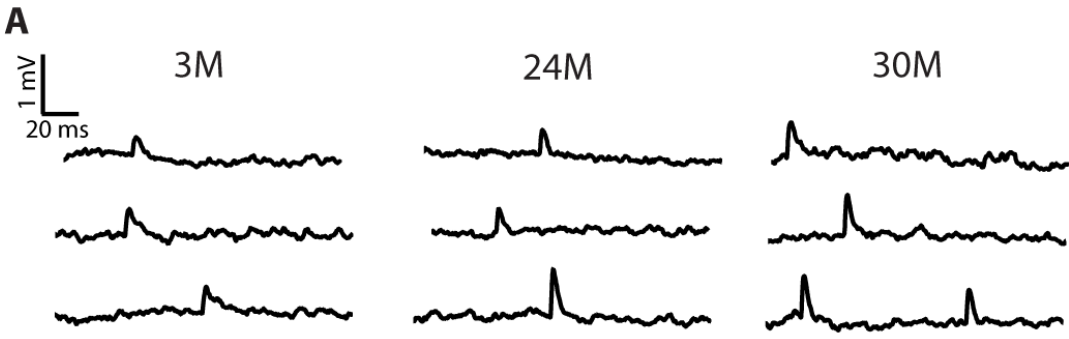


Figure 3.2. L'activité spontanée et le contenu quantique ne sont pas altérées lors du vieillissement du LAL. (A) Exemples de tracés d'enregistrements des PPMs pour des JNMs de souris âgées de 3M (à gauche), 24M (au centre) et 30M (à droite) (B) Histogramme de la fréquence moyenne \pm SEM des PPMs. (C) Histogramme de l'amplitude moyenne \pm SEM des PPMs. (D) Exemples de tracés des PPMs évoquées par notre protocole de stimulation pairée (0.2 Hz, 15 ms d'intervalle) pour les JNMs de souris âgées de 3M (haut), 24M (centre) et 30M (bas). (E-G) Histogramme de la moyenne \pm SEM de l'amplitude des PPMs (E), le contenu quantique (F) et la facilitation pairée (G).

L'activité spontanée n'est pas altérée avec l'âge

En premier, nous avons investigué les changements avec l'âge dans la fréquence et l'amplitude des événements spontanés. Tel qu'illustré à la Figure 3.2B, les JNMs de souris âgées de 3M montrent une fréquence de PPMs de 1.32 ± 0.18 Hz (n=5, N=2), qui ne diffère pas à celle des JNMs 24M de 1.21 ± 0.13 Hz (n=10 N=4) et 30M de 1.77 ± 0.39 Hz (n=6 N=3). Ainsi, la fréquence des PPMs ne semble pas altérée avec l'âge (Kruskal-Willis, $p > 0.05$). De même, aucune différence n'est observée pour l'amplitude des PPMs (Figure 3.2C, Kruskal-Willis avec des post-tests de Dunn, $p > 0.05$) pour les JNMs de souris âgées de 3M (0.31 ± 0.05 mV, n=5 N=2), 24M (0.38 ± 0.04 mV, n=10 N=4) et 30M (0.32 ± 0.03 mV, n=8 N=3). Donc, les événements spontanés ne semblent pas altérés avec le vieillissement et l'augmentation du nombre de (N) de souris 3M permettra de valider cette conclusion. Tout de même, ces résultats sont cohérents avec les observations de Banker al. (1983) au niveau du *gluteus maximus*, mais des différences ont aussi été observées pour d'autres muscles (voir la revue de Badawi et Nishimune 2017).

Le contenu quantique et la facilitation pairée sont préservés lors du vieillissement

Suivant ces enregistrements des événements spontanés, les propriétés des événements évoqués ont été évaluées à l'aide d'un protocole de facilitation pairée (2 stimulations à 15 ms d'intervalle) à 0.2 Hz. De ces enregistrements, nous avons mesuré l'amplitude des PPMs évoquée par la première stimulation (Figure 3.2D), en incluant les échecs de PPMs. Tel que

montré par la Figure 3.2E, l'amplitude des PPMs ne semble pas altérée lors du vieillissement (Kruskal-Willis, $p > 0.05$), puisque l'amplitude moyenne ne diffère pas entre les JNMs de 3M (0.71 ± 0.25 mV, $n=5$ $N=2$), les JNMs de 24M (0.66 ± 0.09 mV, $n=10$ $N=4$) et les JNMs de 30M (0.6479 ± 0.08 mV, $n=8$ $N=3$).

Puis, le contenu quantique a été calculé à partir de l'amplitude des PPMs et des PPMs pour les différents groupes (Del Castillo and Katz, 1954). Considérant l'absence d'altérations significatives pour l'amplitude des événements évoqués et spontanés, nous nous attendions à observer une préservation du contenu quantique pour notre modèle d'étude. Effectivement, la Figure 3.2F montre que le contenu quantique semble conservé avec l'âge (Kruskal-Willis, $p > 0.05$). Plus précisément, le contenu quantique des JNMs de 3M est de 2.35 ± 0.53 ($n=5$, $N=2$), pour celles de 24M est de 1.79 ± 0.15 ($n=10$, $N=4$) et pour celles de 30M est de 2.42 ± 0.44 ($n=6$, $N=3$). Ces résultats pour notre modèle d'étude suggèrent que l'augmentation du contenu quantique avec l'âge n'est pas l'unique destin de la JNM sénescence (Banker et al., 1983; Fahim, 1997).

Finalement, les propriétés présynaptiques de transmission ont aussi été évaluées à l'aide du ratio de la facilitation paillée. À cet effet, la Figure 3.2G montre que la facilitation paillée tend à être conservée lors du vieillissement (Kruskal-Willis, $p > 0.05$) pour les JNMs de 3M (1.25 ± 0.05 , $n=5$ $N=2$), de 24M (1.21 ± 0.4 , $n=10$ $N=3$) et de 30M (1.17 ± 0.03 , $n=6$ $N=3$). En considérant le tout, les propriétés de facilitation et le contenu quantique des événements évoqués ne semblent pas altérés avec l'âge pour le LAL. Toutefois, nous sommes conscients qu'il est nécessaire d'augmenter le nombre de répliquas biologiques (N) pour confirmer ces observations.

3.3 La plasticité à long-terme est altérée lors du vieillissement

Nos résultats à la JNM montrent que la fiabilité de la communication synaptique tend à être conservée avec l'âge. Dès lors, nous nous sommes demandé si les JNMs maintenaient aussi leur capacité d'adaptation de la transmission synaptique, une propriété essentielle à la synapse et qui est fortement régulée par les CSPs chez l'animal adulte (Ko and Robitaille, 2015). Nous avons ainsi examiné la plasticité synaptique des JNMs en réponse à un paradigme de stimulation

illustré à la Figure 3.3A. Ce paradigme consiste en des stimulations basales de 0.2 Hz avec 3 trains de SHFs (100 Hz pendant 5 secondes) et l'amplitude des PPMs évoquées par ces stimulations a été enregistrée à l'aide d'une microélectrode intracellulaire pendant toute la période de stimulation. Puis, différentes formes de plasticité synaptique pouvant être régulées par les CSPs (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001; Todd et al., 2010) ont été analysées dont la dépression synaptique, l'augmentation synaptique et la plasticité à long-terme.

En premier, nous avons analysé la dépression synaptique générée pendant les trains de SHFs. La Figure 3.3C montre que la dépression synaptique n'est pas influencée par l'âge pour chacune des SHFs (Figure 3.3C, ANOVA, post-tests de Tukey, $p > 0.05$). Effectivement, les JNMs de 3M (N=6) montrent respectivement pendant chacune des SHFs (SHFs 1-3) une amplitude moyenne des PPMs de $26.32 \pm 1.81\%$, $24.92 \pm 1.88\%$ et $23.65 \pm 1.94\%$, comparable avec les JNMs de 24M (N=6) qui montrent respectivement une amplitude moyenne des PPMs de $27.12 \pm 2.14\%$, $24.73 \pm 0.88\%$ et $23.58 \pm 0.96\%$. Ainsi que pour les JNMs de souris 30M (N=7) qui montrent respectivement une amplitude moyenne des PPMs de $27.10 \pm 20.07\%$, $25.65 \pm 1.65\%$ et $24.04 \pm 1.53\%$. Ces résultats suggèrent que la dépression synaptique est une forme de plasticité synaptique bien conservée lors du vieillissement de la JNM.

Par la suite, nous avons analysé une autre forme de plasticité synaptique à court-terme associée plutôt au renforcement de la synapse, soit l'augmentation synaptique survenant après chacune des SHFs (Post-SHF 1-3). À cet effet, la Figure 3.3D montre que l'augmentation synaptique aussi n'est pas altérée avec le vieillissement pour les JNMs (Figure 3.3C, N=6, ANOVA, $p > 0.05$). Notamment pour la Post-SHF 1, l'augmentation synaptique était similaire pour les JNMs 3M, 24M et 30M (post-test de Tukey, $p > 0.05$) avec respectivement $24.96 \pm 6.90\%$, $26.82 \pm 5.91\%$ et $32.17 \pm 4.46\%$. De même suivant la Post-SHF 2, l'augmentation synaptique n'était pas différente pour les JNMs (post-test de Tukey, $p > 0.05$) avec respectivement $24.25 \pm 6.90\%$, $15.88 \pm 7.12\%$ et $21.27 \pm 7.32\%$. Ainsi que pour la Post-SHF 3, celle-ci n'était pas différente pour les JNMs 3M, 24M et 30M (post-test de Tukey, $p > 0.05$) avec respectivement $22.47 \pm 7.37\%$, $18.60 \pm 8.24\%$ et $14.13 \pm 7.46\%$. Donc, ces résultats révèlent que le phénomène d'augmentation synaptique n'est pas significativement altéré avec l'âge pour la JNM. Pris ensemble, ces derniers résultats suggèrent que les formes de plasticité à court-terme de la JNM (dépression et augmentation synaptique) sont bien préservées avec l'âge.

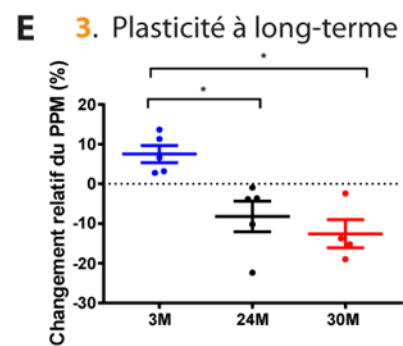
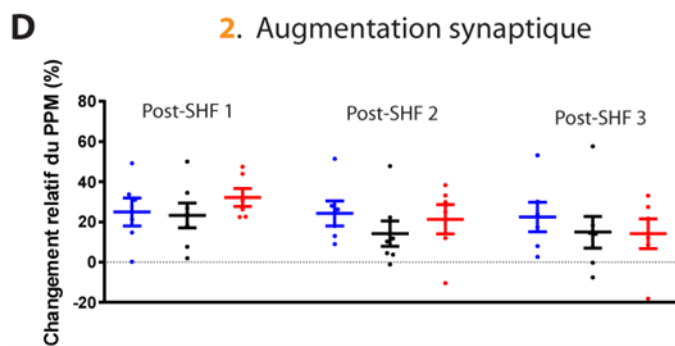
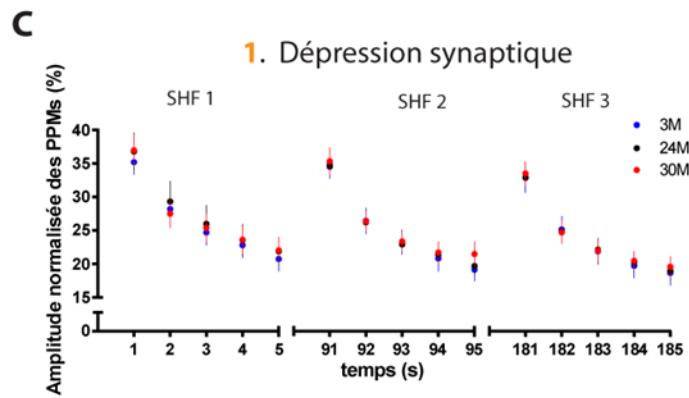
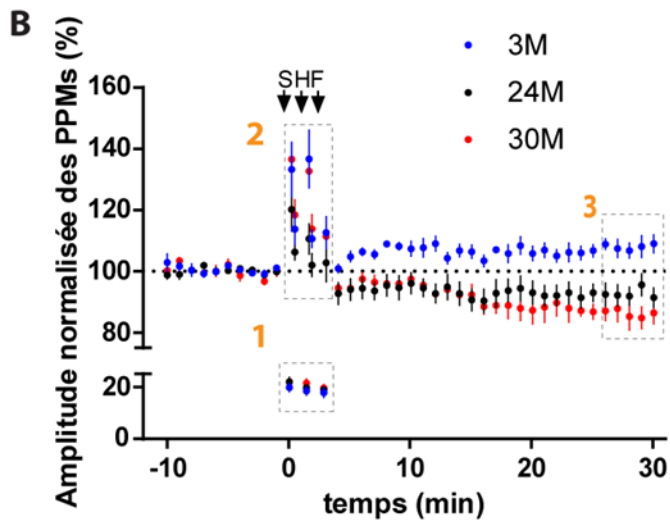
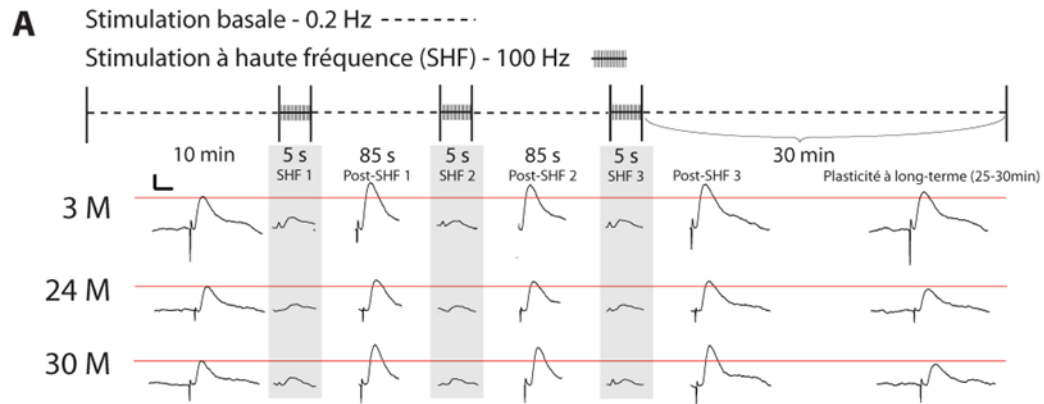


Figure 3.3. La plasticité synaptique à long-terme de la JNM est altérée lors du vieillissement. (A) Paradigme de stimulation pour la plasticité synaptique (en haut) avec des exemples de PPMs (en bas) pour la stimulation basale, les stimulations à haute fréquence (SHF 1-3), suivant les SHFs (post-SHF 1-3) et 30 min suivant la première SHF (long-terme). (B) Amplitude normalisée des PPMs \pm SEM pendant le paradigme de stimulation pour les JNMs de souris adulte (3M; en bleu), âgée (24M; en noir) et très âgée (30M; en rouge). Notez les trois formes de plasticité synaptique observées soient la dépression synaptique (1), l'augmentation synaptique (2) et la plasticité à long-terme (3). (C) Amplitude normalisée des PPMs \pm SEM pendant les SHFs (SHF 1-3) de 5s (100 PPMs par seconde). (D) Histogramme du changement relatif des 15 PPMs \pm SEM suivant directement les SHFs (post-SHF 1-3). (E) Histogramme du changement relatif des PPMs \pm SEM de la 25^{ième} à la 30^{ième} minute suivant la première SHF. Échelle : 5 ms (axe horizontal) et 1 mV (axe vertical). * $p \leq 0.05$ et ** $p \leq 0.01$

Par la suite, nous avons analysé les formes de plasticité à long-terme en observant les changements dans l'amplitude normalisée des PPMs 25 à 30 minutes après la première SHF (Figure 3.3A, B et E), puisque cette forme de plasticité peut considérablement modifier la fonction synaptique sur une très longue période. On observe de profondes altérations dans la plasticité à long-terme avec l'âge (Figure 3.3E, ANOVA, $p \leq 0.01$). Tel qu'illustré par la Figure 3.3B, les JNMs de souris 3M (en bleu, N=6) montre une augmentation de la réponse synaptique persistante sur plusieurs minutes, alors que les JNMs de souris 24M (en noir, N=6) et 30M (en rouge, N=7) montrent à l'opposé une diminution de la réponse synaptique persistante sur plusieurs minutes. Il est important de mentionner que les changements relatifs dans l'amplitude du PPM pour les JNMs de 3M (Figure 3.3E, $7.48 \pm 2.16\%$) sont significativement différents autant pour le groupe 24M (Figure 3.3E, $-8.20 \pm 3.85\%$, post-test de Tukey, $p \leq 0.05$) que le groupe 30M ($-12.60 \pm 3.56\%$ post-test de Tukey, $p \leq 0.01$). De plus, cette altération révélée dans la plasticité à long-terme ne semble pas s'aggraver à un âge plus avancé, puisqu'aucune différence n'est observée entre les JNMs de souris âgées de 24M et de 30M (changement relatif de l'amplitude du PPM, $-8.20 \pm 3.85\%$ vs $-12.60 \pm 3.56\%$, post-test de Tukey, $p > 0.05$). En somme, la plasticité à long-terme est altérée dans un contexte de vieillissement normal et semble

s'inverser en passant d'une potentialisation à une dépression synaptique persistante sur plusieurs minutes.

Donc, l'analyse des phénomènes de plasticité synaptique suggère que les mécanismes de la plasticité à court-terme semblent préservés avec l'âge, alors que les mécanismes qui médient la plasticité synaptique à long-terme sont profondément altérés pour les souris âgées et très âgées. Ces résultats sont partiellement en accord avec la récente étude de Krief et al. (2018), qui ont observé des altérations autant dans la plasticité à court-terme que la plasticité à long-terme pour la souris âgée (22M). Pris ensemble, les altérations de la plasticité à long-terme semblent être un phénomène cardinal pour la JNM sénescence.

Plusieurs mécanismes peuvent y être impliqués, mais nous supportons l'hypothèse que les CSPs contribuent en partie à cette altération de la plasticité à long-terme (Krief et al., 2018), puisqu'elles ont la capacité de moduler à la hausse ou à la baisse la communication synaptique et qu'une dysrégulation gliale est suffisante pour inverser les phénomènes de plasticité à long-terme (Todd et al., 2010). Dès lors, nous avons décidé d'approfondir notre investigation uniquement pour les souris de 3M et 24M, puisqu'aucune différence synaptique importante n'est observée entre les souris de 24M et 30M, puis que les altérations des propriétés des CSPs ont été caractérisées seulement chez les souris de 3M et 24M (Krief et al., 2018).

3.4 Manipulation sélective de l'activité calcique des CSPs

Dans le but d'investiguer la contribution des CSPs aux altérations de la plasticité synaptique observées plus tôt, il est nécessaire de manipuler spécifiquement l'activité gliale pour en analyser l'effet sur les phénomènes de plasticité synaptique. Nous avons opté pour la méthode d'électroporation de cellule unique puisqu'elle permet d'introduire des molécules dans des cellules cibles avec un fort taux de succès et sans affecter les propriétés synaptiques (Nevian and Helmchen, 2007; Darabid et al., 2013)(Darabid et al., 2018; en révision). Des molécules altérant l'activité gliale peuvent ainsi être incorporées dans les CSPs et cette tactique a déjà été utilisée avec succès dans une autre étude pour manipuler les CSPs à la JNM en développement (Darabid et al., 2018).

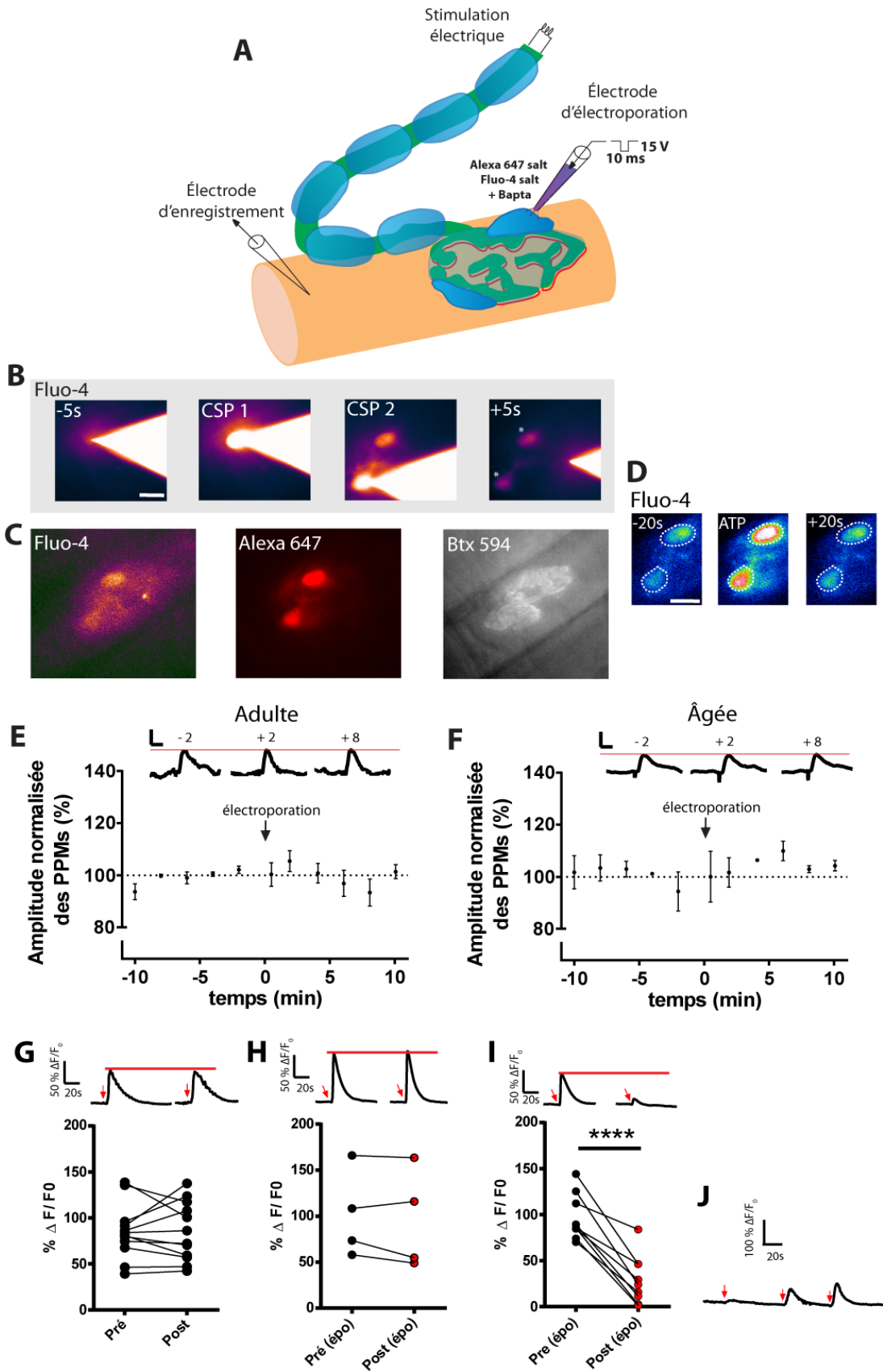


Figure 3.4. La méthode d'électroporation de cellule unique permet de sélectivement introduire des molécules dans les CSPs sans affecter la transmission synaptique et les propriétés gliales. (A) Schéma de la méthode d'électroporation de cellule unique pour les CSPs (en bleu) couplée à l'enregistrement électrophysiologique des PPMs. Un pulse (15 V; 10 ms) traverse la micropipette d'électroporation pour perméabiliser momentanément la membrane des CSPs et permettre l'introduction de molécules. (B) Images en fausses couleurs acquises avec un microscope à épifluorescence et détaillant en séquence l'électroporation de 2 CSPs pour introduire les molécules d'Alexa 647 et de Fluo-4. La micropipette d'électroporation est d'abord positionnée près d'une CSP par lumière transmise (-5s), puis un pulse est envoyé pour charger la première CSP (CSP 1), repositionnée avant d'envoyer un autre pulse pour charger la deuxième CSP (CSP 2). Noter le chargement sélectif du Fluo-4 dans les CSPs (*) dans l'image prise 5s après le deuxième pulse (+5). (C) Images prises à la fin de l'expérience (2h post électroporation) du marqueur morphologique (Alexa 647), de l'indicateur calcique (Fluo-4) et du marqueur des récepteurs nicotiques de la JNM (Btx 594). Noter les CSPs électroporées situées dans la même région que les récepteurs nicotiques. (D) Images des changements Ca^{2+} des CSPs 20 secondes avant l'application locale d'ATP (-20 s), en réponse à l'application d'ATP (ATP) et 20 secondes après l'ATP (+20) avec un retour au niveau basal. (E-F) En haut, exemples de PPM 2 minutes avant l'électroporation de CSPs (-2), 2 minutes après l'électroporation de CSPs (+2) et 8 minutes après l'électroporation de CSPs (+8) pour les JNMs de souris adultes (E) et âgées (F). En bas, amplitude normalisée des PPMs \pm SEM 10 minutes avant et 10 minutes après l'électroporation des CSPs (flèche) pour les JNMs d'adulte 3M (E) et pour les JNMs d'âgée 24M (F). (G-I) CSPs chargées par incubation de Fluo-4 AM. En haut, exemple de réponse calciques de CSPs à l'application locale d'ATP (flèche rouge) avant-après 20 minutes d'attente (G), avant-après l'électroporation de molécules d'Alexa 647 (H) et avant-après l'électroporation de molécules d'Alexa 647 et de Bapta (4 mM) (I). Notez la suppression de la réponse calcique pour les CSPs électroporées de Bapta (4 mM). En bas, l'amplitude de ces réponses calciques de CSPs (G-I). (J) Exemple de réponses calciques des CSPs "Bapta" à plusieurs applications locales de l'agoniste ATP. Noter la récupération de la réponse calcique au fil des applications. Échelle B-D : 10 μ m; Échelle E-F : 5 ms (axe horizontal) et 1 mV (axe vertical). **** $p \leq 0.0001$

La méthode d'électroporation de cellule unique (Figure 3.4A) consiste à l'introduction de molécules chargées dans les CSPs, à l'aide d'impulsion négatives (15 V, 10 ms) dirigée par une électrode d'électroporation (Darabid et al., 2013). En tous temps, l'indicateur calcique Fluo-4 a été introduit pour monitorer l'activité calcique des CSPs, en plus de l'indicateur morphologique Alexa 647 pour monitorer la forme des CSPs. Les CSPs ont été chargées une à la fois (pour la suite définie comme "électroporée") (Figure 3.4B), mais il est intéressant de mentionner qu'une diffusion des molécules a aussi été observée (~25% du temps) entre les CSPs. Tout de même, au minimum 2 CSPs ont été électroporées pour chaque JNM expérimentée. Ce nombre correspond généralement à plus de 50% des CSPs, puisqu'on retrouve en moyenne 3 CSPs à la JNM adulte et âgée pour le muscle LAL de souris (Krief et al., 2018; en révision). De plus, ce ratio est requis pour manipuler la régulation gliale (Todd et al., 2010).

Nous avons d'abord examiné la spécificité et l'efficacité de la technique d'électroporation de cellule unique. La Figure 3.4B montre des séquences tirées d'une vidéo prise pendant cette méthode d'électroporation pour une souris adulte et on peut observer que cette méthode est spécifique pour les CSPs (identifié par un *) autant pour les molécules de Fluo-4 (Figure 3.4B-C) que pour l'Alexa 647 (Figure 3.4C). Ces molécules introduites dans les CSPs peuvent rester jusqu'à quelques heures, tel qu'observé pour les images acquises 2h suivant l'expérimentation à la Figure 3.4C. Il est important de souligner que des résultats similaires de sélectivité ont été obtenus pour les souris âgées (données non présentées). Par la suite, l'identité et la viabilité des CSPs a été vérifiée par leur forme un peu arrondie, leur présence au-dessous des régions synaptiques identifiées par un marqueur des récepteurs postsynaptiques (Figure 3.4C; Btx 594) et leur capacité à répondre par une élévation calcique à l'application locale de l'agoniste ATP (exemple à la Figure 3.4D). D'autant plus important, la Figure 3.4F montre que l'application de cette méthode sur les CSPs n'influence pas la transmission synaptique basale chez l'adulte (amplitude normalisée des PPMs 2 min avant la méthode d'électroporation, 102.10 ± 1.41 %, 2 min après la méthode, 105.50 ± 4.02 %, et 8 min après la méthode, 93.35 ± 5.15 %, $N=4$, Friedman, post-test de Dunn, $p > 0.05$; Figure 3.4F). De même, elle ne semble pas influencer la transmission basale pour la JNM âgée (amplitude normalisée des PPMs 2 min avant la méthode d'électroporation, 94.41 ± 7.51 %, 2 min après la méthode, 101.60 ± 5.63 %, et 8 min après la méthode, 102.9 ± 1.28 %, $N=2$, Friedman, post-test de Dunn, $p > 0.05$, Figure

3.4G). Ainsi, la méthode d'électroporation de cellule unique est un bon outil qui permet d'introduire sélectivement des molécules dans les CSPs sans affecter la transmission synaptique basale.

Ensuite, nous avons porté notre attention sur les propriétés gliales suivant la méthode d'électroporation. Étant donné que cette méthode perméabilise temporairement la membrane plasmique des CSPs, nous nous demandions si la méthode d'électroporation à elle seule pouvait compromettre sévèrement les propriétés gliales et s'il était possible d'introduire un puissant chélateur du Ca^{2+} , le Bapta, pour abolir les mécanismes calcium-dépendants des CSPs. Pour tester le tout, nous avons pris avantage de la capacité des CSPs à répondre à l'application d'ATP, puisqu'elle fatigue très peu les réserves internes de ces cellules lorsqu'elle est appliquée successivement à des intervalles d'au moins 15 minutes (Georgiou et al., 1999). De ce fait, il est possible de comparer l'effet avant-après de la méthode d'électroporation et de la chélation du Bapta (Figure 3.4G-I).

Ainsi, nous avons préalablement chargé les CSPs par incubation de Fluo-4 AM, une méthode de référence extensivement utilisée pour l'étude des CSPs (Ko and Robitaille, 2015). Tel qu'attendu, nous avons observé une réponse à l'ATP similaire pour deux applications locales d'ATP (10 μM) séparées par un intervalle de 20 minutes ($n=12$, $N=5$, t-test pairé, $p>0.05$, Figure 3.4G). Si la méthode d'électroporation de cellule unique n'affecte pas les propriétés gliales, nous nous attendions à observer le même phénomène pour des CSPs électroporées. C'est exactement ce qu'on a obtenu à la Figure 3.4H puisque l'amplitude de la réponse calcique des CSPs à l'application locale d'ATP (10 μM) reste semblable (t-test pairée, $p>0.05$, $n=4$, $N=2$) à celle testée sur les mêmes cellules 20 min après une électroporation uniquement de molécules d'Alexa 647. Donc, la technique d'électroporation à elle seule n'affecte pas la réponse calcique des CSPs à l'ATP. Maintenant en rajoutant du Bapta (4mM) dans la solution de la micropipette d'électroporation, la Figure 3.4I montre que l'amplitude de la réponse calcique est fortement diminuée (t-test pairée, $p < 0.0001$, $n=9$, $N=3$), 20 min après l'électroporation d'Alexa 647 et de Bapta (4mM). Cette baisse significative de la réponse calcique signifie que les molécules de Bapta ont efficacement été introduites dans les CSPs et cette suppression calcique n'est pas le résultat d'une mort cellulaire, puisqu'elle peut être récupérée par des applications locales d'ATP de manière successives (voir l'exemple à la Figure 3.4J). D'autant plus qu'une concentration

plus faible de Bapta (2mM) a aussi été testée, mais elle n'était pas effective pour altérer les réponses calciques (données non présentées). Il est important de mentionner que ces résultats de la Figure 3.4G-I proviennent de souris adultes, mais des résultats similaires ont aussi été observées pour les préparations de souris âgées (données non présentées). Tout bien considéré, notre méthode d'électroporation ne semble pas affecter les mécanismes impliqués dans l'élévation calcique des CSPs en réponse à l'agoniste ATP et elle permet d'introduire des molécules chélatrices Bapta qui vont altérer l'activité calcique des CSPs.

3.5 L'abolition de l'activité calcique des CSPs altère les phénomènes de plasticité synaptique

Les CSPs des JNMs du LAL, autant de souris adultes qu'âgées, vont répondre par une élévation calcique aux SHFs (100 Hz, 5s), le même patron d'activité utilisé pour notre paradigme de plasticité synaptique (Krief et al., 2018; article en révision). Sachant que les CSPs peuvent moduler les phénomènes de plasticité synaptique (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001; Todd et al., 2010), cette détection de l'activité synaptique par les CSPs pendant les SHFs pourrait refléter une participation gliale aux phénomènes de plasticité synaptique que nous avons précédemment caractérisés. De plus, ces mêmes études de modulation gliale ont rapporté que l'abolition de l'activité calcique des CSPs permettait d'examiner leur participation à la plasticité synaptique. Dès lors, nous avons voulu tester l'hypothèse qu'une abolition de l'activité calcique gliale altérerait les phénomènes de plasticité synaptique à long-terme autant chez la souris adulte qu'âgée.

Pour ce faire, nous avons préalablement électroporé les CSPs (avec ou sans Bapta) d'une JNM, puis nous avons procédé à l'imagerie calcique de ces CSPs électroporées en réponse aux SHFs du paradigme de stimulation précédemment utilisé pour étudier la plasticité synaptique (Figure 3.5E-L). Simultanément pour ces JNMs expérimentées, nous avons aussi enregistré les PPMs pendant tout le paradigme de stimulation afin d'étudier l'effet de ces manipulations gliales sur la plasticité synaptique.

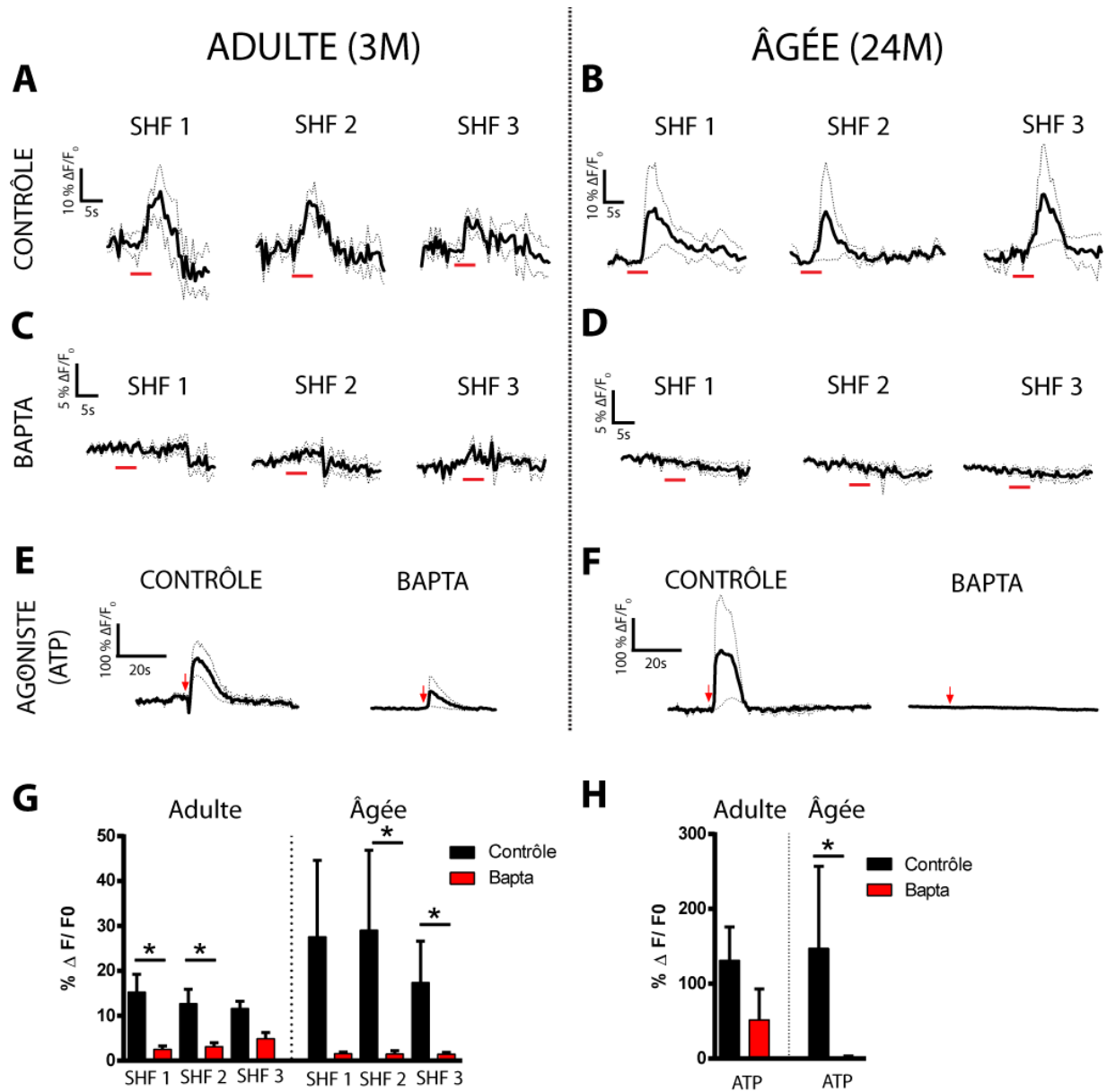


Figure 3.5. L'activité calcique des CSPs est abolie par le chélateur calcique BAPTA. (A-D) Réponses calciques moyennes des CSPs (trait foncé) \pm SEM (trait pointillé) induites par les SHFs 1-3 (100 Hz 5s; trait rouge) pour les JNMs adulte (3M) (A et C) et âgée (24M) (B et D). Les CSPs dites "Contrôle" ont été chargées par électroporation de molécules d'Alexa 647 et de Fluo-4 (A-B). Les CSPs dites "Bapta" ont été chargées par électroporation de molécules d'Alexa 647, de Fluo-4 et de Bapta (4 mM) (C-D). Noter l'absence de réponses pour les CSPs "Bapta". (E-F) Réponses calciques moyennes des CSPs (trait foncé) \pm SEM (trait pointillé) induites par une seule application locale de l'agoniste ATP (10 μ M; flèche rouge) pour les CSPs

“Contrôles” et “Bapta” de JNMs adulte (E) et âgée (F). (G-H) Histogramme de l’amplitude moyenne des réponses calciques des CSPs “Contrôle” et “Bapta” de JNMs adultes et âgées pour les SHFs 1-3 (G) et pour l’application de l’agoniste ATP (H). * $p \leq 0.05$

La détection de l’activité synaptique est abolie pour les CSPs électroporées avec du Bapta

Dans un premier temps, considérant que notre méthode d’électroporation ne semble pas affecter les propriétés gliales autant chez la souris adulte qu’âgée, nous nous attendions à observer des réponses calciques aux SHFs pour les CSPs électroporées avec seulement l’indicateur calcique et morphologique (groupe témoin). Alors que les CSPs électroporées en plus avec du Bapta (Bapta; 4mM) ne devraient pas être en mesure de répondre par une élévation calcique aux SHFs.

Effectivement, la Figure 3.5A-B montre que les CSPs électroporées sans Bapta semblent répondre aux trois SHFs chez la souris adulte (100% des cellules répondent à au moins une SHF, $n=5$ $N=2$) et âgée (75% des cellules répondent à au moins une SHF, $n=4$ $n=2$). En plus, l’amplitude de ces élévations calciques ne semble pas différer avec l’âge pour chaque SHF (Figure 3.5G, tests de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni, $p > 0.05$), ce qui est consistant avec les résultats reportés par une récente étude qui a utilisé une méthode différente d’imagerie calcique (Krief et al., 2018; en révision). Toutefois, il est important de considérer que ces élévations calciques aux SHFs que nous avons observées sont très variables en termes d’amplitude, principalement en raison de la variabilité de la concentration finale de l’indicateur calcique dans la cellule suivant la méthode d’électroporation (Nevian and Helmchen, 2007).

Tout de même, nous observons un effet éminent pour l’élévation calcique des CSPs aux SHFs lorsqu’elles sont électroporées avec du Bapta (Figure 3.5C-D). Effectivement, ces réponses calciques paraissent abolies autant pour l’adulte (17% répondent à au moins une SHF, $n=3$ $N=6$) que pour la souris âgée (0% des cellules répondent à au moins une SHF, $n=3$ $N=6$). De plus, cette abolition de l’élévation calcique est significative pour les CSPs adultes (Figure 3.5G, tests de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni, $p \leq 0.05$), et ce pour la SHF 1 (Contrôle $15.26 \pm 4.02\% \Delta F/F_0$ vs Bapta $2.62 \pm 0.96\% \Delta F/F_0$), la SHF 2 (Contrôle $12.71 \pm 3.24\% \Delta F/F_0$ vs Bapta $3.28 \pm 1.03\% \Delta F/F_0$) et tend avec un $p = 0.06$ à être significatif pour la SHF 3

(Contrôle 11.61 ± 1.62 % $\Delta F/F_0$ vs Bapta 3.28 ± 1.03 % $\Delta F/F_0$). De même, l'amplitude des réponses calciques des CSPs âgées tend ($p= 0.10$) à diminuer avec le Bapta pour la SHF 1 (Contrôle 27.60 ± 17.00 % $\Delta F/F_0$ vs Bapta 1.52 ± 0.43 % $\Delta F/F_0$), mais elle est significativement diminuée (Tests de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni, $p \leq 0.05$) pour la SHF 2 (Contrôle 29.05 ± 17.79 % $\Delta F/F_0$ vs Bapta 0.93 ± 0.59 % $\Delta F/F_0$) et la SHF 3 (Contrôle 17.42 ± 9.25 % $\Delta F/F_0$ vs Bapta 1.35 ± 0.53 % $\Delta F/F_0$). À la lumière de ces derniers résultats, l'élévation calcique des CSPs pour les SHFs et conséquemment leur capacité de détection de l'activité synaptique semble supprimée lorsque les CSPs sont électroporées de Bapta (4mM) autant pour la souris adulte qu'âgée.

Par ailleurs, à la fin de chacune des expérimentations, nous avons aussi vérifié la réponse calcique à l'application locale d'ATP (10 μ M) pour ces CSPs électroporées. Étant donné que le Bapta abolit en grande partie la réponse calcique des CSPs à l'ATP, nous nous attendions à répéter ces observations et confirmer l'efficacité de la chélation calcique pour ces cellules. À cet effet, la Figure 3.5I-J illustre de grandes amplitudes pour les élévations de Ca^{2+} des CSPs contrôles autant chez l'adulte que l'âgée, alors que ces élévations calciques pour les CSPs Bapta paraissent fortement diminuée chez l'adulte et complètement abolie chez l'âgée. Effectivement, la Figure 3.5L montre que l'amplitude des réponses calciques chez l'adulte tend à diminuer avec le chélateur calcique (contrôle 131.20 ± 44.57 %, $n=5$ et $N=2$ vs Bapta 51.64 ± 41.26 %, $n=6$ et $N=3$, Mann-Whitney, $p > 0.05$), alors qu'elle semble complètement abolie chez l'âgée (contrôle 147.0 ± 109.6 , $n=3$ et $N=2$ vs Bapta 2.22 ± 1.109 , $n=6$ et $N=3$, Mann-Whitney, $p \leq 0.05$). En considérant le tout, ces résultats suggèrent que les CSPs Bapta ne semblent plus répondre adéquatement pour la détection de l'activité synaptique (SHF) et à l'application d'ATP.

L'augmentation synaptique et la plasticité à long-terme pourraient impliquer une participation gliale

Par la suite, nous avons porté notre attention sur les enregistrements électrophysiologiques réalisés simultanément avec les manipulations gliales, afin d'étudier l'implication des CSPs sur la plasticité synaptique à la JNM adulte et âgée. La réalisation de ces expériences constitue en soi un défi technique important pour obtenir des tailles d'échantillons

optimales, par conséquent nous reporterons aussi le nombre de répliquas nécessaire pour les compléter. Ainsi, dans la prémisse que les CSPs sont impliquées dans les phénomènes de plasticité synaptique précédemment caractérisées (Figure 3.3), nous nous attendons à observer des altérations dans la plasticité synaptique pour les JNMs avec des CSPs Bapta en comparaison avec les JNMs avec des CSPs Contrôle.

D'abord pour les JNMs d'animaux adultes, la Figure 3.6B montre l'amplitude moyenne des PPMs entre les deux groupes de JNMs manipulées (3M N=2; 3M Bapta N=3) et les trois formes de plasticité synaptique analysées. En premier, la dépression synaptique pendant chaque SHF ne semble pas altérée lorsque l'activité calcique des CSPs est abolie (Figure 3.6C, tests de Mann-Whitney, $p > 0.05$). Effectivement, l'amplitude moyenne des PPMs pour les JNMs 3M était respectivement pour chaque SHF de $21.46 \pm 0.59\%$, $22.20 \pm 5.08\%$ et $20.59 \pm 0.32\%$. Très similaire aux JNMs de 3M Bapta qui montrent respectivement une amplitude moyenne des PPMs de $20.66 \pm 5.29\%$, $19.12 \pm 0.02\%$ et $20.32 \pm 5.92\%$. Ainsi, ces résultats suggèrent que les CSPs adultes ne semblent pas impliquées dans la dépression synaptique pour notre modèle d'étude murin, alors qu'elles participent à ce phénomène de plasticité synaptique à la JNM de grenouille (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001). Ensuite, nous avons analysé l'augmentation synaptique (Figure 3.6D). Ce phénomène de renforcement synaptique aussi n'est pas significativement différent pour les JNMs dont les CSPs ont leur activité calcique abolie, et ce pour chaque Post-SHF (Figure 3.6D, tests de Mann-Whitney, $p > 0.05$). Notamment, l'amplitude moyenne des PPMs pour le groupe 3M était respectivement pour chaque Post-SHFs (1-3) de $55.45 \pm 19.26\%$, de $55.77 \pm 22.20\%$ et de $43.59\% \pm 22.76\%$, alors que l'amplitude moyenne des PPMs est multipliée par un facteur de ~ 2 pour les JNMs avec activité calcique gliale abolie, et ce pour chaque Post-SHFs (1-3) soient $97.88 \pm 29.83\%$, $105.30 \pm 37.32\%$ et $101.3 \pm 39\%$. Néanmoins, il est nécessaire de garder en considération la taille de l'échantillon pour expliquer l'absence d'effet significatif, puisque ces différences de moyenne importante deviendraient significatives avec des répliquas (N) de 7 par groupe expérimental (test de puissance pour mesurer la taille de l'échantillon, GraphPad StatMate 2.00). En sommes, nos présentes données suggèrent que les CSPs chez l'adulte ne semblent pas impliquées dans la dépression synaptique et l'augmentation synaptique.

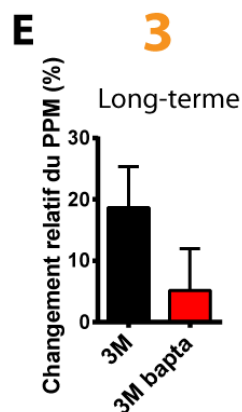
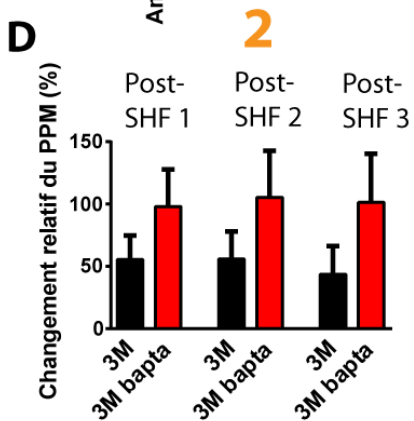
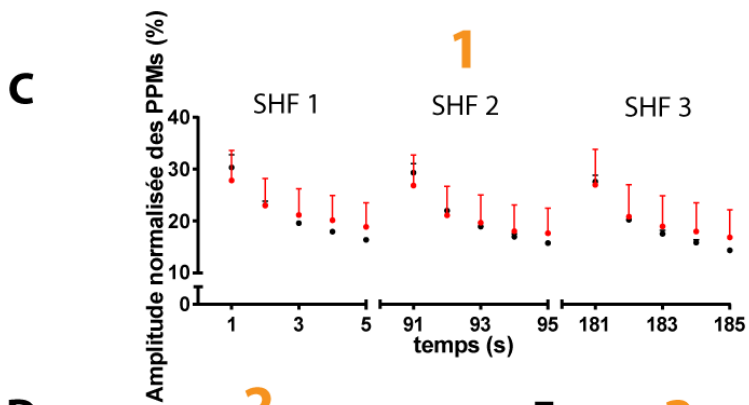
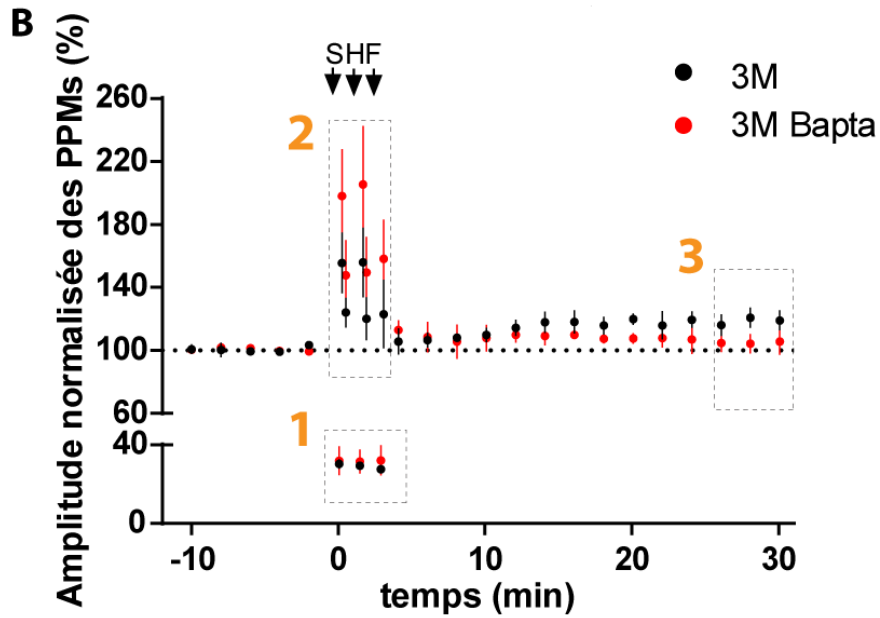
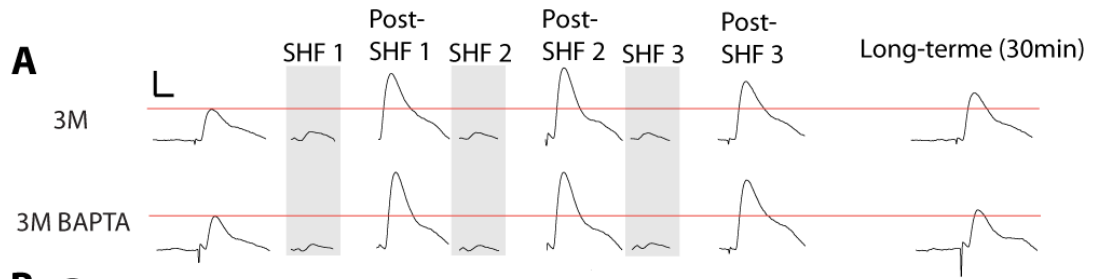


Figure 3.6. L'effet d'une altération de l'activité calcique des CSPs sur la plasticité synaptique des JNMs de souris adulte. (A) Exemples de PPMs pour la stimulation basale, les SHFs (SHF 1-3), suivant les SHFs (post-SHF 1-3) et 30 min suivant la première SHF (long-terme). Les JNMs 3M ont des CSPs chargées avec des molécules d'Alexa 647 et de Fluo-4, alors que les JNMs 3M BAPTA ont des CSPs chargées avec des molécules d'Alexa 647, de Fluo-4 et de Bapta (4 mM). (B) Amplitude normalisée des PPMs \pm SEM pendant le paradigme de stimulation pour les JNMs de souris adultes (3M; en noir) et (3M BAPTA; en rouge). Les formes de plasticité observées sont la dépression synaptique (1), l'augmentation synaptique (2) et la plasticité à long-terme (3). (C) Amplitude normalisée des PPMs \pm SEM pendant les SHFs (SHF 1-3) de 5s (100 PPMs par seconde). (D) Histogramme du changement relatif des 15 PPMs \pm SEM suivant directement les SHF (post-SHF 1-3). (E) Histogramme du changement relatif des PPMs \pm SEM de la 25^{ième} à la 30^{ième} minute suivant la première SHF. Échelle : 5 ms (axe horizontal) et 1 mV (axe vertical).

Puis, nous avons examiné l'implication des CSPs dans la plasticité à long-terme qui est le phénomène de plasticité synaptique altérée lors du vieillissement (Figure 3.3). Une implication des CSPs dans cette forme de plasticité synaptique chez l'adulte renforcerait l'idée qu'elles soient impliquées dans les altérations de plasticité synaptique observées chez l'âgée. La Figure 3.6E montre que la potentialisation synaptique à long-terme ne diminue pas significativement lorsque l'activité calcique des CSPs est abolie (Figure 3.6E, test de Mann-Whitney, $p > 0.05$). En dépit que le changement relatif du PPM de la 25^{ième} à la 30^{ième} minute soit de $18.67 \pm 6.69\%$ pour le groupe contrôle et de $5.16 \pm 6.82\%$ pour le groupe Bapta. Des différences d'un facteur de plus de 3 sont observées pour la valeur moyenne du changement relatif du PPM et ces différences deviendraient significatives avec une taille d'échantillon de 8 répliquas par groupe (test de puissance pour mesurer la taille de l'échantillon, GraphPad StatMate 2.00). Tout de même, il reste que nos données semblent suggérer que la plasticité à long-terme des JNMs de la souris adulte n'est pas principalement médié par les CSPs.

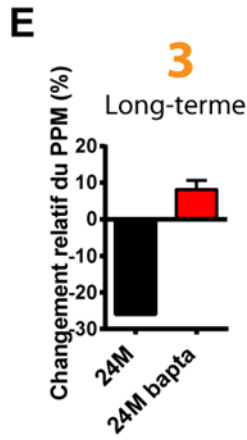
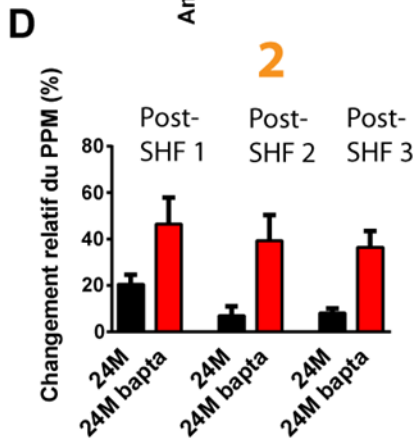
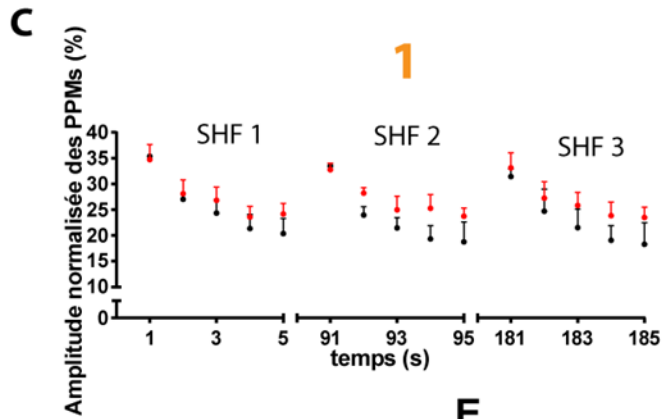
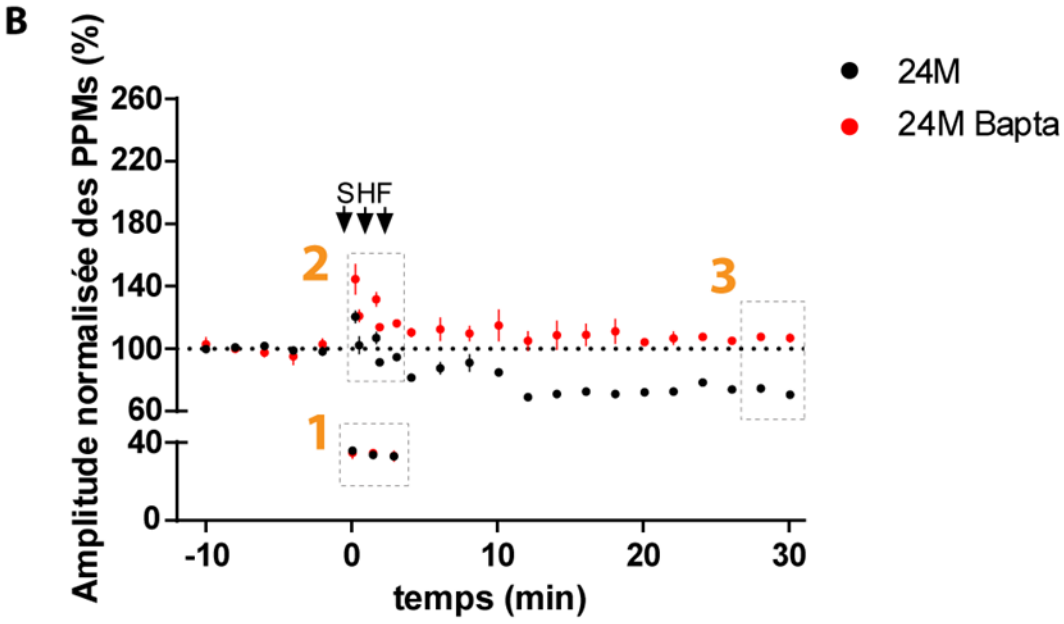
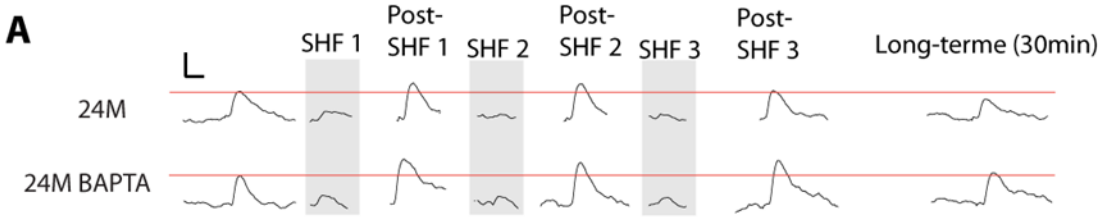


Figure 3.7. L'effet d'une altération de l'activité calcique des CSPs sur la plasticité synaptique des JNMs de souris âgée. (A) Exemples de PPMs pour la stimulation basale, les SHFs (SHF 1-3), suivant les SHFs (post-SHF 1-3) et 30 min suivant la première SHF (long-terme). Les JNMs 24M ont des CSPs chargées avec des molécules d'Alexa 647 et de Fluo-4, alors que les JNMs 24M BAPTA ont des CSPs chargées avec des molécules d'Alexa 647, de Fluo-4 et de Bapta (4 mM). (B) Amplitude normalisée des PPMs \pm SEM pendant le paradigme de stimulation pour les JNMs de souris adultes (24M; en noir) et (24M BAPTA; en rouge). Les formes de plasticité observées sont la dépression synaptique (1), l'augmentation synaptique (2) et la plasticité à long-terme (3). (C) Amplitude normalisée des PPMs \pm SEM pendant les SHFs (SHF 1-3) de 5s (100 PPMs par seconde). (D) Histogramme du changement relatif des 15 PPMs \pm SEM suivant directement les SHFs (post-SHF 1-3). (E) Histogramme du changement relatif des PPMs \pm SEM de la 25^{ième} à la 30^{ième} minute suivant la première SHF. Noter la direction opposée des changements synaptiques. Échelle : 5 ms (axe horizontal) et 1 mV (axe vertical).

Maintenant pour les animaux âgés, la Figure 3.7B montre l'amplitude normalisée des PPMs pendant le paradigme de stimulation où on peut observer des différences importantes entre les groupes. En effet, les JNMs avec des CSPs électroporées sans Bapta (contrôle, N=2) vont montrer une diminution, de manière persistante, de leur transmission synaptique suivant les SHFs. Ces observations sont cohérentes avec nos précédents résultats pour les JNMs âgées et très âgées (Figure 3.3B), suggérant que notre méthode d'électroporation seule ne semble pas affecter les phénomènes de plasticité synaptique. Étonnamment, les JNMs avec des CSPs électroporées avec Bapta (Bapta, N=3) montrent une légère augmentation de la transmission synaptique à long-terme qui persiste dans le temps, ce qui est exactement le même phénotype observé pour la JNM adulte (Figure 3.3B) et les JNMs adultes manipulées (Figure 3.6B). Ces différents changements dans la transmission synaptique sont particulièrement révélés par les phénomènes de plasticité synaptique analysés.

En premier lieu pour la dépression synaptique, les JNMs 24M contrôles montrent amplitude moyenne pendant chaque SHF (SHF 1-3, Figure 3.7C) de $25.68 \pm 1.96\%$, $27.47 \pm 2.45\%$ et $23.40 \pm 2.05\%$. Semblable aux JNMs 24M Bapta qui montrent une amplitude moyenne pendant chaque SHF de $26.98 \pm 1.86\%$, $22.99 \pm 3.29\%$ et $26.70 \pm 2.64\%$. L'activité calcique

des CSPs ne semble pas impliquée dans la dépression synaptique à la JNM âgée (Figure 3.7C, tests de Mann-Whitney, $p > 0.05$). En second lieu pour l'augmentation synaptique, la Figure 3.7D montre que cette forme de renforcement de la synapse tend à être plus importante pour les JNMs dont les CSPs ont une activité calcique abolie (Tests de Mann-Whitney, $p > 0.05$). En effet, l'amplitude moyenne des PPMs pour le groupe 24M était respectivement pour chaque Post-SHF (1-3) de $20.46 \pm 4.12\%$, de $6.88 \pm 4.07\%$ et de $8.09\% \pm 1.95\%$, alors que l'amplitude moyenne des PPMs est multipliée par un facteur de ~ 2 à 6 pour les JNMs avec activité calcique gliale abolie, et ce pour chaque Post-SHF (1-3) soit de $46.41 \pm 11.44\%$, $39.28 \pm 11.02\%$ et $36.33 \pm 7.13\%$. Curieusement, cette augmentation très importante, mais non significative, est très semblable à celle observée pour les JNMs adultes manipulées (Figure 3.6). En considérant toutes ces observations, nous devons augmenter notre nombre de répliquas biologiques jusqu'à l'atteinte d'un nombre (N) de 5 par groupe expérimental (test de puissance pour mesurer la taille de l'échantillon, GraphPad StatMate 2.00), afin de pouvoir affirmer avec certitude que l'activité calcique des CSPs régulent à la baisse les phénomènes d'augmentation synaptique de la JNM âgée.

Par ailleurs, les changements les plus profonds vont toucher la plasticité à long-terme. Effectivement, on observe, à la Figure 3.7E, une transmission synaptique diminuée à long-terme (25^{ème} à la 30^{ème} minutes suivant la première SHF) pour les JNMs contrôles de souris 24M (changement relatif du PPM, -26.02% , $N=1$). Cette observation est supportée par les résultats obtenus sur des JNMs âgées dont les CSPs n'ont pas été électroporées (Figure 3.3E). Complètement à l'inverse, les JNMs Bapta de souris 24M présentent une transmission synaptique augmentée à long-terme (changement relatif du PPM, $8.16 \pm 2.44\%$, $N=3$). Il est important de mentionner qu'une telle augmentation de la transmission synaptique à long-terme n'a été observée pour aucune JNM âgée ou très âgée antérieurement étudiée. En considérant ces résultats, l'abolition de l'activité calcique des CSPs semble renverser les phénomènes de plasticité synaptique passant d'une dépression à une potentialisation synaptique à long-terme.

À la lumière de tous ces résultats, les mécanismes calcium-dépendants des CSPs ne semblent définitivement pas impliqués dans la dépression synaptique, alors qu'une augmentation du nombre de répliquas biologiques permettrait de révéler la participation significative des mécanismes calcium-dépendants gliaux dans l'augmentation synaptique et la

plasticité à long-terme des JNMs adultes et âgées. De plus, nos observations suggèrent que les CSPs semblent directement impliquées dans l'altération des phénomènes de plasticité synaptique à la JNM sénescence et appuie l'hypothèse que la régulation gliale de l'activité synaptique est altérée avec l'âge. La prochaine étape est de décortiquer les mécanismes cellulaires de cette dysrégulation gliale de la plasticité synaptique à long-terme.

3.6 Les mécanismes purine-dépendants semblent impliqués dans l'altération des phénomènes de plasticité synaptique

À la JNM de souris, les phénomènes de plasticité synaptique dépendants des CSPs sont médiés par les récepteurs présynaptiques à l'adénosine A_{2A} et A_1 (Todd et al., 2010). En particulier, cette étude a démontré que les récepteurs A_{2A} médient la potentialisation synaptique gliale dépendante, alors que les récepteurs A_1 médient la dépression synaptique gliale dépendante. Dans la prémisses que les altérations de la plasticité à long-terme observés avec le vieillissement normal sont gliales-dépendantes, nous émettons l'hypothèse que la potentialisation à long-terme des JNMs adultes est médiée par l'activation des récepteurs A_{2A} et la dépression à long-terme des JNMs âgées par l'activation des récepteurs A_1 . Pour tester cette hypothèse, nous avons d'abord enregistré les PPMs avec des stimulations basales (0.2 Hz, 10 minutes) avant de changer la solution physiologique de perfusion avec une solution semblable, mais contenant un antagoniste des récepteurs à l'adénosine (A_{2A} ou A_1). Puis, nous avons enregistré l'effet pharmacologique sur la transmission basale pendant 20 minutes (0.2 Hz) et par la suite étudié les phénomènes de plasticité synaptique évoqués par notre paradigme de stimulation (Figure 3.8A).

ADULT 3M

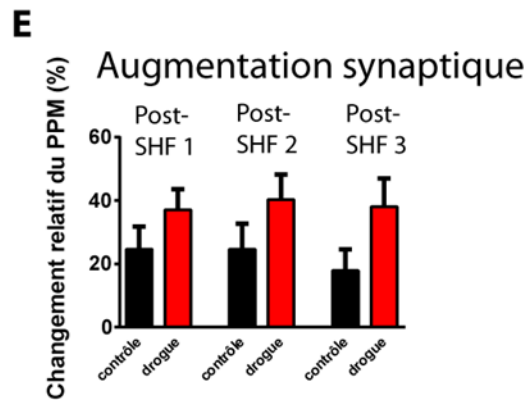
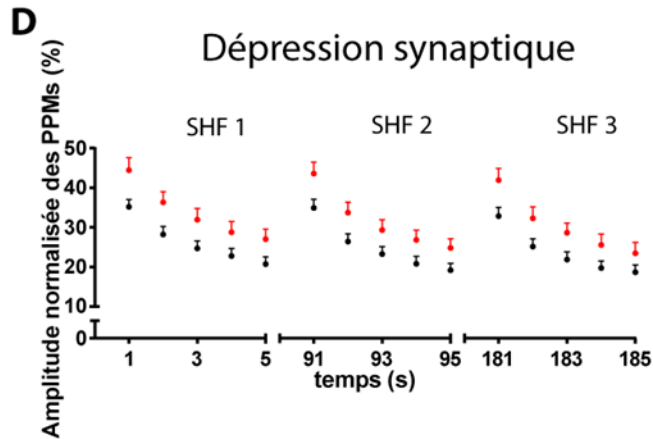
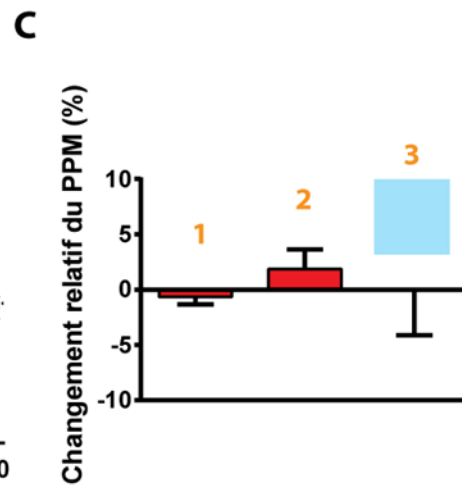
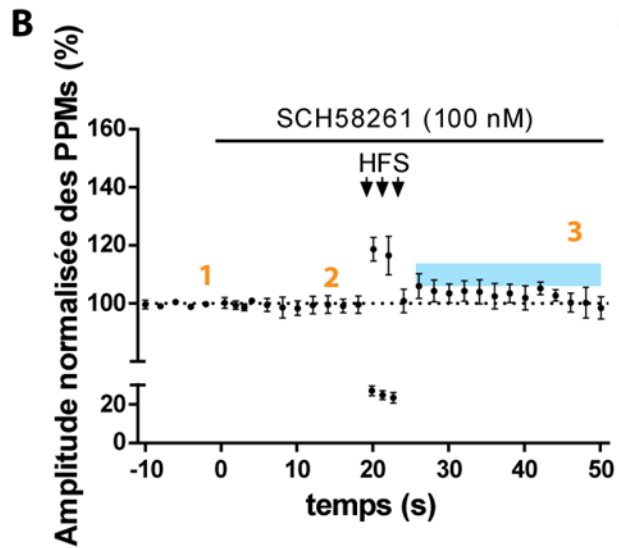
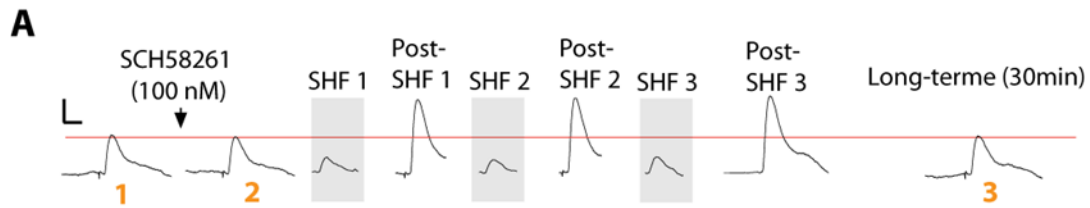


Figure 3.8. L'inhibition des récepteurs A_{2A} affecte les phénomènes de plasticité synaptique.

(A) Exemples de PPMs pour la stimulation basale avant l'application (1) et après l'application (2) de l'antagoniste des récepteurs A_{2A} (SCH58261; 100 nM; Drogue), les SHFs (SHF 1-3), suivant les SHFs (post-SHF 1-3) et 30 min suivant la première SHF (3, long-terme). (B) Amplitude normalisée des PPMs ± SEM pour les JNMs de souris adultes (3M). Notez que l'application de SCH58261 n'affecte pas la transmission synaptique (2). Le rectangle bleu correspond à l'amplitude normalisée des PPMs ± SEM du groupe contrôle en absence de drogue (Figure 3.3; 3M) (C) Histogramme du changement relatif des PPMs ± SEM pour les 5 minutes avant l'ajout de SCH58261 (1), les PPMs 15 à 20 minutes après l'ajout de SCH58261(2) et les PPMs 25 à 30 minutes suivant la première SHF (3). Le rectangle bleu correspond à la plasticité à long-terme du groupe contrôle ± SEM (Figure 3.3; 3M). (D) Amplitude normalisée des PPMs ± SEM pendant les SHFs (SHF 1-3) de 5s (100 PPMs par seconde). (E) Histogramme du changement relatif des 15 PPMs ± SEM suivant directement les SHFs (post-SHF 1-3). Échelle : 5 ms (axe horizontal) et 1 mV (axe vertical).

L'inhibition des récepteurs A_{2A} altère les phénomènes de plasticité synaptique à la JNM adulte

D'abord pour les JNMs adultes, la perfusion d'une solution physiologique Ringer contenant l'antagoniste des récepteurs A_{2A} (SCH-58261, 100 nM) n'a pas affecté la transmission synaptique basale (Friedman, post-test de Dunn, $p > 0.05$). À cet effet, la Figure 3.8C montre que le changement relatif du PPM pendant la période de transmission basale ('1', $-0,64 \pm 0.68\%$, N=5) était semblable au changement relatif du PPM 15 minutes suivant le début de perfusion de la drogue SCH-58261 ('2', $1.87 \pm 1.76\%$, N=5). Cette absence d'effet sur la transmission basale est d'ailleurs cohérente avec les résultats précédemment publiés par (Todd et al., 2010).

Ensuite, nous avons aussi examiné la plasticité synaptique à court-terme en comparaison avec les résultats obtenus lors de notre caractérisation de la plasticité synaptique (Figure 3.3). D'abord pour la dépression synaptique, la Figure 3.8D montre que les JNMs en présence de SCH-58261 (100 nM) tendent légèrement à moins diminuer, en termes d'amplitude de leur PPMs, pendant chacune des SHFs comparativement au JNM contrôle du même âge (tests de t avec correction de Bonferroni, N=5, $p > 0.05$). Particulièrement, les JNMs avec l'antagoniste

A_{2A} montrent respectivement pour chacune des SHFs (SHF 1-3) une amplitude moyenne des PPMs de $33.72 \pm 2.66\%$, $31.67 \pm 2.42\%$ et $30.39 \pm 2.61\%$. Nous nous attendions à observer une tendance dans la direction opposée, où l'antagoniste A_{2A} aggrave la dépression synaptique compte tenu du rôle facilitateur des récepteurs A_{2A} (Todd et al., 2010). De même, nous nous attendions à observer une diminution de l'augmentation synaptique si ce phénomène de plasticité synaptique implique les récepteurs A_{2A}. Toutefois, aucune différence significative n'est observée dans l'augmentation synaptique, lorsque l'on compare les JNMs en présence de l'antagoniste A_{2A} avec des JNMs de même âge, et ce pour chacune des Post-SHFs (Figure 3.8E, Post-SHF 1-3, tests de t avec correction de Bonferroni, N=5, $p > 0.05$). D'ailleurs, l'augmentation synaptique des JNMs avec la SCH-58261 (100 nM) est respectivement pour chaque Post-SHF (1-3) de $37.10 \pm 6.47\%$, de $40.31 \pm 7.92\%$ et $38.01 \pm 8.96\%$. Mis ensemble, ces résultats suggèrent que les récepteurs A_{2A} ne semblent pas particulièrement impliqués dans les phénomènes de plasticité à court-terme étudiés dans notre étude.

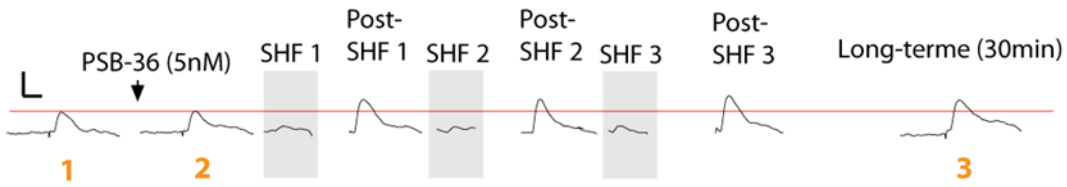
D'un autre côté, l'antagoniste des récepteurs A_{2A} a inhibé la plasticité à long-terme des JNMs adultes. Effectivement, la plasticité à long-terme 25-30 minutes suivant les trains de SHFs ('3', avec un changement relatif du PPM de $-0.08 \pm 4.05\%$, N=4) n'était significativement pas différente de la transmission basale ('1') ou de la transmission basale en présence de l'antagoniste A_{2A} ('2') (Figure 3.8C, Friedman, post-test de Dunn, $p > 0.05$). La plasticité à long-terme en présence de l'antagoniste A_{2A} est donc abolie, mais elle n'est cependant pas significativement différente de la plasticité à long-terme moyenne des JNMs adultes caractérisée précédemment à la Figure 3.3 (encadré bleu, t-test non pairé avec une correction de Bonferroni, $p > 0.05$). Ainsi, ces derniers résultats suggèrent que l'inactivation des récepteurs A_{2A} inhibe en partie les phénomènes de plasticité synaptique à long-terme chez l'adulte.

L'inhibition des récepteurs A₁ renverse la plasticité à long-terme de la JNM âgée

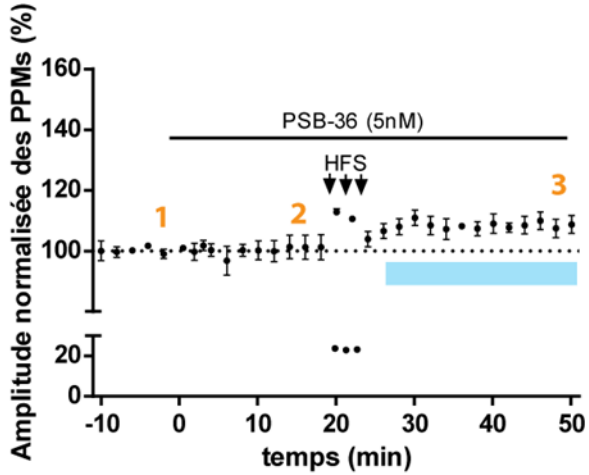
Dans la prémisse que les phénomènes de plasticité synaptique médiés par les CSPs impliquent des mécanismes purines-dépendants, alors la dépression synaptique à long-terme observée à la JNM âgée pourrait impliquer une activation des récepteurs A₁ et/ou une inactivation des récepteurs A_{2A}. Sinon, cette modulation gliale implique d'autres mécanismes non connus.

ÂGÉE (24M)

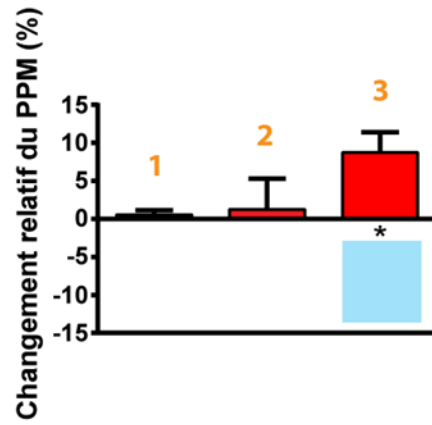
A



B

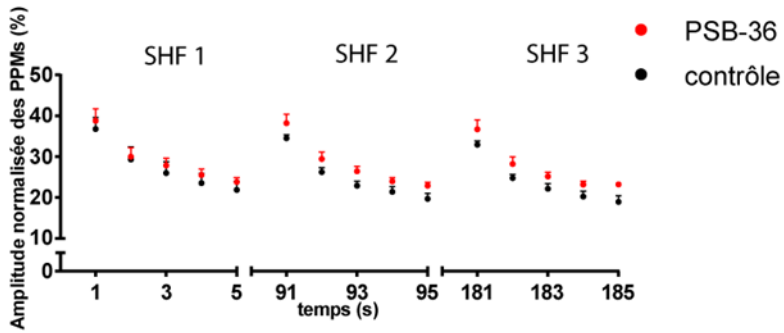


C



D

Dépression synaptique



E

Augmentation synaptique

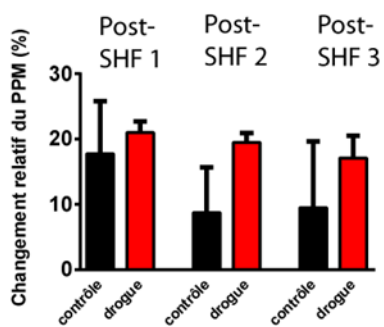


Figure 3.9. L'inhibition des récepteurs A₁ renverse l'altération de la plasticité à long-terme des JNMs âgées. (A) Exemples de PPMs pour la stimulation basale avant l'application (1) et après l'application (2) de l'antagoniste des récepteurs A₁ (PSB-36; 5 nM; Drogue), les SHFs (SHF 1-3), suivant les SHFs (post-SHF 1-3) et 30 min suivant la première SHF (3, long-terme). (B) Amplitude normalisée des PPMs ± SEM pour les JNMs de souris âgées (24M). Notez que l'application de la PSB-36 (5 nM) n'affecte pas la transmission synaptique basale (2). Le rectangle bleu correspond à l'amplitude normalisée des PPMs ± SEM du groupe contrôle en absence de drogue (Figure 3.3; 24M) (C) Histogramme du changement relatif des PPMs ± SEM pour les 5 minutes avant l'ajout de drogue (1), les PPMs de la 15^{ième} à la 20^{ième} minute après l'ajout de PSB-36 (2) et les PPMs 25 à 30 minutes suivant la première SHF (3). Le rectangle bleu correspond à la plasticité à long-terme du groupe contrôle ± SEM (Figure 3.3; 24M). (D) Amplitude normalisée des PPMs ± SEM pendant les SHFs (SHF 1-3) de 5s (100 PPMs par seconde). (E) Histogramme du changement relatif des 15 PPMs ± SEM suivant directement les SHFs (post-SHF 1-3). Échelle : 5 ms (axe horizontal) et 1 mV (axe vertical). * $p \leq 0.05$

De ce fait, nous avons testé l'hypothèse d'une activation des récepteurs A₁ à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques similaires aux expériences d'antagoniste A_{2A}, mais cette fois en testant l'effet de l'antagoniste des récepteurs A₁ PSB-36 (5nM) sur la transmission synaptique basale et la plasticité synaptique (Figure 3.9A).

Cohérent avec le rôle des récepteurs A₁ dans la transmission synaptique (Todd et al., 2010), la Figure 3.9C montre que le changement relatif du PPM pendant la transmission basale ('1', $-0,55 \pm 0.56\%$, N=4) était semblable (Friedman, post-test de Dunn, $p > 0.05$) au changement relatif du PPM 15 minutes suivant le début de perfusion du PSB-36 ('2', $1.23 \pm 4.02\%$, N=4).

Par la suite, nous avons examiné les effets sur les phénomènes de plasticité à court-terme. Si les récepteurs A₁ participent à la dépression synaptique pendant la SHF, on s'attendrait à observer une inhibition de la dépression synaptique lorsqu'ils sont inactivés. Plutôt, la Figure 3.9D ne montre aucune différence au niveau de la dépression synaptique pour les JNMs âgées en présence de l'antagoniste A₁ comparativement aux résultats obtenus pour les JNMs âgées (test de t avec correction de Bonferroni, N=3, $p > 0.05$). Notamment, l'amplitude moyenne des

PPMs pour les JNMs en présence de l'antagoniste A₁ étaient respectivement pour chaque SHF (1-3) de $29.20 \pm 1.85\%$, de $28.55 \pm 1.15\%$ et de $27.52 \pm 1.10\%$. De ce fait, les récepteurs A₁ ne semblent pas impliqués dans cette forme de plasticité synaptique. De même, aucune différence n'est observée pour l'augmentation synaptique pour les JNMs en présence de l'antagoniste A₁ (tests de t avec correction de Bonferroni, N=4, $p > 0.05$). Cette augmentation synaptique, en termes de changement relatif du PPM, était pour chacun des Post-SHF (1-3) de $20.96 \pm 1.72\%$, $19.47 \pm 1.45\%$ et de $17.07 \pm 3.41\%$. À la lumière de ces derniers résultats, les récepteurs A₁, tout comme observé pour les récepteurs A_{2A}, ne semblent pas particulièrement impliqués dans la plasticité à court-terme.

Par ailleurs, on observe un profond changement au niveau de la plasticité à long-terme des JNMs âgées puisque l'inhibition des récepteurs A₁ a significativement renversé cette forme de plasticité passant d'une dépression synaptique à une potentialisation à long-terme (Figure 3.9C, '3', test de t avec une correction de Bonferroni, $p < 0.05$). Effectivement, la plasticité à long-terme 25-30 minutes suivant la première SHF, en présence de l'antagoniste A_{2A}, était de $8.71 \pm 2.67\%$ (N=3). Aussi, cette forme de plasticité synaptique tend à être différente de la transmission basale et de la transmission basale en présence de l'antagoniste A_{2A} (Figure 3.8C, Friedman, post-tests de Dunn, $p > 0.05$, N=3). D'autant plus qu'il est important de souligner que cette potentialisation à long-terme en présence de l'antagoniste A₁ a été observée pour toutes les JNMs âgées expérimentées, puis elle est semblable à celle observée pour les JNMs adultes et pour les JNMs dont l'activité modulatrice des CSPs a été altérée. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'antagoniste A₁ n'altère pas la transmission synaptique basale, mais qu'il abolit et tend à inverser la plasticité synaptique à long-terme à la JNM âgée. Mis ensemble, nos résultats suggèrent que la dépression synaptique à long-terme observée à la JNM âgée semblerait non seulement dépendante de l'activité calcique des CSPs, mais elle impliquerait aussi l'activation des récepteurs A₁.

Chapitre 4 : Discussion

L'affaiblissement musculaire associé au vieillissement normal est inévitable et il peut sévèrement compromettre la qualité de vie des personnes âgées. Son étiologie est complexe, mais la dégénérescence de la JNM est un candidat important que nous avons investigué dans la présente étude. Nous avons porté une attention particulière sur l'efficacité de la JNM sénescence, puisqu'elle est de première importance pour la fonction musculaire, puis nous avons examiné le rôle des cellules gliales à cette synapse. À l'aide d'enregistrements électrophysiologiques, nous avons montré que la plasticité synaptique à long-terme est de polarité inversée chez les animaux âgés (24M et 30M), passant d'une potentialisation à une dépression synaptique avec l'âge. Pour investiguer les mécanismes sous-tendant cette altération synaptique, nous avons adapté une stratégie impliquant la méthode d'électroporation de cellule unique pour manipuler l'activité calcique des CSPs. Cette manipulation gliale conjointement à des enregistrements électrophysiologiques ont permis de révéler que les altérations des phénomènes de plasticité à long-terme semblent être médiées de manière calcium-dépendante par les CSPs. Puis, nous avons montré que ces différents phénomènes de plasticité synaptique à long-terme sont aussi dépendants de l'activation des récepteurs à l'adénosine, qui sont des effecteurs présynaptiques des CSPs (Todd et al., 2010).

Le succès de notre étude est qu'elle montre pour la première fois l'implication des cellules gliales dans les altérations fonctionnelles de la JNM sénescence. Dans les prochaines sections, nous allons proposer une dysrégulation synaptique par les CSPs sénescents, puis nous allons aborder les répercussions des altérations synaptiques sur la fonction motrice et les mécanismes explicatifs de cette dysrégulation gliale. Par la suite, nous allons proposer un modèle intégré de la JNM sénescence, aborder l'hétérogénéité des altérations associées au vieillissement et proposer des cibles thérapeutiques pour ralentir le déclin moteur. Finalement, nous allons aborder l'implication de dysrégulation gliale dans les maladies neurodégénératives.

4.1 La dysrégulation des CSPs sénescents

Plusieurs changements importants sont observés au niveau des CSPs lors du vieillissement. Ces cellules gliales vont paraître hypertrophiées (Ludatscher et al., 1985) et des données du laboratoire en processus de publication (Krief et al., 2018; en révision) montrent que

les CSPs semblent élaborer davantage de prolongements gliaux, en plus de présenter une activation diminuée des récepteurs gliaux muscariniques lors de la détection de l'activité synaptique. Une diminution de l'activation muscarinique est associée à une augmentation de l'expression gliale de GFAP (Georgiou et al., 1994) et il a été proposé que ce phénotype des CSPs soit associé à la réparation de la JNM sénescence (Krief et al., 2018). Curieusement, plusieurs de ces caractéristiques des CSPs sénescences sont semblables à celles qui caractérisent les astrocytes "réactifs" au SNC (Anderson et al., 2014) et cette "réactivité" est associée à des changements importants de l'expression génique et de la fonction des astrocytes qui peuvent être bénéfiques ou dommageables pour l'intégrité neuronale (Anderson et al., 2014; Liddelw and Barres, 2017). Ce phénotype astrocytaire est aussi très hétérogène et il est observé en réponse à des lésions aiguës/trauma, maladies neurodégénératives et particulièrement lors du vieillissement (Liddelw and Barres, 2017; Clarke et al., 2018). En effet, une récente étude suggère que le phénotype réactif prédominant des astrocytes chez l'animal âgé est le type A1 (Clarke et al., 2018), un type neurotoxique (Liddelw et al., 2017). En intégrant ce concept de "réactivité" pour la CSP, nous proposons que les CSPs sénescences puissent aussi présenter un phénotype avec des changements d'expression génique et fonctionnelles qui pourrait contribuer à la dégénérescence de la JNM. Dans cette veine, encore aucune étude n'a été réalisée pour comparer le transcriptome génique des CSPs dans un contexte de vieillissement, puisqu'isoler la CSP à celle myélinisante constitue encore un défi technique important qui nécessite d'identifier de meilleurs marqueurs cellulaires pour les mammifères (Ko and Robitaille, 2015). Tout de même, des évidences suggèrent une dysrégulation par les CSPs de l'efficacité synaptique et du maintien du contact synaptique chez l'animal âgé.

D'abord, la régulation de l'efficacité synaptique par les CSPs dépend largement de leurs propriétés de détection de l'activité synaptique (Ko and Robitaille, 2015). Toutefois chez l'animal âgé, la contribution des récepteurs muscariniques gliaux pour la réponse calcique évoquée lors de la détection synaptique semble diminuée (Krief et al., 2018). Puis, mes travaux du présent mémoire montrent que les mécanismes calcium-dépendants des CSPs de JNMs adultes pourraient contribuer à l'augmentation persistante de l'efficacité synaptique, alors que les mécanismes calcium-dépendants des CSPs sénescences pourraient contribuer à la dépression synaptique à long-terme observée pour les JNMs âgées (24M). Ces altérations gliales dans la

modulation de l'efficacité synaptique semblent principalement cibler l'élément présynaptique. En effet, la terminaison axonale a été extensivement démontrée comme étant la principale cible de la modulation synaptique par les CSPs (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001; Todd et al., 2010) et dans notre étude, l'implication des récepteurs à l'adénosine dans les phénomènes de plasticité synaptique gliaux-dépendants supporte une interaction neurone-glie chez l'animal âgé. En considérant le tout, nous proposons un modèle d'une dysrégulation de l'efficacité synaptique par les CSPs qui est dépendante de l'âge (Figure 4.1). D'ailleurs, ce modèle nous permet de prédire que la dysrégulation gliale semble persistante très tard dans le vieillissement (souris 30M), puisque l'altération de la plasticité à long-terme demeure.

Par la suite, cette altération de la modulation gliale est observée conjointement à des âges où la JNM montre une désorganisation structurelle (Valdez et al., 2012)(Krief et al., 2018). De fait, la régulation par les CSPs de la stabilité et de l'efficacité synaptique est étroitement liée (Ko and Robitaille, 2015). Par exemple, l'étude de (Reddy et al., 2003) a montré qu'une suppression complète de la régulation des CSPs menait à long-terme (après 1 semaine) à une diminution importante de la transmission synaptique, mais aussi à des dénervations importantes des JNMs. De plus, il a été suggéré que la régulation gliale de la maintenance synaptique implique l'activation des mêmes récepteurs gliaux que pour la modulation gliale de l'activité synaptique (Ko and Robitaille, 2015). Considérant les altérations des récepteurs gliaux (Krief et al., 2018) et la dysrégulation gliale de l'efficacité synaptique observée par notre étude, nous proposons qu'une dysrégulation gliale puisse aussi contribuer à l'instabilité structurelle observée avec l'âge. Dès lors, il est avant tout primordial d'éclaircir les mécanismes cellulaires gliaux impliqués dans la maintenance synaptique chez l'animal adulte (Ko and Robitaille, 2015) pour ensuite examiner leur implication chez l'animal âgé. Cela permettrait de réaliser des observations de l'intégrité structurelle par imagerie répétée *in vivo* chez l'animal âgé où la fonction des CSPs est altérée par une approche virale ou pharmacologique.

En considérant le tout, les CSPs sénescents montre un phénotype "réactif" avec une régulation anormale de l'efficacité synaptique et possiblement de la maintenance de la JNM. En contraste, des évidences suggèrent que la régulation gliale de la réparation synaptique paraît conservée avec l'âge, mais qu'elle n'arrive plus à compenser efficacement l'environnement et

l'instabilité de la JNM sénescence (Balice-Gordon, 1997; Kang and Lichtman, 2013)(Krief et al., 2018).

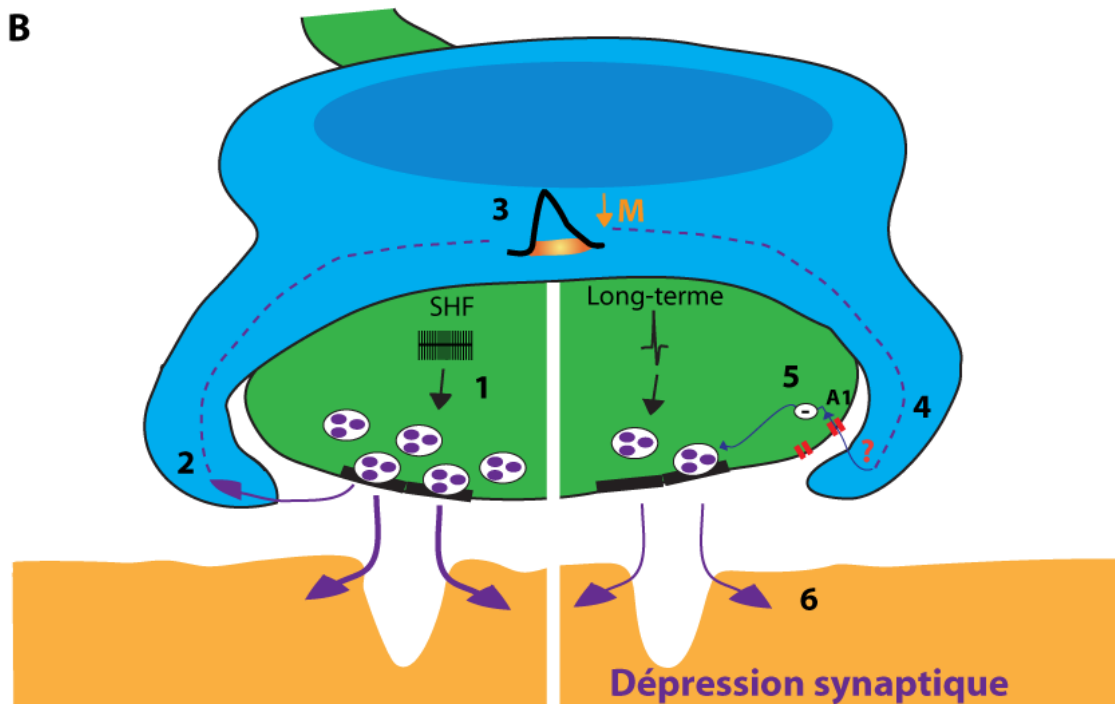
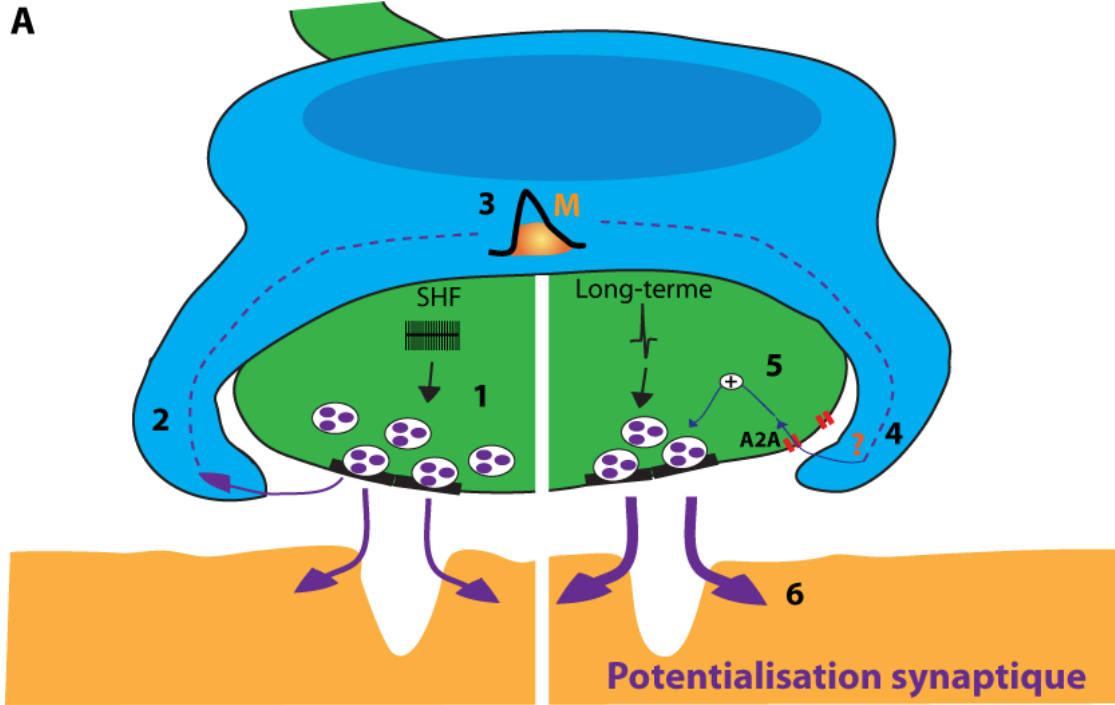


Figure 4.1. Modèle simplifié d'un dérèglement dépendant de l'âge de l'efficacité synaptique par les CSPs. **A**, Pour l'animal adulte, la libération de neurotransmetteurs évoquée par une SHF (1) active des récepteurs gliaux (2) et mène à une élévation calcique des CSPs avec une contribution muscarinique (M) importante (3). Des mécanismes calcium-dépendants pourraient entraîner une libération de gliotransmetteurs (purines) (4) qui mènerait à l'activation des récepteurs A_{2A} (5) et conséquemment à une potentialisation à long-terme de la transmission synaptique (6). **B**, Pour l'animal âgé, la libération de neurotransmetteurs évoquée par une SHF (1) active des récepteurs gliaux (2) et mène à une élévation calcique des CSPs avec une contribution muscarinique diminuée (3). Cette fois, les mécanismes calcium-dépendants pourraient entraîner une libération de gliotransmetteurs (purines) (4) qui mènerait à l'activation des récepteurs A₁ (5) et conséquemment à une dépression à long-terme de la transmission synaptique (6).

4.2 Conséquences possibles des altérations synaptiques sur la fonction motrice

D'abord, une diminution de la libération de neurotransmetteurs médiée par les CSPs sénescents pourrait contribuer à la diminution du facteur de sécurité de la JNM, un phénomène déjà observé chez l'animal âgé (Deschenes, 2011). Cela aurait pour conséquence d'augmenter le risque d'échec du couplage entre la dépolarisation du PPM et la contraction musculaire. Notamment, Balice-Gordon (1997) a observé pour les JNMs d'animaux âgés qu'une diminution importante de la transmission synaptique suivant des stimulations répétées de 10-20 Hz entraînait, environ 50% du temps, un échec pour initier la cascade de contraction musculaire. Ces échecs vont compromettre le contrôle moteur et largement diminuer la force musculaire générée puisque les UMs recrutées ne seront que partiellement activées. Pour les personnes âgées, cela se résume en une plus grande variabilité pendant une activité musculaire soutenue, ce qui pourrait accentuer l'imprécision des mouvements et contribuer aux altérations des capacités de production d'une force isométrique (Morrison and Newell, 2012). Toutefois, cette dépression synaptique gliale dépendante semble être compensée après une très longue période chez l'animal âgé, car nous n'avons pas observé de diminution dans l'amplitude basale des PPMs avec l'âge, notamment, par une augmentation du contenu quantique avec l'âge (Fahim,

1997). Seulement, ce phénomène compensatoire n'a pas été observé pour notre modèle d'étude. Donc, il semblerait que cette plasticité glial-dépendante observée à un âge avancé ne cible pas des processus cellulaires persistants telles que l'expression génique et la synthèse des protéines, ou alors que d'autres mécanismes homéostatiques de plasticité synaptique soient en cause pour rétablir l'efficacité synaptique (Badawi and Nishimune, 2018). Il serait important d'évaluer précisément la durée de ces formes de plasticité à long-terme et particulièrement si elles peuvent se cumuler en répétant le paradigme de stimulation, afin d'établir précisément l'impact que cette baisse d'efficacité synaptique pourrait avoir sur la fonction motrice. À l'instar, cet effet pourrait aussi être favorable pour la JNM sénescence et la fonction motrice, puisqu'il permettrait de réduire significativement la quantité d'énergie dépensée par la transmission synaptique (Harris et al., 2012).

Par ailleurs, il existe une relation entre l'activité synaptique et la stabilité synaptique au niveau du SNC. Spécialement pour le phénomène de dépression à long-terme de la synapse qui a été associée à son élimination (Wiegert and Oertner, 2013). Ce phénomène a aussi été observé pendant le développement de la JNM, où un nombre surnuméraire de terminaisons axonales sont en compétition pour former le contact synaptique et la seule terminaison axonale qui est conservée est généralement celle avec la plus grande efficacité synaptique (Buffelli et al., 2003). Ce n'est pas encore bien compris s'il existe une relation semblable pour la JNM adulte, mais cela pourrait particulièrement avoir un impact pour la JNM sénescence. En effet, la dénervation de la JNM a été extensivement observée chez l'animal âgé (Valdez et al., 2010; Jang and Van Remmen, 2011) et elle est attribuée à une instabilité du contact synaptique couplée à des mécanismes de réparation inefficace qui peuvent être gliales-dépendantes (Balice-Gordon, 1997). La dénervation de la JNM altère toutes les fonctions motrices associées au contrôle moteur, étant donné qu'une fibre musculaire squelettique dénervée n'est plus fonctionnelle pour l'UM et qu'elle dégénère si elle n'est pas réinnervée dans une période critique (Sakuma et al., 2016). Aussi, la dénervation de la JNM précède la perte de masse musculaire et il a été proposé qu'elle contribue à la sarcopénie qui touche les personnes âgées (Deschenes et al., 2010). En effet, une étude a montré que l'induction d'une instabilité importante de la JNM produit un phénotype de sarcopénie chez la souris (Butikofer et al., 2011). De plus, l'instabilité de la JNM dépendante de l'âge est associée à un remodelage de l'UM avec des fibres musculaires de même

type anormalement rassemblées, à une augmentation de la taille des UMs et à une diminution importante du nombre d'UMs rapides (voir la revue de Hepple and Rice, 2016). Ensemble, la perte des fibres musculaires couplée au remodelage des UMs contribue fortement à la perte de force musculaire (Hepple and Rice, 2016).

À la lumière de ces évidences, la dénervation des JNMs et l'affaiblissement suivant une forte activité des JNMs restantes contribuent à accroître la variabilité et la fatigabilité des capacités motrices, en plus de diminuer la force musculaire. Lorsqu'elles sont combinées, ces altérations motrices vont sévèrement compromettre l'autonomie physique des personnes âgées (Power et al., 2013). Il est donc capital d'éclaircir les mécanismes sous-tendant la régulation anormale par les CSPs, puisqu'elle pourrait contribuer à ces altérations de la JNM sénescence.

4.3 Qu'est-ce qui sous-tend la dysrégulation de l'efficacité synaptique par les CSPs?

Une dysrégulation de l'efficacité synaptique par les CSPs peut prendre origine à différents niveaux dans la cascade de la modulation gliale, entre autres par une détection inappropriée de l'activité synaptique par les CSPs, une gliotransmission anormale et une altération des effecteurs gliaux.

Altérations de la détection de l'activité synaptique

D'abord, il a été proposé qu'une dysrégulation par les CSPs sénescences de la plasticité à long-terme soit associée à une diminution de la contribution des récepteurs muscariniques (Krief et al., 2018). Pourquoi les récepteurs muscariniques gliaux sont-ils moins activés avec l'âge? En fait, une diminution de l'activation des récepteurs muscariniques gliaux peut être médiée, entre autres, par un blocage de l'activité synaptique (Belair et al., 2010) ou par une diminution d'expression/interaction des neurotrophines tel que la NT-3 (Todd et al., 2007). Aussi, elle peut être causée par des changements avec l'âge du sous-type et du niveau d'expression des récepteurs gliaux (M1, M3, M5) ainsi que de leur localisation. Par exemple, les récepteurs muscariniques gliaux ne sont pas localisés précisément près des régions des zones actives pendant la formation de la JNM (Darabid et al., 2013) et il est possible qu'avec l'âge les

mécanismes cellulaires responsables de l'ancrage de ces récepteurs muscariniques gliaux soient altérés. De ce fait, mieux comprendre les mécanismes cellulaires responsables de l'organisation des récepteurs gliaux et le sous-type de récepteur muscarinique glial principalement altéré avec l'âge constitue une perspective de recherche intéressante.

Une diminution de sensibilité des récepteurs muscariniques avec l'âge pourrait altérer la réponse calcique gliale et conséquemment altérer la gliotransmission. Toutefois, tout comme dans l'étude de Krief et al., (2018), nous n'avons pas observé de baisse dans l'amplitude de la réponse calcique des CSPs sénescence à l'activité synaptique. Étant donné que l'effet modulateur des CSPs sénescence semble toujours calcium-dépendant, cela peut être une question de signalisation calcique différentiel (muscarinique vs purinergique). En d'autres mots, il est possible que la signalisation muscarinique active des mécanismes calcium-dépendant différents de la signalisation purinergique et conséquemment influence différemment la libération de gliotransmetteurs. D'autant plus, cette explication est compatible avec des évidences au niveau des astrocytes d'une relation spatiotemporelle entre la réponse calcique et les propriétés de gliotransmission (Araque et al., 2014). Une expérience qui permettrait de révéler en partie la contribution muscarinique à la modulation gliale serait d'examiner les phénomènes de plasticité synaptique gliale dépendante à la JNM en présence d'antagoniste muscarinique tel que l'atropine, un puissant antagoniste à large spectre des récepteurs muscariniques, ou préférentiellement avec un antagoniste spécifique pour les récepteurs muscariniques gliaux (M1, M3, M5) (Wright et al., 2009). D'un autre côté, une autre explication concernant la signalisation calcique implique la capacité des CSPs à décoder l'activité synaptique. En effet, la modulation gliale est aussi fortement tributaire de la forme de la réponse calcique gliale, qui correspond à un code qui dicte en quelque sorte la gliotransmission (Todd et al., 2010). Puisque la forme de la réponse calcique des CSPs est conservée avec l'âge (Krief et al., 2018), une interprétation inexacte de ce code calcique par les mécanismes gliaux calcium-dépendants pourrait mener à un dérèglement de la régulation gliale. Une expérience pour éclaircir ces mécanismes de décodage serait de tester un paradigme de stimulation différent de celui utilisé dans la présente étude, qui médie idéalement une forme de réponse gliale et synaptique différente pour la JNM adulte telle qu'observée par (Todd et al., 2010), puis de comparer l'effet d'un tel paradigme de stimulation sur les propriétés de la JNM âgée.

Par ailleurs, une diminution de la contribution muscarinique est aussi associée à des changements de l'expression génique de GFAP et à un phénotype de réparation gliale (Georgiou et al., 1999). Il est connu qu'un phénotype de réparation pour les cellules de Schwann myélinisantes est associé à une régulation à la hausse des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation du nerf et en contrepartie à une régulation à la baisse des gènes impliqués dans la fonction myélinisante (Arthur-Farraj et al., 2017). Dans la même veine, une diminution de la contribution muscarinique pourrait aussi réguler à la baisse plusieurs gènes impliqués dans la régulation gliale de l'activité synaptique et produire des changements dans la signalisation cellulaire responsable de la dysrégulation gliale.

Altérations de la gliotransmission purinergique

La gliotransmission purinergique a été particulièrement étudiée à la JNM dans le contexte de la modulation gliale de l'efficacité synaptique (Todd et al., 2010; Ko and Robitaille, 2015). Il est connu que le type de récepteurs présynaptiques à l'adénosine activé (A_1 ou A_{2A}) dépend du patron d'activité synaptique (Correia-de-Sa et al., 1996) et de la signature calcique des CSPs (Todd et al., 2010). Puis, qu'une activation des récepteurs à l'adénosine influence la libération de neurotransmetteurs en régulant différents types de canaux calciques présynaptiques (Correia-de-Sa et al., 1996; Silinsky, 2004).

Pour l'animal âgé, les récepteurs A_1 semblent être privilégiés, puisque leur inactivation abolit totalement la dépression synaptique qui semble aussi être gliale dépendante. Compatible avec nos résultats, l'activation des récepteurs A_1 est préservée chez l'animal âgé, alors que l'activation des récepteurs A_{2A} est altérée (Pousinha et al., 2012). Ensemble, ces observations suggèrent que les mécanismes présynaptiques des récepteurs A_1 sont conservés avec l'âge et que les mécanismes altérés de la modulation gliale sont plutôt en aval des effecteurs présynaptiques. Ainsi, c'est plutôt le choix du type de récepteur à l'adénosine qui est compromis, puisque la potentialisation à long-terme des JNMs adultes semble impliquer les récepteurs A_{2A} .

Étant donné que les récepteurs A_1 et A_{2A} se régulent pour balancer leur activation qui est dépendante du niveau d'adénosine (Cunha, 2001; Todd et al., 2010), un débalancement

favorisant les récepteurs A_1 chez l'animal âgé (Pousinha et al., 2012) pourrait aussi sous-tendre la dépression synaptique médiée par les CSPs. Cependant, l'inactivation des récepteurs A_1 et l'abolition de l'activité calcique gliale ont produit une plasticité à long-terme similaire, suggérant que l'activation des récepteurs A_1 plutôt que l'inactivation des récepteurs A_{2A} est responsable de la dépression à long-terme gliale dépendante.

Cependant, l'implication des récepteurs A_1 présents sur les CSPs (Garcia et al., 2013) et pouvant contribuer à la détection de l'activité synaptique (Rochon et al., 2001) ne peut pas être exclue de notre étude. Pour éclaircir davantage le tout, il serait primordial de caractériser complètement les capacités d'activation et d'inactivation des récepteurs A_1 et A_{2A} avec l'âge pour notre modèle d'étude, ainsi que l'activité des ectonucléotidases responsable de dégrader l'ATP gliale en adénosine (Richardson and Brown, 1987; Cunha and Sebastiao, 1991; Correia-de-Sa et al., 1996).

Interaction entre les CSPs

Les JNMs du LAL sont composés de plusieurs CSPs (~3 cellules) autant pour l'animal adulte qu'âgé (Krief et al., 2018) et leur régulation de l'efficacité synaptique pourrait aussi impliquer des interactions entre les CSPs.

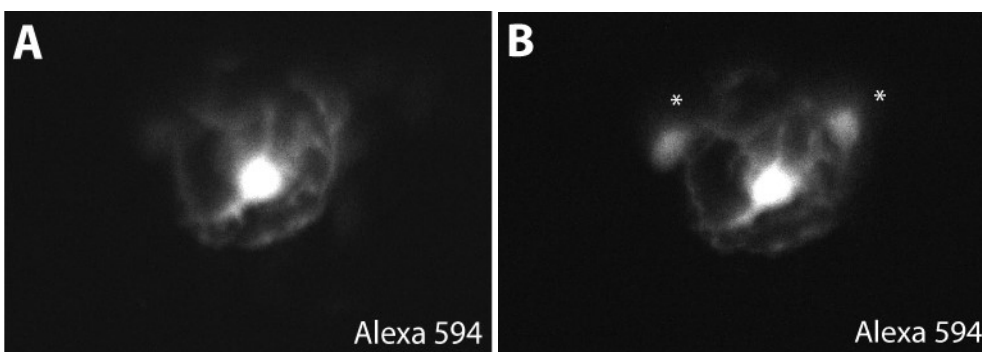


Figure 4.2. Communication cytoplasmique entre les CSPs. (A) Images prises par microscopie à épifluorescence du marqueur morphologique Alexa 594 quelques minutes suivant la méthode d'électroporation de cellule unique et (B) la même JNM une heure plus tard. Noter la présence du marqueur morphologique au niveau du soma de deux CSPs non électroporés (*).

Effectivement, les CSPs d'une même JNM montrent des signes de connexion cytoplasmique, puisque les molécules électroporées dans une CSP ont parfois diffusé au fil du temps vers d'autres CSPs (Figure 4.2) et ce phénomène est observé aussi à la JNM âgée. Très peu est connu sur cette communication entre les CSPs, si elle est fonctionnelle et comment elle influence la fonction gliale et synaptique. Cette communication pourrait être réalisée par des jonctions communicantes (de l'anglais *gap junction*) qui ont été bien documentées pour d'autres cellules gliales telles que les cellules de Schwann myélinisantes (Balice-Gordon et al., 1998) et les astrocytes (Bennett et al., 2003). Les jonctions communicantes permettent le transfert, entre autres, de métabolites, d'ions et messagers intracellulaires entre les cellules. On peut imaginer qu'une telle communication soit bénéfique pour amplifier l'effet modulateur des CSPs, mais que dans des conditions pathologiques ou de vieillissement normal cela puisse amplifier la dysrégulation gliale. Il est aussi possible que cette observation soit un artéfact induit par notre méthode d'électroporation de cellule unique dont le fort voltage pourrait ouvrir cette communication cytoplasmique entre les CSPs. Si tel est le cas, cette communication cytoplasmique ne serait probablement que très peu fonctionnelle dans des conditions normales et elle pourrait davantage être un vestige de leur similitude avec les cellules de Schwann myélinisante, tout comme l'expression par les CSPs de molécules impliquées dans la myélinisation (Georgiou and Charlton, 1999; Ko and Robitaille, 2015).

4.4 Modèle intégré de la JNM sénescence

À la lumière de la dernière section, plusieurs altérations de l'élément glial peuvent compromettre sa fonction régulatrice et conséquemment la fonction synaptique. Cependant, la JNM est une synapse tripartite et il est nécessaire de considérer, puis d'intégrer les changements survenant au niveau des trois éléments actifs de cette synapse puisqu'ils peuvent s'influencer mutuellement. De ce fait, nous discuterons des altérations observées à la JNM sénescence et de leur possible interaction (voir la Figure 4.3).

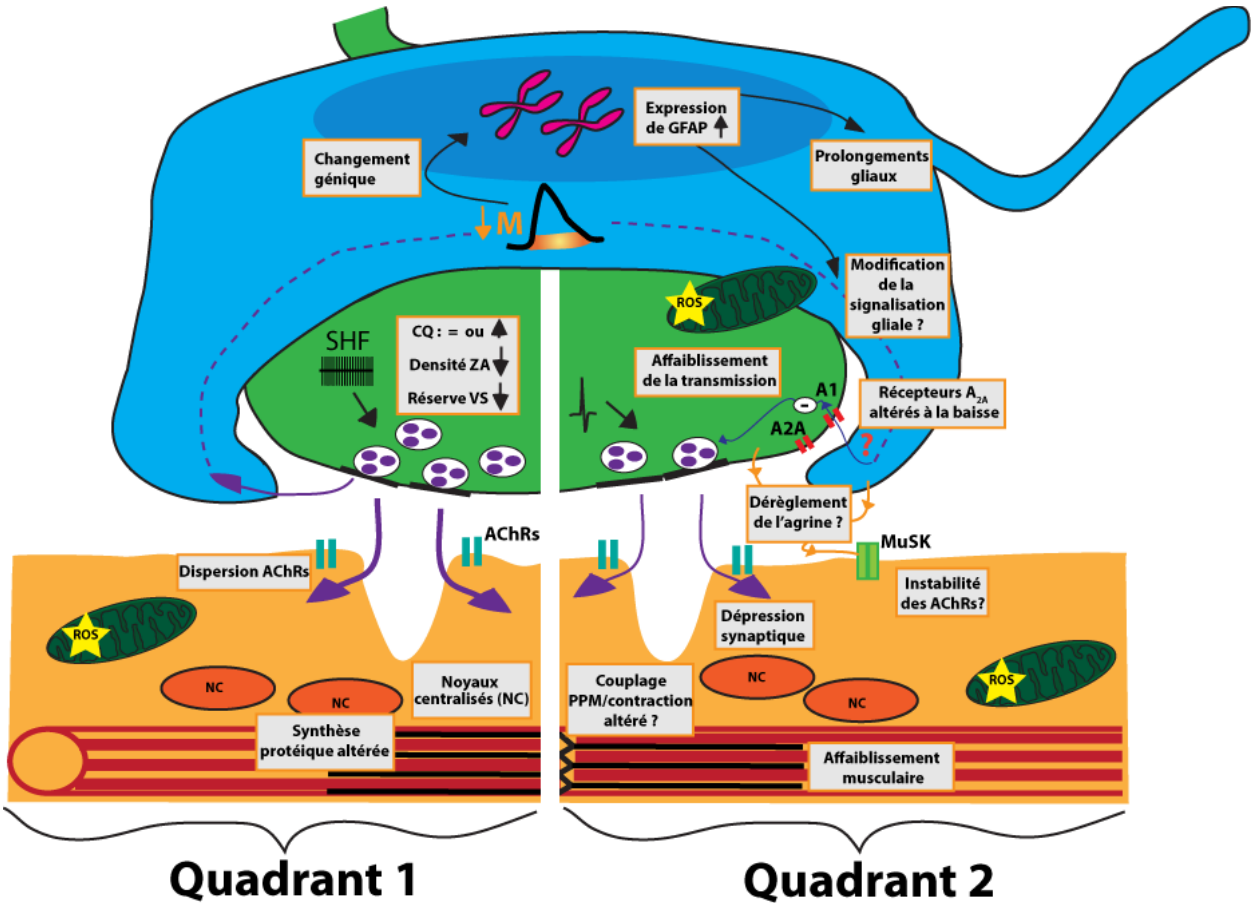


Figure 4.3. Schéma intégratif de la JNM sénescence et des interactions possibles entre les altérations cellulaires. (Quadrant 1) Chez l'animal âgé, la terminaison axonale est amincie avec une réserve moins importante de vésicules synaptiques (VS) et des zones actives (ZA) de plus faible densité (Badawi and Nishimune, 2018). En surcroît, les AChRs sont positionnées en îlots, ce qui disperse la communication synaptique. Ensemble, ces éléments pourraient refléter un affaiblissement de la transmission synaptique, toutefois le contenu quantique (CQ) et l'amplitude des PPMs ont plutôt été observées maintenues (présente étude) ou augmentées (Banker et al., 1983; Fahim, 1997). Cela dénote une certaine forme de compensation pour conserver le couplage synaptique avec la contraction musculaire. Par ailleurs, une forte activité synaptique enclenchée par une SHF induit une réponse calcique gliale avec une contribution muscarinique diminuée (Krief et al., 2018; en révision), ce qui reflète de possibles changements géniques (Georgiou et al., 1994; Georgiou et al., 1999) et synaptiques. **(Quadrant 2)** Notamment, une possible augmentation de l'expression de GFAP par les CSPs pourrait expliquer l'observation plus importante de prolongements gliaux chez l'animal âgé (Krief et al.,

2018; en révision). Des changements géniques des CSPs pourraient aussi influencer la signalisation calcique responsable de la modulation gliale dépendante de l'efficacité synaptique. Ce dérèglement de la régulation gliale semble impliquer les récepteurs à l'adénosine A₁, dont l'activité est conservée avec l'âge (Pousinha et al., 2012), pour mener à un affaiblissement de la transmission synaptique. En plus, des changements neuronaux ou gliaux pourraient influencer l'expression ou le clivage de l'agrine et contribuer à l'instabilité de la JNM (Yang et al., 2001; Butikofer et al., 2011). Tout bien considéré, une instabilité de la JNM et l'affaiblissement de la transmission synaptique suivant une forte activité synaptique pourraient contribuer à l'affaiblissement musculaire observée lors du vieillissement. Noter la présence d'altérations mitochondriales pour les différents éléments cellulaires et la présence de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) pouvant affecter l'intégrité cellulaire. Boîtes : altérations documentées ou potentielles de la JNM sénescence.

4.5 Hétérogénéité des altérations associées au vieillissement normal

L'étude des propriétés cellulaires de résistances et de vulnérabilités face aux altérations associées au vieillissement normal est une autre piste fortement intéressante pour mieux comprendre les mécanismes pouvant sous-tendre tous ces changements de l'âge. Effectivement, il est bien connu que le vieillissement est, un processus multifactoriel qui affecte différemment les capacités motrices de chaque individu, mais des différences sont aussi observées au sein d'un même individu (Lopez-Otin et al., 2013). En particulier, les JNMs de muscles différents présentent une hétérogénéité pour leurs altérations morphologiques (Valdez et al., 2012) et fonctionnelles (Banker et al., 1983). De même, les JNMs d'un même muscle vont aussi présenter une hétérogénéité morphologique (Jang and Van Remmen, 2011), mais aussi fonctionnelle puisque nous observons une variabilité dans les phénomènes de plasticité à long-terme lorsqu'on considère chaque JNM séparément (Figure 4.4).

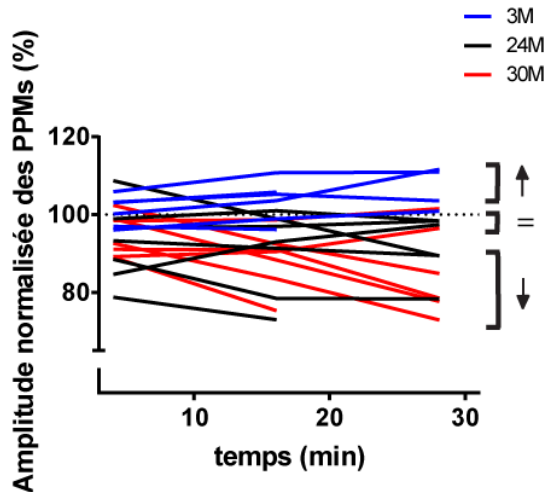


Figure 4.4. Représentation linéaire de chacun des enregistrements électrophysiologiques utilisés pour caractériser la plasticité synaptique de la JNM sénescence. Noter la diversité des changements pour les trois groupes d'âge (3M, 24M et 30M) dans l'amplitude normalisée des PPMs suivant les trois SHFs (0-3 min).

Si toutes les JNMs étaient affectées de la même manière par le vieillissement, on s'attendrait à observer des séparations claires dans les phénomènes de plasticité synaptique des JNMs entre le groupe adulte et les groupes âgés. Plutôt, la Figure 4.4 illustre que certaines JNMs (3M, 24M et 30M) répondent similairement aux paradigmes de stimulation en s'adaptant très peu (=). Par ailleurs, la fréquence plutôt que la sévérité de la dépression synaptique (↓) différencie les JNMs de 24M et 30M. Ces dernières observations appuient l'idée d'une hétérogénéité entre les JNMs sénescences avec certaines JNMs présentant un phénotype altéré et d'autres un phénotype semblable à la JNM adulte (Jang and Van Remmen, 2011; Valdez et al., 2012). Une explication réside au niveau des UMs, puisque les JNMs d'UM différente vont présenter des propriétés synaptiques distinctes (Tremblay et al., 2017) et une vulnérabilité différente dans un contexte pathologique, mais aussi dans un contexte de vieillissement normal (Barbat-Artigas et Robitaille., 2018; article en soumission). Étant donné que les UMs rapides fatigables avec des fibres de type IIa sont plus vulnérables à la dégénérescence lors du vieillissement (Einsiedel and Luff, 1992), il serait important d'investiguer à l'aide de marquage immunohistochimique postexpérimental l'influence des différentes UMs rapides du LAL (Erzen et al., 2000) pour l'hétérogénéité des phénomènes de plasticité synaptique.

Considérant cette hétérogénéité importante observée avec l'âge, les CSPs d'une même JNM peuvent-elles aussi présenter une vulnérabilité différentielle lors du vieillissement? Notamment, retrouve-t-on des CSPs "saines" et des CSPs "altérées" pour chaque JNM sénescence? Une comparaison des propriétés gliales avec l'âge (Krief et al., 2018), en particulier

de leur contribution muscarinique au niveau de la même JNM, permettrait de révéler une hétérogénéité. Tout de même, nos résultats suggèrent qu'au moins 2 CSPs "altérées", le nombre de cellules dont l'activité calcique a été manipulée, sont suffisantes pour modifier l'efficacité de la JNM sénescence puisque nous avons observé un effet sur la plasticité à long-terme. D'autant plus que cette observation est compatible avec l'étude de Todd et al. (2010) suggérant un seuil d'au moins 50% des CSPs. Or, les JNMs âgées (24M) du LAL comprennent en moyenne 3 CSPs (Krief et al., 2018), suggérant que le dérèglement d'une seule CSP (CSP non manipulée) ne semble pas en mesure d'altérer la fonction synaptique, ce qui appuie l'idée d'un seuil de CSPs "altérées" pour expliquer les altérations synaptiques. Évidemment, il est aussi possible que le chélateur calcique Bapta ait diffusé entre toutes les CSPs de la JNM, tout comme le marqueur morphologique, et que les manipulations gliales ait affecté toutes les CSPs. Une belle stratégie qui permettrait de mieux comprendre la relation entre l'altération des CSPs et l'altération synaptique serait d'induire une réponse calcique gliale, à l'aide d'un chélateur calcique photoactivable (Todd et al., 2010), et d'en observer l'effet pour la JNM sénescence. Particulièrement, nos données préliminaires suggèrent qu'une seule CSP adulte, dont une réponse calcique est induite, est suffisante pour potentialiser la transmission synaptique. De ce fait, il serait très intéressant d'examiner si l'activation d'une CSP âgée est suffisante pour induire une dépression synaptique ou si l'effet est partagé ce qui appuierait l'idée d'une hétérogénéité des CSPs avec l'âge.

4.6 Ralentir l'affaiblissement musculaire

L'affaiblissement musculaire est une étape simplement inévitable du vieillissement, mais quelques interventions peuvent ralentir sa sévérité afin de permettre de profiter encore, avec une belle autonomie physique, de ce que la vie peut nous réserver.

La restriction calorique et l'exercice physique

La restriction calorique (RC) et l'exercice physique (EP) sont des interventions qui ont été extensivement documentées pour leurs effets bénéfiques sur le vieillissement normal de l'organisme. D'abord, la RC correspond à une diminution de l'apport calorique consommée

sans atteindre le point de malnutrition. Elle est directement associée à une augmentation impressionnante de longévité d'environ 50% pour les souris et à un ralentissement du déclin physiologique observé pour plusieurs systèmes du corps, dont le système musculaire (Fontana et al., 2010). Effectivement, la RC réduit la perte de masse musculaire associée avec l'âge, principalement en préservant le nombre de fibre musculaire, puis elle est associée à une augmentation des capacités aérobiques des fibres squelettiques et à une préservation des motoneurones spinaux (McKiernan et al., 2004; Hepple et al., 2005; Valdez et al., 2010). De plus, elle est aussi associée à une préservation de la structure de la JNM sénescence puisque le nombre de dénervations et la sévérité des fragmentations postsynaptiques sont fortement diminuées (Valdez et al., 2010). Par ailleurs, l'EP a aussi été associé à un prolongement de la longévité autant pour la souris que pour l'humain, en plus d'améliorer la force et la masse musculaire lors d'entraînement de résistance ce qui permet de contrebalancer les effets de la sarcopénie et de ralentir la sévérité de son apparition (Gremeaux et al., 2012). Au niveau de la JNM, un mois d'EP a été associée à une diminution des altérations structurelles de la JNM tout comme la RC, mais ce mois d'EP a aussi permis de renverser partiellement certaines altérations structurelles dépendantes de l'âge (Valdez et al., 2010). L'effet protecteur de l'EP semble toucher principalement les muscles sollicités, alors que la RC a un effet global plus important (Valdez et al., 2010). Ainsi, il a été proposé que la préservation structurelle de la JNM sénescence par la RC est subséquente à la préservation du motoneurone et des fibres musculaires, alors que l'EP semble impliquer davantage de mécanismes locaux de maintenance synaptique (Valdez et al., 2010). Étant donné le rôle important des CSPs dans la maintenance synaptique (Reddy et al., 2003), il serait important de comparer les propriétés gliales chez l'animal âgé dans un contexte de RC ou de EP, puisqu'elles pourraient être révélatrices de propriétés gliales bénéfiques pour la préservation de la JNM sénescence.

L'influence de l'EP n'a pas été directement évalué dans notre étude, en dépit que les souris eussent accès à une roue de course (une forme d'exercice volontaire). En fait, nous avons opté pour le muscle LAL de l'oreille, étant donné qu'il n'est pas directement sollicité pour les mouvements locomoteurs afin de réduire le plus possible la variabilité de l'EP sur les propriétés des JNMs (Valdez et al., 2010). Malgré tout, nous avons examiné l'effet de l'exercice sur les

propriétés synaptiques du LAL et nos données préliminaires montrent des différences dans la plasticité à long-terme pour la souris adulte en absence de roue de course (Figure 4.5).

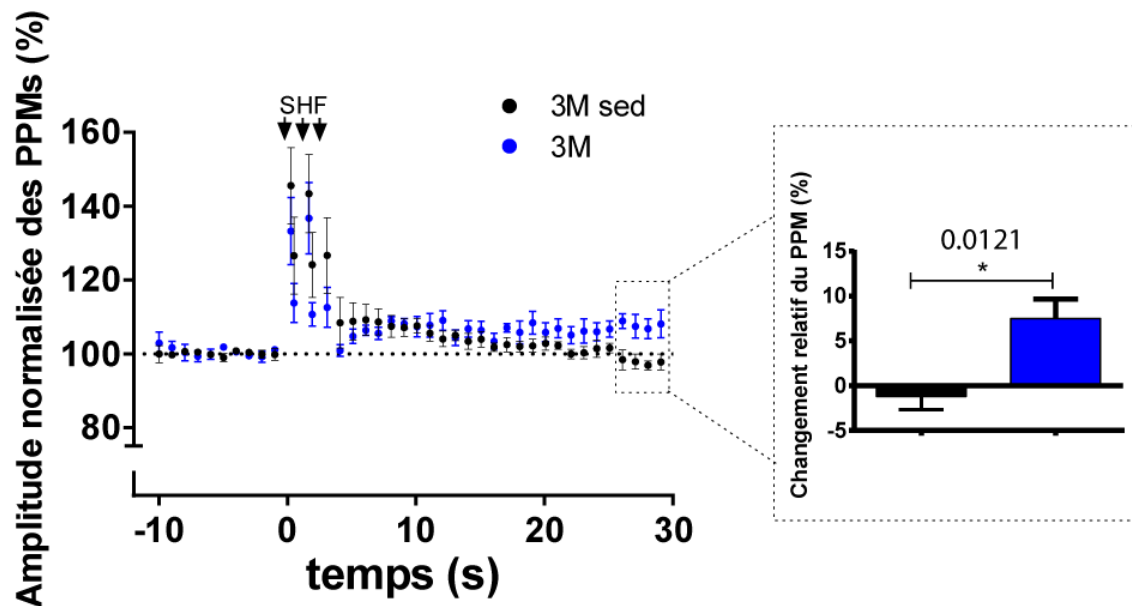


Figure 4.5. La plasticité à long-terme des JNMs de souris adulte est affectée par l'exercice physique. À gauche, amplitude normalisée des PPMs \pm SEM pendant le paradigme de stimulation pour les JNMs de souris adulte (3M, N=6; en bleu) et adulte sédentaire (3M sed, N=6; en noir). À droite, histogramme du changement relatif des PPMs \pm SEM de la 25^{ème} à la 30^{ème} minute suivant la première SHF.

Il est possible que les muscles LAL soient maintenus contractés pour garder les oreilles de la souris accolées à son corps lors de la course, afin d'offrir davantage de dynamisme. Une autre explication est que l'EP ait un effet indirect via notamment des changements du métabolisme énergétique, lipidiques et au niveau systémique (Agarwal, 2012). En considérant le tout, la variabilité du niveau d'exercice des souris est une limite importante de notre étude, puisqu'elle pourrait influencer les altérations de la plasticité synaptique. En plus, ces changements de plasticité synaptique, dépendants de l'exercice physique, soulèvent la possibilité de modifications dans la régulation de l'efficacité synaptique par les CSPs puisqu'elles régulent ces phénomènes. Décortiquer la relation entre les CSPs et l'activité physique est important puisque l'inactivité ou la sédentarité est un enjeu de notre société (Owen

et al., 2010) qui est généralement associé à une aggravation des altérations liées au vieillissement (Booth et al., 2011).

Ciblée la JNM et les CSPs

Une autre intervention intéressante serait de directement cibler les mécanismes cellulaires pouvant sous-tendre les altérations de la JNM pour ralentir l'affaiblissement musculaire (Butikofer et al., 2011; Gonzalez-Freire et al., 2014; Hepple and Rice, 2016). L'idée est de préserver la fonction et la maintenance de la JNM. Une approche thérapeutique ciblant la JNM est avantageuse puisque cette synapse périphérique n'est pas limitée par la barrière hématoencéphalique (Pardridge, 2012). Cela permet d'explorer des molécules potentielles dont l'action n'est limitée qu'en périphérie pour minimiser les effets adverses possibles. Un exemple important est les neurotrophines, qui ont déjà été proposés comme candidat d'intérêt pour la JNM sénescence puisqu'elles vont jouer des rôles cruciaux dans la maintenance et la survie de la synapse (Balice-Gordon, 1997; Jang and Van Remmen, 2011). Toutefois, les neurotrophines vont aussi agir sur un très large spectre de mécanismes cellulaires centraux et en périphérie, puis des thérapies reposant notamment sur le BDNF ou le CNTF ont observé plusieurs effets adverses, dont des effets systémiques et musculaires (1996; Kazim and Iqbal, 2016).

Notre étude soulève les CSPs comme un candidat d'intérêt. Effectivement, nos résultats couplés à d'autres évidences suggèrent que la fonction modulatrice et neuroprotectrice des CSPs ne semble plus optimale pour maintenir la JNM sénescence (Balice-Gordon, 1997)(Krief et al., 2018; en révision). Dès lors, des interventions visant à rétablir les propriétés et/ou la régulation des CSPs sénescences, comparable à celle observée pour l'animal adulte où la maintenance et la réparation de la JNM sont efficaces, permettraient probablement de ralentir la dégénération de la JNM sénescence. Ainsi, une première approche serait d'accroître la sensibilité des récepteurs muscariniques gliaux (M1, M3, M5) à l'aide d'agoniste spécifique pour possiblement rétablir les propriétés de détection de l'activité synaptique. Cependant, dans ces conditions les CSPs ne pourraient plus détecter adéquatement des atteintes de la fonction synaptique par une baisse d'activation de leurs récepteurs muscariniques, un signal crucial associé aux mécanismes gliaux dépendants de réparation de la JNM (Georgiou et al., 1999). Il est donc crucial d'identifier

précisément quel récepteur muscarinique glial est altéré avec l'âge, si tel est le cas, pour développer une approche ciblant spécifiquement l'activation de ce récepteur ou ces mécanismes de régulation (Haga, 2013).

Une autre approche, soulevée par notre étude, serait d'intervenir sur les effecteurs gliaux et particulièrement sur les récepteurs à l'adénosine. Effectivement, une inactivation des récepteurs A₁ pour l'animal âgé ne compromet pas la transmission synaptique basale de la JNM, mais cette intervention était suffisante pour renverser les altérations de plasticité à long-terme, et ce, pour toutes les souris expérimentées. Cette inactivation des récepteurs A₁ permettrait aussi de modifier le déséquilibre d'activation A₁/A_{2A} observée chez l'animal âgé (Pousinha et al., 2012). Comment une telle inactivation est bénéfique et suffisante pour ralentir la dégénération de la JNM sénescence reste une question ouverte. De l'autre côté, une étude a observé une diminution de la longévité et des problèmes moteurs pour les souris KO du récepteur A₁ (Gimenez-Llort et al., 2002), mais ces effets adverses peuvent aussi être attribués à des problèmes développementaux ou des altérations A₁-dépendantes des fonctions cardiovasculaires, rénales et hépatiques (Chen et al., 2013). Donc, une approche ciblant les récepteurs A₁ nécessite d'être particulièrement vigilant pour minimiser les effets adverses (Chen et al., 2013). Une première étape serait d'évaluer les effets adverses dans des conditions où seulement les récepteurs A₁ des motoneurones sont ciblés, notamment à l'aide de souris *knock-out* conditionnelles, avant d'approfondir la recherche pour des cibles potentielles spécifiques à l'interaction purinergique des CSPs. Étonnamment, un antagoniste commun des récepteurs à l'adénosine est la caféine (Daly and Fredholm, 1998; Karcz-Kubicha et al., 2003) et la consommation de café est associée à long-terme à des effets protecteurs contre le vieillissement et à une diminution du risque de décès (même pour une consommation d'une ou deux tasses par jour) (Je and Giovannucci, 2014).

Une dernière approche très intéressante serait plutôt d'inhiber la gliotransmission purinergique directement au niveau des CSPs, c'est-à-dire en ciblant les mécanismes de relâche d'ATP gliale. Cette inhibition permettrait d'abolir en partie la modulation gliale, ce qui réduirait indirectement les capacités d'adaptation des JNMs, mais cela permettrait probablement de renverser les altérations de la plasticité synaptique. Ces mécanismes ne sont pas connus pour les CSPs (Ko and Robitaille, 2015). Toutefois, elles ont été investiguées pour les astrocytes, bien

que le sujet reste encore controversé, et il a été proposé que des mécanismes d'exocytoses vésiculaires et/ou des canaux spécifiques soient impliqués. Il reste à investiguer la présence de ces éléments gliaux au niveau des CSPs à l'aide de révélation immunohistochimique et leur fonctionnalité à l'aide de bloqueur spécifique.

4.7 Une possible dysrégulation synaptique par les CSPs dans la SLA

Une accumulation d'évidences supporte l'implication active des cellules gliales dans plusieurs maladies neurodégénératives (Griffin et al., 1998; Barres, 2008; Philips and Rothstein, 2014), dont le vieillissement est souvent considéré comme le principal facteur de risque (Niccoli and Partridge, 2012). Notamment, la SLA est une maladie fatale dont les premiers symptômes de paralysie musculaire apparaissent très tôt comparativement au vieillissement (< 60 ans) et évoluant très rapidement (2-5 ans) pour mener au décès du patient (Wijesekera and Leigh, 2009). La SLA est essentiellement caractérisée par la mort des motoneurones et elle implique autant les cellules neuronales que non neuronales (Clement et al., 2003; Boillee et al., 2006). Pendant la progression de la maladie, des altérations synaptiques et gliales ont été observées à la JNM, avant la dégénération des motoneurones (Arbour et al., 2015; Tremblay et al., 2017) et sans nécessairement y être associée (Gould et al., 2006) (voir revue de Arbour et al., 2017). De ce fait, la dégénérescence de la JNM est aussi un élément clef de la SLA et il a été proposé que les CSPs puissent jouer un rôle dans cette dégénérescence synaptique (Arbour et al., 2017).

Parmi les changements observés en stade pré-symptomatique dans un modèle murin de SLA, Arbour et al., (2015) ont révélé une augmentation anormale de la contribution muscarinique des CSPs lors de la détection de l'activité synaptique, conjointement à une augmentation de la transmission synaptique et ces altérations persistent jusqu'au début des symptômes. Curieusement, ces changements sont à l'opposé de ce qui est observé pour les CSPs sénescents (Krief et al., 2018), ce qui pourrait suggérer une dysrégulation gliale de l'efficacité synaptique dans la SLA. D'autant plus que cet effet miroir dans les propriétés gliales et synaptiques, entre le vieillissement normal et la SLA, est aussi observé pour les effecteurs gliaux puisque l'activation des récepteurs A_{2A} est facilité dans un stade pré-symptomatique de SLA (Nascimento et al., 2014), alors qu'il est altéré à la baisse lors du vieillissement (Pousinha et al.,

2012). En considérant le tout, il serait intéressant d'examiner les capacités régulatrices des CSPs pendant la progression de la SLA et d'éclaircir les raisons pour lesquelles des changements au niveau des propriétés gliales, dans des directions opposées, vont être associés à une dégénérescence de la JNM (Valdez et al., 2012). Une explication serait que des altérations intrinsèques de la contribution muscarinique, à la hausse ou à la baisse, compromettent les capacités gliales de maintenance et de réparation synaptique qui vont jouer un rôle déterminant dans l'intégrité de la JNM (Arbour et al., 2017).

Conclusion

Pour conclure, nos résultats montrent de profondes altérations dans la plasticité à long-terme à la JNM sénescence qui semblent être fortement médiées par les CSPs et dépendantes des récepteurs à l'adénosine. De ce fait, notre étude met en lumière l'implication possible des cellules gliales dans les altérations synaptiques survenant lors du vieillissement normal, tout en soulevant l'importance d'éclaircir le rôle des cellules gliales dans la dégénérescence de la JNM et l'affaiblissement musculaire. Pour la suite, une meilleure compréhension des interactions neurone-glie à la JNM sénescence permettrait d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques dans le but de ralentir la sévérité de l'affaiblissement musculaire qui marque l'autonomie des personnes âgées. Aussi, nos observations d'un dérèglement dans la régulation gliale de l'efficacité synaptique évoquent l'importance d'examiner l'implication des astrocytes, des régulateurs importants de l'efficacité synaptique au niveau du SNC (Panatier et al., 2011), dans des conditions de vieillissement normal ou pathologique puisque des altérations synaptiques ont aussi été reportées (Selkoe, 2002; Barnes, 2003; Burke and Barnes, 2010; Azpurua and Eaton, 2015).

Bibliographie

- (1925) Recruitment and some other features of reflex inhibition. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character* 97:488-518.
- (1996) A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. ALS CNTF Treatment Study Group. *Neurology* 46:1244-1249.
- Agarwal SK (2012) Cardiovascular benefits of exercise. *Int J Gen Med* 5:541-545.
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV (2014) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett* 565:23-29.
- Angaut-Petit D, Molgo J, Connold AL, Faille L (1987) The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neurosci Lett* 82:83-88.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728-739.
- Arbour D, Vande Velde C, Robitaille R (2017) New perspectives on amyotrophic lateral sclerosis: the role of glial cells at the neuromuscular junction. *J Physiol* 595:647-661.
- Arbour D, Tremblay E, Martineau E, Julien JP, Robitaille R (2015) Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model. *J Neurosci* 35:688-706.
- Arthur-Farraj PJ, Morgan CC, Adamowicz M, Gomez-Sanchez JA, Fazal SV, Beucher A, Razzaghi B, Mirsky R, Jessen KR, Aitman TJ (2017) Changes in the Coding and Non-coding Transcriptome and DNA Methylome that Define the Schwann Cell Repair Phenotype after Nerve Injury. *Cell Rep* 20:2719-2734.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.
- Austad SN, Fischer KE (2016) Sex Differences in Lifespan. *Cell Metab* 23:1022-1033.
- Azpurua J, Eaton BA (2015) Neuronal epigenetics and the aging synapse. *Front Cell Neurosci* 9:208.
- Badawi Y, Nishimune H (2018) Presynaptic active zones of mammalian neuromuscular junctions: Nanoarchitecture and selective impairments in aging. *Neurosci Res* 127:78-88.
- Balice-Gordon RJ (1996) Dynamic roles at the neuromuscular junction. Schwann cells. *Curr Biol* 6:1054-1056.
- Balice-Gordon RJ (1997) Age-related changes in neuromuscular innervation. *Muscle Nerve Suppl* 5:S83-87.
- Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS (1998) Functional gap junctions in the schwann cell myelin sheath. *J Cell Biol* 142:1095-1104.
- Balice-Gordon RJ, Breedlove SM, Bernstein S, Lichtman JW (1990) Neuromuscular junctions shrink and expand as muscle fiber size is manipulated: in vivo observations in the androgen-sensitive bulbocavernosus muscle of mice. *J Neurosci* 10:2660-2671.

- Banker BQ, Kelly SS, Robbins N (1983) Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J Physiol* 339:355-377.
- Barik A, Li L, Sathyamurthy A, Xiong WC, Mei L (2016) Schwann Cells in Neuromuscular Junction Formation and Maintenance. *J Neurosci* 36:9770-9781.
- Barnes CA (2003) Long-term potentiation and the ageing brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:765-772.
- Barres BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60:430-440.
- Belair EL, Vallee J, Robitaille R (2005) Long-term in vivo modulation of synaptic efficacy at the neuromuscular junction of *Rana pipiens* frogs. *J Physiol* 569:163-178.
- Belair EL, Vallee J, Robitaille R (2010) In vivo long-term synaptic plasticity of glial cells. *J Physiol* 588:1039-1056.
- Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Saez JC (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci* 26:610-617.
- Birks R, Huxley HE, Katz B (1960a) The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 150:134-144.
- Birks R, Katz B, Miledi R (1960b) Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration. *J Physiol* 150:145-168.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52:39-59.
- Booth FW, Laye MJ, Roberts MD (2011) Lifetime sedentary living accelerates some aspects of secondary aging. *J Appl Physiol* (1985) 111:1497-1504.
- Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 512 (Pt 1):197-209.
- Boyas S, Guevel A (2011) Neuromuscular fatigue in healthy muscle: underlying factors and adaptation mechanisms. *Ann Phys Rehabil Med* 54:88-108.
- Brown WR, Thore CR (2011) Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:56-74.
- Bruusgaard JC, Liestol K, Ekmark M, Kollstad K, Gundersen K (2003) Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *J Physiol* 551:467-478.
- Buffelli M, Burgess RW, Feng G, Lobe CG, Lichtman JW, Sanes JR (2003) Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature* 424:430-434.
- 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.
- Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE, 3rd (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234:723-748.
- Burke SN, Barnes CA (2010) Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends Neurosci* 33:153-161.
- Butikofer L, Zurlinden A, Bolliger MF, Kunz B, Sonderegger P (2011) Destabilization of the neuromuscular junction by proteolytic cleavage of agrin results in precocious sarcopenia. *FASEB J* 25:4378-4393.
- Campbell MJ, McComas AJ, Petito F (1973) Physiological changes in ageing muscles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 36:174-182.

- Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21:1911-1922.
- Chai RJ, Vukovic J, Dunlop S, Grounds MD, Shavlakadze T (2011) Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle. *PLoS One* 6:e28090.
- Chan DC (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125:1241-1252.
- Chen J, Mizushige T, Nishimune H (2012) Active zone density is conserved during synaptic growth but impaired in aged mice. *J Comp Neurol* 520:434-452.
- Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB (2013) Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* 12:265-286.
- Chen Y, Swanson RA (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137-149.
- Chinta SJ, Lieu CA, Demaria M, Laberge RM, Campisi J, Andersen JK (2013) Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? *J Intern Med* 273:429-436.
- Clarke LE, Liddel SA, Chakraborty C, Munch AE, Heiman M, Barres BA (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E1896-E1905.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113-117.
- Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM (2013) Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol* 11:315-335.
- Correia-de-Sa P, Timoteo MA, Ribeiro JA (1996) Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J Neurophysiol* 76:3910-3919.
- Couteaux R, Pecot-Dechavassine M (1970) [Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 271:2346-2349.
- Cunha RA (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38:107-125.
- Cunha RA, Sebastiao AM (1991) Extracellular metabolism of adenine nucleotides and adenosine in the innervated skeletal muscle of the frog. *Eur J Pharmacol* 197:83-92.
- Daly JW, Fredholm BB (1998) Caffeine--an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend* 51:199-206.
- Damani MR, Zhao L, Fontainhas AM, Amaral J, Fariss RN, Wong WT (2011) Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell* 10:263-276.
- Darabid H, Arbour D, Robitaille R (2013) Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 33:1297-1313.
- David G, Barrett EF (2000) Stimulation-evoked increases in cytosolic [Ca²⁺] in mouse motor nerve terminals are limited by mitochondrial uptake and are temperature-dependent. *J Neurosci* 20:7290-7296.

- Del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.
- Deschenes MR (2011) Motor unit and neuromuscular junction remodeling with aging. *Curr Aging Sci* 4:209-220.
- Deschenes MR, Roby MA, Eason MK, Harris MB (2010) Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. *Exp Gerontol* 45:389-393.
- Dickstein DL, Weaver CM, Luebke JI, Hof PR (2013) Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neuroscience* 251:21-32.
- Duregotti E, Negro S, Scorzeto M, Zornetta I, Dickinson BC, Chang CJ, Montecucco C, Rigoni M (2015) Mitochondrial alarmins released by degenerating motor axon terminals activate perisynaptic Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E497-505.
- Einsiedel LJ, Luff AR (1992) Alterations in the contractile properties of motor units within the ageing rat medial gastrocnemius. *J Neurol Sci* 112:170-177.
- Erzen I, Cvetko E, Obreza S, Angaut-Petit D (2000) Fiber types in the mouse levator auris longus muscle: a convenient preparation to study muscle and nerve plasticity. *J Neurosci Res* 59:692-697.
- Fahim MA (1997) Endurance exercise modulates neuromuscular junction of C57BL/6NNia aging mice. *J Appl Physiol* (1985) 83:59-66.
- Fahim MA, Robbins N (1982) Ultrastructural studies of young and old mouse neuromuscular junctions. *J Neurocytol* 11:641-656.
- Faulkner JA, Davis CS, Mendias CL, Brooks SV (2008) The aging of elite male athletes: age-related changes in performance and skeletal muscle structure and function. *Clin J Sport Med* 18:501-507.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 328:321-326.
- Garcia N, Priego M, Obis T, Santafe MM, Tomas M, Besalduch N, Lanuza MA, Tomas J (2013) Adenosine A(1) and A(2)A receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 38:2229-2241.
- Georgiou J, Charlton MP (1999) Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia* 27:101-109.
- Georgiou J, Robitaille R, Charlton MP (1999) Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci* 19:3836-3846.
- Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP (1994) Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12:443-455.
- Gimenez-Llort L, Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Fredholm BB, Tobena A, Pekny M, Johansson B (2002) Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci* 16:547-550.
- Gonzalez-Freire M, de Cabo R, Studenski SA, Ferrucci L (2014) The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle. *Front Aging Neurosci* 6:208.
- Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV, Simonsick EM, Tylavsky FA, Visser M, Newman AB (2006) The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61:1059-1064.

- Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW (2006) Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26:8774-8786.
- Gremeaux V, Gayda M, Lepers R, Sosner P, Juneau M, Nigam A (2012) Exercise and longevity. *Maturitas* 73:312-317.
- Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* 8:65-72.
- Gundelfinger ED, Reissner C, Garner CC (2015) Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Front Synaptic Neurosci* 7:19.
- Gutchess A (2014) Plasticity of the aging brain: new directions in cognitive neuroscience. *Science* 346:579-582.
- Gyorkos AM, Spitsbergen JM (2014) GDNF content and NMJ morphology are altered in recruited muscles following high-speed and resistance wheel training. *Physiol Rep* 2:e00235.
- Haga T (2013) Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 89:226-256.
- Halstead SK, Morrison I, O'Hanlon GM, Humphreys PD, Goodfellow JA, Plomp JJ, Willison HJ (2005) Anti-disialosyl antibodies mediate selective neuronal or Schwann cell injury at mouse neuromuscular junctions. *Glia* 52:177-189.
- Harris JJ, Jolivet R, Attwell D (2012) Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75:762-777.
- Heckman CJ, Enoka RM (2012) Motor unit. *Compr Physiol* 2:2629-2682.
- Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simmons L, Moffet B, Vandlen RA, Simpson LC, Koliatsos VE, Rosenthal A, et al. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266:1062-1064.
- Henneman E (1957) Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science* 126:1345-1347.
- Hennig R, Lomo T (1985) Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 314:164-166.
- Hepple RT, Rice CL (2016) Innervation and neuromuscular control in ageing skeletal muscle. *J Physiol* 594:1965-1978.
- Hepple RT, Baker DJ, Kaczor JJ, Krause DJ (2005) Long-term caloric restriction abrogates the age-related decline in skeletal muscle aerobic function. *FASEB J* 19:1320-1322.
- Herrera AA, Banner LR, Nagaya N (1990) Repeated, in vivo observation of frog neuromuscular junctions: remodelling involves concurrent growth and retraction. *J Neurocytol* 19:85-99.
- Hinman JD, Abraham CR (2007) What's behind the decline? The role of white matter in brain aging. *Neurochem Res* 32:2023-2031.
- Hughes BW, Kusner LL, Kaminski HJ (2006) Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 33:445-461.
- Hughes ML, Vander Werff KR, Brown CJ, Abbas PJ, Kelsay DM, Teagle HF, Lowder MW (2001) A longitudinal study of electrode impedance, the electrically evoked compound action potential, and behavioral measures in nucleus 24 cochlear implant users. *Ear Hear* 22:471-486.
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069-1077.

- Jang YC, Van Remmen H (2011) Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* 46:193-198.
- Je Y, Giovannucci E (2014) Coffee consumption and total mortality: a meta-analysis of twenty prospective cohort studies. *Br J Nutr* 111:1162-1173.
- Jernigan TL, Archibald SL, Fennema-Notestine C, Gamst AC, Stout JC, Bonner J, Hesselink JR (2001) Effects of age on tissues and regions of the cerebrum and cerebellum. *Neurobiol Aging* 22:581-594.
- Jessen KR, Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6:671-682.
- Kandel ER (2013) *Principles of neural science*, 5th Edition. New York: McGraw-Hill Medical.
- Kang H, Lichtman JW (2013) Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young adult and aged animals. *J Neurosci* 33:19480-19491.
- Kang H, Tian L, Mikesch M, Lichtman JW, Thompson WJ (2014) Terminal Schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury. *J Neurosci* 34:6323-6333.
- Karcz-Kubicha M, Antoniou K, Terasmaa A, Quarta D, Solinas M, Justinova Z, Pezzola A, Reggio R, Muller CE, Fuxe K, Goldberg SR, Popoli P, Ferre S (2003) Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology* 28:1281-1291.
- Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481-492.
- Kawabuchi M, Tan H, Wang S (2011) Age affects reciprocal cellular interactions in neuromuscular synapses following peripheral nerve injury. *Ageing Res Rev* 10:43-53.
- Kazim SF, Iqbal K (2016) Neurotrophic factor small-molecule mimetics mediated neuroregeneration and synaptic repair: emerging therapeutic modality for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 11:50.
- Kelly SS, Robbins N (1983) Progression of age changes in synaptic transmission at mouse neuromuscular junctions. *J Physiol* 343:375-383.f
- Ko CP, Robitaille R (2015) Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020503.
- Kuffler SW, Yoshikami D (1975) The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J Physiol* 251:465-482.
- Kung TA, Cederna PS, van der Meulen JH, Urbanek MG, Kuzon WM, Jr., Faulkner JA (2014) Motor unit changes seen with skeletal muscle sarcopenia in oldest old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69:657-665.
- Kuno M, Turkanis SA, Weakly JN (1971) Correlation between nerve terminal size and transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 213:545-556.
- Landi F, Liperoti R, Russo A, Giovannini S, Tosato M, Capoluongo E, Bernabei R, Onder G (2012) Sarcopenia as a risk factor for falls in elderly individuals: results from the iSIRENTE study. *Clin Nutr* 31:652-658.
- Li Y, Thompson WJ (2011) Nerve terminal growth remodels neuromuscular synapses in mice following regeneration of the postsynaptic muscle fiber. *J Neurosci* 31:13191-13203.
- Li Y, Lee Y, Thompson WJ (2011) Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse. *J Neurosci* 31:14910-14919.

- Lichtman JW, Magrassi L, Purves D (1987) Visualization of neuromuscular junctions over periods of several months in living mice. *J Neurosci* 7:1215-1222.
- Liddel SA, Barres BA (2017) Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46:957-967.
- Liddel SA et al. (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481-487.
- Lin W, Sanchez HB, Deerinck T, Morris JK, Ellisman M, Lee KF (2000) Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1299-1304.
- Liu W, Chakkalakal JV (2018) The Composition, Development, and Regeneration of Neuromuscular Junctions. *Curr Top Dev Biol* 126:99-124.
- Loerch PM, Lu T, Dakin KA, Vann JM, Isaacs A, Geula C, Wang J, Pan Y, Gabuzda DH, Li C, Prolla TA, Yankner BA (2008) Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS One* 3:e3329.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194-1217.
- Love FM, Thompson WJ (1998) Schwann cells proliferate at rat neuromuscular junctions during development and regeneration. *J Neurosci* 18:9376-9385.
- Love FM, Son YJ, Thompson WJ (2003) Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J Neurobiol* 54:566-576.
- Lubischer JL, Bebinger DM (1999) Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:RC46.
- Ludatscher RM, Silbermann M, Gershon D, Reznick A (1985) Evidence of Schwann cell degeneration in the aging mouse motor end-plate region. *Exp Gerontol* 20:81-91.
- MacDonald R, Barbat-Artigas S, Cho C, Peng H, Shang J, Moustaine A, Carbonetto S, Robitaille R, Chalifour LE, Paudel H (2017) A Novel Egr-1-Agrin Pathway and Potential Implications for Regulation of Synaptic Physiology and Homeostasis at the Neuromuscular Junction. *Front Aging Neurosci* 9:258.
- Mangmool S, Kurose H (2011) G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)* 3:884-899.
- Marner L, Nyengaard JR, Tang Y, Pakkenberg B (2003) Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. *J Comp Neurol* 462:144-152.
- Matteoli M, Haimann C, De Camilli P (1990) Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 37:271-275.
- Maxwell N, Castro RW, Sutherland NM, Vaughan KL, Szarowicz MD, de Cabo R, Mattison JA, Valdez G (2018) alpha-Motor neurons are spared from aging while their synaptic inputs degenerate in monkeys and mice. *Aging Cell* 17.
- McKiernan SH, Bua E, McGorray J, Aiken J (2004) Early-onset calorie restriction conserves fiber number in aging rat skeletal muscle. *FASEB J* 18:580-581.
- McNeil CJ, Doherty TJ, Stashuk DW, Rice CL (2005) Motor unit number estimates in the tibialis anterior muscle of young, old, and very old men. *Muscle Nerve* 31:461-467.
- Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93:421-443.
- Moores TS, Hasdemir B, Vega-Riveroll L, Deuchars J, Parson SH (2005) Properties of presynaptic P2X7-like receptors at the neuromuscular junction. *Brain Res* 1034:40-50.
- Morrison JH, Hof PR (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278:412-419.

- Morrison JH, Baxter MG (2012) The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci* 13:240-250.
- Morrison S, Newell KM (2012) Aging, neuromuscular decline, and the change in physiological and behavioral complexity of upper-limb movement dynamics. *J Aging Res* 2012:891218.
- Murray LM, Comley LH, Thomson D, Parkinson N, Talbot K, Gillingwater TH (2008) Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 17:949-962.
- Nair KS (2005) Aging muscle. *Am J Clin Nutr* 81:953-963.
- Nascimento F, Pousinha PA, Correia AM, Gomes R, Sebastiao AM, Ribeiro JA (2014) Adenosine A2A receptors activation facilitates neuromuscular transmission in the pre-symptomatic phase of the SOD1(G93A) ALS mice, but not in the symptomatic phase. *PLoS One* 9:e104081.
- Nevian T, Helmchen F (2007) Calcium indicator loading of neurons using single-cell electroporation. *Pflugers Arch* 454:675-688.
- Newman AB, Kupelian V, Visser M, Simonsick EM, Goodpaster BH, Kritchevsky SB, Tyllavsky FA, Rubin SM, Harris TB (2006) Strength, but not muscle mass, is associated with mortality in the health, aging and body composition study cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61:72-77.
- Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman JW (2002) Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci* 5:861-867.
- Niccoli T, Partridge L (2012) Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol* 22:R741-752.
- Nishimune H (2012) Molecular mechanism of active zone organization at vertebrate neuromuscular junctions. *Mol Neurobiol* 45:1-16.
- Nishimune H, Shigemoto K (2018) Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease. *Neurol Clin* 36:231-240.
- Oh MM, Oliveira FA, Disterhoft JF (2010) Learning and aging related changes in intrinsic neuronal excitability. *Front Aging Neurosci* 2:2.
- Owen N, Sparling PB, Healy GN, Dunstan DW, Matthews CE (2010) Sedentary behavior: emerging evidence for a new health risk. *Mayo Clin Proc* 85:1138-1141.
- Panatier A, Vallee J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785-798.
- Pardridge WM (2012) Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1959-1972.
- Patton BL, Chiu AY, Sanes JR (1998) Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft. *Nature* 393:698-701.
- Peters R (2006) Ageing and the brain. *Postgrad Med J* 82:84-88.
- Petralia RS, Mattson MP, Yao PJ (2014) Communication breakdown: the impact of ageing on synapse structure. *Ageing Res Rev* 14:31-42.
- Philips T, Rothstein JD (2014) Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 262 Pt B:111-120.
- Pinard A, Robitaille R (2008) Nitric oxide dependence of glutamate-mediated modulation at a vertebrate neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 28:577-587.
- Pousinha PA, Correia AM, Sebastiao AM, Ribeiro JA (2012) Neuromuscular transmission modulation by adenosine upon aging. *Neurobiol Aging* 33:2869-2880.

- Power GA, Dalton BH, Rice CL (2013) Human neuromuscular structure and function in old age: A brief review. *J Sport Health Sci* 2:215-226.
- Reddy LV, Koirala S, Sugiura Y, Herrera AA, Ko CP (2003) Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron* 40:563-580.
- Reynolds ML, Woolf CJ (1992) Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol* 21:50-66.
- Rich M, Lichtman JW (1989) Motor nerve terminal loss from degenerating muscle fibers. *Neuron* 3:677-688.
- Richardson PJ, Brown SJ (1987) ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem* 48:622-630.
- Robitaille R (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 15:7121-7131.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847-855.
- Robitaille R, Adler EM, Charlton MP (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5:773-779.
- Rochon D, Rouse I, Robitaille R (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21:3819-3829.
- Rogers RS, Nishimune H (2017) The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions. *Matrix Biol* 57-58:86-105.
- Rosenheimer JL (1990) Ultraterminal sprouting in innervated and partially denervated adult and aged rat muscle. *Neuroscience* 38:763-770.
- Rouse I, St-Amour A, Darabid H, Robitaille R (2010) Synapse-glia interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties. *Neuroscience* 167:621-632.
- Rudolf R, Khan MM, Labeit S, Deschenes MR (2014) Degeneration of neuromuscular junction in age and dystrophy. *Front Aging Neurosci* 6:99.
- Sakuma M, Gorski G, Sheu SH, Lee S, Barrett LB, Singh B, Omura T, Latremoliere A, Woolf CJ (2016) Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. *Eur J Neurosci* 43:451-462.
- Samuel MA, Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Sanes JR (2012) Agrin and synaptic laminin are required to maintain adult neuromuscular junctions. *PLoS One* 7:e46663.
- Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22:389-442.
- Santafe MM, Salon I, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomas J (2003) Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur J Neurosci* 17:119-127.
- Scahill RI, Frost C, Jenkins R, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC (2003) A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* 60:989-994.
- Seidler RD, Bernard JA, Burutolu TB, Fling BW, Gordon MT, Gwin JT, Kwak Y, Lipps DB (2010) Motor control and aging: links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects. *Neurosci Biobehav Rev* 34:721-733.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789-791.

- Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, Nair KS (2005) Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5618-5623.
- Silinsky EM (2004) Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 558:389-401.
- Silinsky EM, Redman RS (1996) Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog. *J Physiol* 492 (Pt 3):815-822.
- Slater CR (2015) The functional organization of motor nerve terminals. *Prog Neurobiol* 134:55-103.
- Son YJ, Thompson WJ (1995) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14:133-141.
- Soreq L, Consortium UKBE, North American Brain Expression C, Rose J, Soreq E, Hardy J, Trabzuni D, Cookson MR, Smith C, Ryten M, Patani R, Ule J (2017) Major Shifts in Glial Regional Identity Are a Transcriptional Hallmark of Human Brain Aging. *Cell Rep* 18:557-570.
- Sudhof TC (2012) The presynaptic active zone. *Neuron* 75:11-25.
- Tam SL, Gordon T (2003) Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *J Neurobiol* 57:221-234.
- 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.
- Todd KJ, Robitaille R (2006) Purinergic modulation of synaptic signalling at the neuromuscular junction. *Pflugers Arch* 452:608-614.
- Todd KJ, Auld DS, Robitaille R (2007) Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci* 25:1287-1296.
- Todd KJ, Darabid H, Robitaille R (2010) Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 30:11870-11882.
- Tremblay E, Martineau E, Robitaille R (2017) Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model: When Motor Units Matter. *J Neurosci* 37:8901-8918.
- Urbano FJ, Piedras-Renteria ES, Jun K, Shin HS, Uchitel OD, Tsien RW (2003) Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3491-3496.
- Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Fox MA, Sanes JR (2012) Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One* 7:e34640.
- Valdez G, Tapia JC, Kang H, Clemenson GD, Jr., Gage FH, Lichtman JW, Sanes JR (2010) Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14863-14868.
- Walker M, Mason G (2018) A comparison of two types of running wheel in terms of mouse preference, health, and welfare. *Physiol Behav* 191:82-90.
- Wiegert JS, Oertner TG (2013) Long-term depression triggers the selective elimination of weakly integrated synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E4510-4519.
- Wijesekera LC, Leigh PN (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 4:3.

- Wood SJ, Slater CR (2001) Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol* 64:393-429.
- Wright MC, Potluri S, Wang X, Dentcheva E, Gautam D, Tessler A, Wess J, Rich MM, Son YJ (2009) Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses. *J Neurosci* 29:14942-14955.
- Yang JF, Cao G, Koirala S, Reddy LV, Ko CP (2001) Schwann cells express active agrin and enhance aggregation of acetylcholine receptors on muscle fibers. *J Neurosci* 21:9572-9584.
- Zefirov A, Benish T, Fatkullin N, Cheranov S, Khazipov R (1995) Localization of active zones. *Nature* 376:393-394.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.

