

# MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE



N° attribué par la Bibliothèque

## THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Neurophysiologie (Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie)

Présentée et soutenue publiquement par

Emmanuelle Girard

le 18 décembre 2006

Altérations génétiques des cholinestérases chez des  
souris : conséquences morphologiques et fonctionnelles  
à la jonction neuromusculaire

## JURY

Mr. Daniel GILLET  
Mme Claire LEGAY  
Mr. Daniel HANTAÏ  
Mme Catherine GUILLOU  
Mr. Max GOYFFON  
Mr. Jordi MOLGO

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

*A mon père,*

*A Tantou,*

*Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire (CNRS, Gif-sur-Yvette) dirigé par le Dr Gérard Baux.*

*Je tiens en premier lieu à remercier le Dr Jordi Molgó pour m'avoir accueillie au sein de son équipe depuis mon stage de DEA et pour m'avoir formée à la recherche scientifique. Je le remercie d'avoir dirigé mes recherches. Dans ces quelques lignes, je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.*

*Je tiens à remercier particulièrement les membres de mon jury :*

*Monsieur le Dr Daniel Gillet d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.*

*Madame le Pr Claire Legay et Monsieur le Dr Daniel Hantaï qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs scientifiques de ce mémoire. Je les remercie d'avoir consacré une partie de leur temps à juger mon travail.*

*Madame le Dr Catherine Guillou avec qui j'ai eu plaisir à collaborer pendant ma thèse et Monsieur le Pr Max Goyffon qui m'a donné la possibilité d'intégrer le DEA.*

*Je tiens à remercier le Pr Jean-Yves Lallemand, Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette et membre de l'Académie des Sciences, pour le financement de ma thèse.*

*Je tiens à remercier toute l'équipe de l'Institut des Substances Végétales pour leur disponibilité, leur soutien et l'ambiance qui régnait pendant mes nombreuses séances de microscopie confocale. Merci à Spencer Brown, Christel Talbot, Suzanne Bolte et Marie-Noëlle Soler pour leurs conseils et leur écoute.*

*Un très grand merci à Eric Krejci pour m'avoir si souvent conseillée au niveau de l'élevage des souris et de ses subtilités... et pour tous les autres judicieux conseils et son aide pendant ces trois dernières années.*

*Je tiens aussi à remercier Sabine De La Porte pour sa disponibilité et pour m'avoir permis d'utiliser tout le matériel dont j'avais besoin. De plus, nos séances « piscine » du mercredi resteront un très bon souvenir.*

*Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré et qui m'ont permis d'élargir mon champ de vision.*

*Je tiens à remercier Sylvie Roux pour le temps qu'elle m'a consacré lors de mon initiation à la PCR. J'ai énormément appris à son contact. Merci pour les fameuses grisettes de Montpellier, la cartagène de son papa et son amitié qui a fait que mon Sud n'était pas si loin que cela ...*

*Enfin, je ne voudrais pas oublier Evelyne Benoit qui a joué un rôle central dans l'accomplissement de ma thèse. Merci pour cette fameuse remise à niveau qui était plus que nécessaire pour que je puisse continuer et pour tous les nombreux autres détails qui ont fait que j'ai aimé travailler dans ce laboratoire et particulièrement dans cette équipe. Qu'elle sache que je n'oublie pas que je lui suis redevable d'un certain nombre de gâteaux...*

*J'associe à ces remerciements tous les chercheurs du laboratoire (toutes ailes confondues !!!) que je n'ai pas cités mais qui m'ont dépannée à un moment ou à un autre...*

*Merci aussi à Thomas Rohaut qui, pendant ses stages de BTS, m'a donné un sacré coup de pouce et a eu le plaisir ou la douleur (je ne sais pas !) de m'entendre chanter tout au long de la journée.*

*Un grand merci à Pascal Abbas, Jean-Paul Bouillot, Roselyne Charré, Nadine Garrido, Valérie Lavallée, Michèle Outters, Patrick Parra, Martine Ruaux, Sandra Simonot, Dominique Souchu, Jean-*

*Yves Tiercelin, Patricia Villeneuve et Bernadette Wiszniowsky pour leur gentillesse et leur aide quotidiennes.*

*Merci à Cendrine pour ses fameuses madeleines et toutes nos conversations. Je lui souhaite, à elle et à sa ptite famille, du Soleil et tout plein de bonnes choses à Ambazac, l'Académie des Ânes !!!*

*Merci aux anciens du labo, notamment à Julien qui a su tout faire pour que je trouve ma place dès le début au sein de l'équipe, merci pour son aide et son soutien, encore aujourd'hui... et à Vince the King pour ses éternelles taquineries qui, je dois l'avouer, me manquent ; par mail, c'est pas pareil !!!*

*Merci à Hua pour m'avoir offert son Amitié.*

*Un grand merci à tous les thésards grâce à qui le labo est parfois très animé : Alexis, Christelle, Claire, Emmanuel, Elena, Elodie, François, Gilles, Patricia, Sébastien, Stéphanie, Vincent, Yesser sans oublier les trois incontournables : Pierre (désolé les gars, Pierre a la pole position, c'est à cause de son fabuleux gâteau chocolat-orange !!!), Alexandre, « mon Apollon » et Nicolas qui a été d'une aide et d'un soutien très précieux lors de ces derniers jours.*

*Merci à ceux qui sont devenus plus que des « collègues », je suis convaincue que le devenir de chacun ne sera pas un obstacle à notre amitié.*

*Je remercie tous mes amis qui, malgré les kilomètres, m'ont toujours laissé une grande place auprès d'eux. Un merci particulier à Laure et à Fabienne qui vont finir par intégrer ma famille, attention à vous ! Un petit mot pour Chris qui j'espère sera en forme pour que l'on puisse fêter cela tous ensemble à mon retour dans les meilleures conditions possibles et que l'on puisse chanter à tue-tête « ça plane pour moi !! ». Merci à Benoît.*

*Enfin, un grand merci à ma famille et tout particulièrement à ma mère. Je n'énumérerai pas les autres membres de ma « tribu », ils sont trop nombreux mais qu'ils soient assurés que ce mémoire leur est dédié.*

---

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. La jonction neuromusculaire squelettique .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Les différents composants de la jonction neuromusculaire .....</b>	<b>1</b>
1.1.1.1. La terminaison nerveuse motrice .....	1
1.1.1.2. La fibre musculaire squelettique .....	2
1.1.1.3. La cellule de Schwann .....	3
1.1.1.4. La lame basale .....	4
<b>1.1.2. La différenciation présynaptique .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3. La différenciation postsynaptique .....</b>	<b>9</b>
1.1.3.1. L'accumulation des récepteurs nicotiniques .....	10
1.1.3.2. La voie agrine-MuSK-rapsyne-RACH .....	11
<b>1.1.4. La maturation synaptique .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. La libération de neurotransmetteur .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.1. Rappel de certains concepts sur la libération de neurotransmetteur au niveau de la jonction neuromusculaire .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2. Les protéines synaptiques impliquées dans la libération de l'ACh .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.3. Le rôle du calcium dans la libération .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. Les cholinestérases .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.1. L'acétylcholinestérase .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.2. La butyrylcholinestérase .....</b>	<b>26</b>
<b>1.3.3. Diversité moléculaire des cholinestérases .....</b>	<b>29</b>
<b>1.3.3.1. Les différentes sous-unités des cholinestérases .....</b>	<b>30</b>
a. Les sous-unités de type « R » .....	30
b. Les sous-unités de type « H » .....	32
c. Les sous-unités de type « T » .....	32
<b>1.3.3.2. Les molécules associées aux cholinestérases .....</b>	<b>35</b>
a. ColQ .....	35
b. PRiMA, protéine transmembranaire .....	37
c. Interaction entre le peptide « T » de l'AChE et PRAD de ColQ .....	38
<b>1.3.3.3. La signification physiologique des formes moléculaires d'AChE .....</b>	<b>40</b>
<b>1.4. Les souris génétiquement modifiées .....</b>	<b>41</b>
<b>1.4.1. Le gène de l'AChE .....</b>	<b>41</b>
<b>1.4.2. Les souris totalement dépourvues d'AChE .....</b>	<b>41</b>
<b>1.4.3. Les souris dépourvues partiellement d'AChE .....</b>	<b>42</b>
<b>1.4.4. Les souris totalement dépourvues de BChE .....</b>	<b>43</b>
<b>Objectif de la thèse .....</b>	<b>44</b>

---

<b>2. MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>46</b>
<b>2.1. Les souris utilisées comme modèles biologiques</b> .....	<b>46</b>
2.1.1. Souris génétiquement modifiées .....	46
2.1.2. Souris témoins .....	49
<b>2.2. Génotypage des souris</b> .....	<b>49</b>
2.2.1. Extraction de l'ADN .....	50
2.2.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	50
2.2.3. Electrophorèse en gel d'agarose .....	51
<b>2.3. Préparations neuromusculaires isolées de souris</b> .....	<b>51</b>
<b>2.4. Enregistrements électrophysiologiques au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris</b> .....	<b>52</b>
2.4.1. Enregistrements intracellulaires .....	52
2.4.2. Enregistrements extracellulaires .....	54
<b>2.5. Enregistrements mécaniques de la force contractile au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris</b> .....	<b>54</b>
<b>2.6. Agents pharmacologiques utilisés</b> .....	<b>55</b>
<b>2.7. Histochimie</b> .....	<b>56</b>
2.7.1. Sur des échantillons non fixés .....	56
2.7.2. Sur des échantillons fixés .....	56
<b>2.8. Microscopie confocale à balayage laser</b> .....	<b>58</b>
<b>3. RESULTATS</b> .....	<b>61</b>
<b>3.1. Analyse fonctionnelle <i>ex vivo</i> des muscles de souris</b> .....	<b>61</b>
<b>3.1.1. Caractérisation de la contraction musculaire     provoquée par la stimulation nerveuse</b> .....	<b>61</b>
3.1.1.1. Muscles de souris sauvages dans les conditions contrôles .....	61
3.1.1.2. Muscles de souris sauvages traités par des agents anticholinestérasiques .....	62
a. Inhibition des cholinestérasas .....	62
b. Inhibition de l'AChE .....	62
c. Inhibition de la BChE .....	63
3.1.1.3. Muscles de souris génétiquement modifiées dans les conditions contrôles .....	63
3.1.1.4. Muscles de souris génétiquement modifiées traités par des agents anticholinestérasiques .....	64

a. Inhibition de l'AChE .....	64
b. Inhibition de la BChE .....	65
<b>3.1.2. Caractérisation de la libération quantique d'ACh .....</b>	<b>66</b>
<b>3.1.2.1. Fréquence des potentiels de plaque motrice miniatures .....</b>	<b>66</b>
a. Muscles de souris sauvages traités par des agents anticholinestérasiques .....	66
b. Muscles de souris génétiquement modifiées dans les conditions contrôles .....	67
c. Muscles de souris génétiquement modifiées traités par des agents anticholinestérasiques .....	67
<b>3.1.2.2. Contenu quantique .....</b>	<b>68</b>
a. Muscles de souris sauvages traités par des agents anticholinestérasiques .....	68
b. Muscles de souris génétiquement modifiées dans les conditions contrôles .....	68
c. Muscles de souris génétiquement modifiées traités par des agents anticholinestérasiques .....	69
<b>3.1.2.3. Amplitude des potentiels de plaque motrice .....</b>	<b>70</b>
<b>3.1.3. Caractérisation des cours temporels des réponses synaptiques .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1.3.1. Potentiels de plaque motrice miniatures .....</b>	<b>71</b>
a. Muscles de souris sauvages traités par des agents anticholinestérasiques .....	71
b. Muscles de souris génétiquement modifiées dans les conditions contrôles .....	72
c. Muscles de souris génétiquement modifiées traités par des agents anticholinestérasiques .....	72
<b>3.1.3.2. Potentiels de plaque motrice .....</b>	<b>73</b>
<b>3.1.3.3. Courants de plaque motrice miniatures .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1.3.4. Courants de plaque motrice .....</b>	<b>74</b>
<b>3.2. Analyse morphologique des jonctions neuromusculaires de souris .....</b>	<b>75</b>
<b>3.2.1. Position du problème .....</b>	<b>75</b>
<b>3.2.2. Distribution des récepteurs nicotiques à l'ACh .....</b>	<b>77</b>
<b>3.2.3. Distribution des terminaisons nerveuses motrices .....</b>	<b>79</b>
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1. Implication de la BChE dans les réponses contractiles développées par les souris génétiquement modifiées .....</b>	<b>82</b>
<b>4.2. Implication des cholinestérases dans la libération quantique d'ACh .....</b>	<b>82</b>

<b>4.2.1. La libération quantique spontanée d'ACh n'est pas régulée par les cholinestérases .....</b>	<b>82</b>
<b>4.2.2. Le contenu quantique est modulé par les cholinestérases .....</b>	<b>83</b>
<b>4.3. La BChE n'est pas impliquée dans la régulation de la concentration d'ACh donnant lieu aux réponses synaptiques .....</b>	<b>87</b>
<b>4.4. Remodelage synaptique chez les souris génétiquement modifiées .....</b>	<b>89</b>
<b>4.5. Conclusion .....</b>	<b>90</b>

## **Références bibliographiques**

## **Abréviations**

ACh : acétylcholine

AChE : acétylcholinestérase

AChE<sub>R</sub> : sous-unité AChE de type « R »

AChE<sub>H</sub> : sous-unité AChE de type « H »

AChE<sub>T</sub> : sous-unité AChE de type « T »

BChE : butyrylcholinestérase

BET : bromure d'éthidium

CGRP : peptide alternatif du gène de la calcitonine

ColQ : collagène Q

cpm : courant de plaque motrice

cpmm : courant de plaque motrice miniature

FITC : fluorescéine isothiocyanate

IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-triphosphate

Iso-OMPA : tetra-isopropylpyro-phosphamide

MuSK : kinase spécifique au muscle

PBS : tampon de phosphate de sodium

PFA : paraformaldéhyde

PRAD : domaine d'attachement riche en proline

PRiMA : protéine membranaire riche en proline

ppm : potentiel de plaque motrice

ppmm : potentiel de plaque motrice miniature

Q<sub>C</sub> : région C-terminale de la sous-unité ColQ

Q<sub>N</sub> : région N-terminale de la sous-unité ColQ

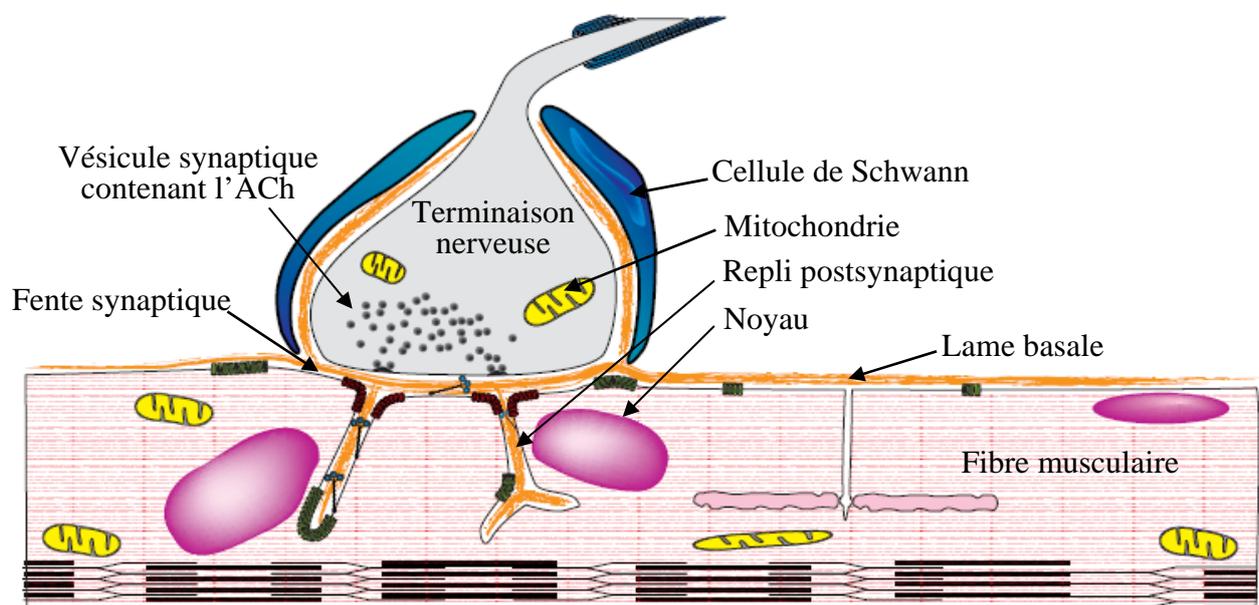
RIP<sub>3</sub> : récepteur à inositol 1,4,5-triphosphate

RRy : récepteur à la ryanodine

RACH : récepteur à l'acétylcholine

RnACh : récepteur nicotinique à l'acétylcholine

# *Introduction*



**Figure 1. Schéma d'une jonction neuromusculaire.** La terminaison nerveuse occupe une gouttière peu profonde dans la fibre musculaire et elle est recouverte par des cellules de Schwann. Les zones actives de la terminaison nerveuse s'apposent directement aux plis de la membrane postsynaptique.

## **1.1. La jonction neuromusculaire squelettique**

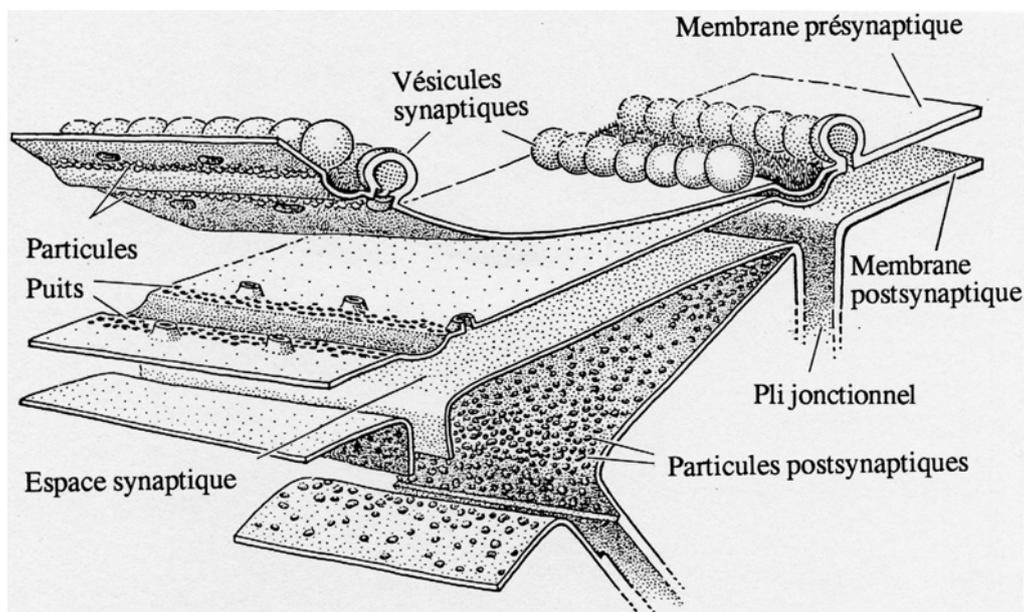
La jonction neuromusculaire est de forme ovale mesurant dans son axe 20 à 50  $\mu\text{m}$ , sa surface est proportionnelle au diamètre de la fibre musculaire et elle représente environ 0,01 à 0,5% de la longueur d'une cellule musculaire. La jonction neuromusculaire est constituée de trois sous domaines cellulaires : la terminaison nerveuse motrice qui correspond à l'extrémité de l'axone du motoneurone, une petite zone de la fibre musculaire squelettique et plusieurs cellules de Schwann périssynaptiques [Couteaux, 1973] (Fig. 1). Ces différents domaines sont hautement spécialisés.

### **1.1.1. Les différents composants de la jonction neuromusculaire**

#### **1.1.1.1. La terminaison nerveuse motrice**

La terminaison nerveuse motrice constitue l'extrémité de l'axone du motoneurone. L'axone est entouré par une gaine de myéline qui assure la transmission saltatoire du potentiel d'action. A proximité de la fibre musculaire, la gaine de myéline disparaît, l'axone se différencie et constitue l'élément présynaptique qui est séparé de l'élément postsynaptique (la fibre musculaire), par la fente synaptique. La terminaison nerveuse motrice est spécialisée dans la libération du neurotransmetteur et des neuropeptides. Elle contient différents organites subcellulaires :

- des vésicules synaptiques de trois types : (i) la plus grande partie est constituée de vésicules synaptiques claires d'un diamètre d'environ 50 nm contenant le neurotransmetteur, l'acétylcholine (ACh), (ii) une seconde population très minoritaire (0,5 – 1%) constituée par les vésicules à corps dense qui sont situées à distance des zones actives et ont un diamètre compris entre 80 et 150 nm. Chez la grenouille, ces vésicules contiennent des neuropeptides comme le CGRP (peptide alternatif du gène de la calcitonine) et la substance P [Matteoli et al., 1990a] [Matteoli et al., 1990b]. Chez les mammifères, les vésicules à corps dense des terminaisons nerveuses motrices ne contiennent pas de substance P. (iii) Le troisième type est constitué par les vésicules à manteau de clathrine qui présentent un centre clair mais dont la surface externe est recouverte de petites particules.



**Figure 2. Vue tridimensionnelle des membranes pré- et postsynaptiques montrant deux zones actives avec leurs rangées de vésicules synaptiques claires immédiatement adjacentes.** Chacune des membranes plasmiques est séparée en deux héli-membranes pour illustrer les structures observées en cryofracture. L'héli-membrane cytoplasmique présynaptique montre des particules alignées au niveau de la zone active qui forme des puits sur la face de fracture de l'héli-membrane présynaptique externe. D'après McMahan.

- de nombreuses mitochondries, dans le cytoplasme des terminaisons nerveuses motrices, qui sont petites et fines par rapport à celles du muscle. Chez les mammifères, les mitochondries situées au centre de la terminaison peuvent occuper jusqu'à 40 % de l'aire terminale. Elles fournissent l'énergie nécessaire à différents processus intracellulaires.

- un système endosomal, dans la terminaison nerveuse, qui serait à la plaque tournante du système de recyclage des vésicules synaptiques claires. Les vésicules synaptiques claires provenant du réseau transgolgien effectueraient un premier cycle d'exo-endocytose nécessaire à leur fonctionnalité avant d'être recyclées par le système endosomal précoce.

- Une régionalisation membranaire, zone en regard du muscle avec plusieurs domaines : des zones actives (Fig. 2) où sont accrochées les vésicules prêtes à libérer l'ACh, des zones d'endocytose des vésicules après libération du médiateur, et une membrane en contact avec les cellules de Schwann.

Il a été écrit précédemment que la terminaison nerveuse motrice contenait des vésicules synaptiques claires. Plusieurs de ces vésicules synaptiques sont concentrées dans des zones denses, au passage des électrons, au niveau de la membrane présynaptique, appelées zones actives par Couteaux, au niveau desquelles les vésicules fusionnent avec la membrane pour libérer leur contenu dans la fente synaptique. La partie préterminale de l'axone moteur ne contient pratiquement pas de vésicules et de mitochondries et aucune zone active. Les molécules de la terminaison nerveuse les mieux étudiées sont les protéines des vésicules synaptiques [Rizo and Sudhof, 2002], le neurotransmetteur et le co-transmetteur : l'ATP, l'enzyme de synthèse de l'ACh: la choline acétyltransférase et le transporteur vésiculaire de l'ACh. Peu de composants de la zone active ont été identifiés, mais sa structure est associée aux canaux  $Ca^{2+}$  et  $K^+$  dépendants du potentiel. La localisation des sites libérateurs de neurotransmetteur maximise l'efficacité de la sécrétion dépendante du calcium [Robitaille et al., 1993] [Sugiura et al., 1995] [Day et al., 1997].

### **1.1.1.2. La fibre musculaire squelettique**

La membrane postsynaptique est spécialisée pour répondre rapidement et de façon sûre à la libération de neurotransmetteur par la terminaison nerveuse. L'élément postsynaptique de la jonction neuromusculaire correspond à une faible surface de la fibre musculaire. Il est responsable de la transformation de l'information provenant du nerf en

potentiel d'action qui résulte de la différenciation moléculaire et membranaire de la fibre musculaire. Cette étape sera détaillée dans le paragraphe 1.2.

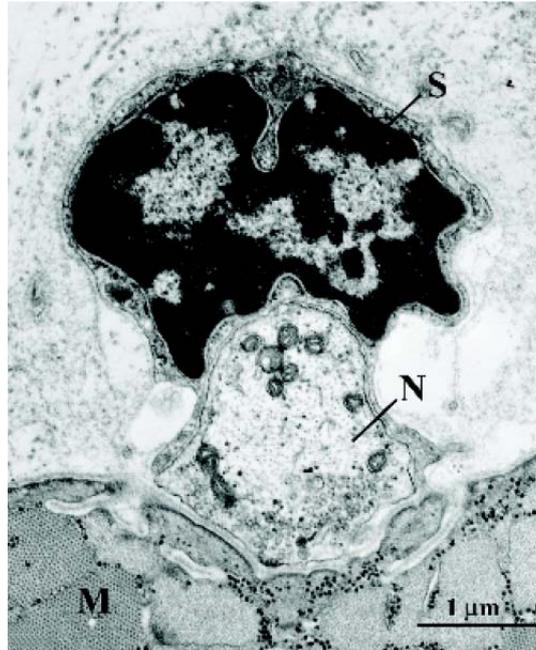
La membrane postsynaptique de la fibre musculaire est enfoncée dans des gouttières peu profondes sous la terminaison nerveuse et elle s'invagine dans des plis sous-synaptiques d'environ 1 à 2  $\mu\text{m}$  de profondeur qui s'ouvrent directement en face des zones actives de l'élément présynaptique. Cette membrane est composée d'une concentration très élevée de récepteurs à l'acétylcholine (RACH) ( $>10\,000/\mu\text{m}^2$ ) [Salpeter and Loring, 1985]. Ces RACH sont concentrés au niveau des crêtes des plis sous-synaptiques et partiellement en bas des côtés des plis, tandis que les canaux sodiques dépendants du potentiel s'accumulent au fond des plis [Wood and Slater, 1997]. Les éléments cytosquelettiques sont susceptibles d'être impliqués non seulement en produisant des plis mais également en maintenant les différents domaines dans ces derniers. D'autres molécules sont, également, concentrées dans la membrane [Moscoso et al., 1995] [Valenzuela et al., 1995] [Zhu et al., 1995]. L'élément postsynaptique est un appareil élaboré du cytosquelette qui a pour fonction principale de produire et de maintenir une densité synaptique élevée de RACH face à un déclin important de la densité des RACH extra-synaptiques ( $\sim 10/\mu\text{m}^2$ ) [Salpeter et al., 1988]. Il est à noter que la rapsyne, l'utrophine et la  $\alpha$ -dystrobrevine-1 sont colocalisées avec les RACH au niveau de la crête des plis alors que l'ankyrine, la  $\alpha$ -dystrobrevine-2 et la dystrophine sont concentrées au fond des plis [Sealock et al., 1984] [Covault and Sanes, 1986] [Flucher and Daniels, 1989] [Wood and Slater, 1998] [Peters et al., 1998].

L'élément postsynaptique sera vu en détail ultérieurement (cf. paragraphe 1.1.2).

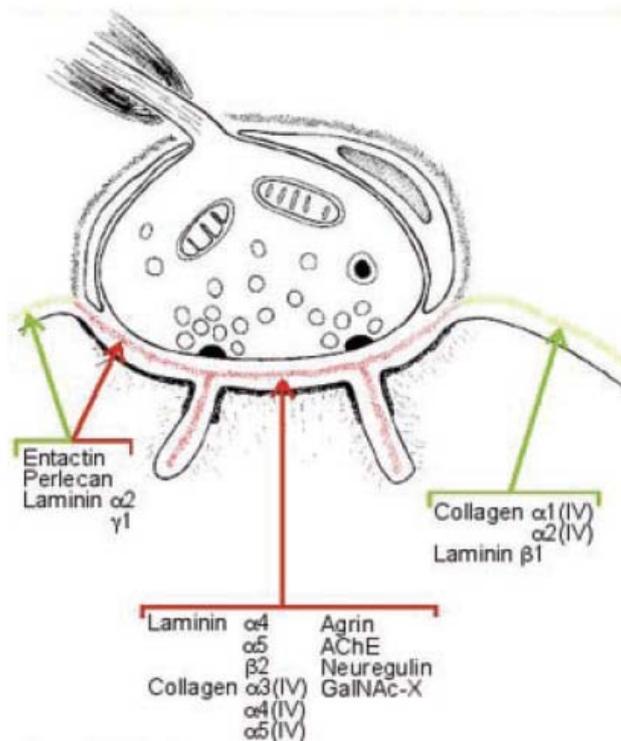
### **1.1.1.3. La cellule de Schwann**

Les cellules de Schwann sont des cellules gliales du système nerveux périphérique. La majorité des cellules de Schwann dans les nerfs adultes sont formées à partir de la crête neurale. Il existe deux types de cellules de Schwann : les cellules myélinisantes et les non myélinisantes qui sont pérисynaptiques.

Le premier type de cellule de Schwann en contact avec des parties préterminales de l'axone forme des gaines de myéline et le deuxième type recouvre la terminaison nerveuse motrice, ce qui permet de l'isoler de son environnement. Ces deux types de cellules de Schwann résultent des mêmes précurseurs, mais diffèrent structurellement. Les cellules de Schwann myélinisantes sont riches en protéines de base de myéline, glycoprotéines



**Figure 3.** Image en microscopie électronique d'une jonction neuromusculaire adulte en coupe transversale. La cellule de Schwann périssynaptique (S) recouvre la terminaison nerveuse (N) qui est apposée aux plis sous-synaptiques de la fibre musculaire (M). D'après Reddy et al., 2003.



**Figure 4. La lame basale de la jonction neuromusculaire.** Les composants sont présents soit dans la lame basale synaptique soit dans celle extra-synaptique soit présents dans ces deux régions. D'après Sanes, 2003.

associées à la myéline, mais pauvres en N-CAM et S-100, tandis que l'opposé est vrai pour les cellules de Schwann pérисynaptiques [Mirsky and Jessen, 1996].

Il a été démontré que les cellules de Schwann pérисynaptiques (Fig. 3) jouent un rôle significatif dans le développement, le fonctionnement, le maintien et la régénération des jonctions neuromusculaires et que, bien que les jonctions neuromusculaires semblent stables durant toute leur vie, elles subissent constamment des transformations, en particulier celles des grenouilles. De plus, elles guident les terminaisons nerveuses pendant ce processus. Quant aux jonctions neuromusculaires de mammifère, elles sont en général plus stables [Feng et al., 2005].

Les cellules de Schwann pérисynaptiques terminales sont impliquées dans la potentialisation de la transmission synaptique. Ce point sera détaillé dans le paragraphe 1.2.3.

#### **1.1.1.4. La lame basale**

L'ensemble des fibres musculaires squelettiques est recouvert par une matrice extracellulaire appelée la membrane basale, elle est épaisse et reconnaissable en microscopie électronique. Cette membrane se compose de deux couches: (i) une interne, la lame basale directement liée à la membrane plasmique et (ii) une lame réticulaire externe. Les composants principaux de la lame basale du muscle sont semblables à ceux des lames basales présentes dans le corps (collagène IV, laminine, entactine). Cependant, les parties synaptiques et extra-synaptiques de la lame basale diffèrent dans leur composition (Fig. 4 et Tableau 1).

La lame basale jonctionnelle contient aussi des molécules qui ne sont pas présentes le long du muscle : l'acétylcholinestérase (AChE) couplée au collagène, un ensemble de glyco-conjugués [Scott et al., 1988], et deux molécules de signalisation, l'agrine et la neuréguline. Les composants de la membrane basale jouent des rôles actifs qui s'étendent aux processus du développement comme à ceux de la régénération. Dans le muscle squelettique, ces processus incluent la myogenèse et la synaptogenèse. La protéine la plus abondante de la lame basale est le collagène de type IV en triple hélice. La protéine sans collagène principale est la laminine, qui est également un hétérotrimère de chaînes relatives, appelées  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les collagènes IV et les laminines existent sous différents isoformes, les plus abondants dans le muscle étant le collagène  $(\alpha 1(IV))_2 (\alpha 2(IV))_1$  et la laminine  $\alpha 2\beta 1\gamma 1$  (également appelée la laminine-2).

**Tableau 1.** Les composants et leur localisation au niveau de la lame basale.

Lame basale extra-synaptique	Lame basale synaptique	Lame basale dans son ensemble
laminine $\beta$ 1	laminine $\alpha$ 5	laminine $\alpha$ 2
collagène $\alpha$ 1 (IV)	laminine $\alpha$ 4	laminine $\gamma$ 1
collagène $\alpha$ 2 (IV)	laminine $\beta$ 2	entactine
	collagène $\alpha$ 3 (IV)	fibronectine
	collagène $\alpha$ 4 (IV)	perlecan
	collagène $\alpha$ 5 (IV)	
	s-entactine	
	AChE	
	GalNAC-X	
	agrine	
	neuréguline	

La lame basale est nécessaire au maintien de l'intégrité musculaire et ses composants favorisent directement la myogenèse et coordonnent, également, le développement du muscle par présentation de facteurs morphogènes, mitogènes et trophiques.

La lame basale de chaque fibre musculaire, traverse la fente synaptique, et avance jusqu'aux plis sous-synaptiques. La lame basale pourrait bloquer le mouvement de l'acétylcholine à travers la fente synaptique, mais les études cinétiques prouvent que sa diffusion jusqu'aux récepteurs est sans difficulté [Land et al., 1984]. La diffusion du transmetteur jusqu'aux récepteurs et les composants passifs de sa diffusion ultérieure hors de la fente synaptique ne sont pas sensiblement affectés par la lame basale.

### 1.1.2. La différenciation présynaptique

Les cônes de croissance peuvent libérer le neurotransmetteur en réponse à la stimulation électrique même avant qu'ils fassent contact avec des fibres musculaires

[Young and Poo, 1983b] [Hume et al., 1983]. D'ailleurs, la transmission neuromusculaire spontanée et évoquée commencent quelques minutes après que le nerf établisse un contact avec le muscle [Xie and Poo, 1986] [Evers et al., 1989]. Toutefois, les synapses sont, initialement, très faibles, pas seulement parce que la densité des RACH est basse, mais également parce que de très petites quantités de transmetteur sont libérées [Kullberg et al., 1977] [Nakajima et al., 1980]. Au cours des jours suivants, la membrane postsynaptique devient mature et la terminaison présynaptique se différencie, également, très nettement.

Les terminaisons nerveuses des synapses récemment formées sont des simples élargissements de bulbes [Linden et al., 1988]. Elles contiennent peu de vésicules synaptiques et aucune zone active ultra-structuralement reconnaissable. Plus tard, le nombre de vésicules synaptiques augmente, et les éléments du cytosquelette caractéristiques de l'axone sont perdus. Les zones actives apparaissent, les vésicules se regroupent aux zones actives [Buchanan et al., 1989] [Lupa and Hall, 1989]. Ces changements, accompagnés d'une augmentation parallèle du volume et de la surface de la synapse, augmentent largement la fréquence de l'exocytose spontanée et le nombre de vésicules qui libèrent le neurotransmetteur en réponse à la stimulation [Dennis, 1981].

Le fait que les spécialisations présynaptiques se forment seulement au niveau des sites de contact avec les fibres musculaires, dans le muscle normal, implique des facteurs dans l'organisation de la différenciation présynaptique [Lupa et al., 1990].

Les molécules dérivées de l'axone et du muscle induisent la différenciation synaptique à la jonction neuromusculaire. Ramon y Cajal et son étudiant Fernando Tello ont d'abord proposé la notion que les facteurs dérivés du muscle contribuaient à la transformation des axones moteurs croissants dans la terminaison présynaptique [Cajal, 1928]. Tello a observé que les axones moteurs formaient des synapses seulement sur les fibres musculaires [Tello, 1907]. Ces études ont suggéré que les facteurs dérivés du muscle sont importants pour l'initiation de l'établissement du contact synaptique par un axone moteur croissant.

L'observation des neurones moteurs et des fibres musculaires en co-cultures a indiqué que le contact entre l'axone et le muscle était nécessaire pour les changements morphologiques initiaux associés à la différenciation pré- et postsynaptiques. Les axones ont formé des bulbes épaississants seulement au niveau des points de contact avec les myotubes, les vésicules synaptiques accumulées dans l'axone au niveau de ces sites et des membranes présynaptiques sont apparues plus denses. Ainsi, les signaux du muscle ont semblé être nécessaires pour induire la différenciation présynaptique. De même, des

signaux dérivés du nerf ont été démontrés comme essentiels à la différenciation postsynaptique.

Soixante-quinze ans après les expériences de dénervation de Tello, McMahan et son équipe [McMahan, 1990], notant que la fibre entière musculaire était entourée par une lame basale, ont soumis l'hypothèse que les facteurs dérivés de l'axone et du muscle qui conduisent la différenciation synaptique sont enfoncés dans la partie synaptique de la lame basale. Pour examiner cette théorie, ils ont dénervé des muscles et induit la dégénération des fibres musculaires de sorte que seule la lame basale soit maintenue. La régénération des nerfs a pu se faire au niveau de leur site synaptique antérieur, en dépit de l'absence d'un partenaire postsynaptique [Sanes et al., 1978]. D'ailleurs, les zones actives dans les terminaisons régénérées présynaptiques sont alignées sur les zones synaptiques précédemment associés avec les plis postsynaptiques [Glicksman and Sanes, 1983]. Quand les myotubes ont régénéré en absence de nerf, les RACH se sont regroupés seulement dans les régions qui étaient précédemment synaptiques [Burden et al., 1979]. Ces études ont montrées que les facteurs dérivés de l'axone et du muscle, capables d'induire la différenciation synaptique, étaient inclus dans la lame basale synaptique. [Fox and Umemori, 2006].

#### - Les inducteurs de la différenciation présynaptique

Un anticorps a été construit pour identifier les molécules extracellulaires concentrées dans la lame basale synaptique par l'équipe de Sanes [Sanes and Hall, 1979]. L'antigène reconnu par un tel anticorps est la laminine  $\beta 2$  [Hunter et al., 1989]. Les laminines sont de larges glycoprotéines hétérotrimériques ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et sont présentes dans les lames basales qui couvrent la surface de nombreux types cellulaires. Dans le muscle squelettique de Vertébrés, les hétérotrimères contenant les sous-unités  $\beta 2$  de la laminine sont exclusivement localisés dans la lame basale synaptique, alors que les trimères contenant les sous-unités  $\beta 1$  de la laminine sont présents dans la lame basale extra-synaptique [Patton, 2003]. La laminine  $\beta 2$ , qui est synthétisée et sécrétée, *in vivo*, par le muscle, agit comme un signal d'arrêt pour la croissance des axones moteur *in vitro* [Green et al., 1992] [Porter et al., 1995]. Les souris dépourvues de laminine  $\beta 2$  forment peu de zones actives, ne peuvent pas correctement regrouper les vésicules synaptiques sur le côté de la terminaison apposée à la fibre musculaire et ont une possibilité diminuée pour libérer les

neurotransmetteurs [Knight et al., 2003]. Ainsi, ces études ont identifiées la laminine  $\beta 2$  comme la première molécule impliquée dans la différenciation présynaptique.

Le mécanisme par lequel la laminine  $\beta 2$  induit la différenciation présynaptique pourrait dépendre de la possibilité de cette laminine à agir sur les canaux calcium dépendants du potentiel qui entourent les zones actives. Il a été démontré que la séquence LRE (leucine-arginine-glutamate) de la laminine  $\beta 2$  est spécifiquement liée aux canaux calcium dépendants du potentiel de type P/Q et N *in vitro*. De plus, l'application de billes recouvertes d'un fragment de laminine  $\beta 2$  contenant la séquence LRE induit le regroupement des canaux calcium dépendants du potentiel dans les neurones moteurs, qui induisent, à leur tour, celui des vésicules synaptiques [Nishimune et al., 2004]. Ainsi, la laminine  $\beta 2$  favorise la différenciation présynaptique *in vitro* en liant et en regroupant les canaux calcium dépendants du potentiel [Fox and Umemori, 2006].

Pour examiner le rôle des interactions de la laminine  $\beta 2$  avec les canaux calcium dépendants du potentiel dans la différenciation présynaptique *in vivo*, des souris dépourvues soit de laminine  $\beta 2$  soit de canaux calcium dépendants du potentiel de type P/Q ont été comparés. Il semble que quelques zones actives se forment, initialement, dans les souris dépourvues de laminine  $\beta 2$ , mais, peu de temps après la naissance, le nombre de ces zones actives semble sensiblement se réduire. Ainsi, la laminine  $\beta 2$  semble nécessaire pour le maintien des zones actives initiales et pour la formation de zones actives à des étapes ultérieures de la synaptogenèse. Les souris dépourvues de canaux calcium dépendants du potentiel de type P/Q montrent une réduction semblable du nombre de zones actives, suggérant que ces canaux calcium dépendants du potentiel sont également impliqués dans la formation ou le maintien des zones actives [Nishimune et al., 2004]. Pour tester directement si les interactions de la laminine  $\beta 2$  avec les canaux calcium dépendants du potentiel sont responsables de la formation des zones actives *in vivo*, un fragment soluble des canaux calcium dépendants du potentiel de type P/Q tronqué contenant une séquence interagissant avec la laminine  $\beta 2$  a été injecté dans des souris sauvages. Les zones actives ont été sensiblement réduites chez ces souris, confortant la notion que l'interaction entre la laminine  $\beta 2$  et les canaux calcium dépendants du potentiel est nécessaire pour le maintien des zones actives [Nishimune et al., 2004]. Ainsi, les interactions entre la laminine  $\beta 2$  et les canaux calcium dépendants du potentiel sont cruciales pour la formation et/ou le maintien des zones actives *in vivo*.

Il est à noter que les sous-unités de la laminine  $\beta 2$  existent en trimères associés avec diverses sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ . Dans la lame basale synaptique, trois hétérotrimères contenant

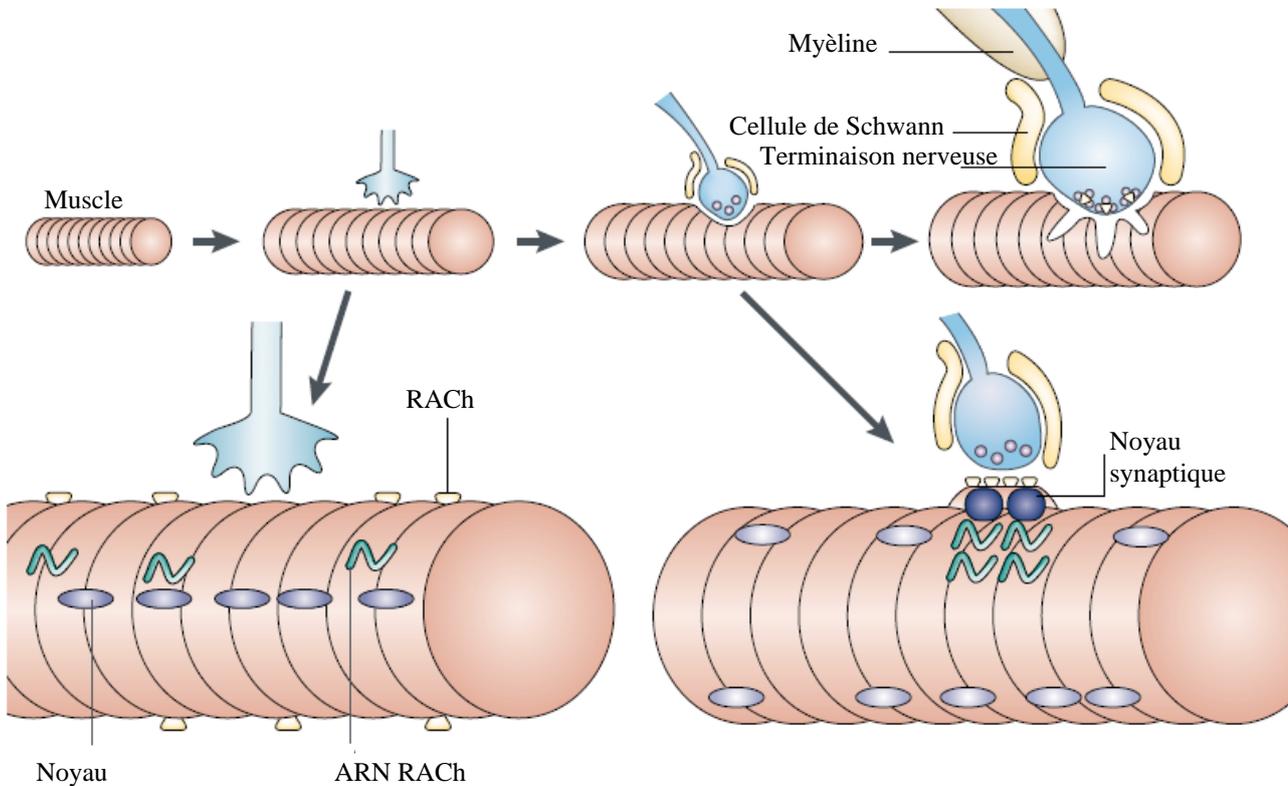
la laminine  $\beta 2$  sont présents : la laminine 4 ( $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ ), la laminine 9 ( $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ ) et la laminine 11 ( $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ ) [Sanes et al., 1990] [Patton et al., 1997]. Ces trois trimères sont localisés différemment dans la lame basale synaptique, ceci suggère que chacun possède un rôle unique dans la formation de la synapse et de son maintien. La seule différence entre ces trimères de laminine est la sous-unité  $\alpha$ , il était donc intéressant d'évaluer les défauts de la formation de la jonction neuromusculaire chez des souris dépourvues de sous-unités  $\alpha$  de laminine dans la lame basale synaptique. Seules les souris dépourvues de laminine  $\alpha 2$  présentent des défauts synaptiques. Le déplacement génétique de la laminine  $\alpha 4$  a pour résultat un alignement non correct des zones actives sur les plis sous-synaptiques [Patton et al., 2001]. Le rôle de la laminine  $\alpha 5$  dans la jonction neuromusculaire est plus difficile à observer car les souris dépourvues de laminine  $\alpha 5$  meurent à la naissance pour des raisons indépendantes [Miner et al., 1998]. Les études préliminaires qui enlèvent, conditionnellement, la laminine  $\alpha 5$  de la jonction neuromusculaire révèlent que l'apposition des terminaisons nerveuses motrices avec les spécialisations postsynaptiques sont incomplètes en l'absence de laminine  $\alpha 5$  [Nishimune et al., 2005]. Les différences dans ces phénotypes synaptiques confirment qu'en effet chacun des trimères synaptiques de laminine a un rôle unique dans la formation de synapse.

Toutes ces études suggèrent que bien que la laminine  $\beta 2$  soit un des organisateurs de la différenciation présynaptique, il en existe d'autres qui sont très probablement dérivés du muscle, et que les chaînes de laminine jouent des rôles modulateurs dans la formation de la synapse [Fox and Umemori, 2006].

### **1.1.3. La différenciation postsynaptique**

L'élément postsynaptique de la jonction neuromusculaire, comme dans d'autres synapses, possède une densité élevée d'amas de récepteurs de neurotransmetteurs qui est étroitement associée à une variété de protéines extracellulaires, transmembranaires et cytoplasmiques. L'élément postsynaptique est organisé par des signaux qui viennent de la terminaison nerveuse présynaptique. Sa forme, sa taille et son architecture moléculaire change lors de sa maturation. Une fois qu'il est mature, il peut être maintenu pendant toute la vie de l'organisme mais il a la capacité de se remodeler lorsque les données changent.

Au niveau de la synapse, les terminaisons nerveuses motrices semblent organiser la différenciation postsynaptique en libérant un protéoglycane appelé l'agrine. L'agrine active



**Figure 5. Formation d'amas de RCh.** (A) Synaptogénèse. L'axone moteur approche un myotube récemment formé. À la surface de contact, l'axone différencie une terminaison nerveuse motrice qui est spécialisée pour la libération de neurotransmetteur, la cellule de Schwann entoure la terminaison, et le muscle forme un appareil post-synaptique complexe. (B) Les récepteurs d'acétylcholine (AChRs) sont initialement présents à un niveau modéré dans toute la surface du myotube. Dans le muscle adulte, en revanche, les RCh sont fortement concentrés dans la membrane post-synaptique et pratiquement absent extra-synaptiquement. Cet amas implique la redistribution des RCh, et la synthèse synaptique localisée de RCh. La synthèse locale résulte de l'augmentation des ARNm des RCh au niveau des noyaux sous synaptiques et de la répression exercée par les noyaux extra-synaptiques. D'après Sanes *et al.*, 2001.

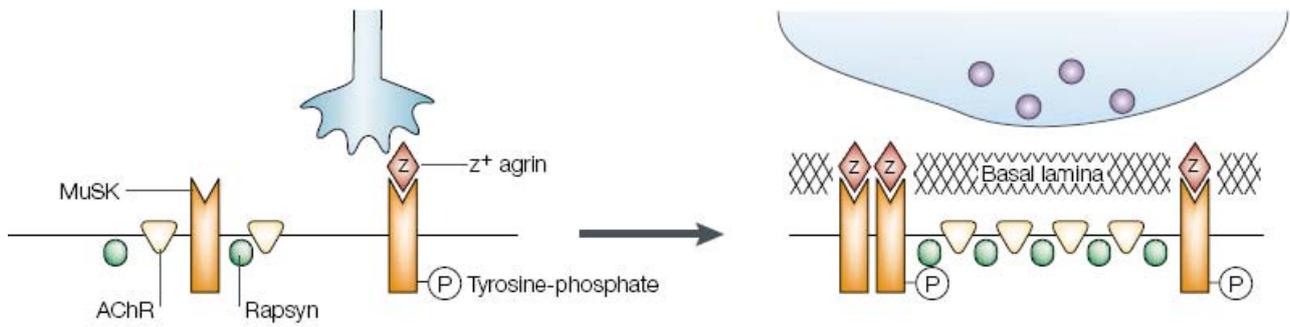
un récepteur tyrosine kinase qui est une kinase spécifique au muscle (MuSK pour « Muscle-Specific Kinase ») sur la surface des myotubes, et qui permet le regroupement des récepteurs à l'acétylcholine (RACH) sous forme d'amas et d'autres composants postsynaptiques par association avec une protéine de liaison cytoplasmique appelée rapsyne.

### 1.1.3.1. L'accumulation des récepteurs nicotiques

Une fois que les myoblastes fusionnent pour former des myotubes, la transcription des gènes codant pour les différentes sous-unités de RACH ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) débute et il en résulte la formation de pentamères fonctionnels ( $\alpha_2\beta\gamma\delta$ ) qui s'incèrent dans la membrane avec une densité qui peut atteindre  $1\ 000\ \mu\text{m}^{-2}$ . En revanche, dans les muscles adultes, la densité des RACH est supérieure à  $10\ 000\ \mu\text{m}^{-2}$ , directement en face de la terminaison nerveuse motrice, alors qu'elle chute à une valeur inférieure à  $10\ \mu\text{m}^{-2}$  dans la membrane extra-synaptique [Fambrough, 1979] (Fig. 5).

Les muscles utilisent, au moins, quatre mécanismes distincts pour effectuer cette transition [Fambrough, 1979] [Duclert and Changeux, 1995] [Burden, 1998] [Huh and Fuhrer, 2002].

- Premièrement, un certain nombre de RACH redistribués dans le plan de la membrane, se déplacent de la réserve extra-synaptique à celle de la synapse. Actuellement, il n'y a aucune évidence pour dire que ce mouvement est vectoriel mais en diffusant aléatoirement, les RACH semblent être « emprisonnés » quand ils atteignent un agrégat [Edwards and Frisch, 1976] [Young and Poo, 1983a].
- Deuxièmement, après la formation des amas de RACH, la stabilité métabolique des RACH augmente ; les RACH des myotubes embryonnaires ont un temps de séjour dans la membrane d'environ un jour, alors que pour les RACH chez les adultes, ce temps est d'environ 14 jours [Fambrough, 1979].
- Troisièmement, quelques noyaux de myotubes sont, toujours, étroitement associés avec la membrane postsynaptique et ces derniers deviennent spécialisés d'un point de vue transcriptionnel, exprimant les gènes qui codent pour les sous-unités des RACH et pour d'autres composants postsynaptiques d'une manière plus importante et à des taux plus élevés que les noyaux non synaptiques [Merlie and Sanes, 1985] [Schaeffer et al., 2001]. Cette transcription préférentielle des gènes codant pour les RACH mène à une



**Figure 6. La voie agrine-MuSK-rapsyne-RACH.** L'agrine est libérée de la terminaison nerveuse motrice et se stabilise dans le lame basale de la fente synaptique. L'agrine active le récepteur MuSK afin d'agrégier les RACH par l'intermédiaire de la protéine cytoplasmique: la rapsyne. D'après Sanes *et al.*, 2001.

accumulation de l'ARNm des RACH dans les zones synaptiques et donc à une synthèse et une agrégation localisées des RACH (Fig. 5).

- Quatrièmement, après la spécialisation de la transcription des noyaux synaptiques, la transcription des gènes RACH est supprimée dans les noyaux non-synaptiques, ce qui mène à une accentuation de la synthèse localisée.

Ces quatre processus expliquent, en grande partie, l'accumulation synaptique des RACH mais d'autres processus, tel que la régulation de la traduction des ARNm locale, peuvent se produire [Sanes and Lichtman, 2001].

### 1.1.3.2. La voie agrine-MuSK-rapsyne-RACH

Une fois formées, les spécialisations synaptiques sont stables. En effet, les agrégats de RACH, liés au cytosquelette synaptique, à la membrane et aux composants de la lame basale, persistent au niveau des sites synaptiques pendant plusieurs semaines après une dénervation. La stabilité de la lame basale suggère qu'elle pourrait jouer un rôle en maintenant l'intégrité postsynaptique. Basée sur l'idée que les neurones moteurs emploient des messagers chimiques pour organiser la membrane postsynaptique, l'hypothèse concernant la présence de ces messagers dans la lame basale est née. Il semble que seule l'agrine (z-agrine) a un rôle probable *in vivo* [Sanes, 2003].

L'agrine, isolée par l'équipe de McMahan, est un protéoglycane héparane-sulfate qui est synthétisé par des neurones moteurs, transportés par les axones moteurs et libéré par les terminaisons nerveuses, où il s'associe avec la lame basale de la fente synaptique de façon stable [McMahan, 1990] [Bowe and Fallon, 1995] [McMahan et al., 1992]. L'agrine a été identifiée par rapport à sa capacité d'induire l'agrégation des RACH sur les myotubes en culture mais il s'est avéré qu'elle participait à l'agrégation de nombreux autres composants de l'élément postsynaptique [Wallace, 1989]. Ces résultats suggèrent que l'agrine est le principal organisateur de la différenciation postsynaptique, dérivé du nerf, à la jonction neuromusculaire [McMahan, 1990] (Fig. 6). Cette hypothèse a été soulignée et confortée par de nombreux résultats dont le fait que l'introduction d'agrine dans les muscles dénervés, par injection d'un vecteur d'expression ou d'une protéine recombinante, engendre la formation d'un élément postsynaptique remarquablement complet [Cohen et al., 1997] [Bezakova and Lomo, 2001] qui laissent peu de doute, au moins dans le contexte de la fibre musculaire, sur le fait que l'agrine  $z^+$  dérivée du nerf est cruciale pour la différenciation postsynaptique. Étant donné le rôle central de l'agrine, il était important

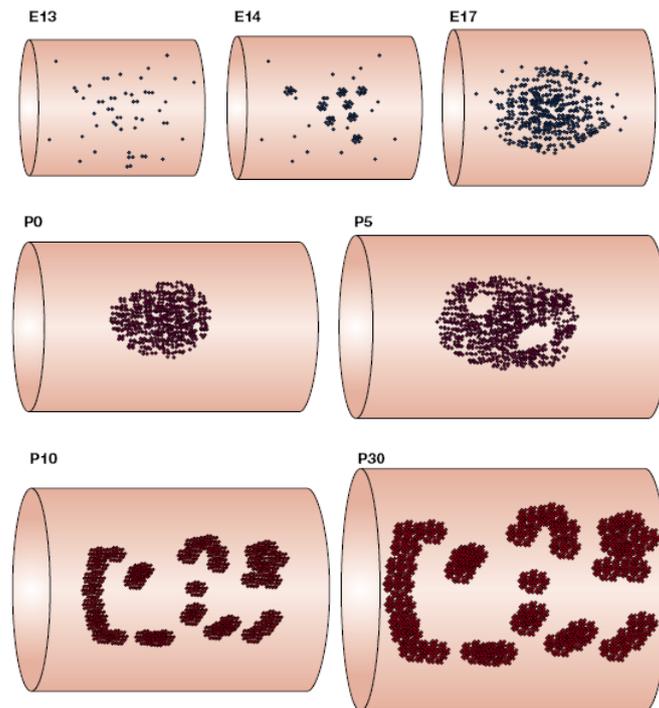
d'identifier son récepteur. De nombreuses molécules, à la surface du myotube, sont susceptibles de lier l'agrine et/ou d'affecter son signal comme NCAM, les laminines, MuSK ou encore des protéoglycanes. Mais des expériences de perte de fonction ont montré qu'une seule de ces molécules jouait un rôle crucial, MuSK [Jennings et al., 1993] [Valenzuela et al., 1995] [DeChiara et al., 1996].

MuSK est un récepteur transmembranaire tyrosine kinase qui a pu être identifié grâce à son expression sélective dans les organes électriques de torpille [Jennings et al., 1993] et dans les muscles de mammifères [Valenzuela et al., 1995]. MuSK est spécifiquement concentré à la membrane postsynaptique. Son rôle en tant que récepteur d'agrine a été mis en évidence par le fait que les souris dépourvues de MuSK ne montraient aucun signe discernable de différenciation postsynaptique en dépit des niveaux normaux d'expression des RACH [DeChiara et al., 1996]. Les expériences réalisées pour caractériser le rôle de MuSK n'ont pas seulement établi le rôle important de MuSK en tant que récepteur à l'agrine mais ont, également, indiqué que d'autres partenaires associés avaient un rôle de modulateur [Gesemann et al., 1996]. L'activation de MuSK induit une cascade d'événements qui se fait par l'intermédiaire de la rapsyne qui induit la formation des amas de RACH [Sanes and Lichtman, 2001] [Burden, 2002].

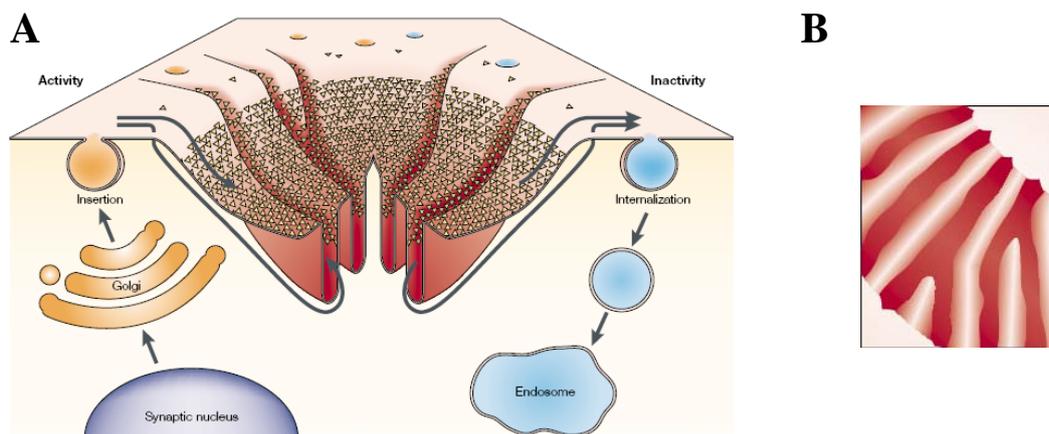
La rapsyne est une protéine cytoplasmique associée à la membrane de 43 kDa. Elle a été isolée grâce à son association étroite avec les RACH. Cette protéine est présente dans la jonction neuromusculaire dès que les amas de RACH sont co-distribués parfaitement avec les RACH de la jonction neuromusculaire adulte. Lorsque les RACH sont co-exprimés avec la rapsyne dans n'importe laquelle des cellules non-musculaires, cela mène à la formation de co-amas RACH-rapsyne [Froehner et al., 1990] [Phillips et al., 1991]. A l'inverse, aucun amas de RACH n'est formé sur les muscles de souris dépourvues de rapsyne, ou sur des myotubes isolés de mutants et traités *in vitro* avec une variété d'agents d'agrégation [Gautam et al., 1995]. Ainsi, il semblerait que la rapsyne soit nécessaire pour toutes les formes d'agrégation de RACH et que les RACH soient des participants actifs à la voie agrine-MuSK-rapsyne-RACH.

#### **1.1.4. La maturation synaptique**

Les jonctions neuromusculaires sont fonctionnelles avant même la naissance, et les nouveau-nés sont complètement dépendants de la transmission neuromusculaire pour leur survie, pourtant la membrane postsynaptique des nouveau-nés est très différente de celle de



**Figure 7. Maturation de l'appareil post-synaptique.** Les micro-amas de récepteur nicotinique à l'acétylcholine (RnACh) fusionnent pour former un agrégat lâche. Plus tard dans l'embryogenèse, l'agrégat se consolide pour former une plaque : ses frontières se dessinent, sa longueur diminue et la densité de RnACh augmente. Après la naissance, la plaque devient perforée pour former ensuite un « bretzel ». L'évolution de cette plaque se fait conjointement à celle du développement du muscle. D'après Sanes *et al*, 2001.



**Figure 8. Récepteurs à l'acétylcholine.** (A) Vue tridimensionnelle montrant les récepteurs à l'acétylcholine (RACH) au niveau des crêtes des plis sous-synaptiques. Les nouveaux RACH sont ajoutés par exocytose et les « vieux » RACH sont éliminés par endocytose, dans la zone péri-synaptique. Les plis fournissent un itinéraire par lequel les RACH pourraient entrer ou partir des zones denses. Les flèches montrent les processus qui sont censés être affectés par l'activité dans le muscle d'adulte. (B) Vue d'un bouton chez des souris adultes, les striations sont des plis. D'après Sanes *et al*, 2001.

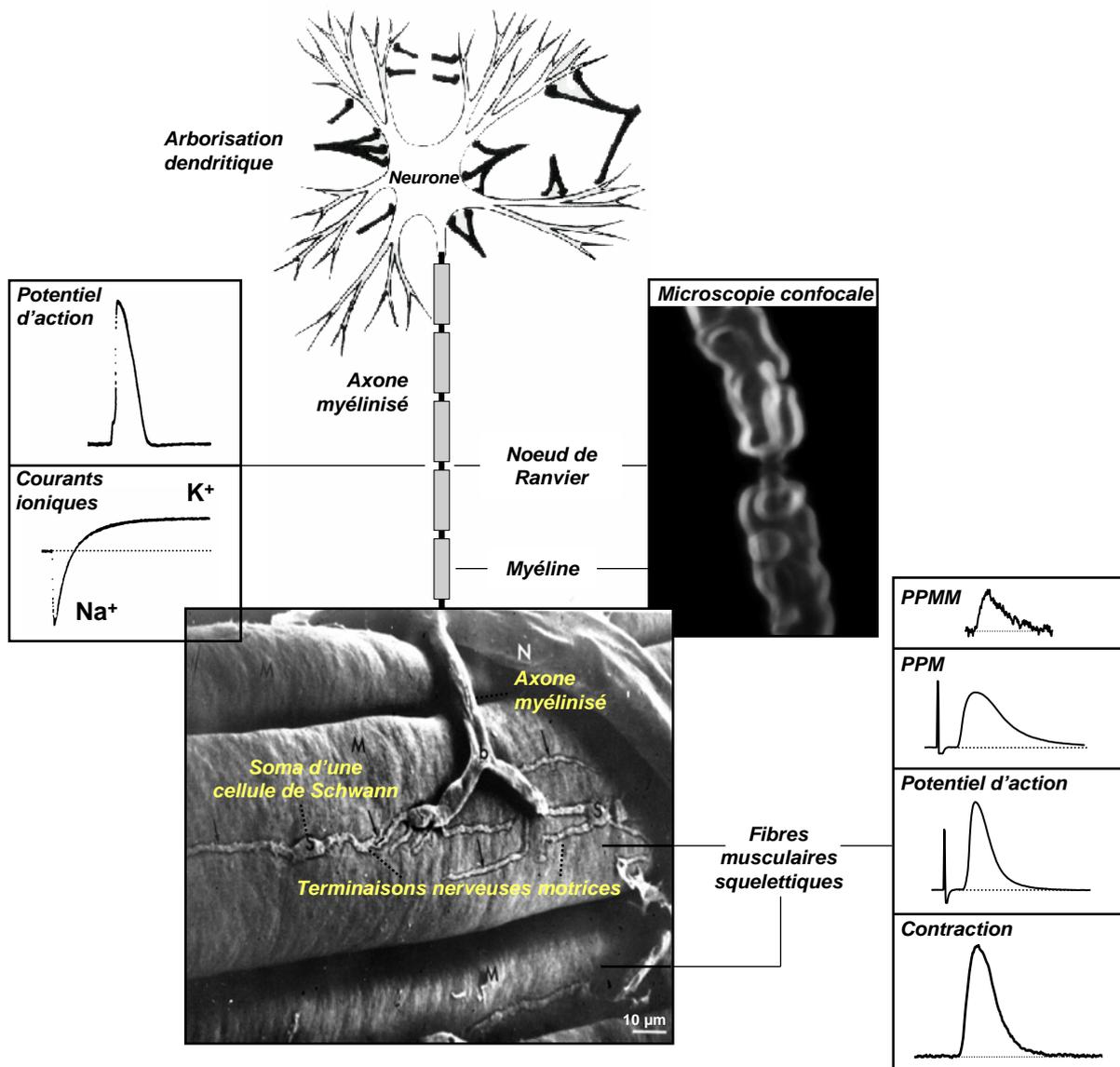
l'adulte. La transformation des amas des récepteurs de la naissance à l'état l'adulte de l'élément postsynaptique implique un ensemble complexe de processus qui se produisent pendant une période prolongée. Il y a, au moins, cinq ensembles importants de changements [Sanes and Lichtman, 1999].

- Premièrement, la forme : l'allure de la jonction passe d'une plaque ovale simple à un ensemble de branches qui ressemble à un « bretzel » (Fig. 7). Une augmentation de surface se produit en parallèle de l'augmentation du diamètre des fibres musculaires.
- En second lieu, la topographie : la membrane de la jonction évolue à partir d'une feuille plate pour devenir une surface invaginée avec des gouttières et des plis (Fig. 8).
- Troisièmement, la matrice extracellulaire et les constituants cytosquelettiques : la composition de la lame basale qui recouvre la membrane riche en RACH et l'appareil du cytosquelette changent quantitativement et qualitativement.
- Quatrièmement, la fonction du canal : une variation dans la composition de la sous-unité RACH mène à un changement de sa perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  et, au cours du développement, la durée d'ouverture moyenne du canal diminue, ce qui fait que la durée d'action du canal mature est rapide.
- Cinquièmement, la division moléculaire : régionalisation des canaux ioniques, avec leurs éléments cytosquelettiques associés.

Des changements importants interviennent, également, du côté présynaptique de la jonction neuromusculaire mature : les terminaisons nerveuses deviennent plus efficaces, les axones moteurs sont myélinisés et, seul un axone est conservé pour l'innervation de la jonction lors du phénomène d'élimination de synapse [Sanes and Lichtman, 2001].

La maturation de la synapse est vraisemblablement sollicitée par rapport à l'augmentation des exigences fonctionnelles vis-à-vis de cette synapse comme la croissance des fibres musculaires, et la demande des animaux qui exigent des réponses rapides de leur système moteur. Le fait que la libération du neurotransmetteur devient plus fiable et que la densité et le nombre total de récepteurs augmentent conforte cette idée. Les changements dus à la maturation sont, peut-être, un moyen de fournir la possibilité à la synapse d'évoluer perpétuellement.

C'est au niveau de la jonction neuromusculaire que le nerf transmet au muscle l'information nerveuse qui déclenche la contraction musculaire. Cette transmission neuromusculaire se fait grâce au neurotransmetteur: l'acétylcholine.



**Figure 9.** Eléments neuromusculaires (du neurone aux fibres musculaires squelettiques) impliqués dans l'excitabilité membranaire ainsi que dans la conduction axonale du potentiel d'action, la libération du neurotransmetteur, la transmission synaptique et la contraction musculaire.

## 1.2. La libération de neurotransmetteur

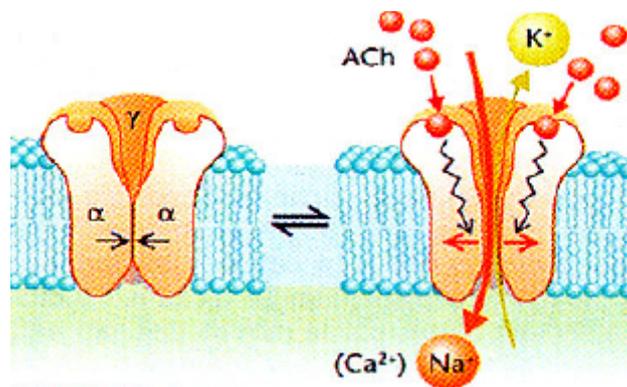
Le couplage neuromusculaire passe par le messenger chimique : l'acétylcholine (ACh). La neurotransmission implique donc au niveau présynaptique un mécanisme de commande de la libération d'ACh à partir d'un potentiel d'action neuronal, et au niveau postsynaptique un mécanisme de génération du potentiel d'action musculaire à partir de la réception de l'ACh.

### 1.2.1. Rappel de certains concepts sur la libération de neurotransmetteur au niveau de la jonction neuromusculaire

Au niveau de la cellule, les phénomènes électriques sont générés par des mouvements d'ions à travers les canaux ioniques situés dans la membrane plasmique. Ces mouvements sont dus aux différences de concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane. Chaque espèce ionique a tendance à diffuser passivement (*i.e.* selon son gradient de concentration) à travers la membrane. La diffusion d'une espèce ionique génère un gradient électrique qui va à l'encontre du gradient de concentration et qui engendre une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane. La valeur du potentiel de membrane va donc dépendre à la fois des conductances relatives des différents canaux ioniques et du potentiel d'équilibre de chaque ion.

L'état de repos de la cellule (*i.e.* lorsqu'elle n'est pas stimulée) correspond à un état d'équilibre où le gradient de concentration compense exactement le gradient électrique. La stimulation de la cellule, par un courant électrique dépolarisant, provoque l'apparition d'un potentiel d'action. Généré au niveau du neurone, le potentiel d'action se propage le long de l'axone jusqu'aux terminaisons nerveuses motrices (Fig. 9). L'axone est une fibre nerveuse qui peut être soit non myélinisée (la propagation du potentiel d'action est alors relativement lente car elle se fait de façon continue) soit myélinisée, c'est-à-dire entourée par une gaine isolante de myéline qui s'interrompt à des endroits réguliers, appelés "nœuds de Ranvier", le long de la fibre (la propagation, dite "saltatoire", est alors relativement rapide car le potentiel d'action se propage d'un nœud de Ranvier à l'autre).

Arrivé au niveau de la jonction neuromusculaire, le potentiel d'action provoque la libération, dans la fente synaptique, de l'ACh contenue dans les vésicules synaptiques claires des terminaisons nerveuses motrices (Fig. 9). Au niveau de la jonction



**Figure 10. Ouverture du canal-récepteur.** Les deux molécules d'ACh se fixent sur le récepteur nicotinique postsynaptique. Le récepteur change de conformation, il s'ouvre et devient perméable aux cations et entraîne une dépolarisation membranaire non propagée.

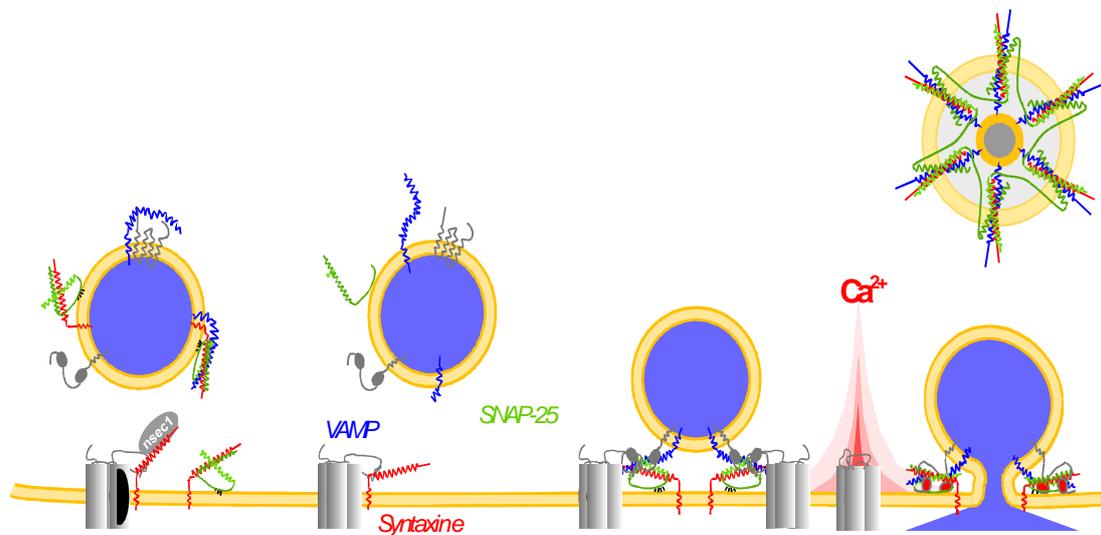
neuromusculaire de Vertébrés, la libération d'acétylcholine (ACh) se produit : (i) soit sous forme de fuite moléculaire (libération non quantique). Cette libération est mesurable car elle provoque une dépolarisation soutenue mais très faible de la membrane jonctionnelle. Ainsi le blocage des récepteurs nicotiques à l'ACh de la plaque motrice par la tubocurarine entraîne une hyperpolarisation de la membrane plasmique (ii) soit sous forme de paquets multimoléculaires d'ACh (contenant environ 10 000 molécules). Ces quanta d'ACh sont contenus dans les vésicules synaptiques claires (libération quantique).

La libération quantique peut être :

- Spontanée, elle est dépendante du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et elle est à l'origine des potentiels de plaque motrice miniatures (ppmm) caractérisés par leur amplitude quasi constante. Ces ppmm résultent de la libération d'un quantum d'ACh.
- Provoquée par l'influx nerveux, elle dépend du  $Ca^{2+}$  extracellulaire et elle est à l'origine des potentiels de plaque motrice (ppm).

L'ACh, après avoir été libérée dans la fente synaptique, agit en se fixant sur les récepteurs nicotiques postsynaptiques. Les récepteurs nicotiques de la jonction neuromusculaire appartiennent à une superfamille de récepteurs ligand-dépendant qui comprennent un canal ionique au sein de leur structure [Katz and Miledi, 1977]. Ils sont constitués de sous-unités protéiques arrangées en forme de rosette avec un pore au centre correspondant au canal ionique [Corringer et al., 2000]. Le récepteur nicotique est en position transmembranaire mais sa partie extracellulaire est beaucoup plus volumineuse que celle intracellulaire. Les récepteurs nicotiques sont activés directement par la fixation de l'agoniste sur un site spécifique au récepteur. L'ACh se fixe sur les deux sous-unités  $\alpha$  qui possèdent deux groupements cystéines adjacents indispensables à la fixation du neurotransmetteur.

Les canaux-récepteurs, ainsi activés par deux molécules d'ACh (Fig. 10), changent de conformation, ce qui permet l'ouverture du canal ionique. Les récepteurs deviennent donc perméables aux cations et entraînent une dépolarisation membranaire non propagée conduisant à un potentiel de plaque motrice miniature (ppmm) ou à un potentiel de plaque motrice (ppm). Ce dernier peut engendrer un potentiel d'action à la surface de la membrane musculaire qui déclenchera la contraction musculaire.



**Figure 11.** Fusion d'une vésicule synaptique à la membrane présynaptique. Les protéines de la membrane de la vésicule (v-SNARE) se placent face à leurs partenaires t-SNARE de la membrane plasmique. Les molécules v-SNARE et t-SNARE forment un complexe. La synaptotagmine, activée par le calcium, accélère le rapprochement de la vésicule synaptique à la membrane plasmique. Les couches lipidiques fusionnent. D'après Humeau et *al*, 2000.

### 1.2.2. Les protéines synaptiques impliquées dans la libération de l'ACh

La libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique est régulée par l'exocytose des vésicules synaptiques de la zone active présynaptique de la terminaison nerveuse. Elle est sous l'influence du  $\text{Ca}^{2+}$  et correspond à une série d'événements qui est encore discutée:

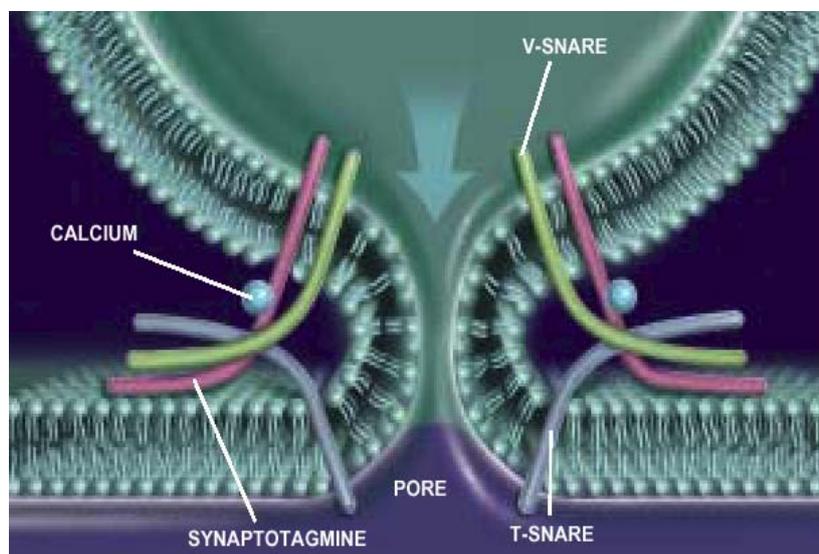
(1) Il y a tout d'abord un pompage moléculaire du neurotransmetteur par les petites vésicules synaptiques claires. Le neuromédiateur est synthétisé par la choline acétyltransférase dans le cytoplasme à partir d'acétate (provenant du métabolisme des mitochondries) et de choline (provenant essentiellement du transport par une protéine, le transporteur de choline de haute affinité). Dans cette étape, le transporteur vésiculaire à l'ACh est impliqué ; c'est une protéine membranaire des vésicules synaptiques qui assure le transport des molécules d'ACh contre un gradient de proton.

(2) Ensuite se déroule la translocation des vésicules vers la membrane présynaptique. La synapsine est localisée à la face externe des membranes vésiculaires. Cette protéine est calmoduline- $\text{Ca}^{2+}$  dépendante. Elle permet l'ancrage des vésicules sur le cytosquelette (*via* la spectrine) et conduit les vésicules au contact de la membrane présynaptique.

(3) La reconnaissance des sites spécifiques se fait sur le versant interne de la membrane présynaptique, elle est suivie d'un processus de fusion des membranes aboutissant à l'ouverture de la vésicule synaptique et au déversement du neuromédiateur dans la fente synaptique (ouverture des synaptopores).

Le processus de préexocytose des vésicules synaptiques dépend de plusieurs complexes protéiques (Fig. 11) :

- Des complexes protéiques d'attachement : SNAP/SNARE. Les SNAP (Soluble NSF Attachment Proteins) forment un complexe de protéines cytosoliques. Les SNAP reconnaissent les SNARE ; il s'agit de récepteurs au SNAP localisés à la fois sur la membrane vésiculaire (ils sont appelés v-SNARE comme la synaptobrevine ou VAMP (Vesicle Associated Membrane Protein)) et sur la membrane présynaptique (ils sont appelés t-SNARE (t pour « target ») comme la syntaxine et SNAP-25 (synaptosomal associated protein of 25 kDa)) [Sudhof, 2004].



**Figure 12.** Un pore de fusion se forme lorsque la synaptotagmine se lie au complexe v-SNARE/t-SNARE. Des ions calcium se fixent sur la synaptotagmine, provoquant un changement de conformation qui rapproche le v-SNARE et le t-SNARE. La fusion de la membrane de la vésicule avec la membrane pré-synaptique entraîne la formation d'un pore par lequel s'écoule le contenu en neurotransmetteurs de la vésicule synaptique. D'après Galli et al., 2002.

- Le NSF (N-ethylmaleimide Sensitive Factor) est une protéine cytosolique nécessaire à la reconnaissance stéréospécifique SNAP-SNARE. En son absence les vésicules s'accumulent près du réseau mais ne fusionnent pas.
- La synaptotagmine, protéine membranaire des vésicules synaptiques, semble être l'une des protéines sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  « sensor ») impliquées dans la régulation de la fusion membranaire. En effet, la synaptotagmine possède deux domaines C2 homologues au domaine C2 de la protéine kinase C. L'augmentation de calcium stimule l'interaction de la synaptotagmine avec le complexe SNARE, les phospholipides et également avec les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du potentiel, et diminue son affinité pour SV2, une protéine des vésicules synaptiques [Schivell et al., 1996] [Charvin et al., 1997] [Davis et al., 1999] [Sudhof, 2004].

La sensibilité de la libération de neurotransmetteurs au calcium est directement liée à l'affinité de la synaptotagmine pour cet ion [Fernandez-Chacon et al., 2001]. Ces données suggèrent que la synaptotagmine est responsable de la dépendance au calcium de la libération de neurotransmetteurs. Il est possible que la synaptotagmine, ancrée dans la membrane de la vésicule, change de conformation au moment où elle capte des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , accélérant l'enroulement des protéines SNARE en tresse et le rapprochement de la vésicule avec la membrane plasmique. Les membranes fusionnent, créant un pore (Fig. 12) qui laisse se déverser le neurotransmetteur dans la fente synaptique [Galli et al., 2002].

(4) Et enfin, les vésicules synaptiques sont recyclées localement dans chaque terminaison. Après leur fusion, elles sont reformées par endocytose. Les nouvelles vésicules se rechargent en neurotransmetteur. Le cycle recommence [Naguib et al., 2002].

### **1.2.3. Le rôle du calcium dans la libération**

Les ions calcium jouent un rôle central dans la libération de neurotransmetteurs à partir des terminaisons nerveuses et dans la régulation de plusieurs formes d'activité cellulaire et particulièrement dans la contraction musculaire et l'excitabilité des membranes nerveuses [Katz, 1969] [Van der Kloot and Molgo, 1994] [Zucker, 1996] [Augustine, 2001]. Il est donc nécessaire que la concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  soit très finement et très efficacement régulée, de manière que le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire soit maintenu à des valeurs très basses [Chesnoy-Marchais and Tritsch, 1999]. La cellule a accès à deux sources de  $\text{Ca}^{2+}$  : l'une externe et l'autre interne retenue dans diverses

structures. Il existe trois types principaux de canaux qui permettent l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule :

(1) Les canaux activés par le potentiel (VOC)

Parmi ces canaux  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles au potentiel, plusieurs sous-types ont été mis en évidence. Il y a entre autres les canaux de type L, N et P/Q.

Le type des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  impliqués dans le déclenchement de la libération a été identifié en examinant les effets d'agents pharmacologiques spécifiques d'un type de canal donné sur la libération de neurotransmetteur [Poulain, 1999].

Les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L jouent un rôle dans le couplage excitation-contraction. Ils sont mis en jeu dans certains types de potentiels d'action. Ce sont des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  à haut seuil d'activation, qui s'activent et s'inactivent lentement avec le potentiel [Chesnoy-Marchais and Tritsch, 1999]. Ces canaux, sensibles aux dihydropyridines, ne semblent pas associés au déclenchement de la libération phasique rapide de neurotransmetteur. Ils sont cependant impliqués dans la libération de neurotransmetteur par les cellules bipolaires de la rétine et dans la sécrétion des catécholamines par les cellules chromaffines. En outre, ils ont un rôle modulateur de la libération en concourant à l'activation des canaux  $\text{K}^+$  par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  [Poulain, 1999].

De façon générale, les canaux impliqués dans la libération sont ceux du type N (bloqués par l' $\omega$ -conotoxine GVIA du mollusque *Conus geographus*) et ceux du type P (bloqués par l' $\omega$ -agatoxine IVA de l'araignée *Agelenopsis aperta*). Le canal de type N est plus caractéristique de la jonction neuromusculaire de grenouille ; le type P/Q est celui impliqué dans la libération d'ACh à la jonction neuromusculaire des mammifères. Il a été montré que la sous-unité  $\alpha_1$  des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type N ou P interagit directement avec la syntaxine 1A et la synaptotagmine. Une des fonctions de cette interaction est d'assurer l'ancrage des vésicules synaptiques à la membrane plasmique au voisinage de la bouche du canal  $\text{Ca}^{2+}$ . La synaptotagmine, le déclencheur  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant de la libération, serait ainsi localisée dans le microdomaine de très haute concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui s'établit quand le canal  $\text{Ca}^{2+}$  est activé.

Dans le système nerveux central des mammifères, c'est plutôt une combinaison de plusieurs types, le type P/Q étant prédominant [Poulain, 1999].

(2) Les canaux activés par les récepteurs (ROC)

(3) Les canaux activés par les stocks (SOC)

Ces canaux ont des propriétés cinétiques très différentes [Berridge, 1997].

Les deux types de canaux intracellulaires responsables de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le réticulum sarcoplasmique et le réticulum endoplasmique sont respectivement les récepteurs à la ryanodine (RyR) et les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3\text{R}$ ). Il y a 2 RyR et au moins 4  $\text{IP}_3\text{R}$ . L'inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) est un second messenger utilisé par de nombreux types cellulaires pour libérer le  $\text{Ca}^{2+}$  des stocks internes. A travers l'activation de la phospholipase C (PLC), de l' $\text{IP}_3$  est produit et ce dernier diffuse rapidement dans le cytosol pour interagir avec les récepteurs à l' $\text{IP}_3$  du réticulum endoplasmique. Ces récepteurs servent donc de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  pour libérer le  $\text{Ca}^{2+}$ . Il en résulte une diminution des stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  situés dans la lumière du réticulum endoplasmique qui provoque la lente activation des SOC. Cette seconde phase d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  permet d'augmenter le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et remplir les stocks intracellulaires.

La régulation des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est importante pour le contrôle de la transmission synaptique. De plus, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ , dans les terminaisons nerveuses motrices à travers les canaux sensibles au potentiel, est connue pour jouer un rôle clef dans la régulation de la libération quantique synchrone de transmetteurs, alors que la libération quantique asynchrone dépend principalement des niveaux de base du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

Le contrôle de la transmission synaptique est aussi régulé par les cellules gliales ; il est à noter que les cellules de Schwann péri-synaptiques terminales sont impliquées dans la potentialisation de la transmission synaptique. En effet, une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules de Schwann soit par le blocage de la pompe ATPase soit en induisant une libération de calcium par injection d' $\text{IP}_3$  (inositol 1,4,5-triphosphate) accentue la transmission synaptique. L'activation des cellules gliales qui intervient dans la régulation de l'efficacité synaptique est dépendante de façon importante de la concentration en calcium [Castonguay and Robitaille, 2001].

Les réserves internes gliales de calcium semblent être régulés par les récepteurs à l' $\text{IP}_3$ , tandis que les réserves internes présynaptiques sont associées préférentiellement avec les récepteurs à la ryanodine et sont contrôlées par des mécanismes de libération auto-catalytique de calcium à partir des réserves intracellulaires (CICR : calcium-induced calcium release). Ceci est conforme aux modes d'activation des compartiments présynaptiques et ceux de la glie dans lesquels les cellules de Schwann péricytoplasmiques, et les cellules gliales en général, sont activées par des neurotransmetteurs par l'intermédiaire des récepteurs couplés à la protéine G, tandis que les réserves internes présynaptiques sont régulées par le principal événement qui provoque la libération soit l'entrée de calcium. Par conséquent, ceci indique que l'efficacité synaptique est contrôlée différenciellement par les

réserves internes gliales régulées par l'IP<sub>3</sub> et par les mécanismes CICR présynaptiques [Castonguay and Robitaille, 2001].

### 1.3. Les cholinestérases

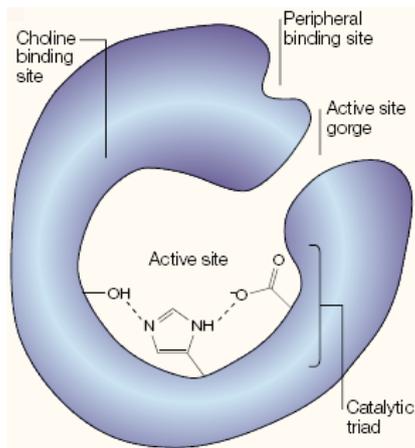
Les cholinestérases sont des hydrolases de sérine qui agissent préférentiellement sur les esters de choline. Différents types de cholinestérases sont traditionnellement distingués sur la base de leur spécificité au substrat. Les acétylcholinestérases (AChE) sont définies par le fait qu'elles hydrolysent l'acétylcholine (ACh) plus rapidement que d'autres esters de choline et qu'elles présentent une petite activité sur la butyrylcholine (BCh) (ou propionylcholine). Quant aux butyrylcholinestérases (BChE), elles sont plus actives sur la BCh que sur l'ACh [Massoulie, 2002]. Cependant, ces cholinestérases non spécifiques sont, également, actives sur l'ACh et un certain nombre d'autres esters de la choline [Massoulie and Bon, 1982].

Les Invertébrés possèdent un nombre variable de gènes codant pour les cholinestérases, par exemple, la drosophile possède un seul gène [Hall and Spierer, 1986] et *Caenorhabditis elegans* possède quatre gènes distincts [Combes et al., 2000]. Les Vertébrés possèdent deux gènes codant pour les cholinestérases : un gène codant pour l'AChE [Massoulie et al., 1993a] et un gène codant pour la BChE [Arpagaus et al., 1990], sauf dans certaines espèces de poissons.

#### 1.3.1. L'acétylcholinestérase

L'AChE est clairement responsable de l'hydrolyse de l'ACh dans les synapses cholinergiques, ce qui est nécessaire pour le contrôle temporel de la transmission synaptique. Par conséquent, les agents anticholinestérasiques peuvent être hautement toxiques lorsqu'ils sont employés couramment comme pesticides et aussi comme agents neurotoxiques dans les guerres chimiques. Leur utilisation ne rime pas seulement avec toxicité car certaines drogues anticholinestérasiques sont, également, employées en tant qu'agents thérapeutiques dans le traitement du glaucome, de la maladie d'Alzheimer ou encore de certains syndromes myasthéniques (myasthénies graves).

La neurotransmission régulée par l'ACh est fondamentale pour un système nerveux fonctionnel. Son blocage brutal est létal et sa perte graduelle, comme dans la maladie



Soreq et al., 2001



Susmann et al., 1991

**Figure 13. Structure 3D de l'acétylcholinestérase.** Paradoxalement pour une enzyme aussi efficace, son site catalytique, identifié par cristallographie par rayon X, se trouve au fond d'une gorge de résidus aromatiques. La fasciculine se lie au site périphérique de l'AChE.

Protein	Origin	Triad residues	Intra-molecular disulphides	Splicing variants	Trans-membrane domain	Glyco-phospholipid linkage	Assembly potential
<b>Cholinesterases</b>							
Acetylcholinesterase	Mammalian	SEH	123	+	-	+	+
Acetylcholinesterase	<i>Torpedo</i>	SEH	123	+	-	+	+
Butyrylcholinesterase	Mammalian	SEH	123	-	-	-	+
Cholinesterase	Insect	SEH	123	-	-	+	+
<b>Other esterases</b>							
Carboxylesterases	Mammalian	SEH	12-	-	-	-	-
Cholesterol esterase	Mammalian	SDH	12-	-	-	-	-
Esterases 6 and P	Insect	SDH	12-	-	-	-	-
Esterase B1	<i>Culex</i>	SEH	1--	-	-	-	-
Juvenile hormone esterase	<i>Heliothis</i>	SEH	1--	-	-	-	-
D2 esterase	<i>Dictostelium</i>	SEH	123	-	-	-	-
Crystal protein	<i>Dictostelium</i>	SEH	123	-	-	-	-
Lipases	<i>Geothricum, Candida</i>	SEH	12-	-	-	-	-
<b>Non-enzyme proteins</b>							
Thyroglobulin	Mammalian	--H	123	-	-	-	-
Neuroigin	Mammalian	-EH	12-	+	+	-	-
Neurotactin	<i>Drosophila</i>	-EH	123	-	+	-	-
Glutactin	<i>Drosophila</i>	---	12-	-	-	-	-
Glilotactin	<i>Drosophila</i>	---	12-	-	+	-	-

**Tableau 2.** Les trois sous familles, les cholinestérases, les autres estérases et les protéines non enzymatiques appartiennent à la super famille des protéines  $\alpha/\beta$ . Les protéines non enzymatiques incluent un nombre de plus en plus important de protéines avec des domaines extracellulaires homologues à l'AChE, et dans certains cas, une région transmembranaire avec un domaine cytoplasmique qui peut interagir avec les protéines de signalisation intracellulaire. Il est à noter que seules les cholinestérases ont la capacité de se lier aux glycopospholipides et de former des hétérodimères. Soreq *et al.*, 2001.

d'Alzheimer [Wright et al., 1993a], est associée à la détérioration progressive des fonctions cognitives. L'acétylcholinestérase (AChE) hydrolyse et inactive l'ACh, elle régule ainsi la concentration de neurotransmetteur dans la synapse [Soreq and Seidman, 2001]. La fin de l'activation est dépendante de la dissociation de l'ACh avec le récepteur, de sa diffusion et de son hydrolyse sauf dans les maladies où les niveaux d'ACh sont limités ou lors de l'inhibition de l'AChE, conditions qui augmentent la durée de l'activation des récepteurs [Silver, 1963].

L'hydrolyse de l'ACh peut aussi être catalysée par une enzyme moins spécifique, la butyrylcholinestérase (BChE). Cette enzyme peut remplacer l'AChE en hydrolysant l'ACh et elle peut, également, jouer le rôle d'un leurre vis-à-vis des molécules anticholinestérasiques naturelles en réagissant avec ces toxines avant qu'elles atteignent l'AChE [Li et al., 2000]. Ces deux enzymes diffèrent au niveau de leur spécificité au substrat et de leur sensibilité aux inhibiteurs, mais elles possèdent 53 % de séquences homologues [Harel et al., 1992]. Cependant, l'AChE semble avoir plus de fonctions que la BChE.

Les séquences codantes pour l'AChE ont été clonées à partir d'espèces de Vertébrés et d'Invertébrés telles que insectes, nématodes, poissons, reptiles, oiseaux et plusieurs mammifères comme l'être humain. Et la structure tridimensionnelle de l'AChE a été déterminée, par cristallographie, chez la torpille [Sussman et al., 1991], la drosophile [Harel et al., 2000] et les mammifères comme l'homme [Bourne et al., 1995] [Marchot et al., 1996] [Kryger et al., 2000] ainsi que celle de la BChE humaine [Nachon et al., 2002]. Les domaines catalytiques de ces enzymes sont organisés comme un ensemble globulaire de feuillets  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  (pli  $\alpha/\beta$ ) [Ollis et al., 1992], qui est partagé avec d'autres estérases et protéines non catalytiques telles que la glutactine de la drosophile et la neurotactine et la neurologine des mammifères.

L'AChE a une activité catalytique extrêmement rapide, la vitesse d'hydrolyse est inférieure à 100  $\mu$ s, ce qui est étonnant car son site actif se trouve au fond de la gorge catalytique étroite (Fig. 13). Des études de mutagenèse dirigée [Shafferman et al., 1992] ont mis en évidence, en particulier, un site de liaison périphérique. Ce site périphérique, caractérisé par des études cinétiques, semble être fondamental pour certaines des fonctions non classiques de l'AChE.

L'AChE peut être classée de plusieurs manières. Mécaniquement, c'est une hydrolase de sérine. Son site catalytique contient un trio catalytique : sérine, histidine et un résidu acide (Tableau 2). Cependant, le groupe acide de l'AChE est un glutamate alors que

dans la plupart des autres cas, c'est un résidu aspartate. Le substrat de l'acétylcholine est orienté dans le site actif par l'interaction de son groupe ammonium quaternaire avec un résidu tryptophane. Dans l'AChE, d'autres résidus aromatiques forment une poche acyle qui détermine la spécificité de l'enzyme vers différents esters de choline et sa sensibilité aux inhibiteurs du site actif [Harel et al., 1992] [Radic et al., 1993] [Vellom et al., 1993]. Les substrats et les inhibiteurs peuvent, également, se lier au site périphérique, situé à l'entrée de la gorge catalytique, qui sert probablement de premier accepteur pour les substrats chargés positivement avant qu'ils arrivent au site actif [Mallender et al., 2000] [Szegeletes et al., 1999]. La distribution polarisée des résidus chargés dans la protéine génère un dipôle électrostatique qui peut attirer les substrats cationiques vers le site actif [Ripoll et al., 1993] [Tan et al., 1993], bien que ce n'ait pas été confirmé par la mutagenèse des résidus acides autour de l'entrée de la gorge catalytique [Shafferman et al., 1994].

Le domaine catalytique de l'AChE comprend des sous domaines N-terminal et C-terminal qui ne peuvent pas s'interpénétrer mais ils établissent un contact étroit, particulièrement au niveau du site périphérique. L'activité catalytique et la spécificité des substrats de l'AChE dépendent de la dynamique des mouvements de la structure de la protéine et ne reflète pas simplement l'adaptation statique entre le site actif et ses ligands comme dans l'hypothèse du schéma « clef-serrure ».

C'est tout à fait conforme avec les propositions théoriques basées sur la dynamique de la protéine, qui suggèrent que la réaction des produits peut sortir le site actif par l'intermédiaire d'un itinéraire alternatif, de ce fait les problèmes de trafic avec l'entrée des molécules du substrat par la gorge catalytique sont évités [Gilson et al., 1994] [Kronman et al., 1994].

La compréhension des propriétés catalytiques de l'AChE est importante pour comprendre son inhibition par les organophosphates et les carbamates. La cristallographie et l'analyse des séquences ont permis d'identifier un groupe d'enzymes apparentées et des protéines non catalytiques. Certaines de ces protéines transmembranaires avec des domaines cytoplasmiques et des domaines extracellulaires homologues à l'AChE partagent l'unique topographie de l'AChE et leur champ électrique fort [Taylor et al., 2000]. Sur la base de leurs structures, toutes ces protéines sont classées comme étant des protéines à feuillet  $\alpha/\beta$ ; sur la base de leur champ électrique, elles sont classées comme des électrotactines [Botti et al., 1998].

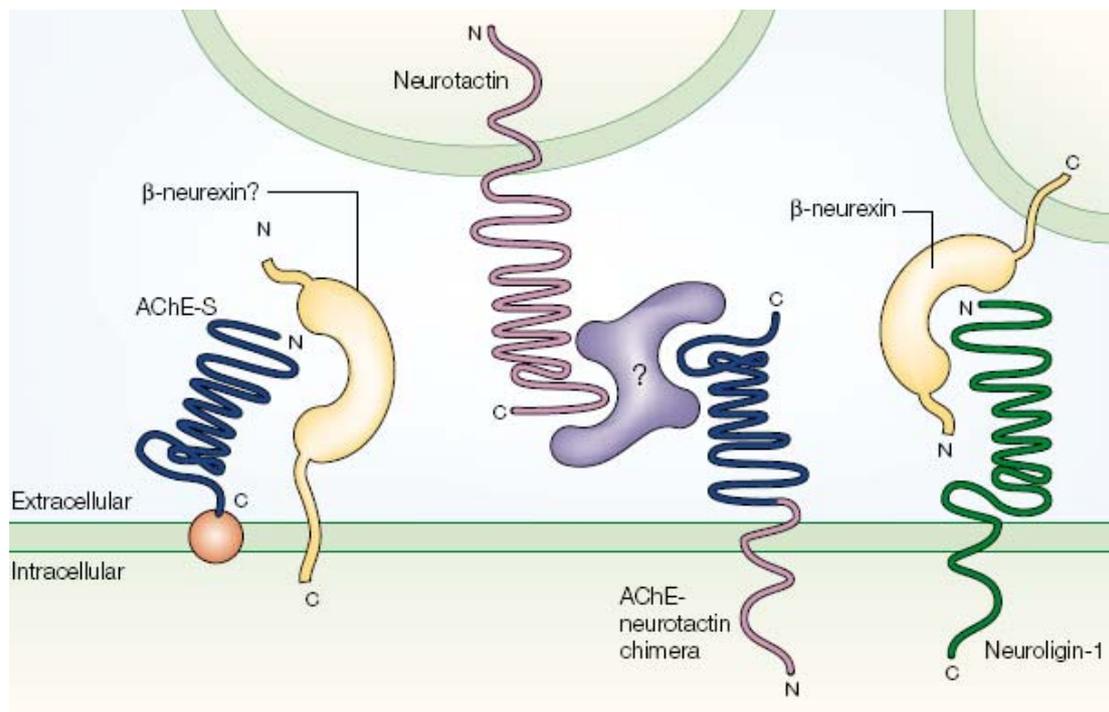
## - Les multiples activités de l'AChE

Les fonctions non classiques des cholinestérases peuvent inclure l'hydrolyse catalytique de l'ACh dans les contextes non synaptiques, comme ce qui est proposé pour les cholinestérases solubles et associées aux cellules dans le flux sanguin. Dans le système nerveux central, l'ACh apparaît avoir une fonction de neuromodulateur plus qu'une fonction conventionnelle de neuromédiateur, entre les éléments pré- et postsynaptiques [Descarries, 1998]. Dans ce sens, l'AChE, et probablement aussi la BChE, contrôlent un niveau ambiant d'ACh plus que la transmission cholinergique point par point [Massoulie, 2002]. L'AChE a été désignée comme facilitant l'agrégation de peptide  $\beta$  amyloïde, probablement à travers une interaction avec son site périphérique [Alvarez et al., 1997] [Inestrosa et al., 1996] et pourtant l'AChE augmente la toxicité du peptide  $\beta$  amyloïde sur les cultures de neurones [Alvarez et al., 1998] [Calderon et al., 1998]. L'AChE et la BChE sont associées à des plaques amyloïdes et à des enchevêtrements neurofibrillaires dans la maladie d'Alzheimer [Carson et al., 1991] [Wright et al., 1993b] et peuvent contribuer à leurs développements [Inestrosa and Alarcon, 1998].

L'idée que l'AChE a des multiples activités sans rapport avec des fonctions biologiques n'est pas évidente. Les données cytochimiques attestent de l'expression de l'AChE régulée spatio-temporellement durant le début de l'embryogenèse [Fitzpatrick-McElligott and Stent, 1981], durant l'extension des neurites embryonnaires et le développement des muscles et avant la synaptogenèse [Betz et al., 1980] [Layer, 1990].

En outre, l'enzyme a été également trouvée dans les neurones adultes non-cholinergiques, et dans les cellules hématopoïétiques. Très tôt des rapports sur la forme soluble, sécrétée et monomérique d'AChE [Kreutzberg, 1969] a été à l'origine que, probablement, cette enzyme pourrait avoir des fonctions non-enzymatiques. Un groupe à travailler pour plaider vis-à-vis de l'existence des activités non-classiques de l'AChE [Appleyard, 1992]. Certaines activités proposées ont été confirmées comme les suivantes :

**Genèse des neurites** : la première activité non classique de l'AChE, dans laquelle sa capacité hydrolytique a été clairement distinguée, est son rôle dans la genèse des neurites. L'AChE exogène épurée favorise la croissance des neurites dans les cellules nerveuses de poussin en culture, tandis que plusieurs inhibiteurs du site actif n'atténuent pas cet effet [Layer et al., 1993], et qu'un inhibiteur du site périphérique bloque la genèse des neurites [Small et al., 1995].



**Figure 14. Mécanisme proposé de quelques fonctions non-classiques de l'AChE.** L'AChE soluble est dessinée en bleu, de même que les régions homologues de neurotactine sont en magenta et que celles de neuroligine-1 sont en vert. Les AChE sont liées à la membrane par une sous unité structurale (orange) qui pourraient être associée à la  $\beta$ -neurexine (jaune) dans une molécule voisine ou incorporée dans la même membrane (à gauche). Alternativement, si ils sont incorporés dans les sites pré- et post-synaptiques, la neuroligine et la  $\beta$ -neurexine pourraient négocier l'adhérence entre cellule (à droite). La neurotactine pourrait adhérer à une autre molécule de neurotactine (non montré), ou se lier à l'AChE par une protéine de liaison non définie (pourpre). L'AChE ou les protéines semblables ne peuvent pas former ce type d'interactions par elles-mêmes. Cependant, quand la région homologue de l'AChE remplace une région de neurotactine, la protéine chimérique maintient la capacité d'adhérence entre les cellules de neurotactine. D'après Soreq *et al.*, 2001.

**Adhérence des cellules :** Les propriétés adhésives du domaine central de l'AChE ont été étudiées dans des expériences de culture en utilisant des cellules de drosophile. Des chimères ont été construites dans lesquelles le domaine AChE homologue de la protéine neurotactine a été remplacé avec l'AChE homologue de la drosophile ou de torpille. La neurotactine est une glycoprotéine transmembranaire exprimée de façon dynamique dans le système nerveux embryonnaire et larvaire de *Drosophila melanogaster*. In vitro, la neurotactine a des propriétés adhésives de type hétérophilique. Le domaine extracellulaire, qui porte l'activité adhésive, est homologue aux protéines appartenant aux acétylcholinestérases (AChE) [de la Escalera et al., 1990]. Ces chimères maintiennent ces propriétés adhésives [Darboux et al., 1996], tandis que l'AChE seule ne montre pas de telles propriétés d'adhésion. Cependant, l'AChE, contrairement à la neurotactine, ne possède pas de domaine transmembranaire. Il se pourrait que l'AChE soluble entre en compétition avec ces structures homologues pour la liaison avec différents partenaires et, ainsi, transporterait ou bloquerait le signal de la morphogenèse dans les neurones [Grifman et al., 1998] (Fig. 14). Cependant, la participation de l'AChE dans les interactions de ce type reste à être prouvée de manière directe.

**Synaptogenèse :** l'activité correspondant à la synaptogenèse de l'AChE a été montrée pour la neuroligine, une autre protéine non-catalytique qui a un domaine extracellulaire homologue à l'AChE et une queue cytoplasmique en C-terminal. Lorsqu'elles sont exprimées dans des cellules non neuronales, les neuroligines induisent des groupements de vésicules synaptiques et une différenciation présynaptique dans les axones adjacents. Ce phénomène a été inhibé par l'addition du domaine extracellulaire de  $\beta$ -neurexine, protéine ancrée dans la membrane présynaptique et partenaire physiologique des neuroligines [Scheiffele et al., 2000], qui pourrait vraisemblablement se lier aussi à l'AChE. Mais le remplacement de la neuroligine par le domaine cholinestérase montre que l'interaction neuroligine-neurexine est spécifique et ne dépend pas simplement d'un repliement général de la protéine. Combinés avec les preuves immuno-histochimiques de la présence de neuroligine dans les synapses excitatrices du cerveau adulte [Song et al., 1999], ces résultats indiquent une participation probable des neuroligines dans le développement des synapses et leur remodelage. Encore une fois, le rôle réel de l'AChE dans ce phénomène, si il y en a un, reste à être examiné de façon plus directe.

**Activation des neurones dopaminergiques** : la chemiluminescence en temps réel a été utilisée pour visualiser la libération d'AChE à partir des dendrites des neurones dopaminergiques dans la substance noire des mammifères [Llinas and Greenfield, 1987]. Il a été montré, plus tard, par le même groupe que l'AChE recombinante purifiée augmentait la dopamine libérée par les neurones dopaminergiques [Holmes et al., 1997]. Ce phénomène autocrine non classique reste à être confirmé par l'utilisation d'autres approches, mais ceci pourrait s'avérer avoir une importance physiologique.

**L'assemblage des fibres amyloïdes** : l'AChE a été rapportée comme favorisant l'assemblage des fibres amyloïdes [Inestrosa et al., 1996]. Le même groupe a constaté que cette activité était bloquée par le propidium, un inhibiteur du site périphérique, mais pas par l'édrophonium, un inhibiteur du site actif de l'AChE, identifiant, ainsi, clairement cette activité d'assemblage comme une fonction non classique de l'AChE. Le complexe AChE- $\beta$ -amyloïde montre une activité AChE qui résiste au faible pH et réduit la sensibilité aux anti-acétylcholinestérasiques, propriétés précédemment démontrées de façon histo-chimiques pour lesquelles l'activité AChE est associée aux plaques présentes dans la maladie d'Alzheimer [Wright et al., 1993a]. Cependant, les limites de cette étude incluent la concentration élevée d'AChE qui est nécessaire pour lier et favoriser la formation des fibres amyloïdes. En outre, seule l'AChE lie les fibrilles amyloïdes *in vitro*, mais l'AChE et la BChE sont accumulées dans les plaques amyloïdes *in vivo*.

**Hématopoïèse et thrombopoïèse** : les activités hématopoïétique et thrombopoïétique ont d'abord été proposées pour l'AChE sur la base de sa présence dans les précurseurs des cellules sanguines [Paoletti et al., 1992] [Lev-Lehman et al., 1997]. Les analyses récentes ont montré que l'activation transcriptionnelle de l'ACHE pendant l'activation des lymphocytes induite par l'hémagglutinine. Des tests d'inhibition ont suggéré une participation mixte des propriétés catalytiques et non classiques de l'AChE dans ce procédé [Kawashima and Fujii, 2000].

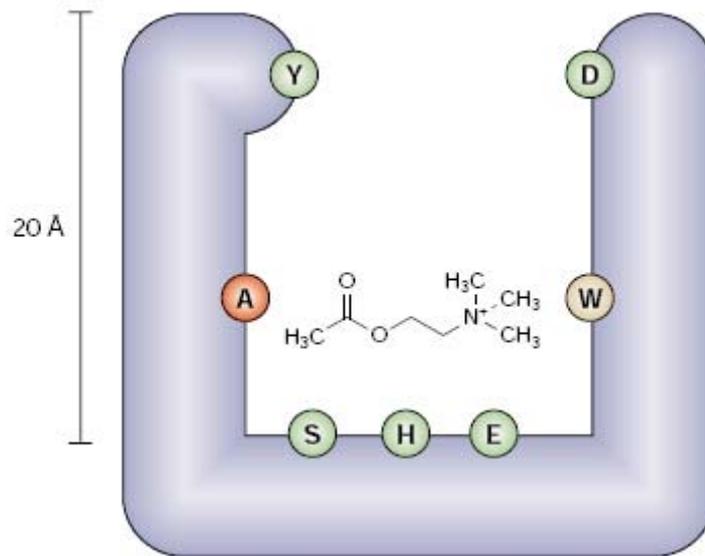
L'hétérogénéité des fonctions non classiques de l'AChE est encore compliquée par la difficulté à distinguer ces fonctions de son rôle dans la régulation de la neurotransmission. Par exemple, il est probable que l'AChE puisse avoir deux types d'activité au niveau des neurones cholinergiques et que l'inhibition de son activité hydrolytique ne bloque pas nécessairement ses fonctions non classiques. Cependant, l'existence de ses fonctions non

catalytiques de l'AChE est remise en cause par une équipe de Montpellier [Cousin et al., 2005]. Leur étude a porté sur des modèles Invertébrés (*Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*) et des modèles Vertébrés (poisson zèbre et souris) qui portent des mutations au niveau du gène de l'AChE qui soit bloquent l'activité sans empêcher la production de l'enzyme soit empêchent la production de la protéine. Les phénotypes, dans ces deux types de mutants, ne sont pas distinguables. Ces modèles n'ont pas fourni de preuves évidentes concernant les activités non catalytiques de l'AChE. Les phénotypes des poissons zèbre indique que l'hydrolyse de l'ACh et donc de l'élimination efficace du neurotransmetteur est importante pour le développement normal. Le phénotype des poissons zèbre et des souris dépourvus d'AChE n'a pas été complètement analysé au niveau des processus autres que ceux impliqués dans la transmission cholinergique. De nombreux aspects du phénotype de ces animaux mutants, et particulièrement dans les organes sensoriels, montrent que ces animaux ne sont pas normaux. Dans les structures et les processus où la transmission cholinergique n'est pas clairement établie, les cholinestérases peuvent jouer un rôle indépendant de celui de l'hydrolyse de l'ACh. Ces fonctions hypothétiques peuvent ne pas être essentielles pour la vie mais pourraient avoir des fonctions de modulation dans le développement et le maintien de l'homéostasie du corps. Par exemple, dans certaines pathologies, l'AChE pourrait s'associer à des protéines avec lesquelles, normalement, elle n'interagit pas. Dans ce cas, la propriété adhésive pourrait mener à un phénotype pathologique spécifique [Cousin et al., 2005].

Pour comprendre le rapport entre les formes moléculaires et les fonctions exercées par l'AChE, il est nécessaire de savoir plus sur les origines moléculaires des différentes formes fonctionnelles de l'AChE (cf paragraphe 1.2.3.).

### **1.3.2. La butyrylcholinestérase**

Le rôle de la BChE chez les Vertébrés supérieurs est moins clair. Il y a de nombreux variants alléliques de la BChE humaine qui réduisent ou éliminent complètement l'activité enzymatique montrant que, l'être humain peut se passer de cette enzyme. Les personnes portant ces variants de la BChE ne présentent pas de pathologies, mais sont extrêmement sensibles aux curares dépolarisants (succinylcholine) utilisés pendant certaines anesthésies. En effet, la BChE est la principale enzyme qui termine l'action de la succinylcholine. Si ce composé n'est pas hydrolysé par la BChE, un blocage de la transmission synaptique se



**Figure 15. Le site actif de la butyrylcholinestérase est au fond d'une gorge de 20 Å.** La triade catalytique comprend la sérine (S), l'histidine (H), et l'acide glutamique (E). Le groupe acyle du substrat (l'ACh est montrée ici) est dans une poche d'acyle (A), tandis que l'azote quaternaire interagit avec le site anionique qui est constitué d'un tryptophane (W). Les substrats sont guidés dans le bas de la gorge catalytique par interaction avec l'acide aspartique (D) et la tyrosine (Y) qui se trouvent à l'entrée de la gorge catalytique. D'après Darvesh S et al., 2003.

produit, et en particulier au niveau des muscles respiratoires et les patients peuvent être en apnée prolongée [Lockridge and Masson, 2000]. En outre, la BChE possède une large gamme de substrats tels que des alcaloïdes issus de plantes comme la cocaïne et il semblerait que la BChE (forme soluble dans le plasma des mammifères) empêche la diffusion de l'ACh dans le sang et/ou l'ingestion orale de composés toxiques [Neville et al., 1990] [Sun et al., 2001].

Comme l'AChE, la BChE a un résidu de sérine (Fig. 15) qui est essentiel pour son activité catalytique et appartient à la famille des protéines pli- $\alpha/\beta$ . Fonctionnellement, la BChE est connue pour catalyser l'hydrolyse de l'ACh [Mesulam et al., 2002b] [Li et al., 2000] [Mesulam et al., 2002a], bien que moins efficacement que l'AChE. Elle est, également, connue pour catalyser l'hydrolyse d'autres esters tels que la cocaïne, l'acide acétylsalicylique et l'héroïne [Lockridge et al., 1980] [Gatley, 1991] [Masson et al., 1998].

Le fait que les personnes avec les variantes silencieuses de la BChE sont apparemment normales a suggéré que cette enzyme ne pourrait pas avoir un rôle essentiel dans la fonction normale du cerveau. Cependant, le terme « silencieux » décrit simplement l'incapacité de cette variante à catalyser l'hydrolyse des esters de la choline. La distribution différentielle et largement répandue de la BChE neuronale, par rapport à celle de l'AChE, suggère un rôle de la BChE dans le système nerveux humain. La BChE pourrait avoir plusieurs rôles possibles dans diverses fonctions neurales et non neurales [Soreq and Zakut, 1993] [Small et al., 1996]. Plusieurs indices indiquent que la BChE pourrait être un co-régulateur de l'activité du neurotransmetteur : l'ACh [Mesulam et al., 2002b] [Li et al., 2000] [Mesulam et al., 2002a] [Soreq and Seidman, 2001] [Greig et al., 2001]. Le rôle de régulation exercé par la BChE sur l'hydrolyse de l'ACh est confirmé avec la démonstration que l'inhibition de la BChE mène à une augmentation dépendante de la dose des niveaux d'ACh dans le cerveau [Giacobini, 2000]. En absence d'AChE, il semble que la BChE peut compenser une partie des fonctions de l'AChE, en particulier en ce qui concerne le système cholinergique [Mesulam et al., 2002b] [Li et al., 2000]. Par exemple, les souris AChE KO sont viables grâce à un soin postnatal spécial. Ces souris ont, également, un taux normal de BChE [Mesulam et al., 2002b] et sont particulièrement sensibles au inhibiteur de BChE [Mesulam et al., 2002b].

Il a été démontré que la BChE était étroitement associée à d'autres protéines telles que l'albumine, la transferrine et des peptidases [Small et al., 1996] [Masson, 1989] [Weitnauer et al., 1999]. Il a été suggéré qu'une association entre la BChE et des protéases telles que la trypsine pourrait avoir une signification fonctionnelle en termes d'activité

protéolytique [Darvesh et al., 2001]. Par exemple, la BChE augmente, de manière significative, l'activité protéolytique de la trypsine. Cette observation a une importance pour le fonctionnement du système nerveux car la trypsine est présente dans le cerveau humain normal et elle pourrait être impliquée dans la pathologie d'Alzheimer [Katona et al., 2002]. Ainsi, la BChE pourrait avoir des fonctions qui dépendent de son interaction avec d'autres protéines, en plus de la co-régulation cholinergique.

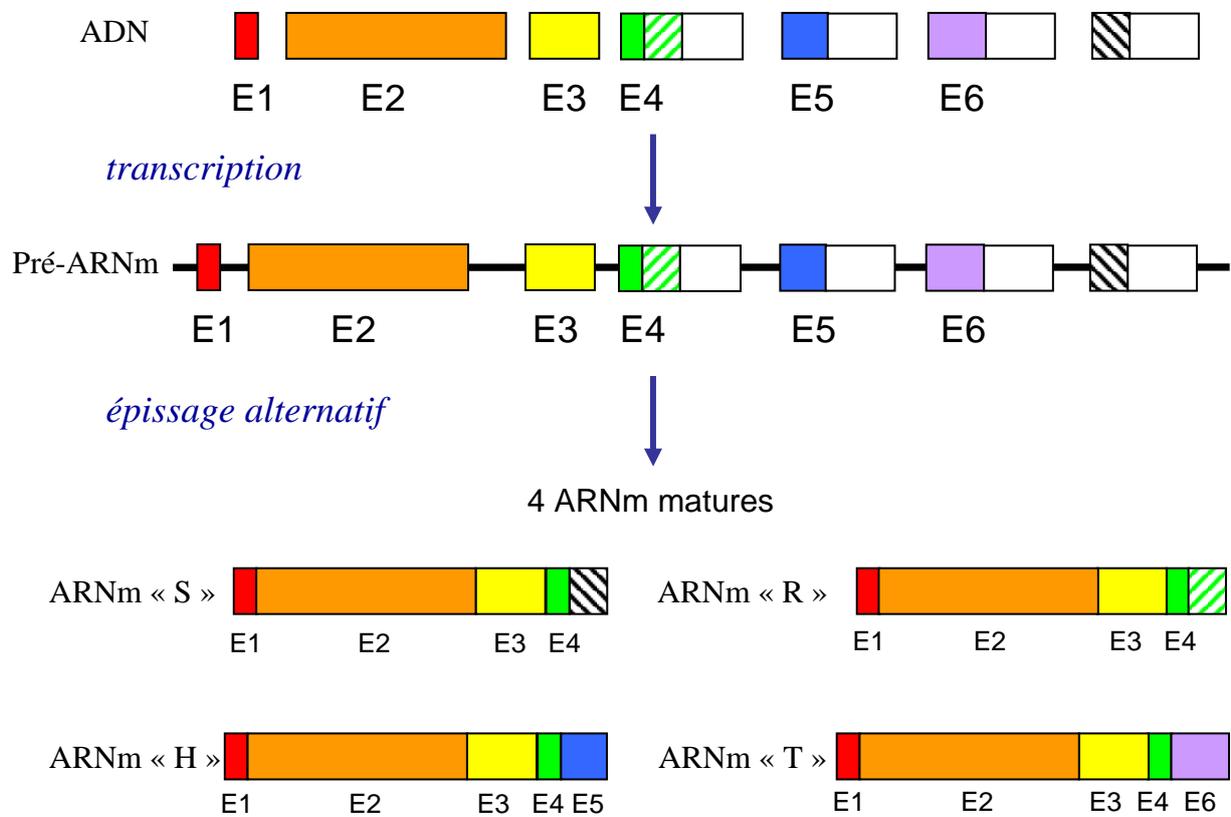
Il a été suggéré que l'AChE et la BChE participent à la régulation de la prolifération cellulaire et à la croissance des neurites durant le développement du système nerveux [Robertson and Mostamand, 1988] [Layer, 1991] [Dubovy and Haninec, 1990] [Soreq and Seidman, 2001]. Dans l'embryon de poussin, la BChE apparaît juste avant la dernière mitose et son expression est suivie de celle de l'AChE, ceci suggère que la BChE pourrait participer à l'expression de l'AChE [Layer, 1991]. De plus, la BChE a été observée dans les axones, dans les terminaisons nerveuses, dans les cônes de croissance et dans les cellules entourant les axones, ce qui indique un rôle possible de la BChE dans la croissance des neurites [Dubovy and Haninec, 1990]. La BChE est transitoirement exprimée dans une large population de neurones durant une courte période au cours du développement postnatal du cerveau de plusieurs espèces, incluant les oiseaux, les rongeurs, les singes et les humains [Robertson and Mostamand, 1988] [Layer, 1991] [Dubovy and Haninec, 1990]. Une telle expression transitoire dans une large population de neurones et de cellules neurales peut être interprété comme le fait que la BChE a un rôle dans le développement du système nerveux à travers son activité enzymatique ou à travers sa capacité à réguler d'autres protéines. Il semble que l'AChE pourrait participer au développement neural en augmentant la transmission cholinergique. Il reste à savoir si la BChE exerce, également, un rôle dans le développement en activant les récepteurs cholinergiques [Darvesh et al., 2003].

La BChE pourrait, donc, avoir des fonctions dans le système nerveux normal et pourrait participer aux processus pathologiques dans les maladies neurodégénératives. Mais les mécanismes par lesquels elle participe dans les maladies neurodégénératives doivent être confirmés.

### 1.3.3. Diversité moléculaire des cholinestérases

Les cholinestérases présentent une large diversité moléculaire établie sur la base de propriétés biochimiques, les sous-unités sont organisées en monomère, dimères et tétramères, certains de ces tétramères peuvent être associés à un collagène ou à une protéine transmembranaire. Un second critère biochimique utilisé pour classer ces édifices est leurs propriétés amphiphiles, c'est-à-dire leurs propriétés d'interagir avec des détergents. Il est proposé que l'organisation moléculaire conditionne leur fonction dans les synapses cholinergiques et dans les contextes non synaptiques que nous avons vu précédemment. Cette diversité résulte de mécanismes de régulations aux niveaux génétiques, post-transcriptionnel et post-traductionnel.

Les différentes sous-unités des cholinestérases sont composées de deux domaines protéiques distincts : un domaine catalytique commun constitué d'environ 500 résidus et un plus petit domaine C-terminal constitué de moins de 50 résidus [Massoulie et al., 1998] [Massoulie, 2002]. Plusieurs peptides C-terminaux peuvent être produits par l'épissage alternatif au niveau de la région en 3' du gène des cholinestérases, ceci dépend des cholinestérases en question : acétylcholinestérase (AChE) ou butyrylcholinestérase (BChE) et de l'espèce. En effet, les gènes des cholinestérases contiennent trois types d'exons qui codent pour des domaines C-terminaux distincts, appelés H pour « Hydrophobic », T pour « Tailed » et S pour « Soluble ». La sous-unité « S » a été exclusivement trouvée chez certains serpents *Elapidae*. De plus, il existe l'ARNm « R » pour « Readthrough », qui a été trouvé chez les torpilles et les mammifères, pour ce dernier, il n'y a pas d'épissage après le dernier exon qui code pour le domaine catalytique. Cependant, les séquences codantes pour les différentes sous-unités ne peuvent pas être correctement considérées comme des « exons » car elles résultent simplement du choix des sites accepteurs qui suivent le dernier exon qui code pour le domaine catalytique. Le processus d'épissage génère donc des sous-unités catalytiques différentes qui contiennent le même domaine catalytique associé à des peptides C-terminaux différents (H, T, S et R) [Massoulie et al., 1998]. Ces courts peptides C-terminaux ne sont pas indispensables pour l'activité enzymatique. Les peptides « R, H, T et S » déterminent la maturation et le devenir de l'enzyme.



**Figure 16. Schéma des différents épissages possibles à partir de l'ADN de l'AChE.**

Lorsque différents types de sous-unités existent dans un organisme, ils sont exprimés dans des territoires distincts, de façon spécifique dans les tissus et les cellules. Par exemple, chez les mammifères adultes, la sous-unité AChE<sub>H</sub> est principalement exprimée dans les cellules sanguines (lymphocytes et erythrocytes), alors que la sous-unité AChE<sub>T</sub> est essentiellement exprimée au niveau des muscles et dans les tissus nerveux centraux et périphériques [Legay et al., 1993a] [Legay et al., 1993b]. Mais l'expression dans les tissus des différentes sous-unités de l'AChE diffère considérablement selon les espèces. Mais nous pouvons conclure que chacune des deux cholinestérases présentes chez les Vertébrés, AChE et BChE, existent sous une multiplicité de formes moléculaires, qui possèdent la même activité catalytique mais diffèrent dans leur structure quaternaire, au niveau de leurs interactions et au niveau de leur solubilité.

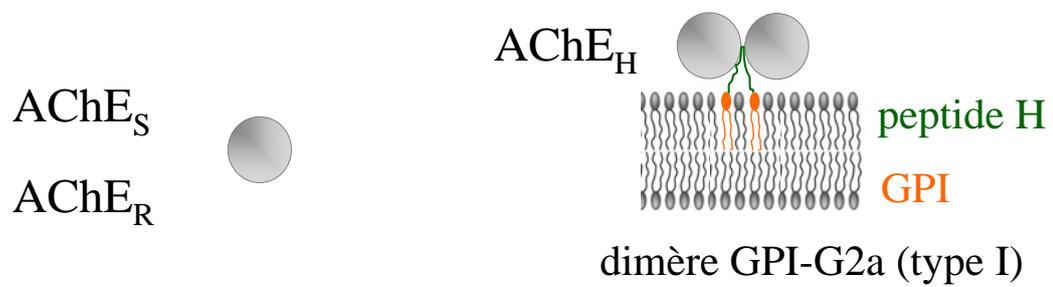
### **1.3.3.1. Les différentes sous-unités des cholinestérases**

L'épissage alternatif participe fortement à la diversité moléculaire des cholinestérases en produisant plusieurs ARNm matures [Graveley, 2001] (Fig. 16).

Nous allons examiner les types distincts des sous-unités naturelles obtenues après épissage alternatif des sites accepteurs de la région 3' du pré-ARNm.

#### **a. Les sous-unités de type « R »**

L'ARNm « R » a été caractérisé chez les torpilles [Sikorav et al., 1988] et chez les mammifères [Li et al., 1993]. Il code pour les peptides « R » qui diffèrent de façon très marquée même entre les différents mammifères (Tableau 3). Ces ARNm résultent de l'absence d'épissage dans la région en 3' et sont souvent très minoritaires. Pourtant ils sont présents dans les tissus embryonnaires [Legay et al., 1995] et leur abondance augmente suite à un stress aigu ou à une exposition à des agents anticholinestérasiques. Cette augmentation semble atténuer l'hyperexcitation initiale.

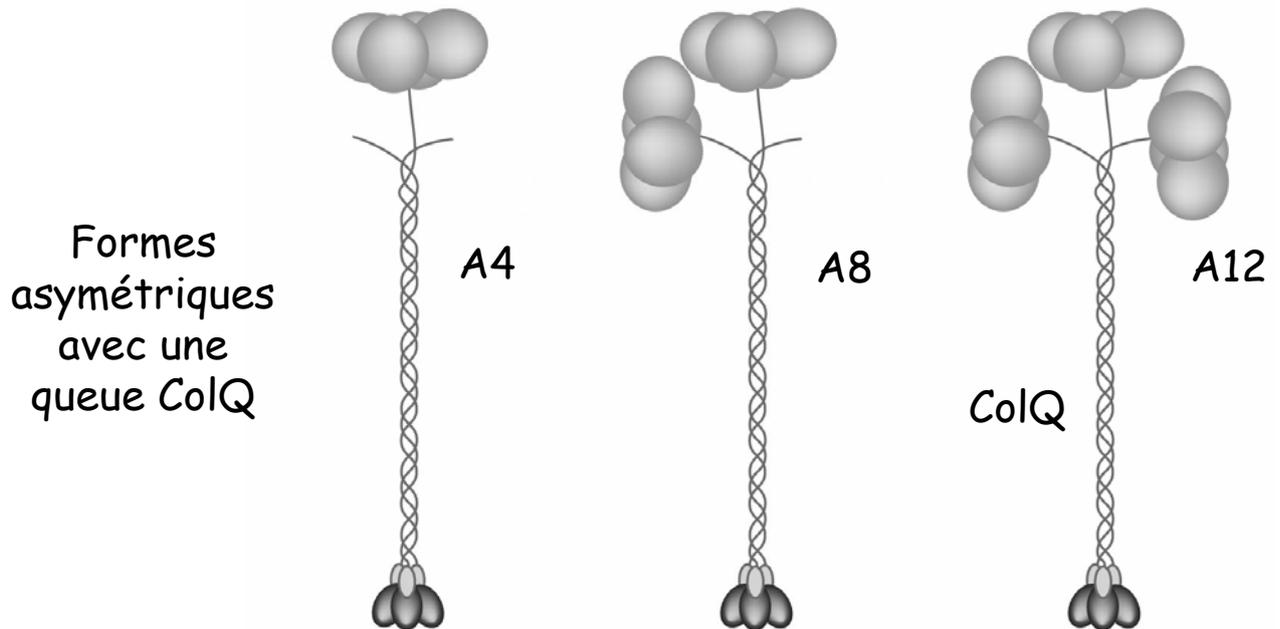
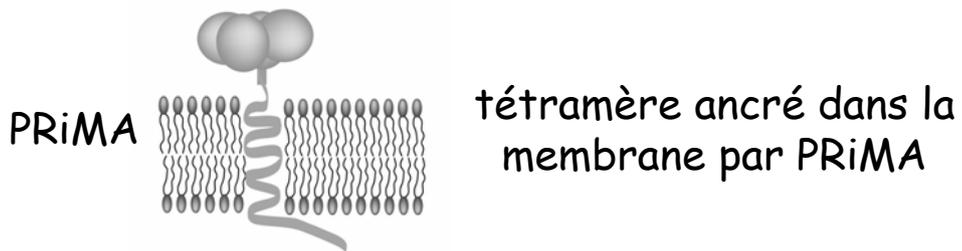
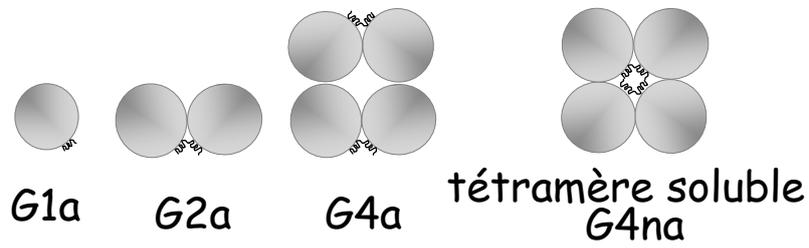


**Figure 17. Schéma des formes moléculaires des sous unités AChE<sub>S</sub>, AChE<sub>R</sub> et AChE<sub>T</sub> de l'acétylcholinestérase.** Les formes enzymatiques AChE<sub>S</sub> et AChE<sub>R</sub> restent monomériques et solubles. La sous unité AChET est ancrée à la membrane par GPI.

**Tableau 3.** Séquences de la région C-terminale de différents peptides « R » ainsi que leurs formes moléculaires et leur distribution dans les tissus. (cf. ESTHER)

	Séquence du peptide dans la région C-terminale	Formes moléculaires	Distribution
R	<b>Torpedo AChE</b> GNVFAFHQKVRTPAKTYHFGVIVAHLLLLSLPTASDVPRASSKW WAHSDPLCS-RRCWESWGRIL	- Monomères solubles (G1 <sub>na</sub> )	- Organes électriques chez <i>Torpedo</i> - Muscles embryonnaires des souris Augmentation du niveau d'expression par le stress dans le cerveau des souris
	<b>Rat AChE</b> GRRGVGKQGMHKAARVGRTERGKGGKHRM		
	<b>Souris AChE</b> GRRMEWGEQGMHKAARVRRGERWGAKHRV		
	<b>Humain AChE</b> GHQGPAGSGWEEGSGSPPGVTPLFSP		

Par contre, ils ne sont pas exprimés de façon normale dans les cerveaux de souris adultes [Kaufer et al., 1998] [Meshorer et al., 2002]. L'enzyme résultante AChE<sub>R</sub> est active catalytiquement et reste soluble et monomérique (Fig. 17) [Massoulie, 2002]. Sa faible abondance in vivo (moins de 2% de l'activité totale de l'AChE dans le cerveau, même après un stress) mène à penser que l'AChE<sub>R</sub> ne semble pas contribuer de façon significative à la régulation cholinergique par l'hydrolyse de l'ACh dans le système nerveux [Perrier et al., 2005]. Cependant, cette enzyme AChE<sub>R</sub> a été décrite comme jouant un important rôle dans le système immunitaire, particulièrement en contrôlant les réponses auto-immunes [Brenner et al., 2003] [Grisaru et al., 1999]. L'AChE<sub>R</sub> est spécialisée pour l'hydrolyse non synaptique et la morphogénèse. Par conséquent, l'action de l'ACh sur les récepteurs nicotiques et l'arrêt de son action par hydrolyse ainsi que l'activité morphogénique de l'AChE pourraient être responsables du maintien de la jonction neuromusculaire de manière dépendante de la composition des différentes sous-unités de l'AChE. Il a été démontré que l'AChE<sub>R</sub> était présente abondamment dans le sérum des rats atteints de myasthénie grave expérimentale par rapport à celui des rats témoins. Son rôle dans ces myasthénies a été souligné [Brenner et al., 2003]. Le rôle de l'AChE<sub>R</sub> pourrait être dû à la spécificité de son peptide en C-terminal qui peut se cliver et être libéré dans le plasma [Grisaru et al., 2001]. Le domaine C-terminal du peptide « R » contient ni cystéines qui peuvent former des ponts disulfures ni des séquences hydrophobes afin que le peptide puisse s'accrocher à la membrane [Massoulie et al., 1998].



**Figure 18. Schéma des formes moléculaires des sous unités AChE<sub>T</sub> de l'acétylcholinestérase.** Les formes enzymatiques AChE<sub>T</sub> sont communes à toutes les espèces et existent aussi pour la butyrylcholinestérase.

## b. Les sous-unités de type « H »

Les sous-unités de type « H » sont caractérisées par le fait que leur peptide C-terminal hydrophobe contient un signal pour le clivage et l'addition d'un lipide et une ou deux cystéines proche(s) du domaine catalytique qui permettent la dimérisation en formant des ponts disulfures (Tableau 4).

**Tableau 4.** Séquences de la région C-terminale de différents peptides « H » ainsi que leurs formes moléculaires et leur distribution dans les tissus. (cf. ESTHER)

	Séquence du peptide dans la région C-terminale	Formes moléculaires	Distribution
H	<b>Drosophile</b> GTC <u>D</u> GD <u>S</u> CSASISPRLOLLGIAALIYICAALRTERVF	- Précurseurs intracellulaires amphiphiles (G <sub>2a</sub> ) - Dimères ancrés par GPI, exposés à la surface cellulaire (G <sub>2a</sub> , type I) - Dimères clivés en C-terminal solubles, sécrétés (G <sub>2na</sub> )	- Tissus nerveux chez les insectes - Muscles, tissus nerveux et organes électriques chez <i>Torpedo</i> - Cellules hématopoïétiques chez les mammifères
	<b>Torpedo AChE</b> AC <u>D</u> GEL <u>S</u> CSSTSSSKGIIFYVLFSLYLIFY		
	<b>Rat AChE</b> ATEVP <u>C</u> T <u>C</u> PSPAHGEAAPRPGPALSLLLFFLFLHSGLRNL		

## c. Les sous-unités de type « T »

L'ARNm « T » génère des sous-unités catalytiques, AChE<sub>T</sub>, qui produisent une large variété de formes d'oligomères, parmi lesquelles il y a des homo-oligomères (monomères, dimères et tétramères) et des associations soit entre les tétramères et le collagène Q (ColQ) soit entre les tétramères et la protéine membranaire riche en proline (PRiMA) (Fig. 18). Les sous-unités catalytiques de type « T » existent chez tous les Vertébrés pour l'AChE et représentent le seul genre de sous-unités pour la BChE.

Les peptides « T » contiennent 40 résidus pour l'AChE et 41 résidus pour la BChE avec 7 résidus aromatiques dont 3 tryptophanes qui sont totalement conservés à travers les Vertébrés et on peut noter que six de ces résidus sont présents dans le peptide de l'*ace-1*, un des gènes codant pour la cholinestérase de *C. elegans* [Arpagaus et al., 1994]. Ils contiennent, également, une cystéine localisée en position 4 dans leur région C-terminale (Tableau 5). La cystéine forme des ponts disulfures soit entre deux sous-unités catalytiques soit entre une sous-unité catalytique et une protéine ancrée associée, ColQ ou PRiMA [Massoulie, 2002].

**Tableau 5.** Séquences de la région C-terminale de différents peptides « T » ainsi que leurs formes moléculaires et leur distribution dans les tissus. (cf. ESTHER)

	Séquence du peptide dans la région C-terminale	Formes moléculaires	Distribution
T	<b>C. elegans ace-1</b> ADVGDPLYLVNKQQMDKWQNEYITTDWQYHFEQYKRYQTYRQSDSET <u>CGG</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Monomères, dimères et tétramères amphiphiles (G1<sub>a</sub>, G2<sub>a</sub>, G4<sub>a</sub>, type II) cellulaires et sécrétés</li> <li>- Formes non amphiphiles tronquées (G1<sub>na</sub>)</li> <li>- Tétramères non amphiphiles (G4<sub>na</sub>)</li> <li>- Association avec des sous-unités ancrées : (i) le collagène Q (formes asymétriques, A<sub>4</sub>, A<sub>8</sub>, A<sub>12</sub>) et (ii) la protéine PRiMA</li> </ul>	Muscles et tissus nerveux chez tous les Vertébrés
	<b>Torpedo AChE</b> ETIDEAERQWKTEFHRW-SSYMMHWKNQFDQY-----SKQER <u>CTNL</u>		
	<b>Bungarus AChE</b> DNIEEAERQWKLEFHLW-SAYMMHWKSNQFDHY-----NKQDR <u>CSEL</u>		
	<b>Rat AChE</b> DTLDEAERQWRAEFHRW-SSYMVHWKNQFDHY-----SKQDR <u>CSDL</u>		
	<b>Humain AChE</b> GNIDEAEWEWKAGFHRW-NNYMMDWKNQFNDYT-----SKKES <u>CVGL</u>		

Les sous-unités AChE<sub>T</sub> génèrent des dimères (G2<sub>a</sub>), des tétramères (G4<sub>a</sub>) amphiphiles ainsi que des tétramères non amphiphiles (G4<sub>na</sub>). Les sous-unités AChE<sub>T</sub> produisent, également, des tétramères non amphiphiles associés à ColQ et PRiMA (Fig. 18). Les molécules amphiphiles sont caractérisées expérimentalement par leur interaction avec les micelles des détergents, qui influence leur sédimentation dans le gradient de sucrose et leur mobilité électrophorétique dans les gels polyacrylamide non dénaturants [Bon et al., 1991]. Il a été suggéré que cette interaction avec les micelles des détergents donne une conformation du peptide « T » en hélice  $\alpha$  [Massoulie et al., 1993a] ; cette hélice amphiphile pourrait former une zone hydrophobe avec les chaînes aromatiques. Un modèle théorique a été proposé où l'hélice  $\alpha$  se replierait sur elle-même et ainsi créerait une zone hydrophobe [Giles, 1997]. Ce type de conformation expliquerait probablement les multiples interactions des sous-unités « T » de cholinestérasés. Ces sous-unités génèrent de nombreuses formes d'oligomères ; des simples monomères aux molécules complexes associées à un collagène ou à une protéine de structure. La proportion entre les monomères et les dimères dépend des espèces, en effet, les dimères des sous-unités AChE<sub>T</sub> sont prédominants chez les torpilles [Duval et al., 1992] alors que les monomères sont principaux chez les rats [Legay et al., 1993b] [Bon and Massoulie, 1997]. Ces molécules sont amphiphiles mais diffèrent des formes ancrées par GPI par leur solubilité plus importante dans les tampons aqueux dépourvus de détergents et elles ne forment pas d'agrégats. Elles sont donc appelées formes amphiphiles de type II [Bon et al., 1988a] [Bon et al., 1988b] [Massoulie et al., 1993b]. En plus des monomères et des dimères, il y a, également, des tétramères et des oligomères produits [Bon and Massoulie, 1997]. Les

tétramères existent sous les formes amphiphiles et non amphiphiles, et diffèrent probablement par l'organisation des peptides « T ». Dans les molécules amphiphiles, la dernière partie de la région hydrophobe du peptide « T » reste exposée alors qu'elle peut être occluse à l'intérieur de la zone hydrophobe dans les formes non amphiphiles. Dans les formes moléculaires avec le collagène ou assymétriques (A), chaque brin de triple hélice de collagène peut être attaché à un tétramère de sous-unités AChE<sub>T</sub>. Dans la forme A12, chaque brin de collagène est attaché à un tétramère catalytique. Quand un ou deux de ces brins sont inoccupés, les formes correspondantes moléculaires sont appelées A4 et A8 respectivement, leur nom indiquant le nombre de sous-unités catalytiques. Alors que la forme moléculaire ancrée à la membrane représente l'espèce majoritaire d'AChE dans le cerveau des mammifères, elle contient une protéine hydrophobe de 20 KDa [Gennari et al., 1987] [Inestrosa et al., 1987] et présente le même type d'organisation grâce au pont disulfure [Roberts et al., 1991].

La plus importante des propriétés des sous-unités « T » est leur capacité à s'associer avec des sous-unités structurales, ColQ qui permet l'ancrage des cholinestérases dans la lame basale des jonctions neuromusculaires [Feng et al., 1999] [Hall, 1973] ou PRiMA qui permet l'ancrage de l'AChE dans la membrane des cellules musculaires ou des neurones [Gennari et al., 1987] [Inestrosa et al., 1987] [Perrier et al., 2002]. Cette capacité à s'associer avec des protéines structurales est une composante de la variété des différentes formes moléculaires qui ne dépend donc pas seulement de l'épissage alternatif.

Alors que les dimères ancrés par GPI sont formés par un pont disulfure avec les cystéines présentes dans les domaines N-Terminal du peptide H, près de la fin du domaine catalytique, les sous-unités AChE<sub>T</sub> peuvent aussi former des dimères. Cependant, les ponts disulfures entre les sous-unités sont formés par des cystéines localisées près de la région C-terminale du peptide T. La formation de tels dimères dépend de la présence de cystéine en aval du domaine catalytique [Massoulie, 2002]. Il a été démontré que la dimérisation est supprimée par le remplacement des cystéines par des sérines dans les sous-unités AChE<sub>H</sub> et AChE<sub>T</sub> [Morel et al., 2001], et les sous-unités tronquées qui sont réduites à leur domaine catalytique restent monomérique mais elles forment des dimères si elles retiennent une cystéine en C-terminal. L'organisation des homo-oligomères AChE<sub>T</sub> n'est pas encore connue et il serait étonnant que les dimères AChE<sub>T</sub> (G2<sub>a</sub>) utilisent la même zone de contact que les dimères ancrés par GPI. Il a été montré que les sous-unités AChE<sub>T</sub> comme les sous-unités AChE<sub>H</sub>, utilisent l'association de faisceau de 4 hélices et que les tétramères G4<sub>a</sub> et G4<sub>na</sub> diffèrent dans leurs interactions quaternaires. Il est probable que le mécanisme de

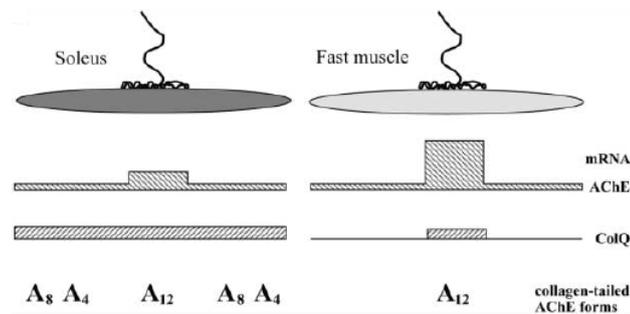
dégradation ne soit pas le même pour les sous-unités AChE<sub>H</sub> et AChE<sub>T</sub> [Morel et al., 2001].

### 1.3.3.2. Les molécules associées aux cholinestérases

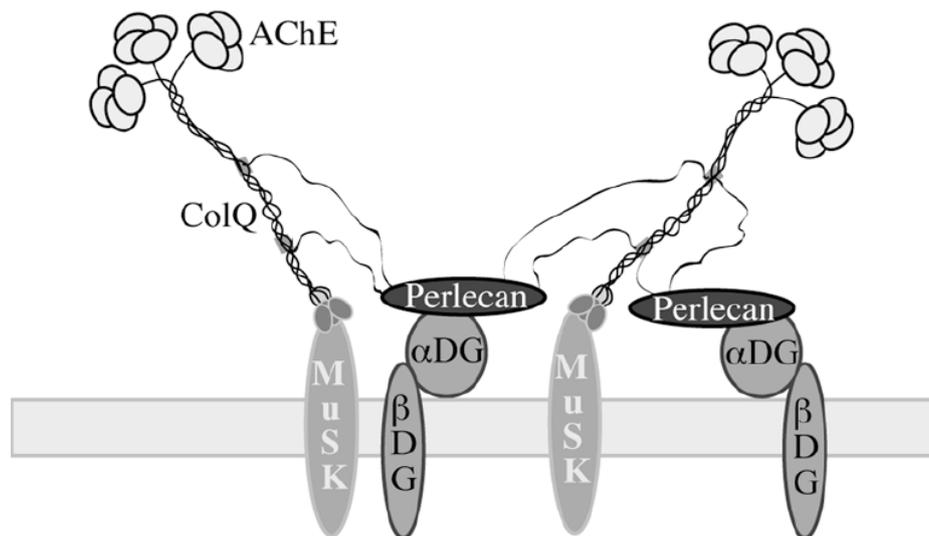
#### a. ColQ

La présence d'un collagène spécifique, ColQ, caractérise les formes moléculaires avec une queue collagène de l'AChE et de la BChE. ColQ localise l'AChE et la BChE dans les lames basales. En effet, ColQ est nécessaire pour l'association ou l'accumulation des formes asymétriques de l'AChE [Feng et al., 1999]. L'AChE associée à ColQ est principalement présente dans les organes électriques de *Torpedo* et *Electrophorus* et dans les muscles squelettiques des Vertébrés supérieurs.

ColQ a été premièrement cloné chez les torpilles [Krejci et al., 1991] puis chez les mammifères [Krejci et al., 1997]. La structure primaire de ColQ comprend un signal peptidique, un domaine N-terminal qui contient un domaine riche en proline responsable de l'association avec l'AChE ou la BChE, un domaine collagène propre avec des répétitions caractéristiques de glycine tous les 3 résidus et une région C-terminale. Des expériences ont montré que la partie distale du domaine C-terminal qui est riche en cystéines n'est pas nécessaire pour un assemblage correct de la triple hélice de collagène et pour la production des formes d'AChE associées à ColQ. Par contre, la partie proximale de ce domaine C-terminal est indispensable à la trimérisation [Bon et al., 2003]. Les formes d'AChE associées à ColQ sont connues pour s'agréger en présence de poly-anions [Bon and Massoulie, 1978], en particulier les glycosaminoglycanes [Brandan et al., 1985]. De telles interactions peuvent attacher les molécules nouvellement secrétées aux composants de la lame basale [Peng et al., 1999] [Rossi and Rotundo, 1996]. Elles peuvent être suivies par d'autres interactions, incluant des associations covalentes avec d'autres composants de la lame basale, probablement par l'action de la transglutaminase [Emmerling et al., 1981] ou l'hydroxylase de lysyle. La triple hélice de collagène contient 2 amas de résidus basiques qui constituent des sites de liaison à l'héparine [Deprez et al., 2003]. Ces 2 sites diffèrent dans leur affinité à l'héparine, ceci suggère qu'ils peuvent interagir spécifiquement avec des sites distincts de la lame basale de la jonction neuromusculaire, peut-être pour permettre une orientation spécifique des molécules d'AChE associées à ColQ.



**Figure 19.** Représentation schématique des ARNm de l'AChE et de ColQ dans différents muscles. D'après Krejci, E et al., 1999.



**Figure 20.** Modèle illustrant le double mécanisme par lequel les formes AChE couplées à ColQ sont accumulées dans la fente synaptique de la jonction neuromusculaire. Les deux types d'interactions entre (i) le domaine C-terminal de ColQ et MuSK et (ii) les deux sites de liaison à l'héparine dans le domaine collagénique de ColQ et perlecan sont montrés. L'interaction entre perlecan et les dystroglycanes ( $\alpha$ DG et  $\beta$ DG) est, également, représentée. Ce modèle explique l'accumulation de l'AChE dans la lame basale synaptique. D'après Cartaud et al., 2004

L'association de ColQ avec les sous-unités AChE<sub>T</sub> peut générer différentes formes hétéromériques qui contiennent soit 1, 2 ou 3 tétramères catalytiques (A4, A8 et A12). Chez les rats, les muscles rapides et lents montrent une différence marquée vis-à-vis de la composition et de la distribution de ces molécules [Sketelj and Brzin, 1985]. Dans les muscles rapides, la forme A12 est largement prédominante et exclusivement localisée dans la jonction neuromusculaire. Dans le muscle lent Soleus, les formes A4 et A8 sont relativement abondantes et sont dans les régions extra-jonctionnelles des fibres musculaires. Ces différences peuvent être expliquées par la distribution des ARNm de l'AChE et de ColQ dans la région de la jonction neuromusculaire et dans celle extra-jonctionnelle de ces muscles [Krejci et al., 1999] (Fig. 19). Dans les muscles rapides, ColQ est seulement exprimé au niveau des jonctions neuromusculaires et son taux est relativement faible comparé à celui de l'AChE, alors que les 3 chaînes de collagène sont associées avec les tétramères d'AChE. Par contre, ColQ est exprimé uniformément dans les régions jonctionnelles et extra-jonctionnelles des muscles Soleus et l'AChE est exprimée à un taux relativement faible donc il semble qu'une fraction des chaînes de ColQ ne soit pas occupée par les tétramères d'AChE [Krejci et al., 1999].

De nombreuses observations ont suggéré que l'accumulation de l'AChE dépend principalement de l'interaction de la queue collagénique de l'AChE avec des protéoglycanes à sulfate d'héparane. En effet, la lame basale est impliquée dans la régulation de l'ACh au niveau de la fente synaptique, puisqu'une partie importante de l'AChE, dans la synapse neuromusculaire, est associée de façon stable à la lame basale synaptique. La clef de l'association est une queue collagénique qui est liée par ponts disulfures aux tétramères des sous-unités catalytiques de l'AChE. Cette forme enzymatique associée au collagène est représentée en grande partie dans le muscle mais peu dans le cerveau. Le gène de cette queue collagénique, appelé ColQ a été cloné et caractérisé [Krejci et al., 1997]. La mutation de ce gène chez les souris mène à la perte de l'AChE synaptique, et les mutations de ColQ chez l'homme sont à la base de quelques cas de myasthénies graves congénitales [Feng et al., 1999] [Shapira et al., 2002]. ColQ, alternativement, se lie au perlecan dans la lame basale [Peng et al., 1999] [Arikawa-Hirasawa et al., 2002] (Fig. 20). Le perlecan, un protéoglycane multifonctionnel à sulfate d'héparane concentré à la jonction neuromusculaire est co-localisé avec les récepteurs nicotiniens à l'ACh, est l'unique molécule qui accepte l'AChE couplée au collagène et qui permet donc son ancrage au niveau des zones de contact nerf-muscle. Dans les souris dépourvues de perlecan, l'AChE ne s'accumule pas dans la jonction neuromusculaire alors

que l'agrine, un autre protéoglycane de la matrice extracellulaire est toujours présente [Arikawa-Hirasawa et al., 2002]. Le perlecan est le mécanisme principal pour la localisation de l'AChE au niveau de la lame basale synaptique et il est donc nécessaire à l'accumulation d'AChE. Il se lie à la sous-unité d'AChE par l'intermédiaire de deux sites de liaison à l'héparine, cette forte interaction avec l'héparine est due à la présence de deux séquences riches en résidus basiques dans le domaine de ColQ organisé en trimère de collagène [Deprez et al., 2003].

Une deuxième interaction est nécessaire à l'accumulation de l'AChE dans la jonction neuromusculaire. MuSK, le récepteur tyrosine kinase organisateur de la jonction neuromusculaire a été identifié comme étant le récepteur membranaire de ColQ [Cartaud et al., 2004]. Il a été suggéré qu'un complexe ternaire impliquant MuSK et perlecan est responsable de l'ancrage de l'AChE à la jonction neuromusculaire. Ceci met en jeu un double mécanisme (Fig. 20) impliquant deux types différents de site de liaison pour l'accumulation de l'AChE dans la fente synaptique : un par l'interaction avec MuSK, et un autre par des interactions avec le perlecan. Il est probable que ces interactions multiples sur ColQ soient nécessaires pour ancrer une si grande molécule dans la fente synaptique.

#### b. PRiMA, protéine transmembranaire

La forme prédominante d'AChE dans le cerveau des mammifères est un tétramère, lié à la membrane, de sous-unités AChE<sub>T</sub> dans lequel 2 sous-unités catalytiques sont liées par des ponts disulfures à une glycoprotéine hydrophobe de 20 KDa [Gennari et al., 1987] [Inestrosa et al., 1987]. Cette protéine hydrophobe a été dénommée « sous-unité P » [Massoulie et al., 1992]. La proportion de tétramères, liés à la membrane, augmente de façon régulière durant le développement et devient prédominante chez l'adulte [Fernandez et al., 1996]. L'AChE forment des amas à la surface des neurones en culture [Rotundo and Carbonetto, 1987] et représentent les espèces d'AChE physiologiquement actives [Sorensen et al., 1982] [Wenthold et al., 1974] [Chan et al., 1972]. La structure hétéromérique de ces molécules ressemble à celle des formes associées à ColQ ; dans les deux cas, les sous-unités catalytiques sont liées par paire par des ponts disulfures à partir des cystéines localisées en position 4 de la région C-terminale du peptide « T » et 2 des sous-unités sont liées directement aux 2 autres, et ces dernières sont attachées à la sous-unité structurale [Roberts et al., 1991] [Rosenberry and Richardson, 1977]. Dans les tétramères liés à la membrane dans les cerveaux de mammifère, 2 sous-unités sont liées à

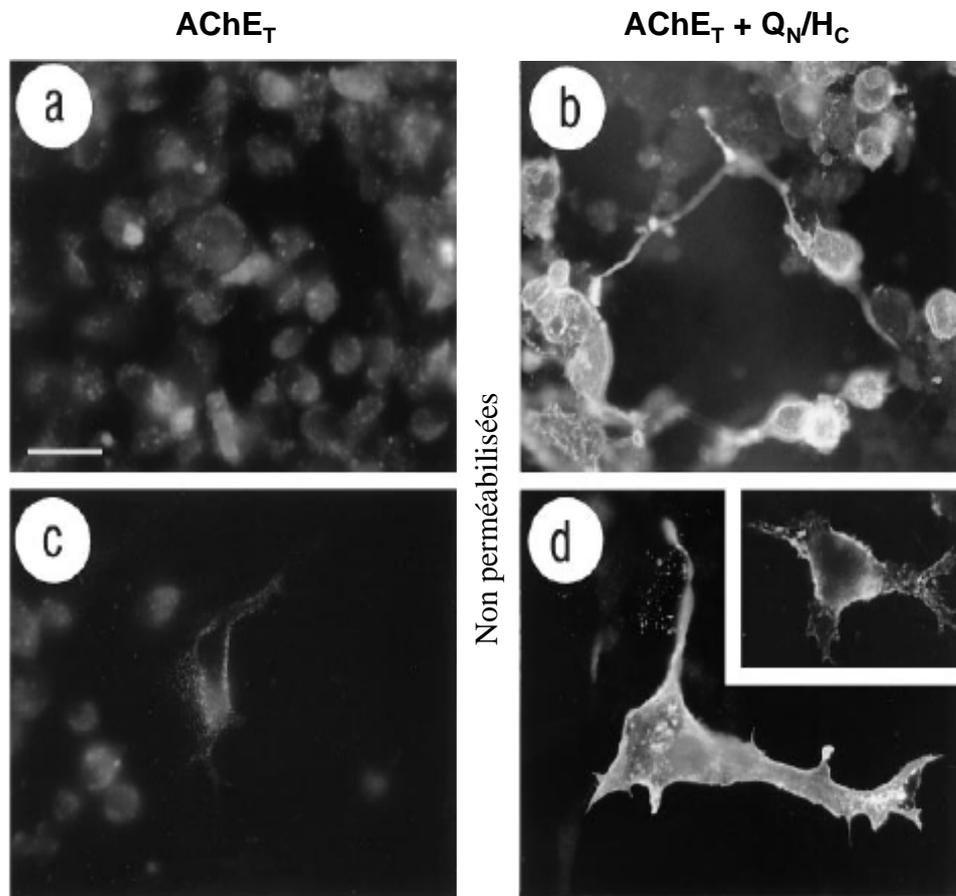
la sous-unité P. Dans les formes d'AChE associées à ColQ, cette association est reproduite avec le domaine d'attachement riche en proline de la sous-unité ColQ [Bon et al., 1997] [Krejci et al., 1997] qui remplace la sous-unité P.

La sous-unité P liée par ponts disulfures aux sous-unités AChE<sub>T</sub> contient un signal peptidique, un domaine extracellulaire qui inclut un motif riche en proline et un site de N-glycosylation, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Quand cette protéine est co-exprimée avec les sous-unités AChE<sub>T</sub>, elle induit la formation de tétramères G4 liés à la membrane et ceci requière le motif riche en proline. Cette glycoprotéine transmembranaire constitue donc « l'ancre » qui permet à l'AChE de se lier à la membrane plasmique et elle est nommée : l'ancre membranaire riche en proline ou PRiMA pour Prolin-rich Membrane Anchor. Comme ColQ, PRiMA peut être associée avec des sous-unités BChE. Il a été montré que PRiMA est un composant des tétramères de l'AChE et BChE liées à la membrane, par l'utilisation d'anti-corps anti-PRiMA dans les tissus de souris (cerveau, muscles et cœur) [Perrier et al., 2002].

### c. Interaction entre le peptide « T » de l'AChE et PRAD de ColQ

Le collagène, ColQ, associé aux cholinestérases est un collagène qui forme des triples hélices « homotrimériques ». La sous-unité ColQ contient une région N-terminale (Q<sub>N</sub>), une région centrale composée de séquences Gly-X-Y répétées et encadrée par 2 paires de cystéines et une région C-terminale (Q<sub>C</sub>) qui peut-être sous divisée en une région proximale et une distale riche en cystéine. Il a été montré que la région N-terminale de ColQ, Q<sub>N</sub>, est responsable de l'attachement avec les sous-unités AChE<sub>T</sub>. Q<sub>N</sub> recrute des sous-unités monomériques et dimériques pour produire des tétramères liés à Q<sub>N</sub> à travers une interaction entre le domaine d'attachement riche en proline (PRAD pour « Proline-rich Attachment Domain ») et 4 parties C-terminales d'AChE<sub>T</sub> [Bon et al., 1997]. Le domaine Q<sub>N</sub> contient une paire de cystéines qui forme des ponts disulfures avec les cystéines localisées en position 4 de la région C-terminale des 2 sous-unités AChE<sub>T</sub> [Lee et al., 1982]. Toutefois, il a été montré que ces cystéines n'étaient pas nécessaires pour l'interaction entre Q<sub>N</sub> et la sous-unité AChE<sub>T</sub>, bien que les ponts disulfures stabilisent probablement l'association quaternaire avec AChE<sub>T</sub> [Bon et al., 1997].

Il a été démontré, par immunofluorescence de cellules COS transfectées, que la sous-unité AChE<sub>T</sub> n'est pas associée à la surface des cellules lorsqu'elle est exprimée seule. Un domaine Q<sub>N</sub> isolé est suffisant pour lier un tétramère AChE<sub>T</sub>, par construction d'une



**Figure 21. Association des sous unités AChE<sub>T</sub> avec le fragment Q<sub>N</sub> de Col Q qui contient un motif riche en proline (PRAD).** Quand elles sont exprimées toutes seules dans les cellules transfectées COS, les sous unités AChET forment des homo-oligomères qui se trouvent dans le réticulum endoplasmique et sont sécrétés dans le milieu mais ne sont pas associés à la membrane. Quand elles sont co-exprimées avec le fragment Q<sub>N</sub> de Col Q, elles sont assemblées avec des tétramères liés à PRAD et ancrés à la surface de la cellule par GPI. La barre d'échelle représente 100 μm dans **a** et **b**, et 60 μm dans **c** et **d**. D'après Bon *et al.*, 1997.

protéine chimérique où  $Q_N$  fusionne avec la partie C-terminale du signal d'addition GPI de la sous-unité « H » de l'AChE de torpille ( $H_C$ ). La co-expression de cette protéine  $Q_N/H_C$  avec des sous-unités catalytiques « T » de l'AChE de torpille, de rat ou humaine produit des tétramères d'AChE ancrés par GPI. Lorsque les sous-unités  $AChE_T$  sont co-exprimées avec la protéine  $Q_N/H_C$ , elles sont exposées à la surface des cellules (Fig. 21). La distribution de l'AChE intracellulaire est totalement différente dans les cas où l' $AChE_T$  est exprimée seule ou co-exprimée avec la protéine  $Q_N/H_C$  ; il y a une accumulation dans les vésicules en présence de la protéine  $Q_N/H_C$  et un modèle réticulaire en son absence. Ceci suggère que l' $AChE_T$  transite différemment du réticulum endoplasmique au milieu externe quand elle est associée à une protéine ancrée par GPI [Bon and Massoulie, 1997]. La sous-unité  $AChE_T$  peut être remplacée dans sa totalité par la région C-terminale du peptide « T » ou par des protéines externes qui contiennent une région C-terminale du peptide « T » comme GFP ou la phosphatase alcaline. La région C-terminale du peptide « T » se conduit comme un domaine d'interaction autonome et elle est appelée : domaine de tétramérisation amphiphile tryptophane ou domaine WAT (W pour tryptophane) [Simon et al., 1998]. Son interaction avec le domaine d'attachement riche en proline ne requiert pas de formation de ponts disulfures [Morel et al., 2001].

Nous avons vu que les sous-unités  $AChE_T$  peuvent être associées avec un fragment N-terminal de ColQ,  $Q_N$ , sans le domaine propre au collagène, caractérisé par la présence de glycane tous les 3 résidus et la région C-terminale. Cette région C-terminale (CTD) est nécessaire à la trimérisation de ColQ qui peut se faire même en absence de la triple hélice de collagène [Bon et al., 2003]. Une analyse de la protéine  $Q_N$ , par mutation et délétion, a montrée que l'interaction entre les sous-unités  $AChE_T$  et  $Q_N$  dépend d'un petit motif peptidique qui contient 2 groupes de 3 et 5 prolines consécutives, séparés par 2 résidus et précédés par 2 cystéines adjacentes, qui est nommé le domaine d'attachement riche en proline (PRAD) [Bon et al., 1997]. La mutagenèse a montré que seules les prolines sont nécessaires à l'association avec les 4 peptides « T ». Nous avons vu précédemment que les ponts disulfures ne sont pas nécessaires mais peuvent stabiliser le complexe : ColQ peut être lié par des ponts disulfures avec 2 sous-unités de cholinestérases, alors que 2 autres sous-unités sont liées, par des ponts disulfures, également, à d'autres sous-unités.

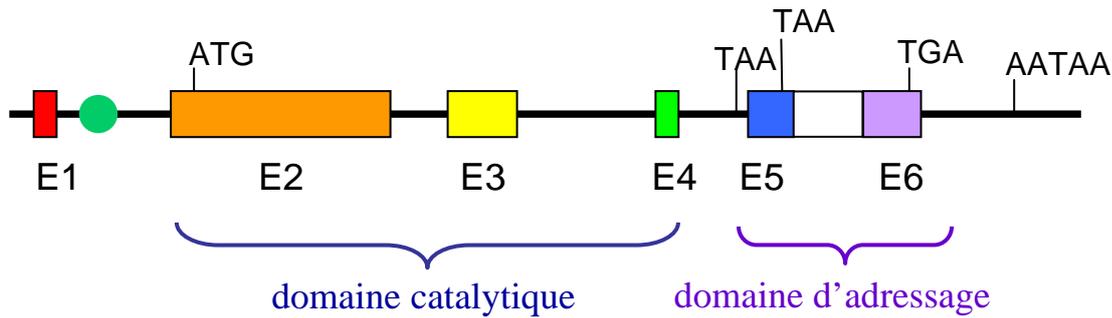
### 1.3.3.3. La signification physiologique des formes moléculaires d'AChE

L'étude du rôle physiologique des différentes formes moléculaires d'AChE *in vivo* a été possible par l'inactivation des gènes. Des souris dépourvues de ColQ [Feng et al., 1999] et totalement d'AChE [Xie et al., 1999] [Xie et al., 2000] ont déjà été obtenues et analysées. Malgré leur fatigue musculaire, ces souris sont viables lorsque leurs conditions d'élevage font l'état d'une attention particulière.

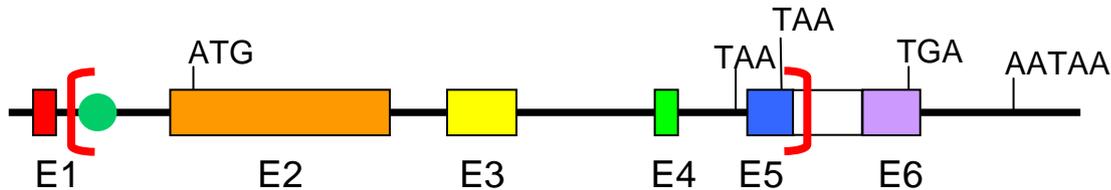
Les muscles des souris ColQ KO ne montrent pas d'accumulation normale d'AChE à la jonction neuromusculaire, de plus, la fasciculine, une toxine de serpent qui bloque l'activité AChE, ne prolonge pas les courants de plaque motrice miniatures, comme c'est le cas chez les muscles de souris sauvages, ceci indique une absence d'hydrolyse fonctionnelle de l'ACh à ce niveau [Feng et al., 1999]. Il est à noter que la BChE liée à la membrane est détectable au niveau des sites neuromusculaires mais disparaît après dénervation et cependant, elle semble être associée aux terminaisons présynaptiques ou aux cellules de Schwann pérисynaptiques non myélinisantes. Cette analyse des souris ColQ KO exclue apparemment la contribution significative des tétramères d'AChE ancrés à la membrane par PRiMA dans l'hydrolyse de l'ACh. Ceci apparaît paradoxal car cette forme d'enzyme existe dans les muscles. Des analyses biochimiques de sections de muscles ont montré que la forme tétramérique d'AChE est localisée dans une zone péri-jonctionnelle qui entoure la jonction neuromusculaire [Gisiger and Stephens, 1988]. Les exercices musculaires induisent des changements marqués dans le taux de cette forme particulière d'enzyme, sans modification des autres espèces moléculaires comme les formes ancrées par ColQ [Gisiger et al., 1994] [Gisiger et al., 1991b] [Gisiger et al., 1991a]. Le contenu musculaire en formes G4a augmente ou diminue selon le type de muscles et le type d'exercice [Jasmin and Gisiger, 1990]. Ceci reflète l'adaptation à l'activité musculaire. Il est probable que les formes d'AChE G4a contrôlent une réserve d'ACh qui diffuse près de la jonction après des stimulations répétitives.

Il est à noter que les formes G4a sont spécifiquement réduites dans les muscles dystrophiques, ceci résulte de déficience génétique, peut être comme une seconde conséquence à la dysfonction musculaire [Oliver et al., 1992].

Nos travaux vont tenter de déterminer les différents rôles physiologiques des différentes formes moléculaires d'AChE en étudiant différentes souches de souris transgéniques.



**Figure 22. Gène de l'acétylcholinestérase.** Il est composé de 6 exons. La boîte blanche entre l'exon 5 et l'exon 6 représente un intron présent dans l'ARNm. L'exon 1 possède des séquences non transcrites. La protéine est encodée par les exons 2 à 6. La région régulatrice de l'intron située entre l'exon 1 et l'exon 2 est symbolisée par la pastille verte.



**Figure 23. Construction des souris AChE KO.** La délétion de 5 kb du gène de l'AChE est matérialisée par les parenthèses en rouge.

Tissus	Homozygote -/- (U/g)	
	Tween	Triton
Foie	0	0
Intestins	0	0
Sérum	0	0
Coeur	0	0
Coeur, 1 M NaCl	0	0
Poumon	0	0
Muscle	0	0
Muscle, 1 M NaCl	0	0
Cerveau	0	0

**Tableau 6. Activité AChE dans les tissus de souris AChE KO âgées de 12 jours** (souche 129SV). L'activité est exprimée en  $\mu$ moles d'acétylthiocholine hydrolysée par minute et par gramme de poids humide ou par mL de sérum. La valeur 0 signifie qu'aucune activité n'a été détectée. D'après Li *et al.*, 2000.

## 1.4. Les souris génétiquement modifiées

### 1.4.1. Le gène de l'AChE

Les gènes codant pour les acétylcholinestérases de souris et d'homme ont été clonés à partir de la bibliothèque génomique. L'analyse de restriction et une comparaison de séquence avec les ADN complémentaires (ADNc) ont défini les limites entre les exons et les introns. Les analyses du gène de l'AChE chez la torpille indiquent que différentes formes d'enzymes sont codées dans un gène simple qui produit des espèces multiples d'ARNm [Li et al., 1991]. Chez les mammifères, trois exons, qui ne donnent pas de variants génétiques, codent pour le signal peptidique et pour le N-terminal de 535 acides aminés communs à toutes les formes de l'enzyme. Alors que les exons suivants sont à l'origine de la diversité structurale du domaine C-terminal des sous-unités catalytiques [Sikorav et al., 1988] [Maulet et al., 1990] [Gibney and Taylor, 1990]. Le gène de l'AChE est donc constitué de deux domaines (Fig. 22) : un domaine catalytique et un domaine d'adressage.

### 1.4.2. Les souris totalement dépourvues d'AChE

Les souris dépourvues d'acétylcholinestérase (AChE) ont été produites par recombinaison homologe (« Knock-Out », AChE KO) [Xie et al., 1999]. Ces souris portent une délétion de 5 kb qui couvre les exons 2, 3,4 et 5 du gène de l'AChE, éliminant ainsi la production du domaine catalytique de l'enzyme (Fig. 23). Ces souris sont maintenues dans la souche génétique 129S2/Sv, condition *sine qua non* à leur survie jusqu'à l'état adulte. Dans les autres cas, les souris meurent après environ 2 semaines de vie.

Les rôles importants de l'AChE dans la neurotransmission, au niveau des synapses cholinergiques, présageaient que l'absence d'activité AChE au sein des souris AChE KO serait létale pour ces dernières. Cela a, donc, été une surprise de constater que ces souris sans activité enzymatique AChE et sans aucune protéine de l'AChE (Tableau 6) étaient viables et qu'elles étaient capables de respirer et de se déplacer [Xie et al., 2000]. La maturation et le développement normaux des animaux hétérozygotes a démontré que la réduction de 50% de l'activité AChE était suffisante pour supporter le développement et la

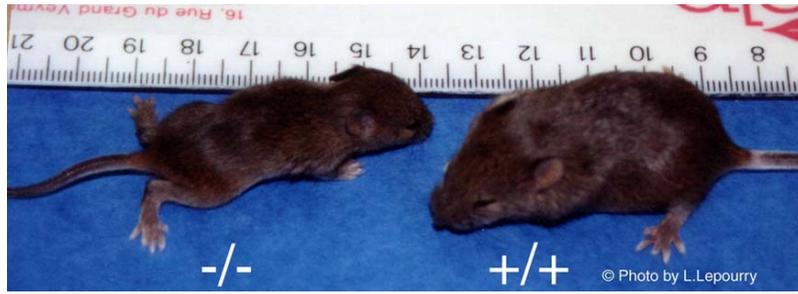


Photo 1. Photographies de souris AChE KO et sauvages.

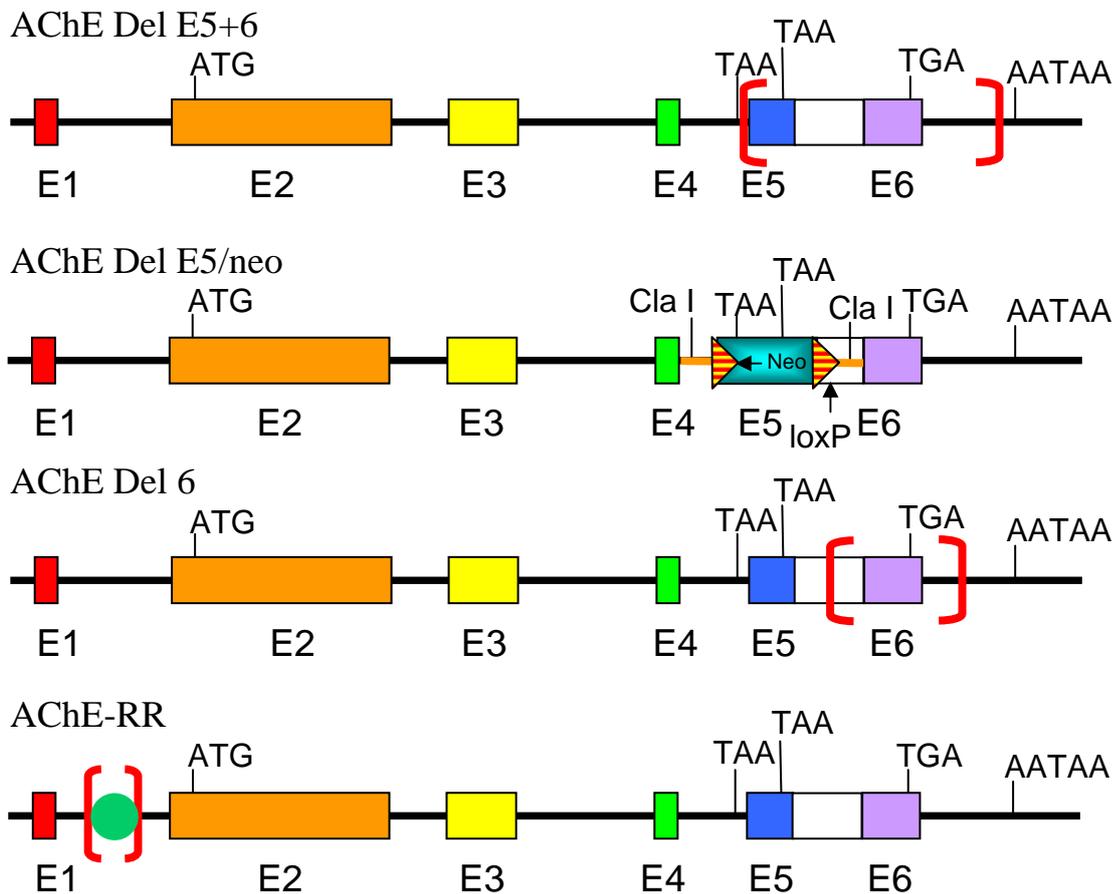


Figure 24. Schéma des différentes délétions introduites dans le gène codant pour l'AChE et aboutissant à un déficit partiel d'AChE.

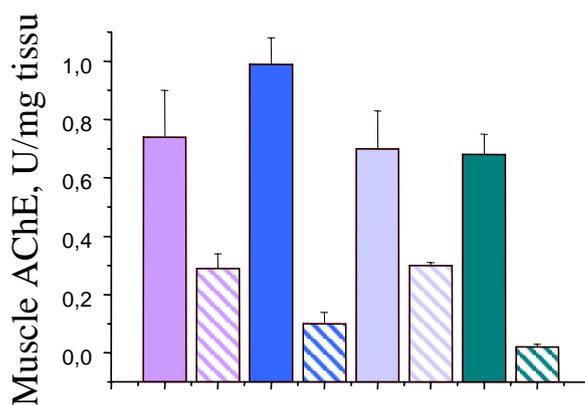
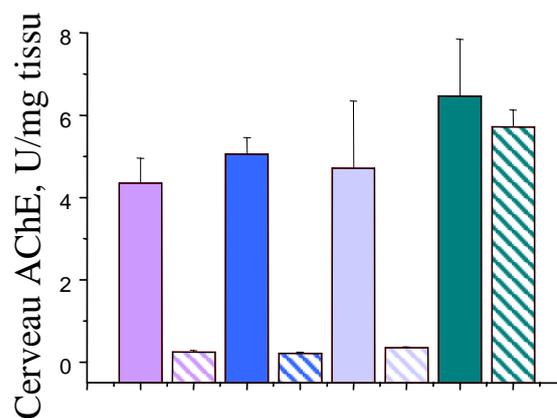
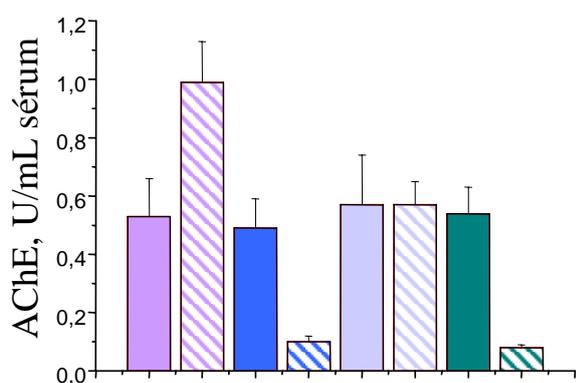
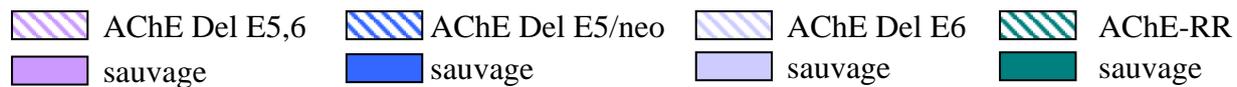
Les délétions partielles du gène de l'AChE sont matérialisées par les parenthèses en rouge.

croissance. Bien qu'une absence complète de l'AChE n'ait pas empêché l'organogenèse embryonnaire, elle a limité le développement continu après la naissance. Plusieurs explications possibles existent pour cette combinaison intéressante de résultats, y compris le fait que les animaux homozygotes nuls sont déficients nutritionnellement ou sont incapables d'obtenir des calories suffisantes pour soutenir leur croissance. Les tremblements en continu des animaux homozygotes nuls peuvent exiger un apport calorique supérieur à celui nécessaire aux animaux sauvages [Xie et al., 2000].

Malgré leur viabilité, ces souris ne sont pas normales, elles sont plus petites que les hétérozygotes ou que les homozygotes sauvages (Photo 1), elles prennent du poids beaucoup plus lentement que les autres. Ces souris ont un phénotype particulier : leurs yeux s'ouvrent tardivement, elles n'ont pas de bon réflexe, leur oreille externe n'est pas mature, les tremblements du corps sont persistants, elles tournent en rond quand elles se déplacent et il y a un taux de mortalité, à l'âge jeune, assez important. Environ 50 % des homozygotes nuls sont morts au 14<sup>e</sup> jour postnatal et 100% sont morts le 21<sup>e</sup> jour [Duysen et al., 2002]. Ces pourcentages peuvent évoluer avec des conditions d'élevage et un soin particulier apporté au souris.

### 1.4.3. Les souris dépourvues partiellement d'AChE

Des souris partiellement dépourvues d'AChE ont été construites [Camp et al., 2004] [Camp et al., 2005] : les souris AChE Del E5,6, dont les exons 5 et 6 ont été supprimés, ne possèdent que les formes solubles de l'AChE (AChE<sub>R</sub>) ; les souris AChE Del E5/neo dont l'exon 5 a été remplacé par une cassette de néomycine, ce qui empêche l'expression de l'AChE ; les souris AChE Del E6, dont l'exon 6 a été invalidé, ne possèdent pas les formes moléculaires (AChE<sub>T</sub>) ancrées à la membrane par ColQ et PRiMA ; les souris AChE-RR dont la région régulatrice (RR) de l'intron située entre les exons 1 et 2 a été supprimée (Fig. 24). Parmi ces souris, nous avons étudié plus particulièrement celles dont le gène de l'AChE a subi une délétion des exons 5 et 6 (AChE Del E5,6). Ces souris ont été produites à partir d'un fond génétique mixte (129, C57Bl/6, Black Swiss et FVB) et maintenues dans le fond génétique C57Bl/6. Ces différentes souris KO ont un phénotype variable selon leur souche. Certaines souris sont plus affectées que d'autres, les souris homozygotes nulles pour les souches AChE Del E5,6 sont plus petites et plus faibles que les sauvages, elles produisent, également, des petits bruits comme des couinements. Elles présentent, parfois,



**Figure 25. Activité AChE dans les tissus de souris AChE Del E5,6, AChE Del E5/neo, AChE Del E6 et AChE RR.** L'activité est exprimée en unités par mg de tissu ou par mL de sérum. D'après Camp S.

Souris	AChE <sub>T</sub> (hors cellule) ancrée par PRiMA G1a	AChE <sub>T</sub> ancrée par PRiMA	AChE <sub>R</sub> forme soluble	AChE <sub>H</sub> ancrée par GPI	BChE (hors cellule) ancrée par PRiMA	BChE ancrée par PRiMA
	<p>G2a G4a tétramère soluble A4 A8 A12 ColQ</p>			<p>peptide H</p>	<p>ColQ</p>	
AChE KO	—	—	—	—	✓	✓
AChE del E5,6	—	—	✓	—	✓	✓
AChE del E5/Neo	✓	✓	✓	—	✓	✓
AChE del E6	—	—	✓	✓	✓	✓
BChE KO	✓	✓	✓	✓	—	—

**Tableau 7.** Récapitulatif des différentes formes moléculaires de cholinestérases présentes chez les souris génétiquement modifiées

des tremblements qui en général correspondent au moment où elles « chantent » et une fatigabilité musculaire visible.

L'activité de l'AChE a été quantifiée au niveau des muscles, du cerveau et du sérum des souris AChE Del E5,6, AChE Del E5/neo, AChE Del E6 et AChE-RR (Fig. 25). L'activité de l'AChE est, de façon générale, plus faible, dans les différents tissus étudiés, chez les souris dépourvues partiellement d'AChE que chez les souris sauvages de la même souche. Cependant, il est à noter que l'activité de l'AChE dans le sérum est similaire chez les souris AChE Del E6 et leurs souris témoins et qu'il y a, également, une similitude entre l'activité de l'AChE dans le cerveau des souris AChE-RR et les souris sauvages. L'activité de l'AChE dans le sérum des souris AChE Del E5,6 est supérieure à celle des souris sauvages, cette augmentation est probablement due au fait que ces souris génétiquement modifiées possèdent seulement les formes solubles de l'AChE qui sont excrétées dans le sérum.

#### **1.4.4. Les souris totalement dépourvues de BChE**

Des souris totalement dépourvues de BChE ont également été construites. Le domaine catalytique de la BChE a été remplacé par le gène de résistance à la néomycine. Il n'y a donc aucune activité enzymatique BChE dans les différents tissus de ces souris. Ces souris sont viables et fertiles, leur phénotype est semblable à celui des souris sauvages.

Les formes moléculaires des cholinestérases présentes chez ces souris génétiquement modifiées sont récapitulées dans le tableau 7.

La connaissance des rôles fonctionnels des cholinestérases présente, à l'heure actuelle, un intérêt fondamental puisque ces dernières sont impliquées dans des maladies, comme la maladie d'Alzheimer ou les syndromes de myasthénies congénitales, où la neurotransmission régulée par l'ACh est altérée. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs des cholinestérases en tant que pesticides ou armes chimiques justifie également l'étude des rôles fonctionnels des cholinestérases. Actuellement, la souris est un des mammifères dont le génome peut être façonné aisément. En particulier, la recombinaison homologe dans les cellules souches embryonnaires permet de produire des souris portant une modification donnée dans le gène de l'AChE ou dans celui de la BChE. Ces souris, génétiquement modifiées, sont des modèles expérimentaux qui intègrent la multitude d'interactions cellulaires et de processus physiologiques qui se produisent en permanence dans l'organisme vivant et qui ne peuvent pas être reproduits en totalité dans un modèle expérimental *in vitro*. Les différentes souches de souris (totalement dépourvues d'AChE, ou de certaines de ses formes, et de BChE) sont donc des outils particulièrement intéressants pour appréhender, *in vivo*, l'étude des rôles fonctionnels de la BChE et des différentes formes moléculaires de l'AChE au niveau de la jonction neuromusculaire.

L'objectif de cette thèse est de caractériser, d'un point de vue fonctionnel et morphologique, ces différentes souches de souris génétiquement modifiées afin d'obtenir des informations sur l'importance des rôles (i) des différentes formes moléculaires de l'AChE dans l'hydrolyse de l'ACh au niveau de la jonction neuromusculaire et (ii) de la BChE au niveau de la transmission synaptique. Pour cela, nous avons étudié, au moyen de diverses techniques (mesure de la force contractile, électrophysiologie classique, immunomarquage et imagerie), les adaptations fonctionnelles et morphologiques induites par l'absence totale de cholinestérases, ou de certaines de leurs formes, au niveau de jonctions neuromusculaires des souris génétiquement modifiées.

Il a été surprenant de constater que ces souris génétiquement modifiées puissent se développer avec un phénotype nettement moins affecté que ce que l'on aurait pu penser en regard de l'importance de leurs modifications génétiques. Dans un premier temps, nous avons donc caractérisé la force contractile développée par les héli-diaphragmes isolés de ces souris afin d'avoir une vision globale des conséquences de l'absence totale de cholinestérases, ou de certaines de leurs formes, sur la transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire.

Dans un second temps, afin de déterminer l'importance du rôle de l'élément présynaptique dans le processus d'adaptation développé par ces souris génétiquement modifiées, nous avons étudié la libération quantique d'ACh au niveau de leurs jonctions neuromusculaires. Plus particulièrement, nous avons analysé la fréquence de la libération spontanée d'ACh et le contenu quantique déterminé à partir des potentiels de plaque motrice enregistrés au niveau de préparations neuromusculaires isolées de ces souris, en absence (conditions contrôles) et en présence d'inhibiteurs sélectifs des cholinestérases.

Nous avons ensuite étudié l'importance des rôles fonctionnels des cholinestérases, en particulier celui de la BChE, au niveau de l'élément postsynaptique. Pour cela, nous avons caractérisé les décours temporels des réponses synaptiques enregistrées au niveau des préparations neuromusculaires isolées des souris génétiquement modifiées, en absence et en présence d'inhibiteurs sélectifs des cholinestérases.

Finalement, les études précédentes ayant fortement suggéré qu'une adaptation morphologique se produisait au niveau des jonctions neuromusculaires des souris génétiquement modifiées, nous avons étudié, à l'aide de techniques d'immunomarquage et d'imagerie, la distribution des récepteurs nicotiques ainsi que celle des terminaisons nerveuses motrices. Les résultats obtenus nous ont permis d'obtenir des informations précises quant à l'adaptation morphologique au niveau des éléments pré- et postsynaptiques des jonctions neuromusculaires des souris génétiquement modifiées.

*Matériels*  
*et*  
*Méthodes*

## **2.1. Les souris utilisées comme modèles biologiques**

### **2.1.1. Souris génétiquement modifiées**

Les souris dépourvues d'acétylcholinestérase (AChE) ont été produites, dans le laboratoire du Professeur Oksana Lockridge (Eppley Institute, University of Nebraska, Medical Center, USA), par recombinaison homologue (« Knock-Out », AChE KO) [Xie et al., 1999].

Le Professeur Palmer Taylor et son équipe (Department of Pharmacology, University of California, San Diego, USA) ont construit des souris dépourvues de certaines des formes moléculaires de l'AChE [Camp et al., 2004] [Camp et al., 2005] : les souris AChE Del E5,6, les souris AChE Del E5/neo, les souris AChE Del E6 et les souris AChE-RR nous ont été gracieusement données par le Professeur Taylor et son équipe. Parmi ces souris, nous avons étudié plus particulièrement celles dont le gène de l'AChE a subi une délétion des exons 5 et 6 (AChE Del E5,6).

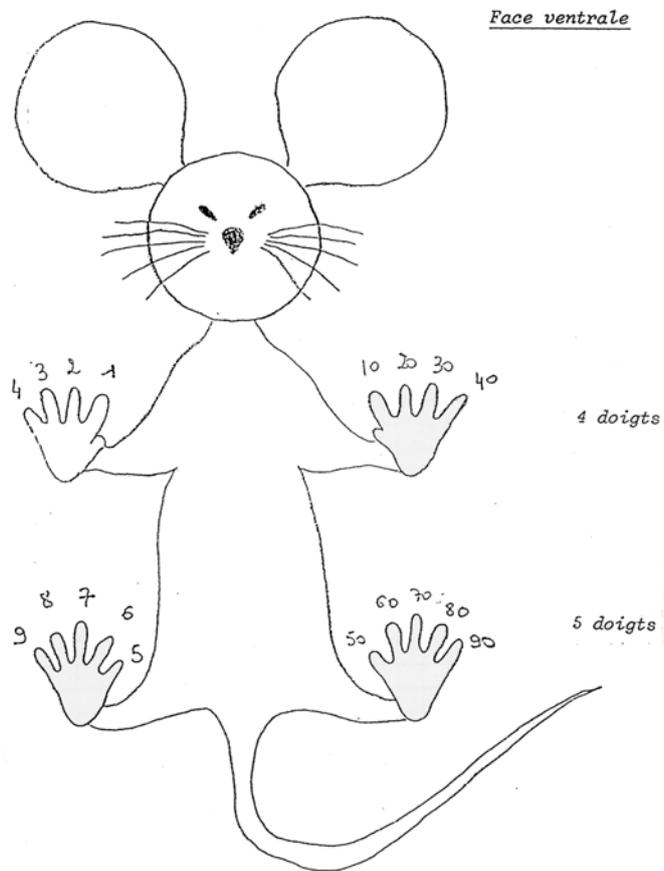
Les souris dépourvues de BChE (BChE KO) ont été également construites dans le laboratoire du Professeur Oksana Lockridge, le domaine catalytique de la BChE a été remplacé par le gène de résistance à la néomycine.

La nomenclature, concernant les différentes souris, utilisée lors de cette étude est récapitulée dans le Tableau 8.

**Tableau 8.** Récapitulatif de la nomenclature des souris génétiquement modifiées utilisées dans cette étude.

Souris	Caractéristiques
AChE KO AChE KO sauvage	Le gène codant pour l'AChE a été éliminé Souris sauvage issue de la souche AChE KO
AChE Del E5,6 AChE Del E5,6 sauvage	Les exons 5 et 6, au niveau du gène codant pour l'AChE, et la cassette de néomycine, après l'expression de la recombinaise Cre, ont été éliminés Souris sauvage issue de la souche AChE Del E5,6
AChE Del E5/neo AChE Del E5/neo sauvage	L'exon 5, au niveau du gène codant pour l'AChE, a été éliminé mais la cassette de néomycine a été conservée Souris sauvage issue de la souche AChE Del E5/neo
AChE Del E6 AChE Del E6 sauvage	L'exon 6, au niveau du gène codant pour l'AChE, et la cassette de néomycine, après l'expression de la recombinaise Cre, ont été éliminés Souris sauvage issue de la souche AChE Del E6
AChE-RR AChE-RR sauvage	La région régulatrice de l'intron situé entre les exons 1 et 2, au niveau du gène codant pour l'AChE, a été éliminée Souris sauvage issue de la souche AChE-RR
PRiMA KO PRiMA KO sauvage	Le gène codant pour la protéine PRiMA a été éliminé Souris sauvage issue de la souche PRiMA KO

L'élevage des souris s'est déroulé dans les animaleries de l'INRA à Montpellier (pour les souris AChE KO) et du CNRS sur le campus de Gif-sur-Yvette (pour les autres souris transgéniques). Les souris homozygotes ont été obtenues par croisement entre mâles et femelles hétérozygotes. Les accouplements concernent, en général, 6 femelles et 3 mâles. Deux femelles et un mâle sont placés dans une même cage, en faisant attention à ce que les géniteurs ne soient pas issus de la même portée. Les accouplements sont effectués à des intervalles réguliers, et non pas en continu par manque de place. En effet, dans la zone réservée aux souris transgéniques de l'animalerie, nous n'avons à notre disposition pour ces différentes souches de souris qu'une armoire composée de 4 colonnes. Dans chacune de ces colonnes, 8 à 12 cages (selon la taille de celles-ci) peuvent être stockées. Pour chaque colonies, nous gardons des animaux géniteurs (6 à 8 femelles et 3 à 4 mâles), des animaux homozygotes mutants ainsi que des animaux homozygotes sauvages issus des



**Figure 26. Schéma simplifié d'une souris vue ventralement et de la numérotation utilisée à l'animalerie de Gif-sur-Yvette.**

mêmes portées et, si possible, du même sexe. Il faut également prévoir de la place pour le sevrage des animaux. Lors du sevrage, les animaux des différentes portées sont séparés de leurs mères et un tri est effectué entre les mâles et les femelles. Les mâles issus de la même portée peuvent être mis dans une même cage tant qu'ils n'ont pas été accouplés à des femelles. Lorsque les mâles ont été accouplés, il y a des rapports de dominance qui s'installent et qui peuvent entraîner la mort des animaux dominés. Il est donc préférable, ensuite, d'isoler les mâles en n'en mettant qu'un par cage. Nous évitons également de mettre des animaux d'âges trop différents dans la même cage.

Avant le sevrage, lorsque les animaux sont âgés de 10 jours, voire moins (mais jamais plus), les animalières notent le sexe des animaux ainsi que la couleur de leur pelage, sur un cahier de gestion des élevages. A ce moment là, elles procèdent au marquage des souris qui consiste à les numéroter en leur prélevant la dernière phalange de certains doigts selon le numéro qui leur a été attribué (Fig. 26). Ensuite, elles prélèvent 2 à 4 mm de la queue de l'animal. Ce morceau de tissu, qui servira au génotypage de l'animal, est déposé dans un tube numéroté et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Dans le cahier de gestion des élevages de l'animalerie sont donc répertoriés les numéros des animaux géniteurs (et par conséquent leur âge), le nombre d'animaux par portée ainsi que leur numéro, leur sexe, la couleur de leur pelage, leur date de naissance et leur génotype. Certaines erreurs sont possibles comme celle de donner le même numéro à deux animaux différents ou d'inverser les tubes qui contiennent les bouts de queue. Lorsque nous avons un doute à ce niveau là et que les résultats du génotypage nous mènent à penser que ces animaux sont des hétérozygotes ou des homozygotes sauvages, alors ils sont réformés, c'est-à-dire qu'ils sont tués par immersion dans de la carboglace. Les cadavres sont conservés dans des congélateurs spécifiques de l'animalerie puis collectés régulièrement par une entreprise spécialisée. Lorsque l'un d'eux est un animal homozygote mutant, le génotypage est recommencé à partir d'un petit bout d'oreille.

Lorsque le génotypage est terminé, il est important de faire un tri au niveau des animaux pour pouvoir rapidement faire de la place dans l'armoire. Nous gardons tous les animaux homozygotes mutants et les animaux homozygotes sauvages issus des mêmes portées qui serviront de témoins dans nos expériences, ainsi que quelques animaux hétérozygotes mâles et femelles. Les autres animaux sont réformés. Lorsque les souris hétérozygotes sont en âge de se reproduire, nous réformons les précédents géniteurs.

Les animaux sont gardés dans des conditions classiques, c'est-à-dire à une température constante de  $24^{\circ}\text{C}$  avec un cycle « jour-nuit » de 12 heures. Une attention

particulière est accordée à ces souris. En effet, comme elles sont sensibles à la lumière et au bruit, le changement des cages ainsi que les autres manipulations sont faites dans le calme. De plus, les souris sont toujours manipulées avec des gants pour éviter qu'elles soient au contact de trop nombreuses odeurs. La nourriture et l'eau sont données à volonté. Il est à noter que, lors des premières semaines (avant et pendant le sevrage), les souris sont nourries avec un supplément alimentaire qui est du lait maternel Pelargon 2<sup>ème</sup> âge (Nestlé®). Ce lait est préparé dans des tubes à centrifuger de 50 mL avec une dose de lait en poudre dissoute dans de l'eau (q.s.p. 50 mL). Après dissolution complète, une tétine empruntée aux biberons de l'animalerie est placée sur le tube à centrifuger. Les tubes de lait sont disposés dans la cage, près du biberon d'eau et sont changés tous les 2 à 3 jours mais les tétines sont contrôlées tous les jours pour vérifier le bon écoulement du lait. Au début, lorsque l'élevage a commencé, nous avons eu beaucoup de pertes dès les premiers jours. Pour palier à ce problème, nous avons nourri les nouveaux-nés les plus faibles en leur injectant directement du lait dans la gueule, par l'intermédiaire d'une seringue de 1 mL.

### **2.1.2. Souris témoins**

Les souris homozygotes sauvages (+/+) sont issues des mêmes portées que les souris transgéniques homozygotes mutantes (-/-) utilisées pour les expériences. Elles sont donc issues des mêmes fonds génétiques et sont élevées dans les mêmes conditions.

Dans certaines expériences, des souris Swiss-Webster, de préférence des femelles adultes (20-25g), ont été utilisées.

## **2.2. Génotypage des souris**

Les souris homozygotes mutantes des lignées que nous possédons au laboratoire sont stériles. Il est donc nécessaire de croiser des souris hétérozygotes entre elles pour obtenir des souris homozygotes. Pour cela, nous devons établir le sexe et le génotype des portées pour déterminer si les souris obtenues sont homozygotes (+/+ ; -/-) ou hétérozygotes (+/-) pour la mutation d'intérêt.

Le génotypage des souris transgéniques se réalise en 3 étapes : extraction de l'ADN, réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et électrophorèse sur gel d'agarose.

**Tableau 9.** Récapitulatif des oligonucléotides et des conditions nécessaires à la PCR et des programmes utilisés.

Souris typée	Allèle	Oligonucléotides	Séquence des oligonucléotides	Taille des fragments (pb)	Conditions PCR	Programme		
					vol. oligo/PCR	activation de l'enzyme	cycle de réplication (35 fois)	élongation finale
AChE Del E5,6	AChE Del5-56 wt	AChE sens 4	GCAGCAATATGTGAGCCTGA	226	0,08 µL	94°C / 15 min	94°C / 30sec	72°C / 10 min
		AChE rev 4wt	CTGGGGAGGTGGAGAAGAG					
	AChE Del5-56	AChE sens 4	GCAGCAATATGTGAGCCTGA	422	0,02 µL		58°C / 45 sec	
		AChE rev del56	GGGTGGGTGGGATTAGATA				72°C / 1 min	
AChE Del E6	AChE Del6 wt	Del65 PS	TTCCTCTCCTTCTGTTCCA	242	1 µL	94°C / 15 min	94° C / 30 sec	72°C / 10 min
		RTe6 rev	GCTCCTGCTTGCTATAGTGGC					
	AChE Del6 mut	Del65 PS	TTCCTCTCCTTCTGTTCCA	275	1 µL		55°C / 45 sec	
		3PNeor1	GGCGTTACCCAACCTTAATCG				72°C / 1 min	
AChE Del E5/Neo	AChE Del5-56 wt	AChE sens 4	GCAGCAATATGTGAGCCTGA	226	1 µL	94°C / 15 min	94° C / 30 sec	72°C / 10 min
		AChE rev 4wt	CTGGGGAGGTGGAGAAGAG					
	AChE Del5 cre	AChE sens 4	GCAGCAATATGTGAGCCTGA	300	1 µL		58°C / 45 sec	
		AChE rev cre	GCCGCTAATTCCGATCATATT				72°C / 1 min	
AChE RR	AChE Del 1 wt	AChE Del1 rev	AGTAGAGACCAAGAAGAGGCCAGA	347	0,04 µL	94°C / 15 min	94° C / 30 sec	72°C / 10 min
		AChE wt Del 1 sens	AGCGGAAGCCCCGAGTTATAATTA					
	AChE del 1 mut	AChE-Del1rev	AGTAGAGACCAAGAAGAGGCCAGA	160	0,08 µL		60°C / 45 sec	
		ACHE-Mutdel1-sens	TGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCT				72°C / 1 min	

Préparation mix PCR pour un tube de 20 µL: Tampon 10X : 2 µL, eau : q.s.p. 20 µL, dNTP : 0,4 µL, enzyme : 0,1 µL

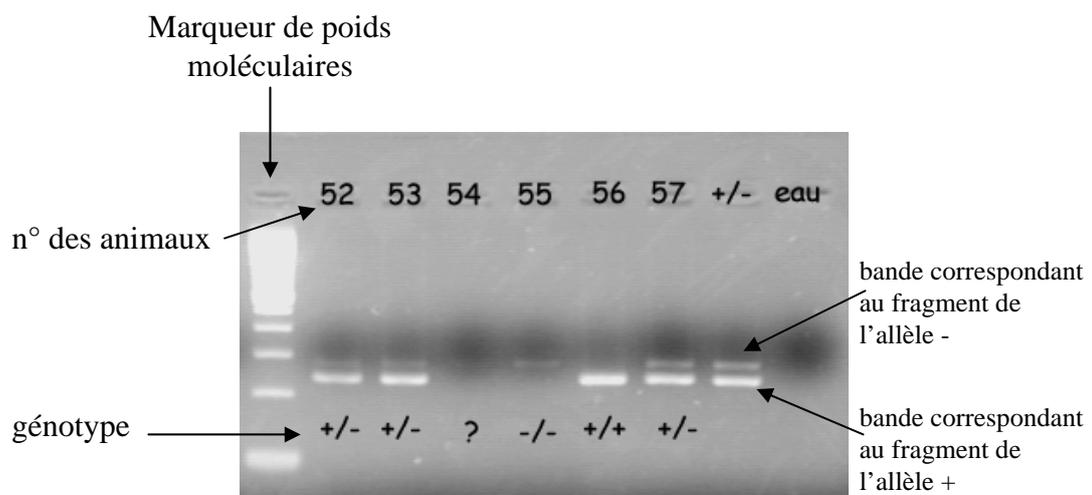
### **2.2.1. Extraction de l'ADN**

Nous avons utilisé une méthode de lyse alcaline pour extraire l'ADN génomique des prélèvements de souris. Chaque morceau de tissu (2 à 4 mm) est mis à incuber dans 100  $\mu$ L d'une solution contenant 25 mM de NaOH pendant 20 minutes à 95°C dans une plaque chauffante pour puits. Il est important de noter que la solution diluée de soude doit être préparée extemporanément à partir d'une solution récente de soude concentrée (1 N). Après le retour à la température ambiante, 100  $\mu$ L de 40 mM de Tris-HCl (préparé à partir Tris-HCl en poudre) sont ajoutés à chaque échantillon. Cette étape permet d'obtenir une solution finale tamponnée à pH 8 environ. Les échantillons sont ensuite conservés à 4 ou – 20°C.

### **2.2.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Toutes les amplifications sont réalisées grâce à un thermocycleur (GeneAmp PCR System 2700) qui permet de faire atteindre aux échantillons préalablement préparés dans du mix PCR, les températures nécessaires pour la réplication (Tableau 9). Le mix PCR contient toutes les bases (dNTP ; 0,2  $\mu$ M final), l'enzyme (1 unité) et les amorces (0,25  $\mu$ M final chacune) nécessaires à la réplication des brins d'ADN ainsi qu'une solution tampon (1X final) contenant du magnésium. Dans chaque tube PCR, nous déposons 19  $\mu$ L de mix PCR et 1  $\mu$ L d'ADN. Lors des géotypages, nous faisons des témoins positifs, c'est-à-dire qu'en plus des souris à typer, nous ajoutons 2 tubes dans lesquels nous déposons l'ADN déjà identifié de souris (l'ADN d'un homozygote sauvage ou mutant et l'ADN d'un hétérozygote). Ceci nous permet de vérifier que les bandes obtenues sur gel d'agarose correspondent bien et que nous ne détectons pas de bandes qui pourraient être dues à une contamination.

L'enzyme utilisée est la « Hot Star Taq DNA polymérase » [Qiagen S.A., France]. Les dNTP (« PCR Nucleotide Mix ») proviennent de Roche (Indianapolis, USA). Nous en préparons une solution en diluant 4 fois la solution mère dans de l'eau distillée stérilisée. Les oligonucléotides sont commandés chez Biomers (Ulm, Allemagne). Nous en préparons des solutions de 10  $\mu$ M dans de l'eau distillée stérilisée, en diluant 10 fois les solutions mères. L'utilisation de l'eau distillée stérilisée est nécessaire lors des mises en solution, lors des dilutions effectuées ou encore lors de la préparation du mix PCR pour éviter les



**Figure 27. Photo d'un gel agarose mettant en évidence les fragments amplifiés d'ADN obtenus à partir d'animaux issus de la souche AChE Del E6.**

contaminations. D'ailleurs, pour chaque PCR effectuée, nous faisons également un contrôle négatif où, à la place de l'ADN, nous ajoutons de l'eau au mix PCR, pour vérifier que nous n'avons pas de contamination.

### 2.2.3. Electrophorèse en gel d'agarose

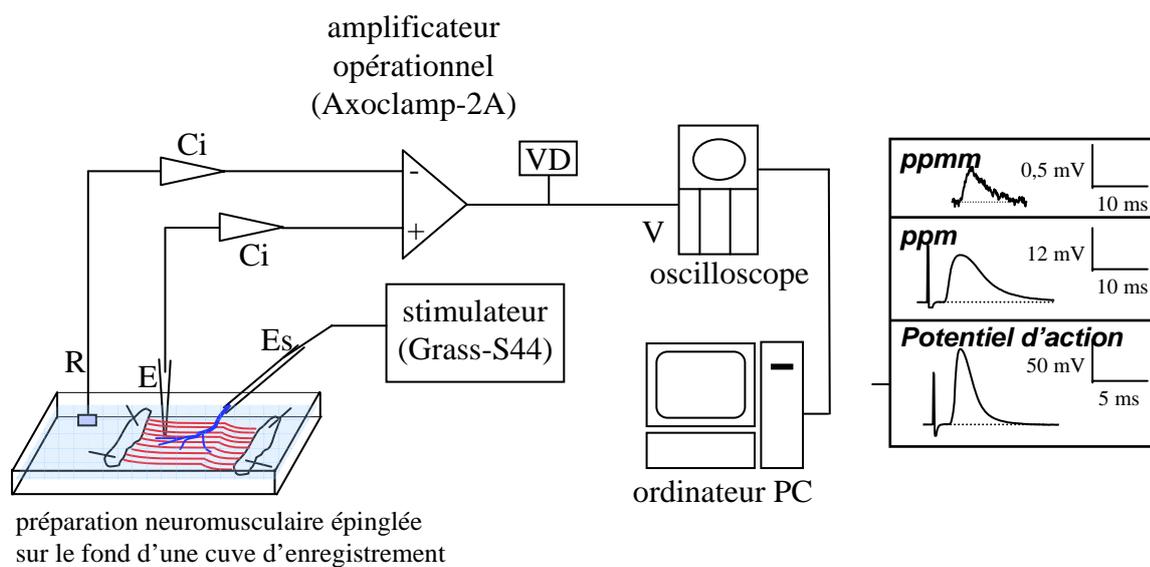
Cette technique a pour but de séparer, en fonction de leur taille, les fragments amplifiés. A chaque échantillon (20  $\mu$ L), nous ajoutons 3  $\mu$ L de tampon de dépôt. Le tampon de dépôt est le TrackIt™ Cyan/Yellow qui provient d'Invitrogen (Paisley, UK). Ensuite, 10  $\mu$ L de chaque échantillon sont déposés dans les puits du gel d'agarose (2%), un des puits étant réservé au marqueur de poids moléculaires de 15 fragments compris entre 100 et 1500 paires de bases (« 100 bp DNA ladder » ; référence : 15628-019, Invitrogen, Paisley, UK). La solution du marqueur de poids moléculaires est préparée à partir de 10  $\mu$ L de solution mère (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) auxquels sont ajoutés 20  $\mu$ L de tampon de dépôt et 95  $\mu$ L d'eau distillée stérilisée.

Le gel d'agarose est préparé en ajoutant 1 g d'agarose dans 50 mL de tampon Tris-Borate-EDTA (TBE 1X) composé de 130 mM de TRIS; 45 mM d'acide borique; 2,5 mM d'EDTA,Na<sub>2</sub> dans H<sub>2</sub>O [pH ~9 (25°C), Sigma-Aldrich]. Après avoir dissout le gel, par chauffage, aux micro-ondes, 2,5  $\mu$ L de bromure d'ethidium (BET, concentration initiale de 1%) sont ajoutés et le gel est coulé dans l'appareil. Après refroidissement, les peignes sont enlevés et le gel est mis en place dans la cuve d'électrophorèse puis chargé. Sous l'application d'un champ électrique (50 volts/cm), les fragments migrent. L'ADN est visualisé sur la table UV et une photo permet de conserver l'image des fragments amplifiés obtenus à partir des différents animaux (Fig. 27).

## 2.3. Préparations neuromusculaires isolées de souris

Les héli-diaphragmes ainsi que leur nerf phrénique sont prélevés après avoir euthanasié les souris par dislocation des vertèbres cervicales. Le diaphragme présente l'avantage d'être facile d'accès et plat, ce qui permet de suivre aisément le trajet des branches nerveuses et d'en faire un modèle de choix pour les études électrophysiologiques.

Le muscle *levator auris longus* (LAL), situé sous l'épiderme dans la région temporelle du crâne, présente un grand intérêt pour les études immunohistochimiques



**Figure 28. Schéma simplifié du dispositif expérimental utilisé pour l'enregistrement intracellulaire des potentiels de membrane et synaptiques (ppm et ppmm) au niveau d'une jonction neuromusculaire squelettique.** R: électrode de référence (pastille de chlorure d'argent); E: micro-électrode d'enregistrement (en verre); Ci: changeur d'impédance; Es: électrode de stimulation du nerf moteur (en bleu); VD: voltmètre digital permettant de mesurer, à la sortie de l'amplificateur opérationnel, la différence de potentiel (V) entre les électrodes R et E.

puisque, en plus d'être plat, il n'est constitué que de 2 à 3 couches de fibres musculaires. Son observation, sous loupe binoculaire, permet de repérer le trajet des branches nerveuses du nerf facial et la région des terminaisons nerveuses [Angaut-Petit et al., 1987].

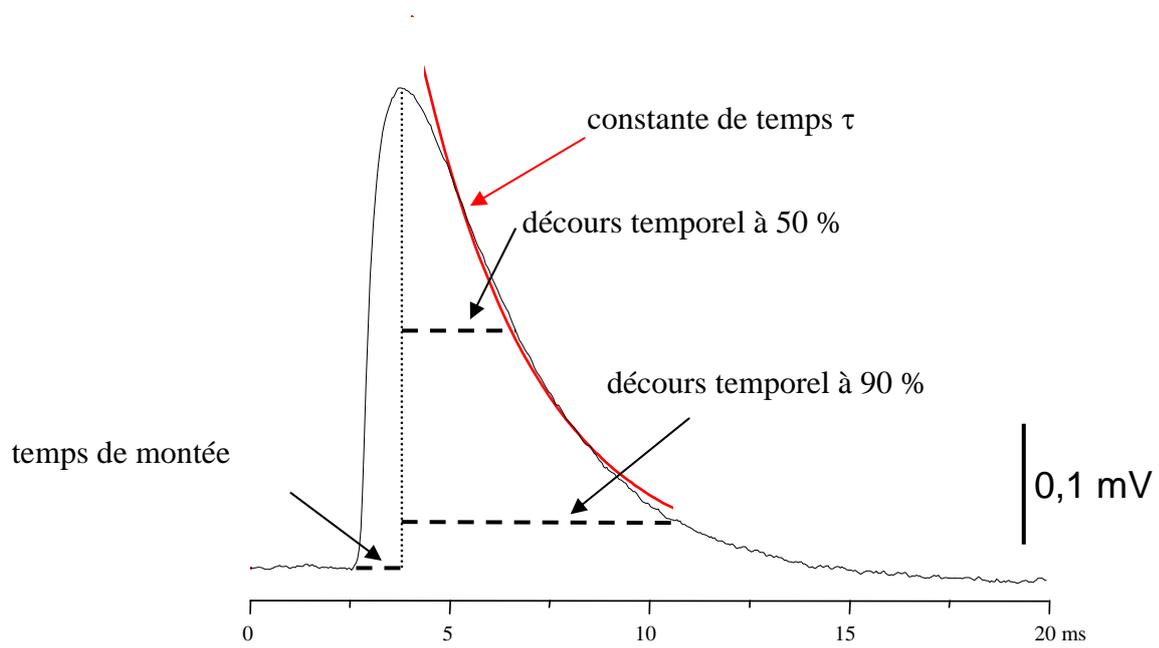
## **2.4. Enregistrements électrophysiologiques au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris**

### **2.4.1. Enregistrements intracellulaires**

Pour les études électrophysiologiques, les préparations nerf-muscle de souris sont épinglées sur le fond de cuves en Plexiglas, recouvert de Rhodorsil<sup>®</sup>. Ces cuves, d'une contenance de 3 ou 10 mL (pour celles qui sont thermostatées), sont remplies d'un milieu physiologique standard (Krebs-Ringer normal) oxygéné et dont la composition est la suivante (en mM): NaCl 154, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, acide N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonique (HEPES, tamponné avec du NaOH) 5, D-glucose 11 (pH 7,4).

Les expériences ont été généralement effectuées à température ambiante, soit 22 +/- 2°C, sauf lors de certaines expériences où les enregistrements mécaniques de la force contractile ont été fait à 32°C, la précision est alors faite dans les légendes des figures. Les potentiels de membrane, les potentiels de plaque motrice (ppm) et les potentiels de plaque motrice miniatures (ppmm) sont enregistrés au niveau des préparations isolées « hémidiaphragme - nerf phrénique » de souris (cf. paragraphe 2.3) à l'aide d'une micro-électrode en verre et en utilisant le système Axoclamp-2A, selon les techniques classiques d'enregistrement (Fig. 28). Les potentiels de membrane et synaptiques, obtenus à la sortie de l'Axoclamp-2A, sont filtrés électroniquement (8 pôles Bessel, 3 kHz) puis visualisés sur un oscilloscope (Tektronix, modèle 5223) et digitalisés à l'aide d'un ordinateur PC-486 équipé d'un convertisseur analogique-numérique DT-2821 (Data Translation) afin d'être analysés à l'aide du programme Scan (fourni par J. Dempster, Université de Strathclyde, Ecosse) autorisant l'accès aux tracés.

Pour générer les ppm et les potentiels d'action, le nerf moteur est stimulé à l'aide d'une électrode de succion formée d'un tube en verre, étiré et poli à l'une de ses extrémités de manière à pouvoir aspirer le nerf sans le détériorer. L'autre extrémité est reliée à une seringue d'aspiration. Deux fils de platine sont fixés sur l'électrode, l'un enroulé à



**Figure 29. Schéma simplifié notifiant les différents caractéristiques d'un potentiel de plaque motrice miniature (ppmm).** Les mêmes caractéristiques ont été également analysées à partir des potentiels de plaque motrice (ppm).

l'extérieur du tube, l'autre à l'intérieur, et connectés à l'unité d'isolement d'un stimulateur (Grass Instruments, modèle S-44).

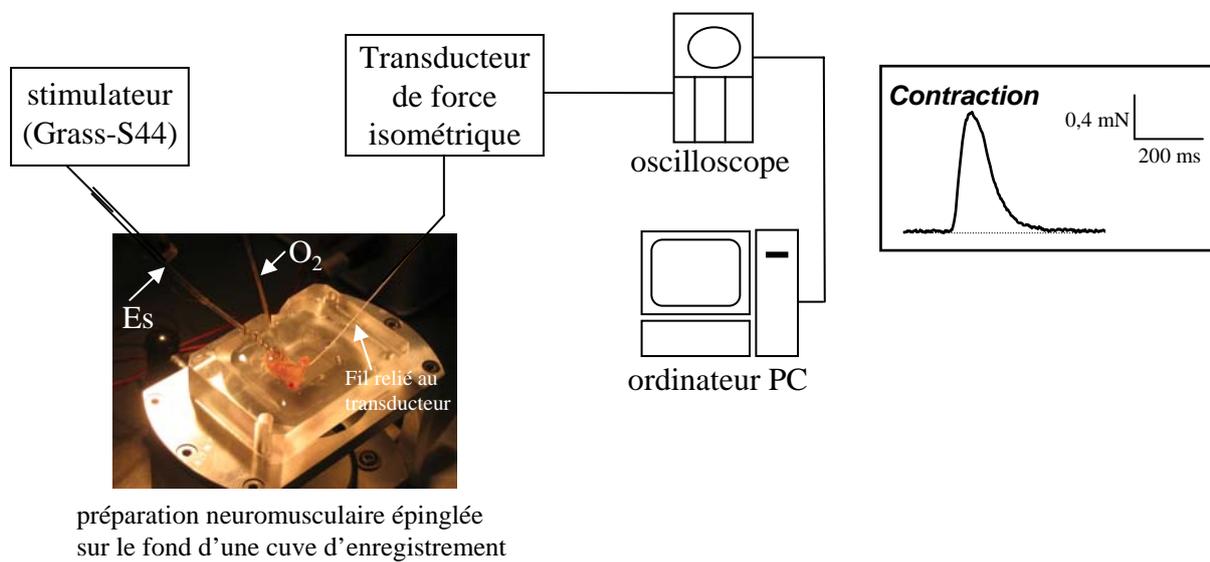
Les micro-électrodes utilisées pour l'enregistrement (E) proviennent de l'étirement, par chauffage, de capillaires en verre de 1,2 mm de diamètre, grâce à une étireuse verticale (David Kopf Instruments, modèle 700 C). Ces micro-électrodes, remplies de KCl (3 M), sont testées dans la solution physiologique standard, *i.e.* Krebs-Ringer normal. Leur résistance est de 2 à 8 M $\Omega$ . Une électrode extracellulaire de référence, constituée d'une pastille agglomérée en chlorure d'argent, est plongée dans la cuve contenant la préparation neuromusculaire (Fig. 28). Une loupe binoculaire et des micromanipulateurs permettent, respectivement, de visualiser et d'insérer la micro-électrode dans une fibre musculaire au voisinage immédiat d'une jonction neuromusculaire.

Après avoir enregistré les ppm et les ppmm, nous analysons leurs caractéristiques qui sont le temps de montée, les décours temporels à 50% et à 90% ainsi que la constante de temps de l'exponentielle simple de leur phase de décroissance ( $\tau$ ). Ces caractéristiques sont schématisées sur la Figure 29.

Lors de nos expériences, nous avons évalué le contenu quantique des ppm résultant de la libération de neurotransmetteur par l'élément présynaptique. Pour cela, nous avons eu recours à la méthode dite des « échecs » [Katz, 1969]. Cette méthode consiste à comptabiliser le nombre d'échecs suite à une stimulation nerveuse, c'est-à-dire le nombre de fois où, suite à une stimulation nerveuse, il n'y a pas eu de réponses synaptiques. Pour inhiber la libération de neurotransmetteur et donc pouvoir enregistrer des échecs, il est nécessaire de travailler dans un milieu physiologique faible en calcium et riche en magnésium (Krebs-Ringer modifié oxygéné et dont la composition est la suivante (en mM) : NaCl 150,6 ; KCl 5 ; CaCl<sub>2</sub> 0,4 ; MgCl<sub>2</sub> 6 ; HEPES (tamponné avec du NaOH) 5, D-glucose 11 (pH 7,4). Suivant les animaux, la composition du milieu en CaCl<sub>2</sub> et MgCl<sub>2</sub> est à modifier afin de ne pas obtenir trop d'échecs. La concentration de calcium peut varier entre 0,4 et 0,6 mM, voire 1 mM pour certaines souches de souris génétiquement modifiées, et celle de magnésium entre 4 et 6 mM. Cette méthode est une façon simple de donner une approximation du contenu quantique (m) par la formule :

$$m = \ln [\text{nombre de stimulation} / \text{nombre d'échecs}]$$

Par cette méthode, nous avons pu comparer, entre les différentes souches de souris, le contenu quantique de neurotransmetteur entrant dans la composition des ppm. Dans certaines expériences où la libération était effectuée dans un milieu de Krebs-Ringer



**Figure 30. Schéma simplifié du dispositif expérimental utilisé pour l'enregistrement mécanique de la force contractile au niveau d'une jonction neuromusculaire squelettique. Es: électrode de stimulation du nerf moteur.**

normal, nous avons utilisé la  $\mu$ -conotoxine GIIIB pour bloquer sélectivement les canaux sodiques du muscle et ainsi s'affranchir de la contraction musculaire.

#### **2.4.2. Enregistrements extracellulaires**

Les courants de plaque motrice (cpm) et les courants de plaque motrice miniatures (cpmm) sont enregistrés au niveau des préparations isolées « héli-diaphragme - nerf phrénique » de souris (cf. paragraphe 2.3) à l'aide d'une micro-électrode en verre remplie soit d'une solution de NaCl (2 M) soit d'une solution de Krebs-Ringer normal. Cette micro-électrode, contrairement à la technique utilisée pour les enregistrements intracellulaires, est posée à la surface de la jonction neuromusculaire sans la pénétrer. Le système pour acquérir puis analyser le signal est le même que celui décrit précédemment (cf. paragraphe 2.4.1).

#### **2.5. Enregistrements mécaniques de la force contractile au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris**

Pour les enregistrements de la force contractile de l'héli-diaphragme de souris (cf. paragraphe 2.3), l'un des tendons de la préparation est relié, par un fil résistant, à un transducteur de force isométrique (Grass Instruments, modèle FT03) et l'autre tendon est fixé, par des petites aiguilles, sur le fond de la cuve d'expérimentation. La stimulation du muscle est réalisée de façon indirecte, par l'intermédiaire du nerf aspiré par une électrode de succion. Suite à une stimulation électrique, le muscle se contracte et étire le fil ce qui permet la propagation du signal jusqu'au transducteur de force qui la convertit en un signal visualisé sur un oscilloscope (Tektronix, modèle 5223) et enregistré sur un ordinateur PC-486 équipé d'un convertisseur analogique-numérique DT-2821 (Data Translation) (Fig. 30). Ce signal, qui correspond donc à la force contractile du muscle, est exprimé en unités de force (Newtons). La tension basale est enregistrée puis modifiée, de sorte à obtenir la réponse maximale, par ajustement de l'étirement du muscle à sa longueur optimale. Cet étirement est obtenu à l'aide d'un micromanipulateur. Dans ces conditions, nous enregistrons la contraction isométrique car la tension basale est maintenue constante tout au long de l'expérience.

Lors de certaines expériences, les enregistrements de la force contractile ont été effectués à 32°C (utilisation de cuves thermostatées), température de la solution où baignaient les préparations neuromusculaires isolées de souris. Nous travaillons à cette température pour pouvoir se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques. Cependant, nous ne pouvons pas travailler à la température corporelle physiologique de la souris car, à cette température (36 – 38°C), des échecs de conduction nerveuse se produisent, ce qui induirait des erreurs dans nos interprétations.

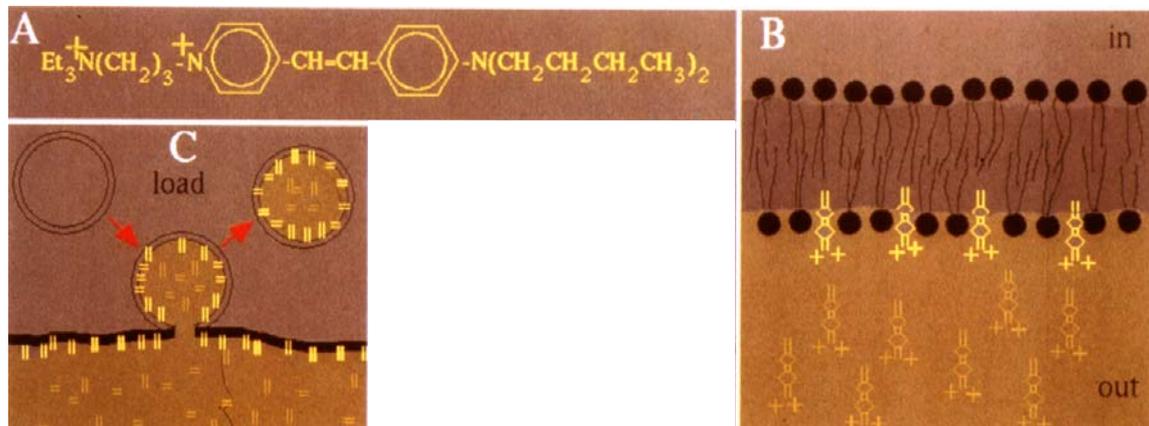
Le protocole utilisé pour obtenir une simple réponse contractile était d'appliquer une stimulation du nerf phrénique de 150  $\mu$ s à une fréquence de 0,2 Hz. Par contre, les réponses téaniques étaient obtenues suite à un train de stimulations (600 ms, fréquences comprises entre 10 et 100 Hz, voire plus) appliqué toutes les 30 secondes. Après avoir effectué les trains de stimulation, nous laissons le muscle au repos pendant quelques minutes avant de passer au protocole dit de « fatigue » qui consiste à appliquer un train de stimulations toutes les secondes à une fréquence donnée élevée (40 - 80 Hz), ce qui mène à l'épuisement de la force contractile développée par le muscle. Ensuite, nous laissons le muscle au repos pendant 30 secondes, puis nous enregistrons une nouvelle réponse téanique et ainsi de suite jusqu'à récupérer l'amplitude maximale de la réponse téanique.

Pour une souris génétiquement modifiée donnée, les expériences sur cette souris et la souris sauvage (témoin) ont été réalisées dans un intervalle de temps de 3 jours au maximum. De plus, lorsque cela a été possible, les deux souris étaient issues de la même portée.

## **2.6. Agents pharmacologiques utilisés**

Lors des enregistrements intracellulaires et mécaniques au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris, différents produits ont été utilisés dont le tetra-isopropylpyro-phosphamide (Iso-OMPA ; un inhibiteur irréversible de la BChE [Sigma-Aldrich Chimie, St Quentin-Fallavier, France], le chlorpyrifos-oxon [Chemical Services Inc., West Chester, PA], la néostigmine méthylsulfate [France Biochem, Meudon, France), un inhibiteur réversible des cholinestérases. La fasciculine-1, un inhibiteur réversible de l'AChE, nous a été fournie par le Professeur E. Karlsson (Université d'Uppsala, Suède).

Les préparations neuromusculaires ont été mises à incuber pendant 60 minutes avec l'iso-OMPA avant d'être rincées abondamment pendant 20 minutes avec le milieu



**Figure 31. Schéma simplifié de l'internalisation du FM1-43 dans la terminaison nerveuse.** A: structure chimique du FM1-43; B: incorporation du FM1-43 à la membrane plasmique; C: processus d'exo-endocytose des vésicules synaptiques permettant l'internalisation du FM1-43. D'après Betz *et al.* (1992).

physiologique. L'incubation avec le chlorpyrifos-oxon était de 30 minutes avant des rinçages abondants. En ce qui concerne les incubations avec la néostigmine et la fasciculine, elles étaient de 30 minutes et non suivies de rinçages.

## 2.7. Histochimie

### 2.7.1. Sur des échantillons non fixés

La préparation neuromusculaire est déposée dans une cuve adaptée aux acquisitions d'images effectuées à l'aide d'un microscope confocal droit. Afin de visualiser la morphologie de l'élément présynaptique, elle est mise à incuber, pendant 15 minutes, avec un milieu riche en  $K^+$  (*i.e.* Krebs-Ringer modifié contenant 60 mM de KCl au lieu de 5 mM) additionné de FM1-43 (4  $\mu$ M). La sonde fluorescente FM1-43 ( $\lambda_{excitation}= 488$  nm,  $\lambda_{émission}= 510$  nm ; Molecular Probes) est un composé styrénique divalent qui s'incorpore rapidement et de manière réversible aux membranes plasmiques neuronales, sans les traverser. La dépolarisation membranaire produite par le milieu riche en  $K^+$ , provoque la libération de neurotransmetteur et l'endocytose des vésicules synaptiques (Fig. 31). Cette dernière permet l'internalisation du FM1-43 dans les terminaisons nerveuses, la membrane des vésicules synaptiques ayant incorporé la sonde. La préparation est ensuite rincée avec du milieu physiologique standard, dépourvu de FM1-43, puis avec un milieu sans  $Ca^{2+}$  et riche en  $Mg^{2+}$  (*i.e.* Krebs-Ringer modifié contenant 0 mM de  $Ca^{2+}$  et 6 mM de  $Mg^{2+}$ ) afin d'arrêter l'incorporation de la sonde à la membrane, en stoppant le processus d'exo-endocytose, et ainsi pouvoir détecter les caractéristiques des terminaisons nerveuses marquées par cette sonde. La sonde marque également, mais de façon passive, la membrane des axones moteurs.

### 2.7.2. Sur des échantillons fixés

Afin de marquer des protéines d'intérêt à l'aide de sondes fluorescentes ou d'anticorps couplés à des fluorochromes au niveau des préparations neuromusculaires, les étapes suivantes sont réalisées : fixation des échantillons, perméabilisation des membranes, saturation du marquage, marquage et montage des préparations.

- Fixation : la fixation des échantillons a pour but de conserver au mieux les structures correspondant à l'état vivant et de créer artificiellement une réticulation figeant les molécules. Dans cette optique, nous utilisons le paraformaldéhyde (PFA) car il pénètre rapidement dans les tissus, permet une bonne conservation des déterminants antigéniques et provoque des pontages intra- et intermoléculaires courts. Le PFA est préparé à 8% en mettant 8 g de PFA dans 100 mL d'une solution de tampon de phosphate de sodium (PBS, 10 mM) que l'on chauffe à 60°C. Pour avoir une dissolution complète, la solution est éclaircie par quelques gouttes de NaOH puis filtrée sur du papier Whatmann. Les préparations neuromusculaires sont fixées par une solution de tampon PBS contenant 4% de PFA et appliquée pendant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite rincés trois fois, pendant 5 à 10 minutes, avec du PBS.

- Perméabilisation : pour détecter les déterminants antigéniques intracellulaires, les préparations neuromusculaires sont perméabilisées par du Triton X-100, un détergeant non ionique classiquement utilisé qui, en particulier, n'interfère pas avec la liaison antigène-anticorps.

- Saturation : le principe de la saturation est de bloquer les charges susceptibles de fixer, de manière non spécifique, les sondes fluorescentes ou les anticorps afin de limiter, voire supprimer, l'augmentation du bruit de fond due à ce marquage non spécifique. Dans cette optique, les sondes fluorescentes et les anticorps sont appliqués dans un milieu externe composé d'une solution de PBS contenant 2% d'albumine de sérum bovin (BSA).

- Marquage par des sondes fluorescentes : pour marquer les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine des préparations neuromusculaires, l' $\alpha$ -bungarotoxine liée à l'alexaFluor-488<sup>®</sup>, à l'alexaFluor-594<sup>®</sup> ou à l'alexaFluor-647<sup>®</sup> [Molecular Probes, Oregon, USA] est employée. Elle est appliquée pendant 45 minutes à 37°C, à une concentration de 2  $\mu$ g/mL.

Pour marquer la lame basale synaptique, la lectine VVA (*Vicia villosa*) couplée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) est employée à une concentration de 20  $\mu$ g/mL [EY Laboratories Inc., California, USA].

- Immunomarquage : les protéines d'intérêt sont marquées à l'aide d'anticorps primaires spécifiques, dilués à des concentrations variables selon les anticorps et appliqués aux échantillons pendant au moins 12 heures. Après plusieurs rinçages avec une solution

de PBS, les préparations neuromusculaires sont traitées pendant 3 heures avec un anticorps secondaire (dilué de 500 à 1000 fois selon les anticorps utilisés) couplé à un fluorochrome et reconnaissant l'anticorps primaire. Finalement, les échantillons sont rincés plusieurs fois avec une solution de PBS.

Lors de nos études, le principal anticorps primaire utilisé était le neurofilament-200 (anti-NF 200, Sigma-Aldrich Chimie, St-Quentin-Fallavier, France) afin de visualiser les terminaisons nerveuses. Il a été dilué 1000 fois et couplé à l'anticorps secondaire Cy3™ (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.), également dilué 1000 fois.

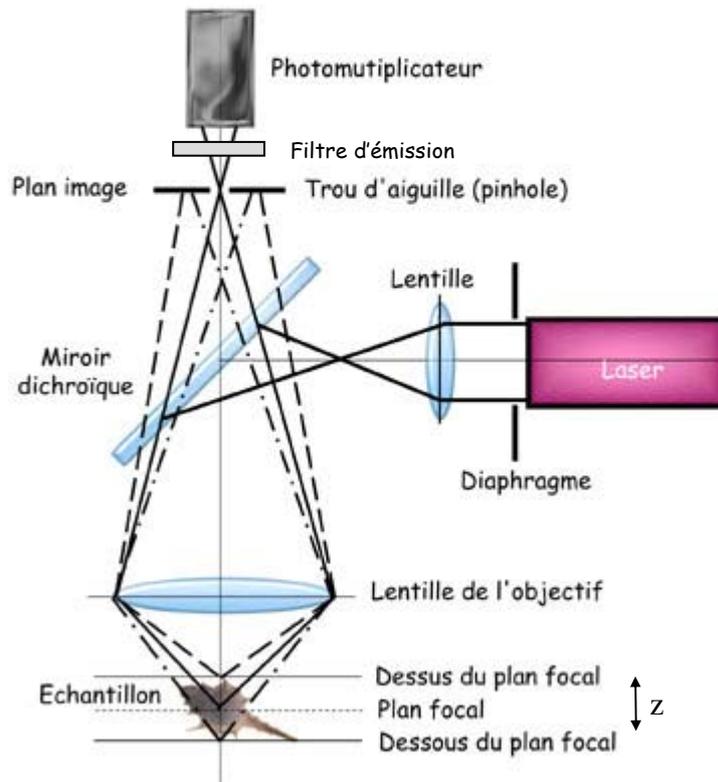
- Montage : les préparations neuromusculaires sont placées sur une lame de verre (76 x 26 mm, SuperFrost®) sur laquelle est déposée une goutte de milieu de montage Vectashield Hard Set ou Vectashield Hard Set DAPI (Vector Laboratories Inc., California, USA), puis recouvertes d'une lamelle de verre (22 x 22 mm, Scientec). Il est à noter que, dans certaines expériences, le milieu de montage avec DAPI a été utilisé afin de marquer les noyaux cellulaires.

Pour visualiser ces échantillons et acquérir leurs images, nous avons utilisé un microscope confocal droit (voir ci-dessous).

## **2.8. Microscopie confocale à balayage laser**

La microscopie confocale est une technique de microscopie photonique qui permet de visualiser et d'étudier des échantillons sans avoir recours à des coupes physiques des tissus observés. Cette technique permet la reconstruction à haute résolution de l'échantillon. Son principe consiste à condenser la lumière émise par une source lumineuse en un point, dit « focal », de la préparation biologique marquée préalablement à l'aide d'une ou de plusieurs sondes fluorescentes (ou fluorochromes), et à détecter uniquement la lumière émise par les molécules situées au niveau de ce point, la lumière parasite étant éliminée.

La source lumineuse la plus appropriée, du point de vue de son intensité et du parallélisme de son faisceau, est un laser. Dans nos expériences, nous avons utilisé le système de microscopie confocale à balayage laser Leica-SP2 équipé avec des objectifs Leica à sec (HC PL Fluotar ; 10X/0,30), à immersion à huile (HCX PL APO ; 40X/1,25-



**Figure 32. Principe de la microscopie confocale à balayage laser.** Un microscope est dit "confocal" lorsque un point de l'échantillon est vu sous le même angle par le condenseur et l'objectif. Le principe essentiel réside dans la présence du "trou d'aiguille" qui n'autorise la détection de signaux fluorescents ne provenant que du plan focal, les photons en provenance des autres plans (en pointillé) étant alors bloqués. La valeur d'un pixel est déterminée par le photomultiplicateur. Ensuite par balayage (selon l'axe XY), une image sera formée. Enfin, par un déplacement de la platine (dans l'axe Z), une série d'images sera saisie pour obtenir un empilement de sections optiques (en xyz). Avec plusieurs photomultiplicateurs, différents couleurs peuvent être imagés simultanément. D'après V. Fraasier et S.Brown.

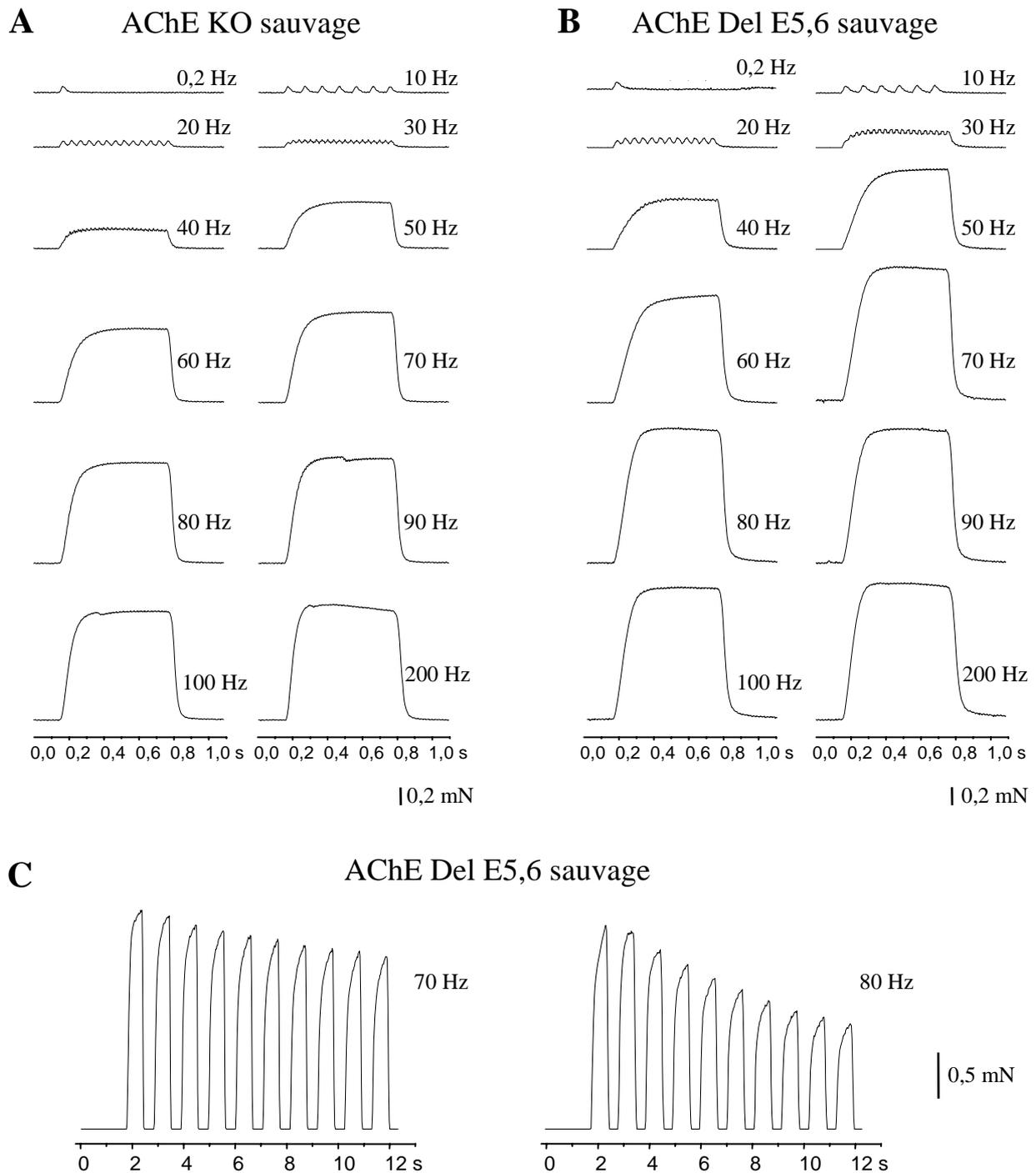
0,75) ou à immersion à eau (HCX PL APO ; 40X/0,80). Ce système possède trois lasers ayant des puissances différentes : Argon de 180 mW, Hélium-Néon de 1,4 mW et Hélium-Néon de 10 mW, qui permettent l'émission de rayons lumineux ayant des longueurs d'ondes respectivement de 458-476-488-514 nm (visible), 543 nm (vert) et 633 nm (rouge).

Le faisceau d'excitation traverse d'abord un filtre AOTF (« Acoustical Optical Tunable Filter »). C'est un cristal dont les propriétés sont modifiables par des ondes acoustiques et qui permet de sélectionner la longueur d'onde du faisceau la plus appropriée pour exciter la sonde fluorescente ( $\lambda_{\text{excitation}}$ ) et d'atténuer la puissance du faisceau avant qu'il ne soit transmis à l'échantillon. Le faisceau est ensuite réfléchi par un miroir dichroïque (car sa longueur d'onde est inférieure à celle caractérisant le miroir dichroïque) et dirigé vers deux miroirs galvanométriques successifs qui, en effectuant des rotations autour de leur axe, assurent un balayage selon les axes x et y de la surface du champ observé (Fig. 32). Ce faisceau est ensuite condensé en un point de l'échantillon par l'objectif du microscope. Les molécules fluorescentes, excitées par cette lumière incidente, émettent en retour des rayons lumineux à une longueur d'onde spécifique de la sonde excitée ( $\lambda_{\text{émission}}$ ). Le faisceau d'émission emprunte le même trajet que le faisceau d'excitation mais en sens opposé. Il traverse le miroir dichroïque (car sa longueur d'onde est supérieure à celle caractérisant le miroir dichroïque, et donc à celle du faisceau d'excitation). En pratique, le miroir dichroïque assure les transferts du faisceau d'excitation vers l'objectif et du faisceau d'émission vers les détecteurs. Ensuite, le faisceau d'émission est condensé par une lentille achromatique en un point dit « confocal » situé au niveau du trou d'un diaphragme. Ce trou d'épingle (ou « pinhole »), de diamètre variable, ne laisse passer que la lumière émise par les molécules fluorescentes situées au niveau du point focal de l'objectif, les photons en provenance des autres plans étant alors bloqués. Il agit donc comme un « filtre » pour les lumières parasites. Le choix de la valeur du diamètre du trou d'épingle est délicat car il doit correspondre à un bon rapport signal/bruit, c'est-à-dire que cette valeur doit être suffisamment grande pour avoir un bon signal, mais pas trop pour ne pas détecter également la lumière émise par les molécules fluorescentes situées en dehors du point focal de l'objectif. Finalement, un prisme permet de diviser le faisceau d'émission en ses composantes spectrales, chacune d'elles étant envoyée vers un premier photomultiplicateur (PMT) qui, d'une part et grâce à un système motorisé de lames de miroir, sélectionne la gamme spectrale désirée et renvoie les autres longueurs d'onde vers d'autres photomultiplicateurs et, d'autre part, convertit les photons

reçus en un signal électrique puis numérique qui sera visualisé sur l'écran de l'ordinateur. La taille des images est de 1024 x 1024 pixels et leur profondeur de 8 bits (soit  $2^8 = 256$  niveaux d'intensité pour représenter chaque pixel).

La station de travail, qui fonctionne sous Windows NT, assure le traitement des images grâce au logiciel « Leica software ». Ce logiciel permet, entre autres, de réaliser la projection de l'ensemble des coupes optiques afin d'obtenir la reconstruction tridimensionnelle de l'échantillon. Le traitement des images est également effectué avec le logiciel « ImageJ » (logiciel du domaine public disponible sur <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Ce dernier nous a permis, notamment, de quantifier la surface de distribution des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine.

# *Résultats*



**Figure 33.** Enregistrements représentatifs de la force contractile des héli-diaphragmes isolés de souris adultes sauvages issues des souches AChE KO (**A**) et AChE Del E5,6 (**B**) à 32°C. Le nerf phrénique a été stimulé par une simple impulsion (150  $\mu$ s - 0,2 Hz) ou pendant 600 ms aux fréquences indiquées en respectant un intervalle de 30 secondes entre chaque contraction. Diminution des réponses téaniques des héli-diaphragmes de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 en fonction de la série de stimulation nerveuse appliquée à 70 Hz et 80 Hz lors d'un protocole de fatigue (**C**). Le nerf phrénique a été stimulé par des impulsions de 600 ms, toutes les secondes.

### 3.1. Analyse fonctionnelle *ex vivo* des muscles de souris

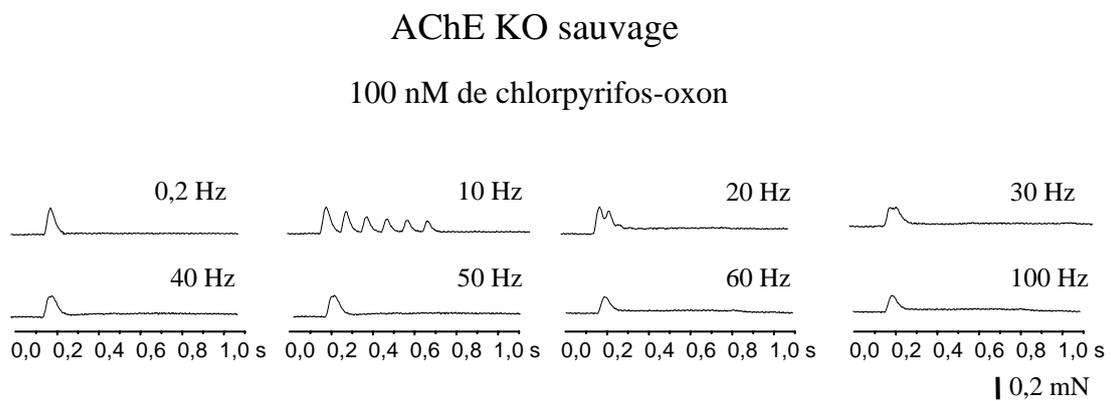
Notre première approche pour caractériser l'état fonctionnel des jonctions neuromusculaires des souris dépourvues, totalement ou partiellement, d'AChE a consisté à étudier la force contractile développée par les muscles de ces souris, *ex vivo*, lors de la stimulation nerveuse. Ensuite, nous avons caractérisé la libération quantique spontanée d'ACh et la libération provoquée par la stimulation nerveuse. Toutes ces études ont été effectuées en absence puis en présence de certains inhibiteurs des cholinestérases.

#### 3.1.1. Caractérisation de la contraction musculaire provoquée par la stimulation nerveuse

##### 3.1.1.1. Muscles de souris sauvages dans les conditions contrôles

Des enregistrements de la force contractile ont été réalisés au niveau de préparations neuromusculaires isolées de souris sauvages issues des souches AChE KO et AChE Del E5,6 (Fig. 33A et B) à 32°C (cf. paragraphe 2.6). Les héli-diaphragmes de ces souris sauvages peuvent développer et maintenir des contractions téaniques lors de stimulations intermittentes, dans une large gamme de fréquence de stimulation nerveuse. En effet, les contractions téaniques de ces muscles sont parfaitement maintenues jusqu'à une fréquence de 100 Hz, voire 200 Hz, la fréquence à laquelle travaille le diaphragme *in vivo* étant de l'ordre de 80 Hz. Il est à noter que les tracés obtenus à partir des souris sauvages issues des différentes souches sont similaires. En particulier, les amplitudes des forces de contraction développées se trouvent dans la même gamme de valeurs, les différences minimales observées étant dues à la variabilité inhérente aux différents animaux.

Les héli-diaphragmes de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 ont été soumis à un protocole de fatigue qui consiste à stimuler, toutes les secondes, le nerf phrénique pendant 600 ms à 70 et 80 Hz (cf. paragraphe 2.6). Dans ces conditions, une décroissance de l'amplitude de la réponse téanique est observée au cours du temps (Fig. 33C). En effet, le muscle, après avoir été sollicité à une fréquence élevée, développe moins de force que lors d'une stimulation téanique isolée. Après quelques secondes de repos, le muscle récupère mais cette récupération n'est pas totale. La diminution des réponses téaniques pourrait être due à des phénomènes présynaptiques de mobilisation de quanta.



**Figure 34.** Effet de l'inhibition des cholinestérases sur la réponse contractile de l'hémi-diaphragme isolés de souris adultes sauvages issues de la souche AChE KO par un traitement préalable avec 100 nM de chlorpyrifos-oxon, à 32°C. Le nerf phrénique a été stimulé par une simple impulsion (150  $\mu$ s - 0,2 Hz) ou pendant 600 ms aux fréquences indiquées en respectant un intervalle de 30 secondes entre chaque contraction.

Car la contraction musculaire provoquée par la stimulation directe du muscle est moins déprimée que lorsqu'elle est provoquée par la stimulation nerveuse (non montrée). La diminution de l'amplitude de la force développée par le muscle est d'autant plus perceptible (le muscle se fatigue plus rapidement et de façon importante) que le muscle est sollicité à des fréquences plus élevées. En effet, elle est de  $22 \pm 3\%$  ( $n = 4$ ) lorsque le muscle est stimulé à 70 Hz et de  $50 \pm 2\%$  ( $n = 4$ ) lorsqu'il est stimulé à 80 Hz ( $n = 4$ ). Ce pourcentage de diminution est calculé entre l'amplitude maximale de la première réponse du train de stimulation et celle de la dernière réponse sur une base de temps de 10 secondes.

### **3.1.1.2. Muscles de souris sauvages traités par des agents anticholinestérasiques**

Dans le but de déterminer si l'inhibition de l'AChE ou de la BChE modifie la contraction musculaire provoquée par la stimulation nerveuse, nous avons étudié l'effet de certains inhibiteurs de ces enzymes.

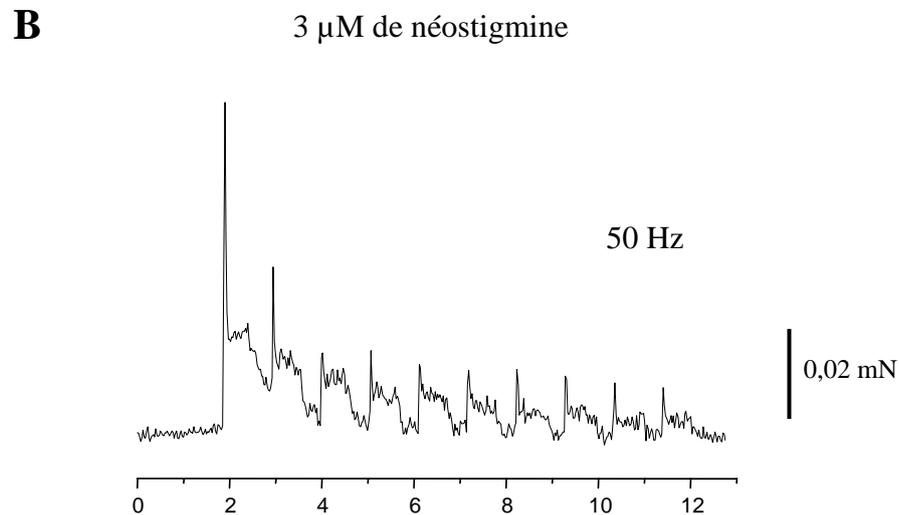
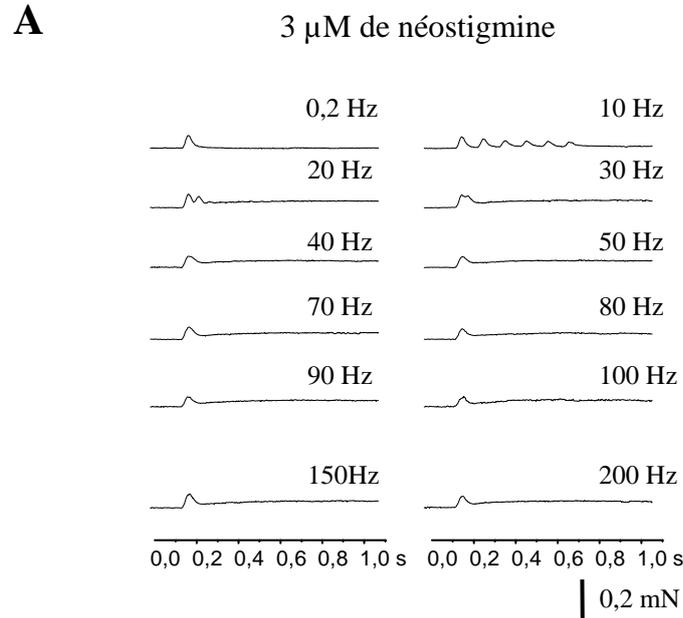
#### **a. Inhibition des cholinestérases**

Nous avons inhibé les cholinestérases, soit l'AChE et la BChE, en traitant au préalable les préparations neuromusculaires de souris sauvages avec 100 nM de chlorpyrifos-oxon ( $n = 2$ ). Dans ces conditions, les héli-diaphragmes de souris sauvages issues de la souche AChE KO sont dans l'incapacité de répondre à la stimulation nerveuse à haute fréquence puisqu'ils ne développent pas de réponses téaniques au-delà de 10 Hz (Fig. 34). Un profil sensiblement similaire de tracés a été obtenu pour les souris sauvages issues des autres souches étudiées (AChE Del E5,6, AChE Del E6, AChE Del E5/neo et PRiMA KO). Ces résultats confirment le rôle important des cholinestérases dans le fonctionnement de la jonction neuromusculaire et donc dans la contraction musculaire provoquée par la stimulation nerveuse.

#### **b. Inhibition de l'AChE**

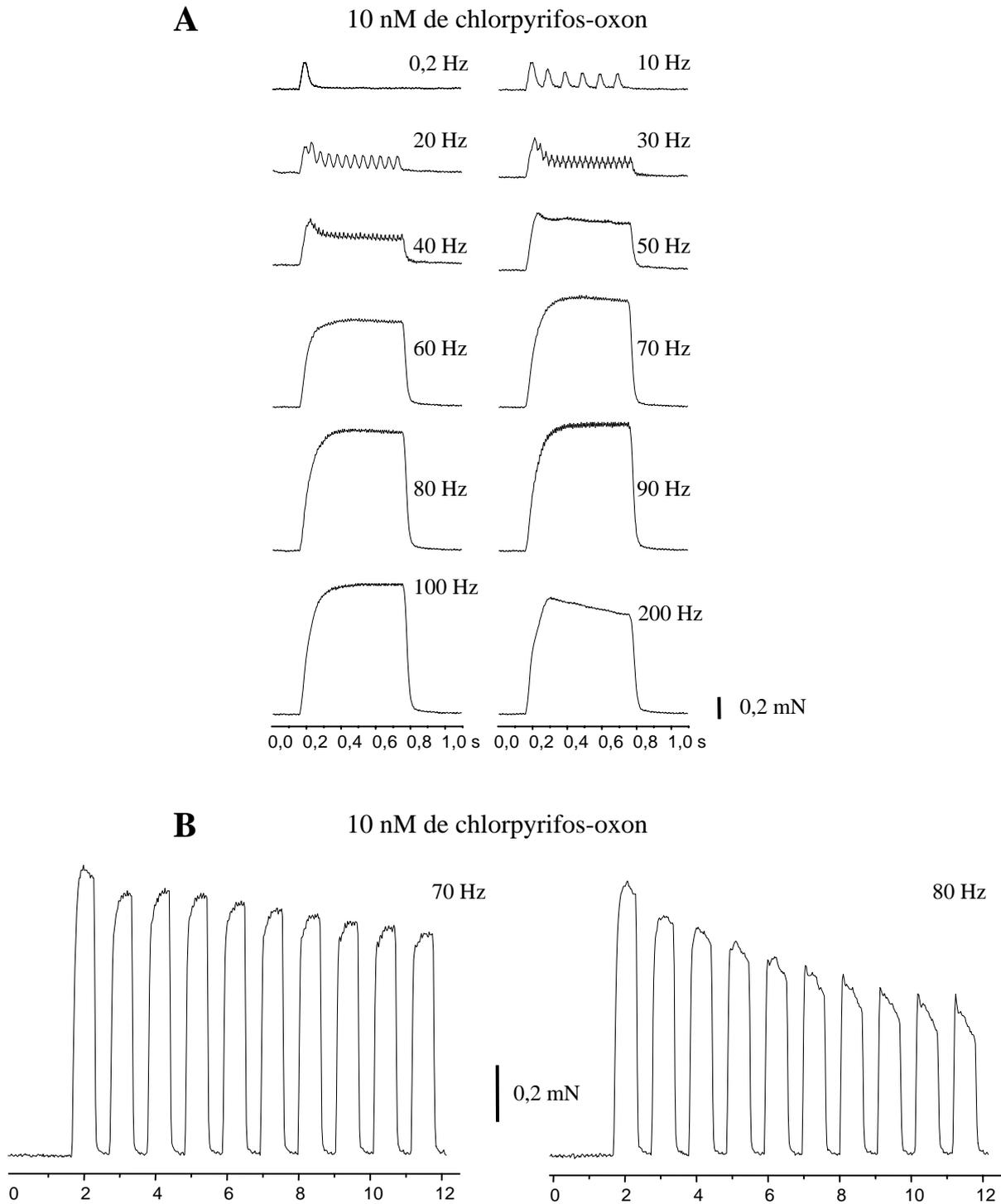
L'AChE a été inhibée par 3  $\mu$ M de néostigmine, au niveau des préparations neuromusculaires ( $n = 2$ ) isolées des souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 ( $n = 2$ ) (Fig. 35). Dans ces conditions, les héli-diaphragmes de ces souris sauvages sont

## AChE Del E5,6 sauvage



**Figure 35.** Enregistrements représentatifs de la force contractile des héli-diaphragmes isolés de souris adultes sauvages issues des souches AChE Del E5,6 à 32°C après inhibition de l'AChE par 3  $\mu$ M de néostigmine. **(A)** Le nerf phrénique a été stimulé par une simple impulsion (150  $\mu$ s - 0,2 Hz) ou pendant 600 ms aux fréquences indiquées en respectant un intervalle de 30 secondes entre chaque contraction. **(B)** Diminution des réponses téaniques des héli-diaphragmes de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 en fonction de la série de stimulation nerveuse appliquée à 50 Hz lors d'un protocole de fatigue. Le nerf phrénique a été stimulé par des impulsions de 600 ms, toutes les secondes.

## AChE Del E5,6 sauvage



**Figure 36.** Enregistrements représentatifs de la force contractile des héli-diaphragmes isolés de souris adultes sauvages issues des souches AChE Del E5,6, à 32°C, après inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 10 nM de chlorpyrifos-oxon. **(A)** Le nerf phrénique a été stimulé par une simple impulsion (150  $\mu$ s - 0,2 Hz) ou pendant 600 ms aux fréquences indiquées en respectant un intervalle de 30 secondes entre chaque contraction. **(B)** Diminution des réponses téaniques des héli-diaphragmes de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 en fonction de la série de stimulation nerveuse appliquée à 70 et 80 Hz lors d'un protocole de fatigue. Le nerf phrénique a été stimulé par des impulsions de 600 ms, toutes les secondes.

incapables de développer des contractions tétaniques au-delà de 10 Hz. Ces expériences ont été également effectuées sur des préparations neuromusculaires isolées de souris sauvages issues des autres souches, et le même profil de réponses tétaniques a été obtenu.

Un protocole de fatigue a été appliqué après l'inhibition de l'AChE par 3  $\mu$ M de néostigmine (Fig. 35B). Dans ces conditions, une chute particulièrement marquée et très rapide des réponses tétaniques se produit lorsque le nerf est stimulé, toutes les secondes, à 50 Hz pendant 600 ms ( $n = 2$ ). En 10 secondes, l'amplitude des réponses est diminuée de plus de 85%. Il est à noter que le pic observé au début des réponses tétaniques est dû au fait que la réponse n'est pas soutenue pendant toute la durée de la stimulation, *i.e.* pendant 600 ms. Ces résultats confirment le rôle important de l'AChE dans le fonctionnement de la jonction neuromusculaire.

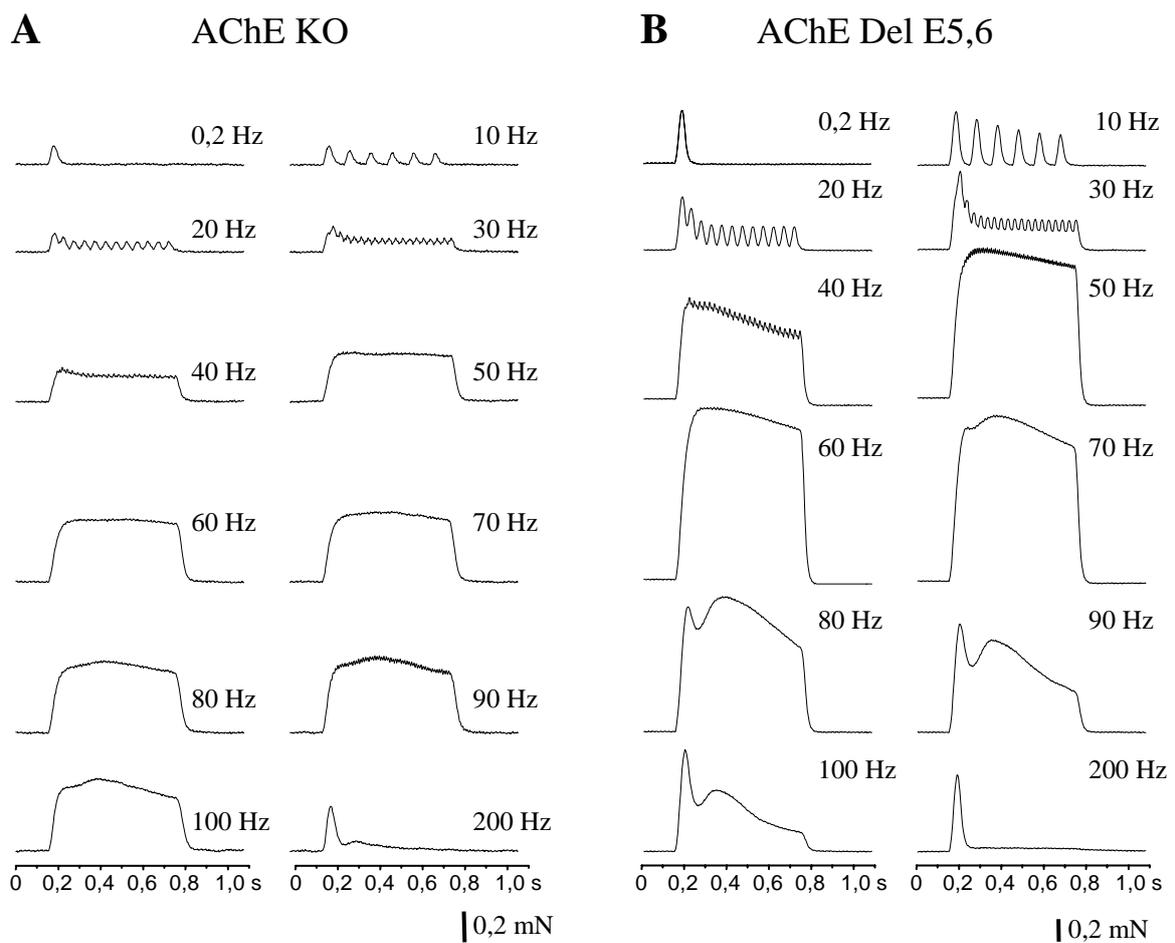
### c. Inhibition de la BChE

Pour obtenir des informations sur le rôle de la BChE dans le fonctionnement de la jonction neuromusculaire, cette enzyme a été inhibée en traitant préalablement des hémidiaphragmes isolés de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 avec 10 nM de chlorpyrifos-oxon (Fig. 36). Dans ces conditions, les préparations neuromusculaires isolées peuvent développer et maintenir des réponses tétaniques à des fréquences élevées (jusqu'à 100 Hz) et ce, malgré l'inhibition de la BChE ( $n = 2$ ). Cependant, à des fréquences plus élevées et non physiologiques (200 Hz), les réponses tétaniques ne sont pas maintenues pendant toute la durée de la stimulation (Fig. 36A). Il n'y a pas de différence notable entre les tracés obtenus avant et après l'inhibition de la BChE (voir Fig. 33B et 36A).

Finalement, l'inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 10 nM de chlorpyrifos-oxon n'engendre pas de chute marquée de l'amplitude des réponses tétaniques enregistrées au cours d'un protocole de fatigue (Fig. 36B). Seule, une légère diminution, de l'ordre de 25 % à 70 Hz et de 35 % à 80 Hz, se produit en 10 secondes. Elle est similaire à celle observée au niveau des préparations neuromusculaires non traitées (voir Fig. 33C).

### 3.1.1.3. Muscles de souris génétiquement modifiées dans les conditions contrôles

Des enregistrements de la force contractile au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris génétiquement modifiées ont été réalisés dans le but de déterminer l'influence qu'exercent certaines formes moléculaires de cholinestérases dans



**Figure 37.** Enregistrements de la force contractile des hémi-diaphragmes de souris adultes AChE KO (**A**) et AChE Del E5,6 (**B**). Le nerf phrénique a été stimulé par une simple impulsion (150  $\mu$ s - 0,2 Hz) ou pendant 600 ms aux fréquences indiquées en respectant un intervalle de 30 secondes entre chaque contraction.

le fonctionnement global du muscle lorsque celui-ci est stimulé par son nerf-moteur. Dans les conditions contrôles, les héli-diaphragmes isolés de souris AChE KO peuvent développer des contractions téaniques mais dans une gamme de fréquence étroite (Fig. 37A). En particulier, ils sont incapables de développer une contraction téanique provoquée par une stimulation nerveuse appliquée à des fréquences supérieures à 100 Hz.

Les héli-diaphragmes isolés des souris AChE Del E5,6 peuvent également développer des contractions téaniques mais qui sont maintenues dans une gamme de fréquence encore plus étroite que celle des souris AChE KO (Fig. 37B).

Nous avons également caractérisé la force contractile au niveau des souris AChE Del E6, AChE Del E5/neo et PRiMA KO. Les résultats obtenus montrent que les préparations neuromusculaires isolées de souris AChE Del E6 peuvent développer des contractions téaniques dans une large gamme de fréquence. En effet, le muscle répond toujours à une stimulation nerveuse appliquée à 200 Hz (Fig. 38A). Par contre, à partir de 70 Hz, la réponse téanique n'est pas maintenue dans le temps. Il semble donc que les souris AChE Del E6 soit moins affectées par la mutation que les souris AChE KO et AChE Del E5,6.

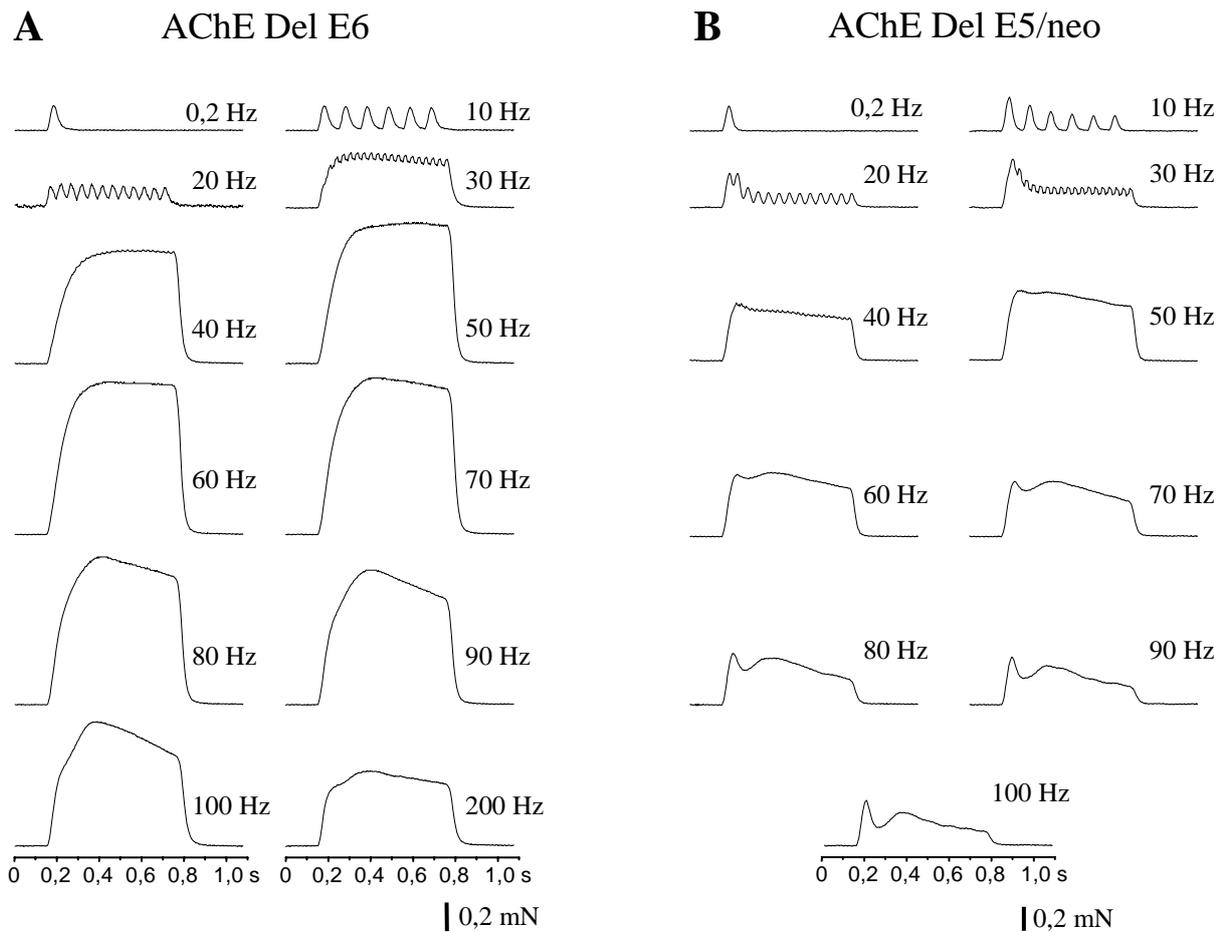
Les héli-diaphragmes de souris AChE Del E5/neo peuvent également développer des réponses téaniques mais, dès 40 Hz, ces réponses présentent une dépression (Fig. 38B).

La force contractile développée par des préparations neuromusculaires de souris PRiMA KO est similaire à celle des souris sauvages (Fig. 38C). Il est à noter que ces souris ne possèdent plus de cholinestérases (AChE et BChE) ancrées à la membrane par PRiMA. L'absence de cholinestérases ancrées à la membrane par PRiMA ne semble donc pas affecter la force contractile.

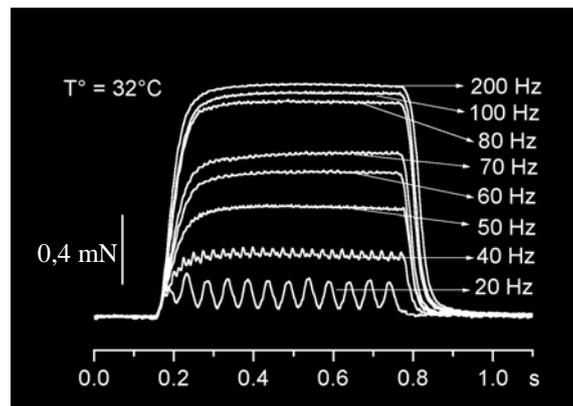
#### **3.1.1.4. Muscles de souris génétiquement modifiées traités par des agents anticholinestérasiques**

##### **a. Inhibition de l'AChE**

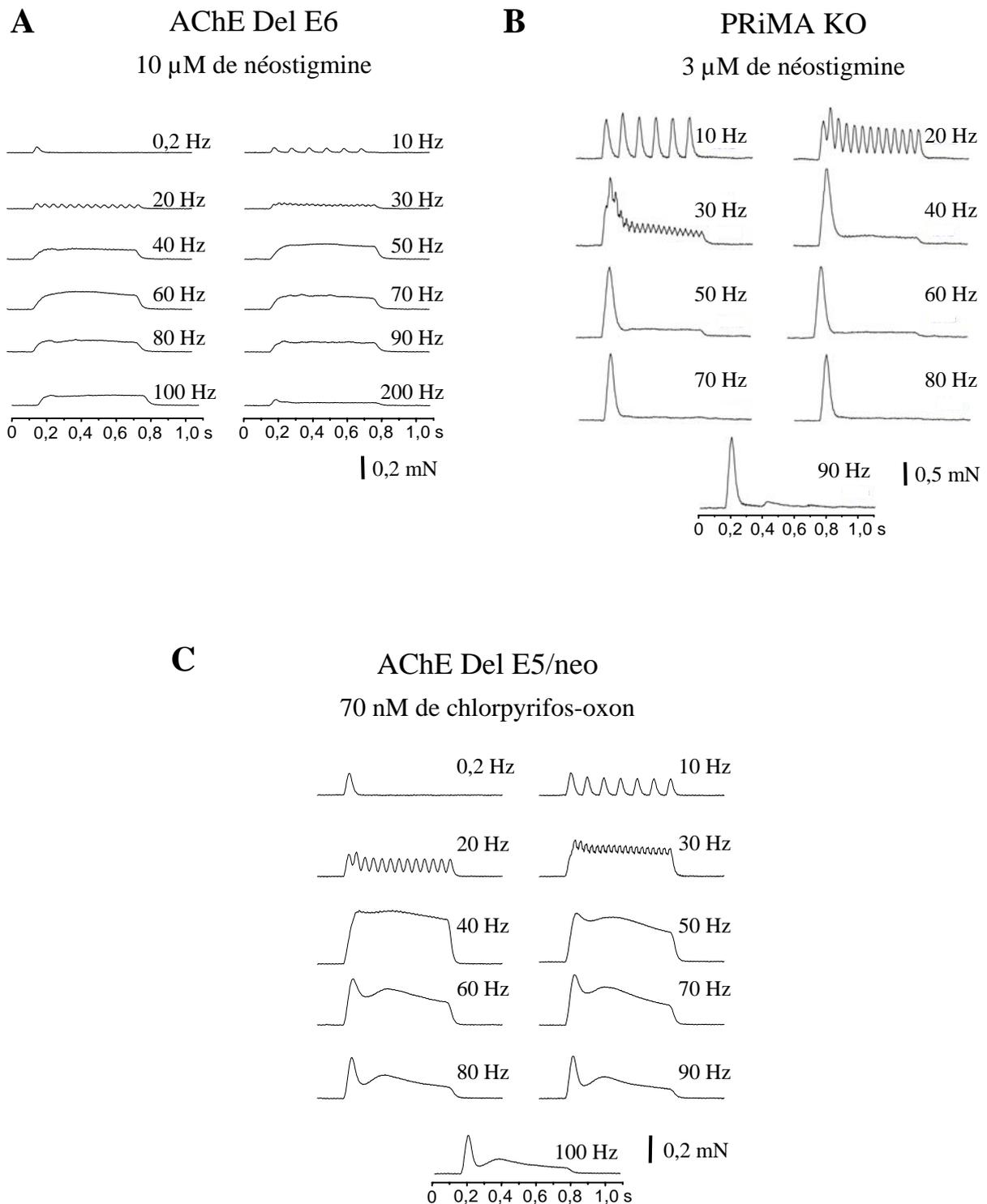
L'inhibition de l'AChE par la néostigmine (10  $\mu$ M) n'empêche pas les muscles des souris AChE Del E6 de répondre à la stimulation téanique (Fig. 39A) mais la force développée par ces derniers est très faible. En effet, son amplitude maximale est environ 10 fois plus petite que celle de la contraction musculaire développée dans les conditions contrôles. Par contre, l'inhibition de l'AChE par la néostigmine (3  $\mu$ M), au niveau des



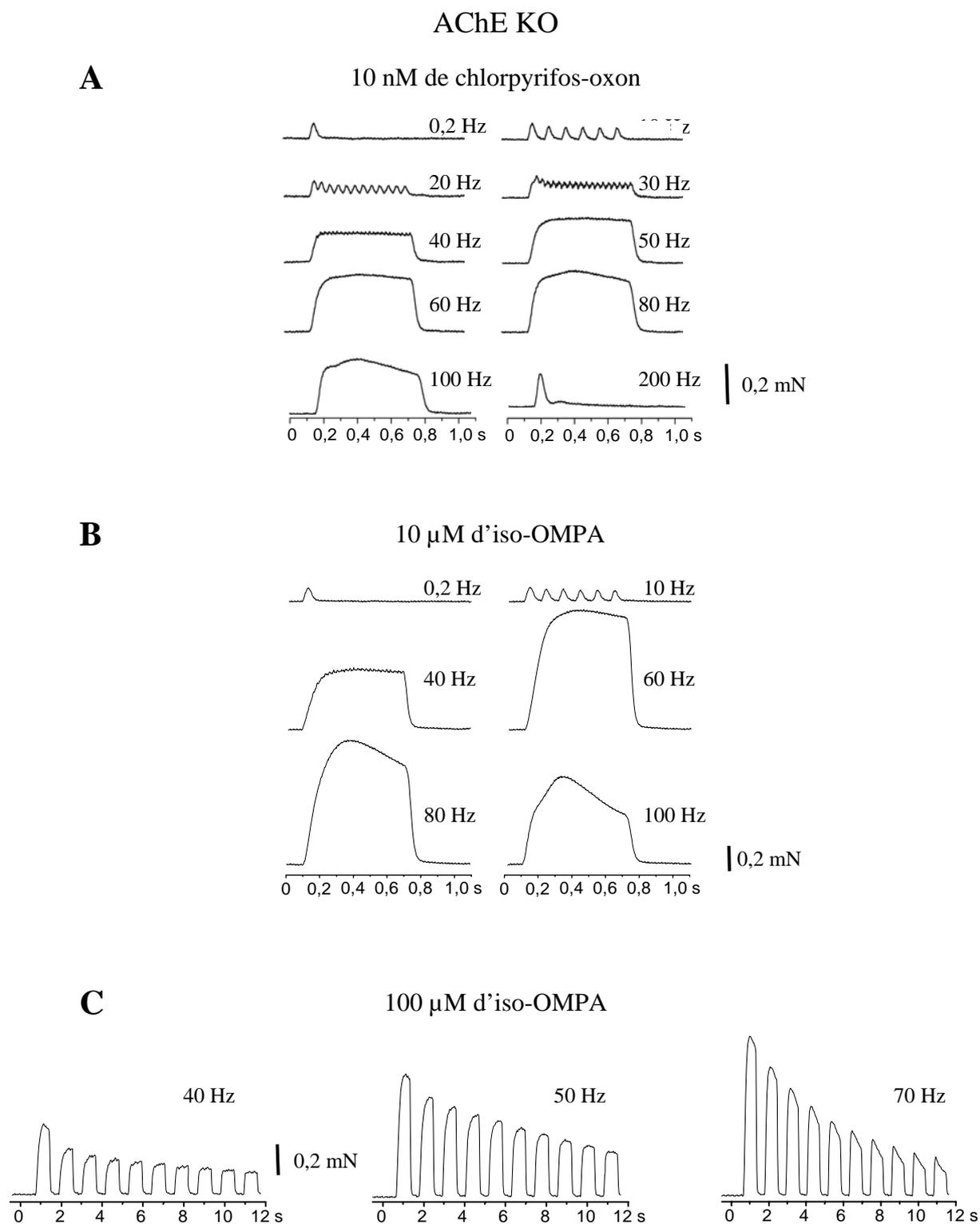
**C** PRiMA KO



**Figure 38.** Enregistrements de la force contractile des héli-diaphragmes de souris adultes AChE Del E6 (A), AChE Del E5/neo (B) et PRiMA KO (C). Le nerf phrénique a été stimulé par une simple impulsion (150  $\mu$ s - 0,2 Hz) ou pendant 600 ms aux fréquences indiquées en respectant un intervalle de 30 secondes entre chaque contraction.



**Figure 39.** Enregistrements de la force contractile des hémi-diaphragmes isolés de souris adultes AChE Del E6 après un traitement préalable avec 10  $\mu$ M de néostigmine (A), de souris PRiMA KO après un traitement préalable avec 3  $\mu$ M de néostigmine (B) et de souris AChE Del E5/neo après un traitement préalable avec 70  $\mu$ M de chlorpyrifos-oxon (C). Le nerf phrénique a été stimulé par une simple impulsion (150  $\mu$ s - 0,2 Hz) ou pendant 600 ms aux fréquences indiquées en respectant un intervalle de 30 secondes entre chaque contraction.



**Figure 40.** Enregistrements de la force contractile des héli-diaphragmes isolés de souris adultes AChE KO après un traitement préalable avec 10 nM de chlorpyrifos-oxon (**A**), après un traitement préalable avec 10  $\mu$ M d'iso-OMPA (**B**) à 32°C. Le nerf phrénique a été stimulé par une simple impulsion (150  $\mu$ s - 0,2 Hz) ou pendant 600 ms aux fréquences indiquées en respectant un intervalle de 30 secondes entre chaque contraction. (**C**) Dépression des réponses téaniques des héli-diaphragmes des souris AChE KO en fonction de la série de stimulation nerveuse appliquée à 40, 50 et 70 Hz lors d'un protocole de fatigue. Le nerf phrénique a été stimulé par des impulsions de 600 ms, toutes les secondes.

préparations neuromusculaires isolées de souris PRiMA KO (Fig. 39B), provoque une dépression très marquée et pour de faibles fréquences, *i.e.* dès 30 Hz.

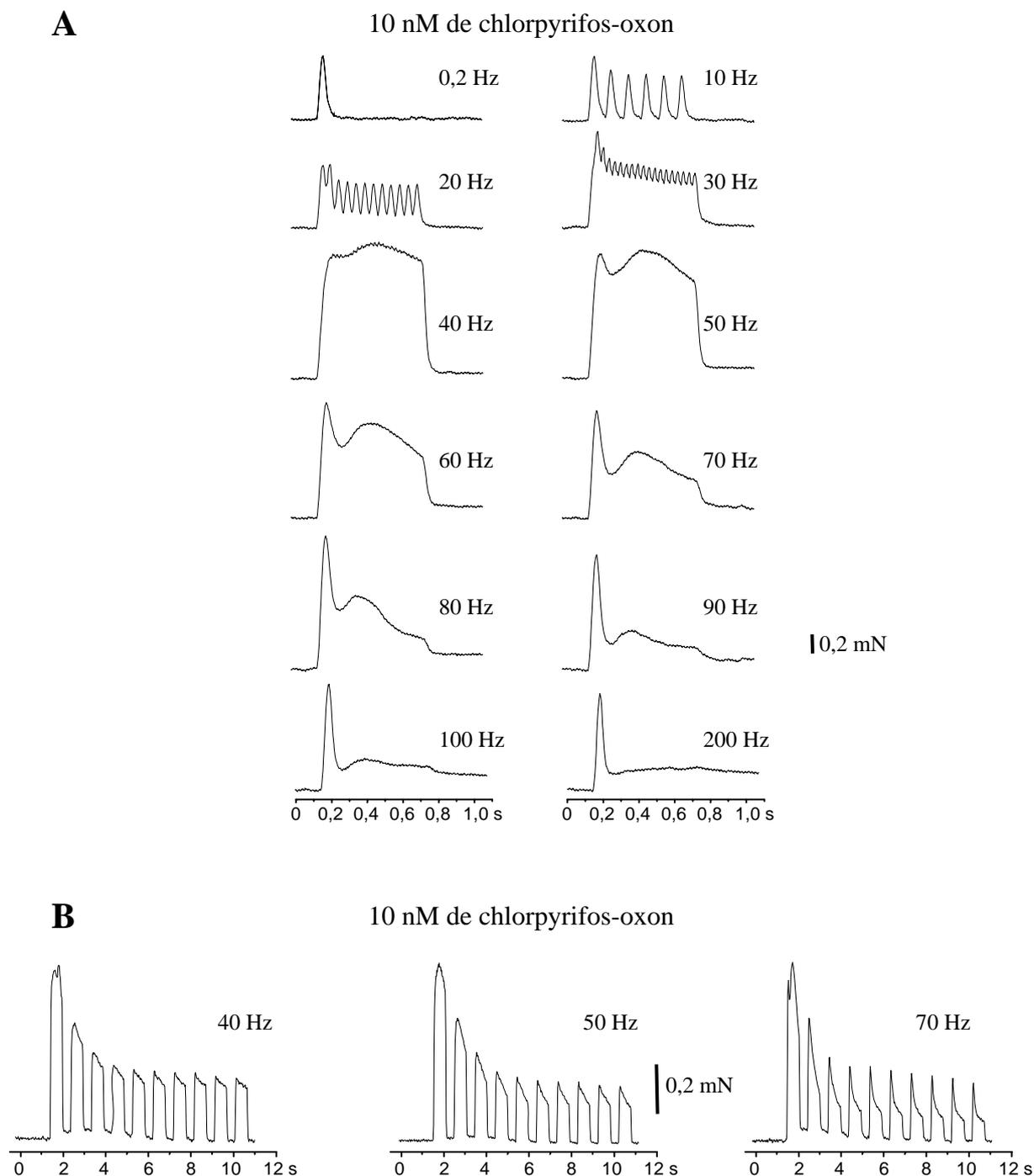
#### b. Inhibition de la BChE

Nous avons également observé les réponses téaniques des muscles des souris AChE Del E5/neo après un traitement préalable avec 70 nM de chlorpyrifos-oxon (Fig. 39C). Dans ces conditions, la BChE est totalement inhibée alors que l'AChE ne l'est que partiellement. Les muscles répondent aux stimulations téaniques mais la dépression des réponses est plus marquée par rapport à celles obtenues dans les conditions contrôles.

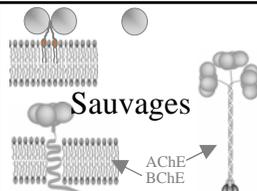
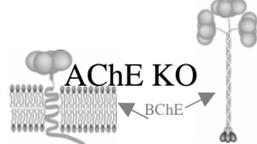
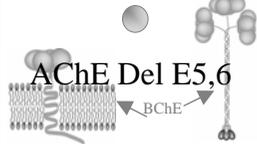
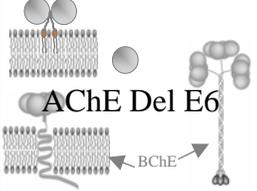
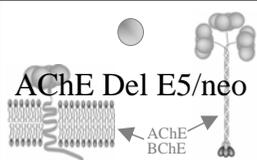
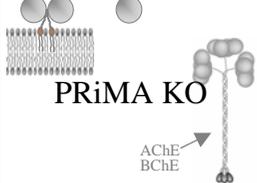
L'inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 10 nM de chlorpyrifos-oxon ou 10  $\mu$ M d'Iso-OMPA des muscles prélevés sur des souris AChE KO provoque une dépression des réponses téaniques enregistrées suite à une stimulation nerveuse appliquée à 80 et 100 Hz (Fig. 40A, B). De plus, la dépression des contractions téaniques successives, enregistrées lors d'un protocole de fatigue, est nettement plus marquée à 70 Hz qu'à 40 Hz au niveau des muscles de souris AChE KO, après l'inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 100  $\mu$ M d'iso-OMPA (Fig. 40C). En effet, la diminution de l'amplitude de la réponse téanique est de 76 % à 70 Hz et de 67 % à 40 Hz. Il est à souligner que, lorsque la BChE est inactive, la dépression de la réponse téanique des muscles où l'AChE est absente (*i.e.* souris AChE KO) est plus importante que celle détectée au niveau des muscles de souris sauvages où l'AChE est présente (voir Fig. 36 et 40C).

L'inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 10 nM de chlorpyrifos-oxon des préparations neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 entraîne une dépression des réponses téaniques beaucoup plus marquée et plus précoce puisqu'elle survient dès 50 Hz (Fig. 41A). De plus, la diminution de l'amplitude des contractions téaniques successives à 40 Hz (64 %) est quasiment identique à celle observée à 70 Hz (68 %) lorsque la BChE est inhibée au préalable par un traitement avec 10 nM de chlorpyrifos-oxon (Fig. 41B). Les effets de l'inhibition de la BChE sont plus marqués chez les souris AChE Del E5,6 que chez les souris AChE KO. Il semble donc que la BChE joue un rôle plus important au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 qu'au niveau de celles des souris AChE KO.

## AChE Del E5,6



**Figure 41.** Enregistrements de la force contractile des hémi-diaphragmes isolés de souris adultes AChE Del E5,6 après un traitement préalable avec 10 nM de chlorpyrifos-oxon   32 C. **(A)** Le nerf phrénique a été stimulé par une simple impulsion (150  $\mu$ s - 0,2 Hz) ou pendant 600 ms aux fréquences indiquées en respectant un intervalle de 30 secondes entre chaque contraction. **(B)** Dépression des réponses tétaniques des hémi-diaphragmes des souris AChE Del E5,6 en fonction de la série de stimulation nerveuse appliquée à 40, 50 et 70 Hz lors d'un protocole de fatigue. Le nerf phrénique a été stimulé par des impulsions de 600 ms, toutes les secondes.

Souris	Conditions contrôles	Inhibition de l'AChE	Inhibition la BChE
 <p><b>Sauvages</b></p>	Capacité de développer et de maintenir des réponses téaniques entre 10 et 200 Hz (Fig. 33A,B)	Incapacité de développer des réponses téaniques au-delà de 10 Hz (Fig. 35)	Capacité de développer et de maintenir des réponses téaniques entre 10 et 200 Hz mais incapacité de les maintenir au-delà de 100 Hz (Fig. 36)
 <p><b>AChE KO</b></p>	Capacité de développer des réponses téaniques jusqu'à 100 Hz mais incapacité de les maintenir au-delà de 60 Hz (Fig. 37A)		Capacité de développer des réponses téaniques entre 10 et 100 Hz mais incapacité de les maintenir au-delà de 60 Hz (Fig. 40)
 <p><b>AChE Del E5,6</b></p>	Capacité de développer des réponses téaniques jusqu'à 100 Hz mais incapacité de les maintenir au-delà de 30 Hz (Fig. 37B)		Capacité de développer des réponses téaniques entre 10 et 90 Hz mais incapacité de les maintenir au-delà de 40 Hz (Fig. 41)
 <p><b>AChE Del E6</b></p>	Capacité de développer des réponses téaniques jusqu'à 200 Hz mais incapacité de les maintenir au-delà de 60 Hz (Fig. 38A)	Capacité de développer des réponses téaniques entre 10 et 100 Hz mais incapacité de les maintenir au-delà de 60 Hz et la force développée est nettement plus faible comparée aux conditions contrôles (Fig. 39A)	
 <p><b>AChE Del E5/neo</b></p>	Capacité de développer des réponses téaniques jusqu'à 100 Hz mais incapacité de les maintenir au-delà de 40 Hz (Fig. 38B)	Capacité de développer des réponses téaniques entre 10 et 100 Hz mais incapacité de les maintenir au-delà de 30 Hz (Fig. 39C)	
 <p><b>PRiMA KO</b></p>	Capacité de développer et de maintenir des réponses téaniques entre 10 et 200 Hz (Fig. 38C)	Incapacité de développer des réponses téaniques au-delà de 20 Hz (Fig. 39B)	

**Tableau 10.** Récapitulatif des résultats obtenus concernant la caractérisation de la contraction musculaire provoquée par la stimulation nerveuse. Les couleurs indiquent les résultats qui, comparés les uns par rapport aux autres, sont surprenants.

L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le Tableau 10. Ils montrent que les héli-diaphragmes isolés de souris sauvages et traités avec des inhibiteurs de l'AChE sont incapables de développer des contractions téaniques au-delà de 10 Hz. Or, ce n'est pas le cas pour les muscles de souris AChE KO (totalement dépourvus d'AChE) dans les conditions contrôles. Ces résultats indiquent que la décroissance de la réponse téanique est moins perceptible au niveau des muscles où l'AChE est absente qu'au niveau des muscles où elle est inactive, ce qui suggère fortement que les souris AChE KO compensent, éventuellement par un processus d'adaptation, l'absence d'AChE. Les dépressions plus marquées des réponses téaniques des muscles de souris où l'AChE, ou certaines de ses formes moléculaires, sont absentes, après l'inhibition de la BChE, nous permettent de penser que la BChE joue un rôle plus important dans les jonctions neuromusculaires où l'AChE, ou certaines de ses formes moléculaires, sont absentes que dans celles où toutes les formes moléculaires de l'AChE sont présentes. Là, encore, ces résultats suggèrent l'existence d'un phénomène compensateur face à l'absence d'AChE dans la fente synaptique.

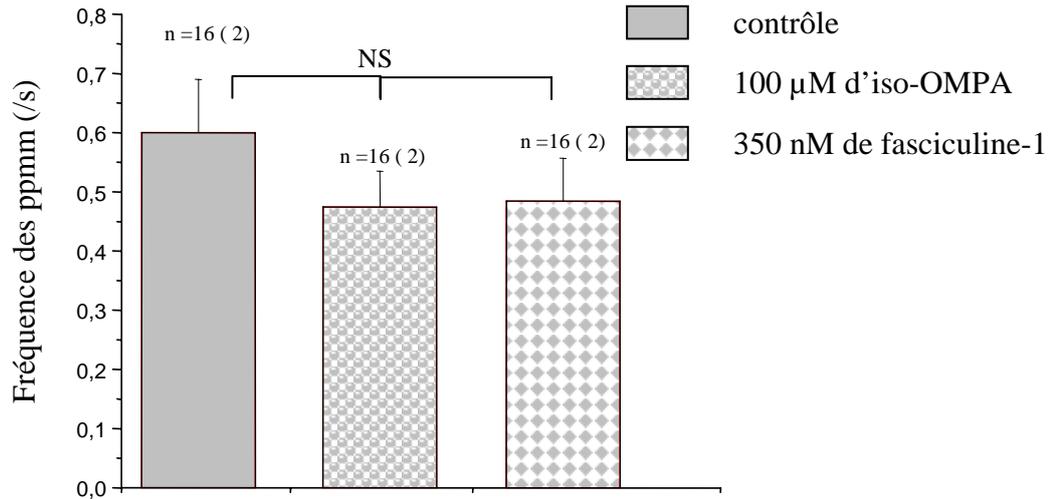
### **3.1.2. Caractérisation de la libération quantique d'ACh**

La libération quantique peut être soit provoquée par l'influx nerveux soit spontanée et elle donne lieu à des réponses synaptiques. L'amplitude des réponses synaptiques varie en fonction du diamètre de la fibre musculaire. En effet, elle est d'autant plus importante que le diamètre de la fibre est petit. L'amplitude des réponses synaptiques est donc inversement proportionnelle au diamètre de la fibre musculaire [Katz and Thesleff, 1957]. Par conséquent, elle dépend des propriétés passives des fibres musculaires, telles que leur résistances et capacités membranaires.

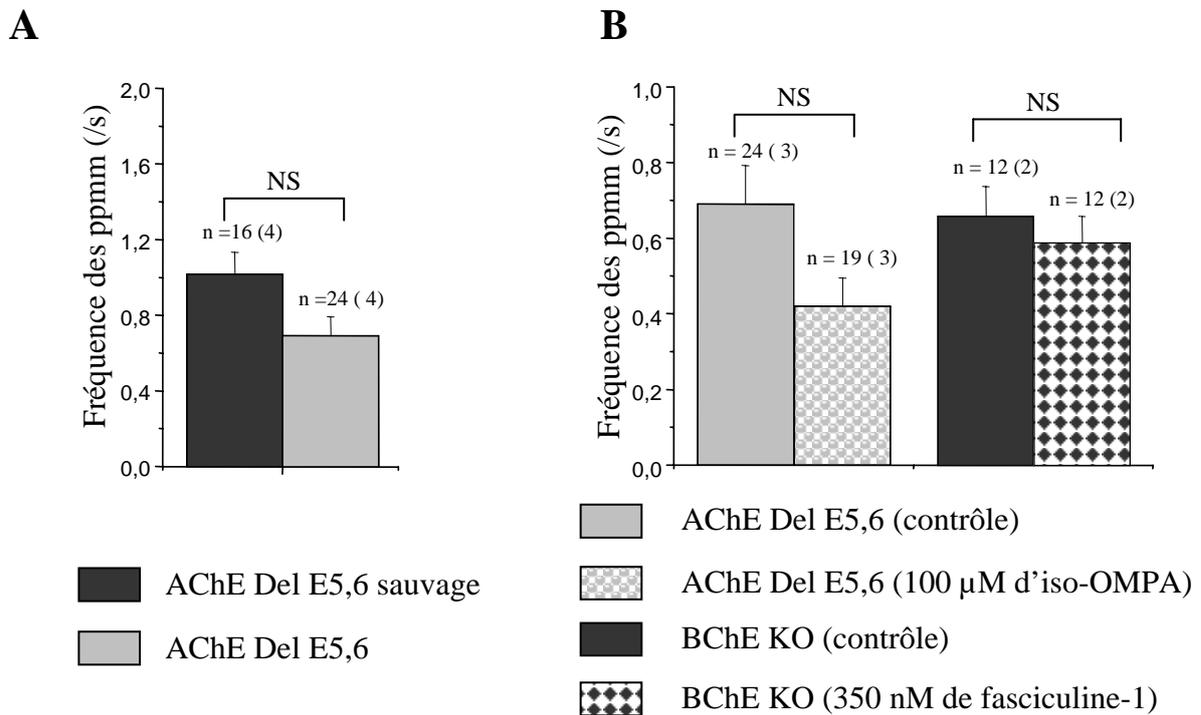
#### **3.1.2.1. Fréquence des potentiels de plaque motrice miniatures**

##### **a. Muscles de souris sauvages traités par des agents anticholinestérasiques**

Après avoir enregistré un grand nombre de ppmm au niveau de différentes jonctions neuromusculaires de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 dans les conditions contrôles, c'est-à-dire dans un milieu de Krebs-Ringer normal (2 mM de  $\text{CaCl}_2$  ;



**Figure 42.** Fréquences des ppmm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 dans un milieu de Krebs-Ringer normal (*i.e.* contenant 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM MgCl<sub>2</sub>) avant et après l'inhibition successive de la BChE puis de l'AChE. Moyenne ± ESM de n jonctions, le chiffre entre parenthèses indiquant le nombre de muscles étudiés. NS: non significatif.



**Figure 43. (A)** Comparaison des fréquences des ppmm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages et mutantes des souches AChE Del E5,6 dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM MgCl<sub>2</sub>). **(B)** Fréquences des ppmm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 et BChE KO avant et après l'inhibition des cholinestérases dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM MgCl<sub>2</sub>). NS: non significatif.

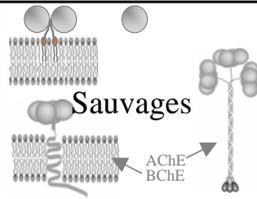
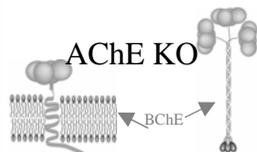
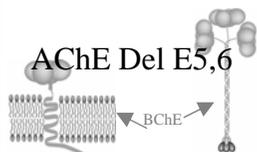
1 mM de  $MgCl_2$ ), nous avons successivement inhibé la BChE, par un traitement préalable avec 100  $\mu M$  d'iso-OMPA, puis l'AChE avec 350 nM de fasciculine-1 (Fig. 42). Dans ces conditions, les fréquences des ppmm obtenues avant et après les inhibitions successives des cholinestérases ne sont pas significativement différentes. Ces résultats indiquent que l'inhibition de la BChE et/ou de l'AChE ne modifie pas notablement la fréquence des ppmm. La libération quantique spontanée d'ACh, chez les souris sauvages ne dépend donc pas de l'activité des cholinestérases.

#### b. Muscles de souris génétiquement modifiées dans les conditions contrôles

Nous avons caractérisé la fréquence des ppmm au niveau de jonctions neuromusculaires de souris génétiquement modifiées dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,5 mM de  $CaCl_2$ ; 5 mM de  $MgCl_2$ ) puis nous avons comparé cette fréquence à celle de leurs témoins respectifs (*i.e.* souris sauvages issues de la même souche) dans les mêmes conditions expérimentales (Fig. 43A). Il est à noter que, la fréquence des ppmm des souris AChE Del E5,6 est plus faible que celle des ppmm des souris témoins, mais pas de manière significative. Lorsque les formes moléculaires AChE<sub>H</sub> et AChE<sub>T</sub> sont absentes (souris AChE Del E5,6) ou que l'AChE est inactive (voir ci-dessus), il n'y a pas de modification notable de la fréquence des ppmm. La libération quantique spontanée d'ACh ne dépend donc ni de la présence des formes moléculaires AChE<sub>H</sub> et AChE<sub>T</sub> ni de l'activité de l'AChE.

#### c. Muscles de souris génétiquement modifiées traités par des agents anticholinestérasiques

L'inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 100  $\mu M$  d'iso-OMPA provoque une légère diminution, mais qui non significative, de la fréquence des ppmm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 (Fig. 43B). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment décrits dans la littérature et qui montrent que l'inhibition de la BChE, par le même traitement, n'affecte pas la fréquence des ppmm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO [Minic et al., 2003].

Souris	Conditions contrôles	Inhibition de l'AChE	Inhibition la BChE
 <p>Sauvages</p>		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> Aucun effet sur la fréquence des ppmm comparée aux conditions contrôles (Fig. 42) </div>	Aucun effet sur la fréquence des ppmm comparée aux conditions contrôles
 <p>AChE KO</p>			Aucun effet sur la fréquence des ppmm comparée aux conditions contrôles [Minic et al, 2003]
 <p>AChE Del E5,6</p>	Aucun effet sur la fréquence des ppmm comparée aux conditions contrôles (Fig. 43A )		Aucun effet sur la fréquence des ppmm comparée aux conditions contrôles (Fig. 43B)
 <p>BChE KO</p>		Aucun effet sur la fréquence des ppmm comparée aux conditions contrôles (Fig. 43B )	

**Tableau 11.** Récapitulatif des résultats obtenus concernant la caractérisation de la libération quantique spontanée d'ACh.

Finalement, l'inhibition de l'AChE par 350 nM de fasciculine-1 au niveau des jonctions neuromusculaires de souris BChE KO (*i.e.* qui n'expriment pas de BChE) ne modifie pas de façon significative la fréquence des ppm (Fig. 43B).

L'ensemble de ces résultats, qui sont résumés dans le Tableau 11 montre, que la libération quantique spontanée d'ACh ne dépend pas notablement de l'activité des cholinestérases au niveau des jonctions neuromusculaires squelettiques.

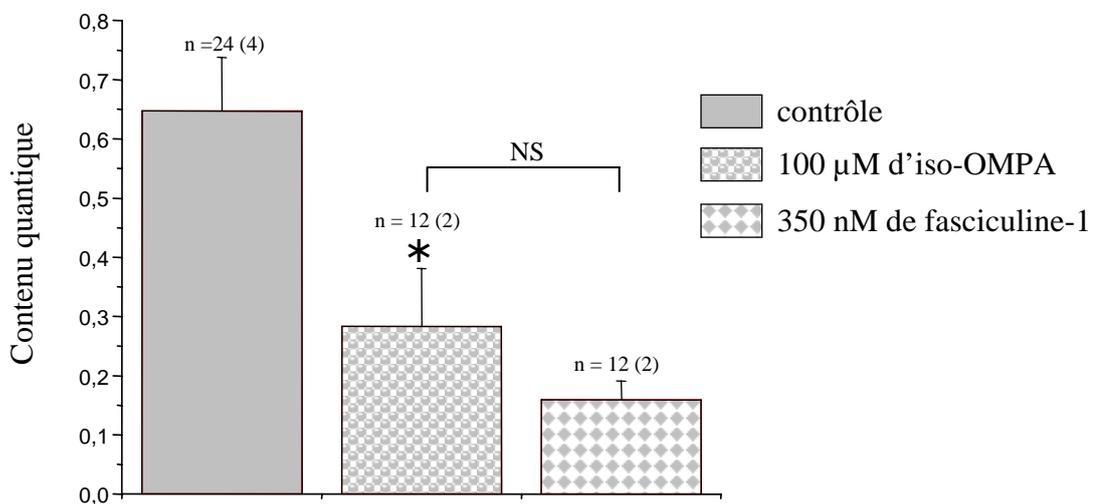
### 3.1.2.2. Contenu quantique

#### a. Muscles de souris sauvages traités par des agents anticholinestérasiques

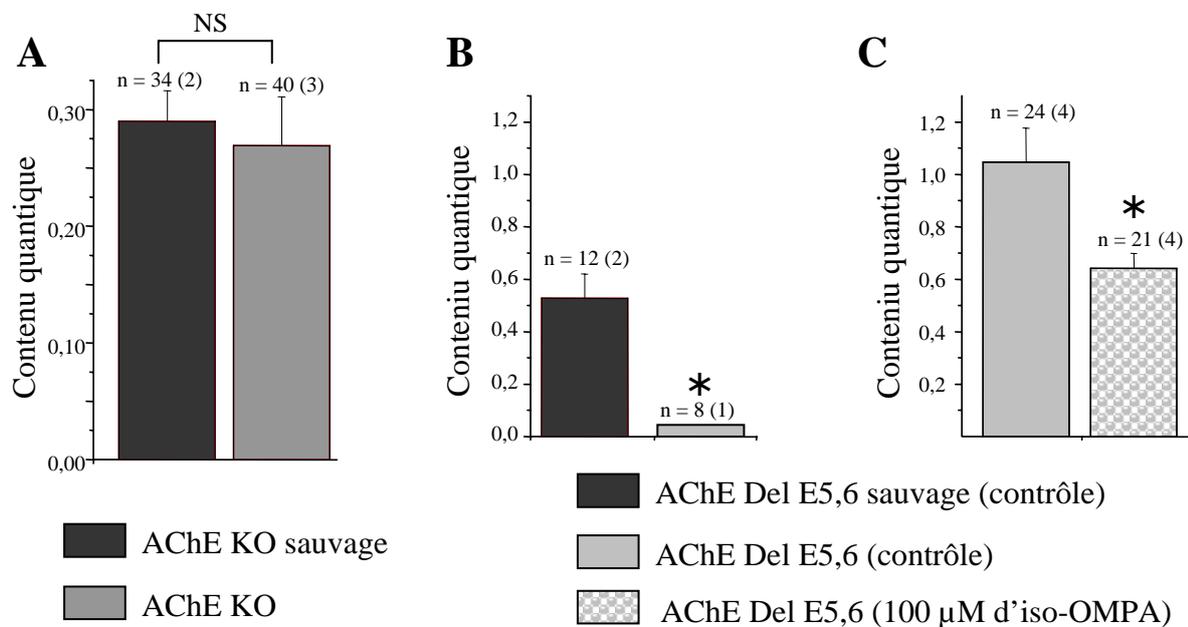
Nous avons étudié l'effet de l'inhibition des cholinestérases sur le contenu quantique estimé, à partir des potentiels de plaque motrice (ppm), par la méthode dite « des échecs » au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 100  $\mu$ M d'iso-OMPA diminue de moitié le contenu quantique (Fig. 44). Le fait que la BChE soit inactive, au niveau de jonctions neuromusculaires de souris sauvages, entraîne donc une réduction importante de la libération quantique d'ACh. De plus, lorsque la BChE est inactive, l'inhibition de l'AChE par 350 nM de fasciculine-1 ne modifie pas de façon significative le contenu quantique. Or il a été précédemment décrit dans la littérature que l'inhibition de l'AChE par 70 à 350 nM de fasciculine-2 augmentait le contenu quantique chez les souris sauvages issues de la souche AChE KO, comparés aux conditions contrôles [Minic et al., 2002]. Il semble donc que l'inhibition de l'activité AChE ne provoque une augmentation du contenu quantique que lorsque l'activité de la BChE est également inhibée, ce qui met en évidence le rôle probable de modulateur joué par la BChE au niveau de la jonction neuromusculaire.

#### b. Muscles de souris génétiquement modifiées dans les conditions contrôles

Le contenu quantique déterminé à partir des ppm enregistrés au niveau des préparations neuromusculaires de souris génétiquement modifiées a été estimé dans les conditions contrôles, *i.e.* en l'absence d'inhibiteurs de cholinestérases. Le contenu quantique estimé à partir des ppm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de



**Figure 44.** Comparaison des contenus quantiques déterminés, par la méthode dite «des échecs», à partir des ppm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires des souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,4 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) avant et après l'inhibition successive de la BChE par un traitement préalable avec 100  $\mu\text{M}$  d'iso-OMPA puis de l'AChE avec 350 nM de fasciculine-1. Moyenne  $\pm$  ESM de n jonctions, le chiffre entre parenthèses indiquant le nombre de muscles étudiés. NS: non significatif; \*:  $p < 0,05$ .



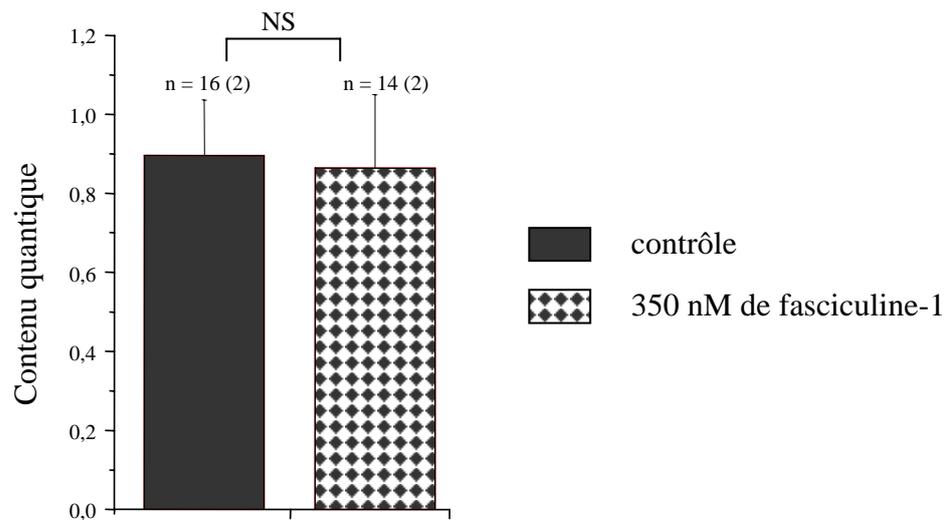
**Figure 45.** Comparaison du contenu quantique déterminé à partir des ppm enregistrés dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) au niveau des jonctions neuromusculaires (A) de souris sauvages et de souris AChE KO et (B) de souris sauvages et de souris AChE Del E5,6. (C) Effet de l'inhibition de la BChE sur le contenu quantique estimé à partir des ppm enregistrés dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (1 mM CaCl<sub>2</sub>; 6 mM MgCl<sub>2</sub>). Moyenne ± ESM de n jonctions, le chiffre entre parenthèses indiquant le nombre de muscles étudiés. NS: non significatif; \*: p<0,05.

souris AChE KO, dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,5 mM de CaCl<sub>2</sub>; 5 mM de MgCl<sub>2</sub>), est similaire à celui des souris sauvages issues de la même souche, estimé dans les mêmes conditions (Fig. 45A). Ce résultat est surprenant car il montre que l'absence de toutes les formes moléculaires de l'AChE au niveau des jonctions neuromusculaires (*i.e.* souris AChE KO) ne modifie pas notablement le contenu quantique, alors qu'il est augmenté lorsque l'AChE est inactive au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages issues de la souche AChE KO [Minic et al., 2002] (cf. discussion).

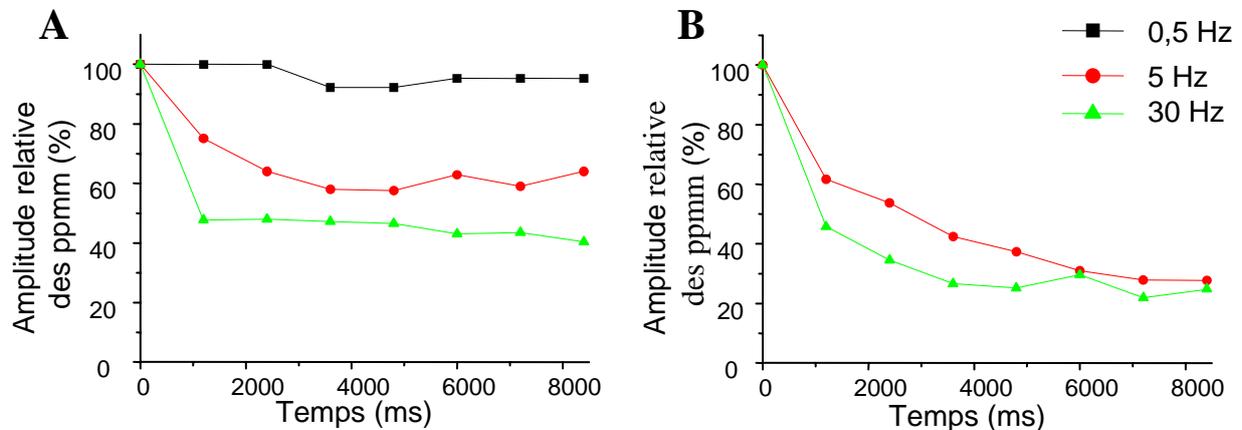
Suite aux résultats précédents, il était logique de penser que le contenu quantique déterminé à partir des ppm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 soit semblable à celui des souris sauvages. Or, dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,5 mM de CaCl<sub>2</sub>; 5 mM de MgCl<sub>2</sub>), une diminution importante du contenu quantique est observée chez les souris AChE Del E5,6, comparées aux souris sauvages (Fig. 45B). Dans ces conditions, la valeur du contenu quantique déterminé chez les souris AChE Del E5,6 était trop faible pour pouvoir détecter, par la suite, une éventuelle modification de ce contenu par des inhibiteurs des cholinestérases. Afin d'augmenter cette valeur, nous avons changé la composition en calcium et en magnésium du milieu physiologique. En effet, il est connu que la valeur du contenu quantique estimé à partir des ppm dépend non seulement de la concentration extracellulaire de calcium [Andreu and Barrett, 1980] [Parnas et al., 1986] [Hochner et al., 1991] mais également de celle de magnésium [Minic et al., 2002] : la valeur du contenu quantique est d'autant plus augmentée que la concentration de calcium est forte et que celle de magnésium est faible. Dans les expériences suivantes, la concentration de calcium extracellulaire a donc été doublée (1 mM vs 0,5 mM), sans modifier notablement celle de magnésium.

c. Muscles de souris génétiquement modifiées traités par des agents anticholinestérasiques

Dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (1 mM de CaCl<sub>2</sub>; 6 mM de MgCl<sub>2</sub>), l'inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 100 µM d'iso-OMPA provoque une diminution du contenu quantique estimé à partir des ppm enregistrés chez des souris AChE Del E5,6 (Fig. 45C). Il est à noter que ce même traitement entraîne également une diminution du contenu quantique chez les souris AChE KO [Minic et al., 2003]. Il apparaît donc qu'en absence d'AChE ou de certaines de ses formes moléculaires au niveau de la jonction neuromusculaire, l'inhibition de l'activité de la BChE provoque une baisse du



**Figure 46.** Comparaison du contenu quantique des ppm enregistrés dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,6 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) au niveau des jonctions neuromusculaires de souris BChE KO avant et après l'inhibition de l'AChE par 350 nM de fasciculine-1. NS: non significatif.



**Figure 47.** Amplitude des ppm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO en fonction du temps à différentes fréquences de stimulation avant (A) et après (B) l'inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 100  $\mu\text{M}$  d'iso-OMPA. Dans chaque cas, l'amplitude des ppm est exprimée par rapport à celle déterminée lors de la première stimulation à une fréquence donnée.

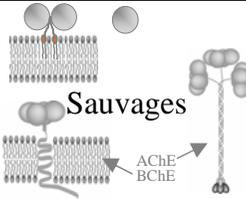
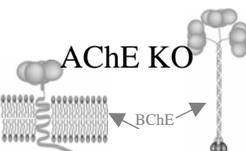
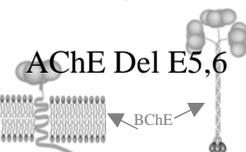
nombre moyen de quanta entrant dans la composition des ppm, *i.e.* diminue la libération quantique d'ACh. Ces résultats sont à mettre en relation avec le fait que lorsque la BChE est inactive au niveau de jonctions neuromusculaires de souris sauvages, une réduction importante de la libération quantique d'ACh est observée (cf. paragraphe 3.1.2.2.a). Ils suggèrent fortement que seule la BChE est impliquée dans la diminution du contenu quantique.

De plus, l'inhibition de l'AChE par 350 nM de fasciculine-1 au niveau des jonctions neuromusculaires de souris BChE KO n'entraîne pas de modification significative du contenu quantique estimé à partir des ppm (Fig. 46). Ce résultat est surprenant car il montre qu'en l'absence de BChE au niveau de la jonction neuromusculaire, l'inhibition de l'activité de l'AChE ne modifie pas le contenu quantique alors que cette inhibition, dans les conditions contrôles engendre une augmentation de ce dernier (voir Fig. 44) (cf. paragraphe 3.1.2.2.a). L'ensemble de ces résultats est résumé dans le Tableau 12.

### 3.1.2.3. Amplitude des potentiels de plaque motrice

L'amplitude des ppm obtenus au niveau des préparations neuromusculaires de souris AChE KO a été étudiée en fonction du temps et à différentes fréquences de stimulation. Il est à noter qu'à la fréquence de 0,2 Hz, l'amplitude des ppm n'était pas modifiée de façon significative au cours du temps (résultats non montrés). Par contre, à des fréquences plus élevées (*i.e.*  $\geq 0,5$  Hz), l'amplitude des ppm, en fonction du temps, est d'autant plus diminuée que la fréquence est augmentée (Fig. 47). En particulier, à des fréquences de 5 et 30 Hz, l'amplitude des ppm est diminuée jusqu'à, respectivement, 40 et 60 % de sa valeur initiale. Cette diminution au cours du temps est accentuée lorsque la BChE est inhibée par un traitement préalable avec 100  $\mu$ M d'iso-OMPA. Dans ces conditions, elle est de 70 et 80 % à des fréquences de, respectivement, 5 et 30 Hz (Fig. 47B). En l'absence de toutes les formes moléculaires de l'AChE, la diminution de l'amplitude des ppm au cours du temps d'autant plus importante que la BChE est inactive.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que la modulation présynaptique de la libération quantique d'ACh dépend de l'activité de la BChE.

Souris	Conditions contrôles	Inhibition de l'AChE	Inhibition la BChE
 <p>Sauvages</p>		Augmentation du contenu quantique, comparé aux conditions contrôles [Minic <i>et al</i> ; 2002]	Diminution du contenu quantique, comparé aux conditions contrôles (Fig. 44)
 <p>AChE KO</p>	Aucune modification du contenu quantique, comparé aux souris sauvages (Fig. 45A)		Diminution du contenu quantique, comparé aux conditions contrôles [Minic <i>et al</i> ; 2003]
 <p>AChE Del E5,6</p>	Diminution du contenu quantique, comparé aux souris sauvages (Fig. 45B)		Diminution du contenu quantique, comparé aux conditions contrôles (Fig. 45C)
 <p>BChE KO</p>		Aucune modification du contenu quantique, comparé aux conditions contrôles (Fig. 46)	

**Tableau 12.** Récapitulatif des résultats obtenus concernant la caractérisation du contenu quantique estimé à partir des ppm enregistrés au niveau des préparations neuromusculaires des différentes souches de souris.

### 3.1.3. Caractérisation des cours temporels des réponses synaptiques

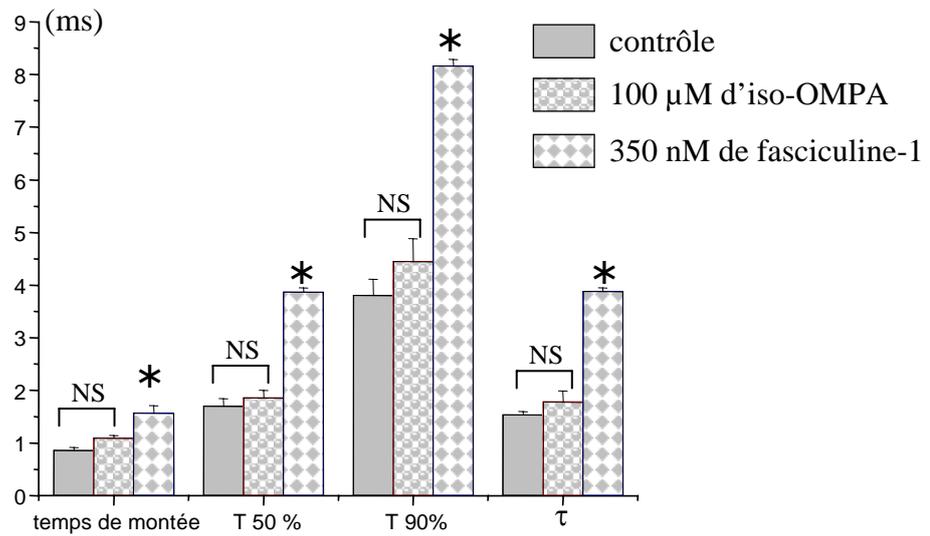
Le temps de montée et les décours temporels des réponses synaptiques sont proportionnels au temps d'activation des récepteurs nicotiniques postsynaptiques. Lorsque les cholinestérases ou certaines de leurs formes moléculaires sont absentes ou inactives au niveau de la synapse, les molécules d'ACh qui, après avoir activé les récepteurs nicotiniques à l'ACh (RnACh) ne sont pas hydrolysées, sont de nouveau libérées dans la fente synaptique et peuvent donc encore activer les RnACh. Ces interactions répétitives ACh-RnACh conduisent à une augmentation du cours temporel des réponses synaptiques qui sont donc prolongées [Katz and Miledi, 1973].

Afin de mettre en évidence les rôles fonctionnels des cholinestérases au niveau de l'élément postsynaptique, nous avons caractérisé le temps de montée, le décours temporel à 50% (ou temps de demi-décroissance, T 50%) et celui à 90 % (T 90%) ainsi que la constante de temps de l'exponentielle de la phase de décroissance ( $\tau$ ) des réponses synaptiques enregistrées au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages et génétiquement modifiées.

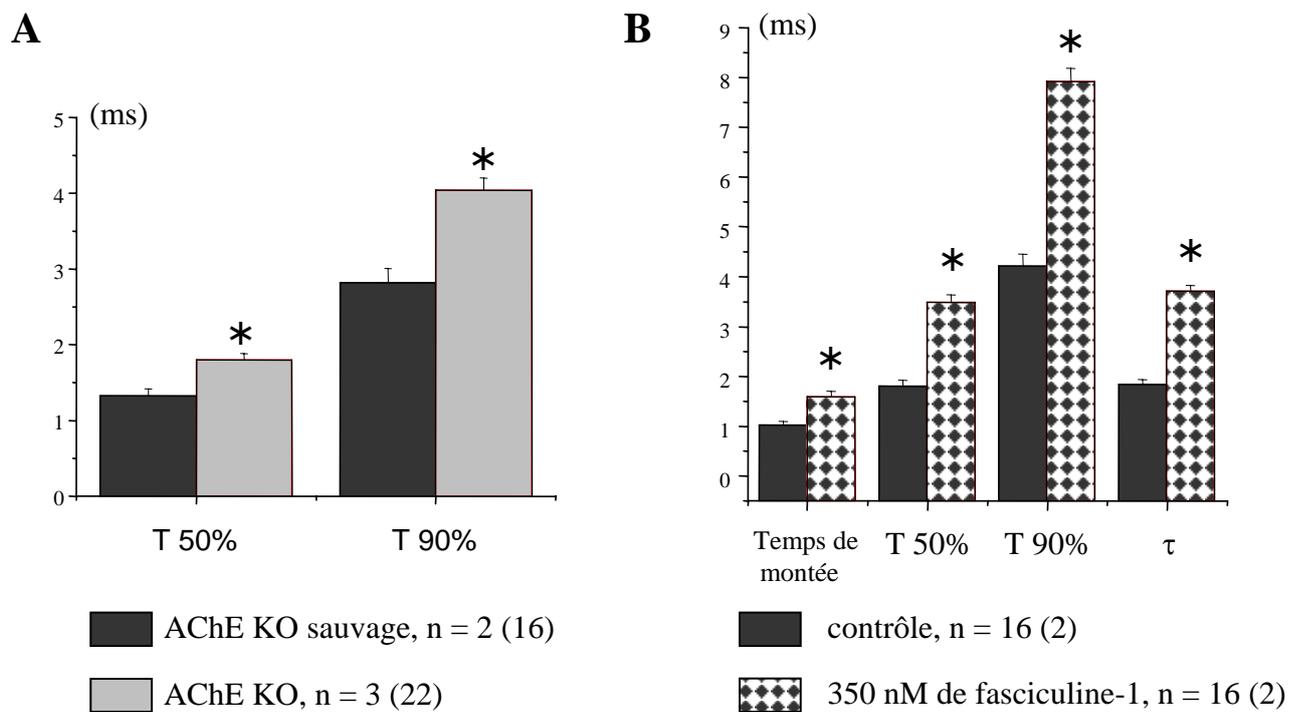
#### 3.1.3.1. Potentiels de plaque motrice miniatures

##### a. Muscles de souris sauvages traités par des agents anticholinestérasiques

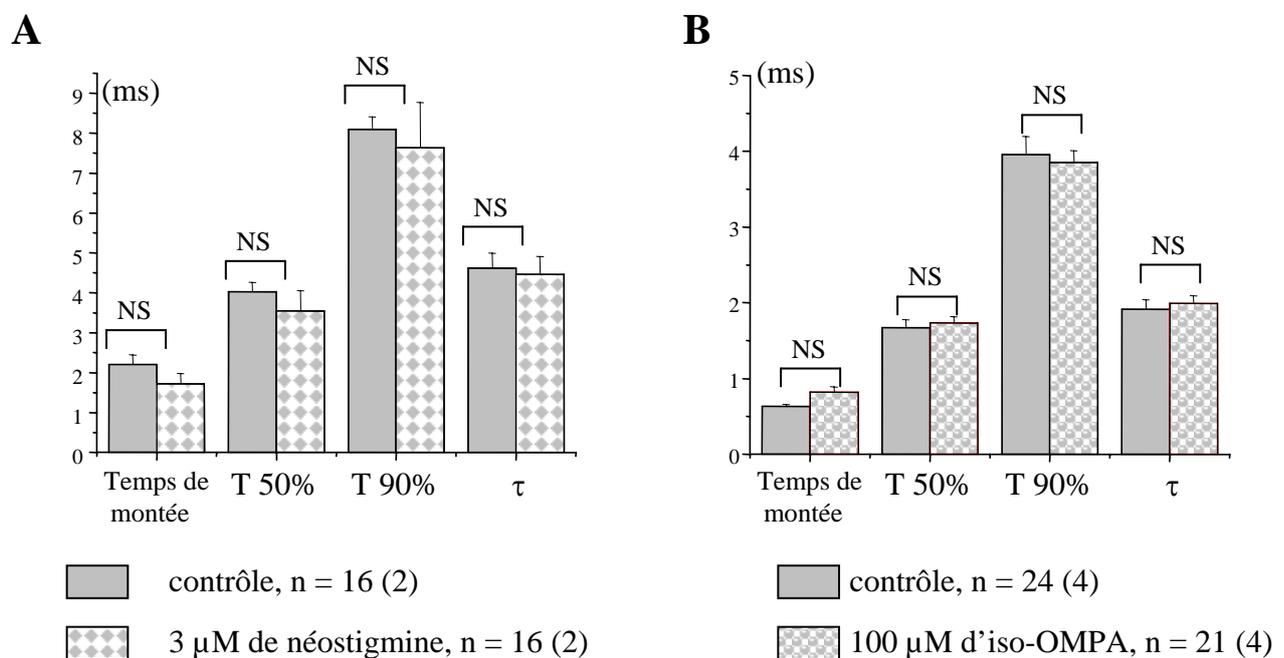
Aucune différence significative n'a été détectée au niveau du temps de montée, des décours temporels et de la constante de temps  $\tau$  des ppmm enregistrés chez les souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6, avant et après l'inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 100  $\mu$ M d'iso-OMPA (Fig. 48). Ces résultats indiquent que, chez les souris sauvages, l'hydrolyse de l'ACh ne dépend pas de l'activité de la BChE. Cependant, l'inhibition de l'AChE par la fasciculine-1 au niveau des jonctions neuromusculaires traitées préalablement avec 100  $\mu$ M d'iso-OMPA, produit une augmentation significative du temps de montée, des décours temporels et de la constante de temps  $\tau$  des ppmm (Fig. 48). Lorsque la BChE est inactive, l'inhibition de l'AChE engendre donc une prolongation très marquée des ppmm, ce qui signifie que les RnACh sont plusieurs fois sollicités au niveau de l'élément postsynaptique.



**Figure 48.** Comparaison des cours temporels des ppmm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 dans un milieu de Krebs-Ringer normal avant et après un traitement préalable avec 100 μM d'iso-OMPA (inhibition de la BChE) puis avec 350 nM de fasciculine-1 (inhibition de l'AChE). Moyenne ± ESM de (A) 20 jonctions au niveau de 4 muscles différents et (B) 24 jonctions au niveau de 4 muscles différents. NS: non significatif; \*:  $p < 0,05$ .



**Figure 49.** Comparaison des cours temporels des ppmm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) (A) et des souris BChE KO dans un milieu de Krebs-Ringer normal (2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) avant et après l'inhibition de l'AChE (B). \*:  $p < 0,05$ .



**Figure 50.** Comparaison des cours temporels des ppmm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 dans un milieu de Krebs-Ringer normal (2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) avant et après l'inhibition de l'AChE (A) et dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) avant et après l'inhibition de la BChE (B). Moyenne  $\pm$  ESM de n jonctions, le chiffre entre parenthèses indiquant le nombre de muscles étudiés. NS: non significatif.

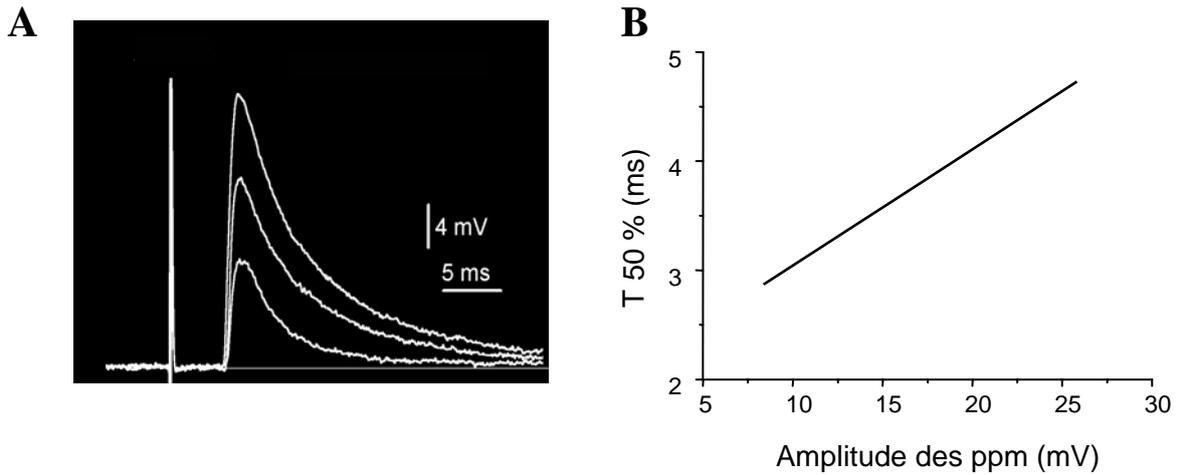
### b. Muscles de souris génétiquement modifiées dans les conditions contrôles

Les décours temporels à 50% et à 90% des ppmm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO sont augmentés comparés à ceux des souris sauvages issues de la même souche (Fig. 49A). Bien que cette augmentation puisse traduire l'activation répétitive des RnACh chez les souris AChE KO, elle est cependant inférieure à celle observée chez les souris sauvages après l'inhibition de l'AChE par la fasciculine-1 (voir Fig. 48). L'absence totale d'AChE au niveau de la jonction neuromusculaire provoque une augmentation des décours temporels des ppmm, mais cette augmentation est moins importante que celle observée lorsque l'AChE est inactive. Il semble donc que la concentration d'ACh dans la fente synaptique lorsque l'AChE est absente, ne soit pas la même que celle lorsque l'AChE est inactive. Là encore, ces résultats suggèrent fortement l'existence d'un phénomène compensateur au niveau des jonctions neuromusculaires de souris où l'AChE est absente.

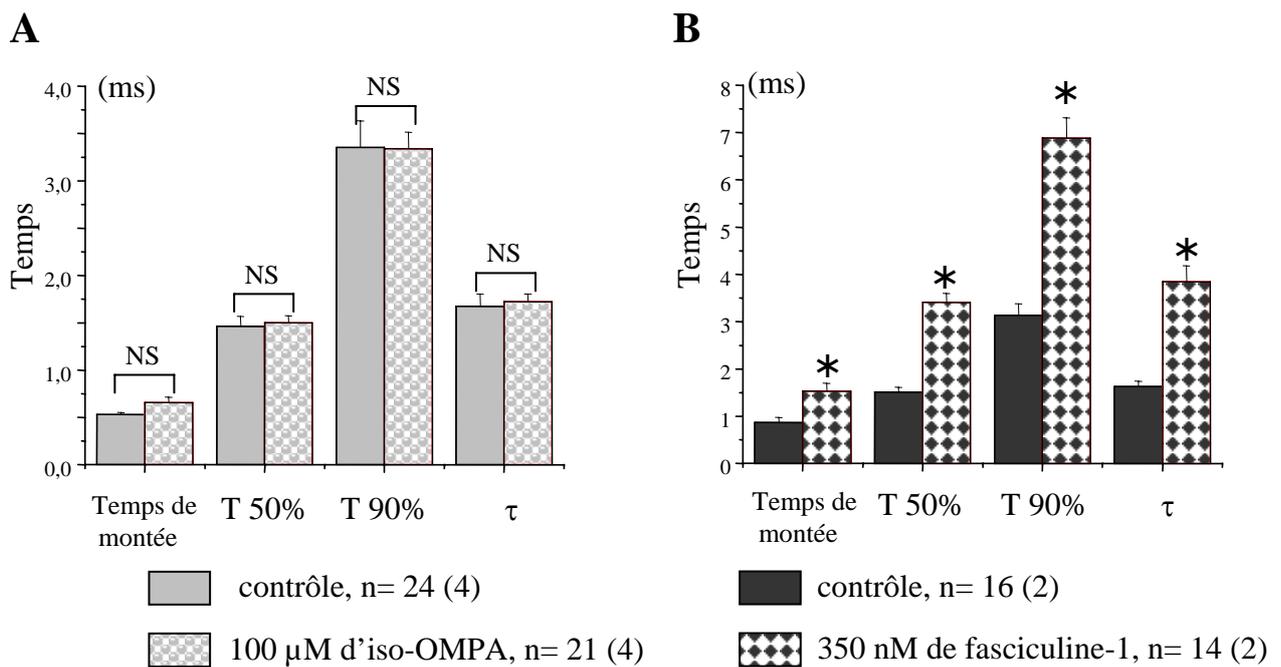
### c. Muscles de souris génétiquement modifiées traités par des agents anticholinestérasiques

L'inhibition de l'AChE par 350 nM de fasciculine-1 au niveau des jonctions neuromusculaires de souris BChE KO provoque une augmentation significative du temps de montée ainsi que des décours temporels et de la constante de temps  $\tau$  des ppmm (Fig. 49B). Cette augmentation est particulièrement marquée au niveau du décours temporel à 90% des ppmm. Ces résultats indiquent que, chez les souris dépourvues de BChE, l'hydrolyse de l'ACh dépend de l'activité de l'AChE. Par contre, lorsque l'AChE est inhibée par 3  $\mu$ M de néostigmine au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6, une légère diminution, mais non significative, du temps de montée et des décours temporels des ppmm est observée (Fig. 50A). L'absence de modification des cours temporels des ppmm, dans ces conditions, suggère fortement que les effets de l'inhibition des formes solubles de l'AChE ne sont pas perceptibles au niveau de l'élément postsynaptique. Ces résultats soulignent la faible importance du rôle des formes solubles au sein de la jonction neuromusculaire.

L'inhibition de la BChE par un traitement préalable avec 100  $\mu$ M d'iso-OMPA au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 n'entraîne pas de modifications notables du temps de montée, des décours temporels et de la constante de



**Figure 51.** Tracés de ppm enregistrés à une fréquence de 30 Hz (A) et décours temporel à 50 % (T 50 %) en fonction de l'amplitude des ppm. La droite représente la régression linéaire des points (B) au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO traitées avec 1,6  $\mu$ M de  $\mu$ -conotoxine GIIB dans un milieu de Krebs-Ringer normal.



**Figure 52.** Comparaison des cours temporels des ppm enregistrés dans un milieu de Krebs-Ringer modifié (0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 avant et après l'inhibition de la BChE (A) et de souris BChE KO avant et après l'inhibition de l'AChE (B). Moyenne  $\pm$  ESM de n jonctions, le chiffre entre parenthèses indiquant le nombre de muscles étudiés. NS: non significatif; \*:  $p < 0,05$ .

temps  $\tau$  des ppm (Fig. 50B). Ce résultat suggère fortement que le rôle principal de la BChE au niveau des jonctions neuromusculaires qui ne possèdent que la forme moléculaire soluble de l'AChE n'est pas l'hydrolyse de l'ACh au niveau de la fente synaptique. Il semble donc que le phénomène compensateur chez les souris AChE Del E5,6 n'implique pas l'activité enzymatique de la BChE.

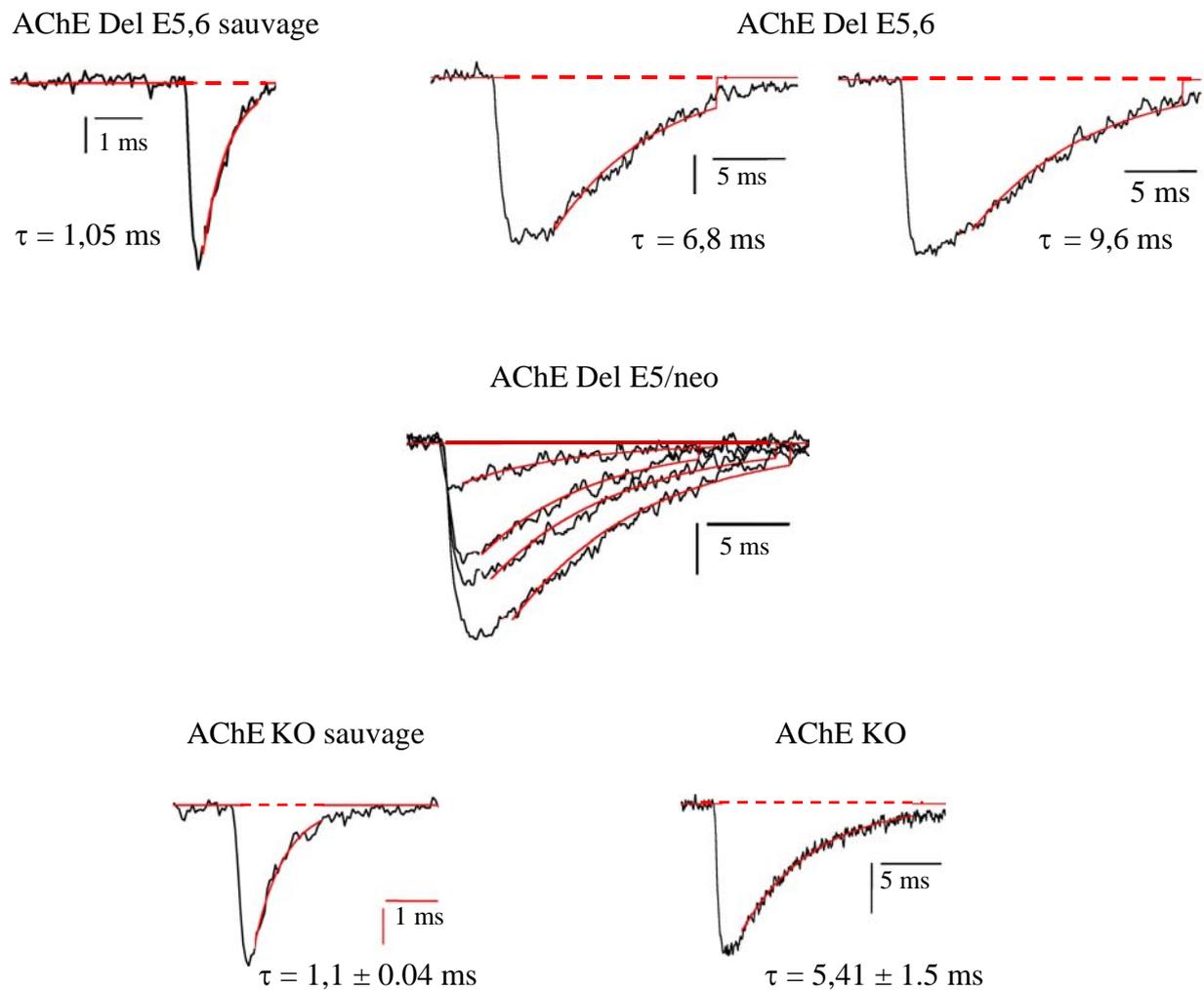
### 3.1.3.2. Potentiels de plaque motrice

Des ppm ont été enregistrés au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris AChE KO, dans un milieu de Krebs-Ringer normal contenant 1,6  $\mu\text{M}$  de  $\mu$ -conotoxine GIIIB afin de bloquer de façon sélective les canaux  $\text{Na}_v$  1.4 des muscles squelettiques sans toutefois bloquer les canaux  $\text{Na}_v$  1.6 de l'axone moteur [Li et al., 1997], et ainsi éviter la contraction musculaire lors de la stimulation nerveuse. Le temps de demi-décroissance (T 50%) des ppm a été calculé et exprimé en fonction de leur amplitude. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence une relation linéaire entre le décalage temporel et l'amplitude des ppm (Fig. 51). Ils indiquent que, dans ces conditions, l'amplitude détermine le décalage temporel du temps de demi-décroissance des ppm.

Nous avons caractérisé, au niveau des jonctions neuromusculaires de souris génétiquement modifiées, le rôle des cholinestérases sur les cours temporels des ppm déclenchés par une stimulation nerveuse. Lorsque la BChE est inhibée par un traitement préalable avec 100  $\mu\text{M}$  d'iso-OMPA au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6, le temps de montée, les décalages temporels et la constante de temps  $\tau$  des ppm ne sont pas significativement modifiés (Fig. 52A). Ces résultats confirment que l'activité de la BChE n'est pas impliquée dans le phénomène compensateur chez les souris AChE Del E5,6.

De plus, l'inhibition de l'AChE par 350 nM de fasciculine-1, au niveau des jonctions neuromusculaires de souris BChE KO, provoque une augmentation importante du temps de montée, des décalages temporels et de la constante de temps  $\tau$  des ppm (Fig. 52B). L'inhibition de l'AChE permet à l'ACh de rester plus longtemps dans la fente synaptique et d'activer de façon répétitive les récepteurs nicotiques à l'ACh.

L'analyse des cours temporels des ppm et des ppm est un bon indice de l'action des cholinestérases au niveau de l'élément postsynaptique. Cependant, les cours temporels de ces réponses peuvent être modulés par les propriétés de la membrane (*i.e.* capacitance et



**Figure 53.** Courants de plaque motrice miniatures enregistrés, dans un milieu de Krebs-Ringer normal, au niveau des jonctions neuromusculaires de souris de souche AChE Del E5,6, AChE Del E5/neo et AChE KO. Les courbes tracées en rouge représente la phase exponentielle de la phase de décroissance des courants.

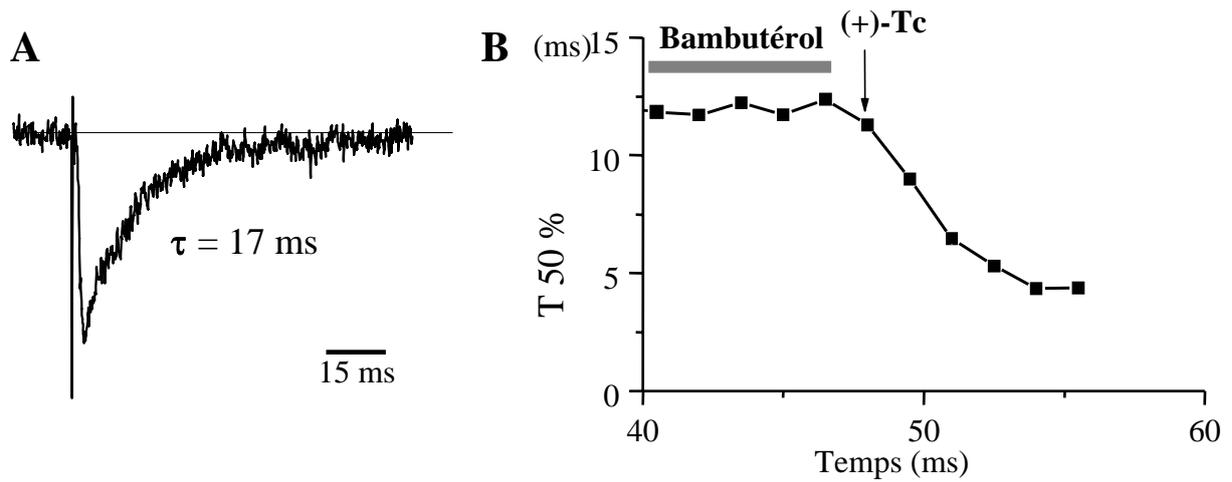
résistance) ainsi que par le diamètre de la fibre musculaire. Afin de s'affranchir de cette modulation et de confirmer les précédents résultats, les décours temporels des courants de plaque motrice miniatures (cpmm) et des courants de plaque motrice (cpm) ont été étudiés. La caractéristique principale des courants de plaque motrice est la constante de temps de l'exponentielle simple de leur phase de décroissance ( $\tau$ ). Cette constante de temps est calculée à l'aide du logiciel Scan.

### 3.1.3.3. Courants de plaque motrice miniatures

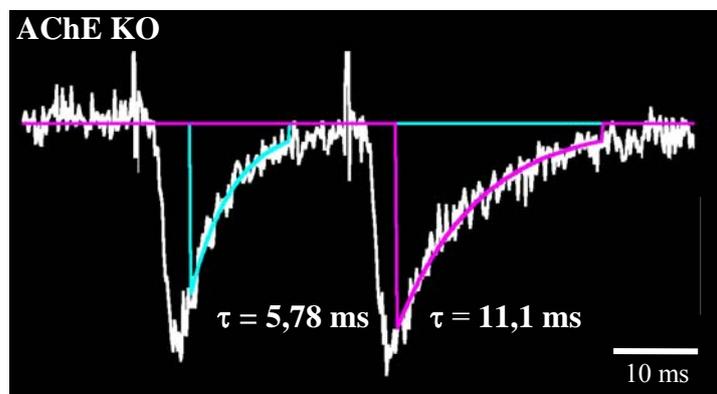
Les courants de plaque motrice miniatures (cpmm) ont été enregistrés au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris AChE KO, AChE Del E5,6 et AChE Del E5/neo. La constante de temps  $\tau$ , qui est de l'ordre de 1 ms pour les souris sauvages, est augmentée, au minimum par un facteur 5, chez les souris génétiquement modifiées (Fig. 53). Malgré l'hétérogénéité des cpmm enregistrés, ils sont toujours très prolongés (cf. Fig. 53 AChE Del E5/neo). Cette augmentation importante de la constante de temps  $\tau$  de l'exponentielle simple de la phase de croissance des cpmm traduit les interactions répétitives entre l'ACh et les RnACh.

### 3.1.3.4. Courants de plaque motrice

Dans le but de déterminer les caractéristiques du décours temporel des courants de plaque motrice (cpm) enregistrés dans des conditions où la libération d'ACh est enregistrée dans un milieu de Krebs-Ringer normal au niveau de la jonction neuromusculaire de souris AChE KO, nous avons utilisé la  $\mu$ -conotoxine GIIIB qui bloque sélectivement les canaux sodiques musculaires (cf. paragraphe 3.1.3.2). Dans ces conditions, la constante de temps  $\tau$  de la décroissance exponentielle des cpm des souris AChE KO est bien plus importante que celle des souris sauvages et que celle des cpmm (Fig. 54A). Nous avons voulu déterminer si l'inhibition de la BChE par le bambutérol (3  $\mu$ M) modifiait le décours temporel des cpm. Comme le montre la Figure 54B, aucun changement significatif du temps de demi-décroissance n'a été détecté, lors de l'action du bambutérol. Afin de préciser si le décours temporel prolongé des cpm était le résultat d'interactions répétitives entre l'ACh et les RnACh, les RnACh ont été bloquées en perfusant une faible concentration de tubocurarine. Les résultats obtenus montrent que cette concentration de



**Figure 54.** (A) Courants de plaque motrice enregistrés au niveau de jonctions neuromusculaires, traitées avec  $1,6 \mu\text{M}$  de  $\mu$ -conotoxine GIIB, isolées de souris AChE KO. (B) Temps de demi-décroissance des ppm enregistrés au niveau de jonctions neuromusculaires de souris AChE KO en fonction du temps, lors de l'action du bambutérol ( $3 \mu\text{M}$ ) puis après un traitement avec  $1,5 \mu\text{M}$  de tubocurarine [(+)-Tc].



**Figure 55.** Potentiation postsynaptique lors de 2 stimulations successives espacées de 25 ms enregistrée au niveau de jonction neuromusculaire de souris AChE KO dans un milieu de Krebs-Ringer normal. Nous remarquons la prolongation du décours temporel et l'augmentation de la constante de temps  $\tau$  de l'exponentielle du second cpm, comparé au premier.

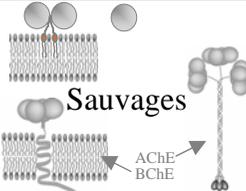
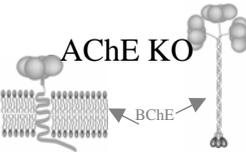
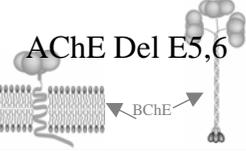
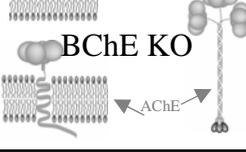
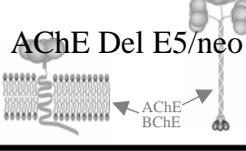
tubocurarine provoque une diminution d'environ 50% du temps de demi-décroissance (Fig 54B), ce qui indique que la prolongation des cpm résulte des interactions répétitives entre les molécules d'ACh et les RnACh postsynaptiques. De plus, lorsque les cpm, au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO, sont déclenchés par 2 stimulations nerveuses identiques appliquées à un intervalle de temps très proche (25 ms), la phase de décroissance de la deuxième réponse est prolongée comparée à celle de la première (Fig. 55). Dans les conditions normales, les molécules d'ACh interagissent une seule fois avec les RnACh et, par conséquent, le décours temporel du cpm reflète principalement la désactivation (*i.e.* la fermeture) des canaux ioniques qui ont été activés (*i.e.* ouverts) par l'ACh. Il y a une bonne concordance entre le cours temporel des cpm et la durée moyenne d'ouverture des canaux synaptiques. L'absence d'AChE est responsable non seulement des activations répétitives, non synchronisées, des RnACh par l'ACh qui mènent au prolongement du cours temporel des cpm mais également de certaines manifestations de potentialisation et de désensibilisation postsynaptiques [Magazanik, 1989].

L'ensemble de ces résultats est résumé dans le Tableau 13.

## **3.2. Analyse morphologique des jonctions neuromusculaires de souris**

### **3.2.1. Position du problème**

La synaptogenèse est un phénomène complexe, longuement étudié. La croissance de la jonction neuromusculaire, qui se produit parallèlement en longueur et en largeur, est rythmée par la croissance des fibres musculaires qui se fait selon le même schéma. La croissance jonctionnelle semble être une conséquence mécanique de la croissance des fibres musculaires [Balice-Gordon and Lichtman, 1990]. L'expansion de la taille de la région postsynaptique est probablement corrélée à l'augmentation de la surface de la fibre musculaire. Lors de cette phase de maturation de la jonction neuromusculaire, le nombre des RnACh présents au niveau de la synapse augmente mais leur densité reste constante [Sanes and Lichtman, 2001], et un alignement spatial se produit entre les terminaisons nerveuses et les amas de RnACh. A la naissance, les terminaisons nerveuses et les amas de RnACh sont approximativement alignés. L'étude de nombreuses jonctions

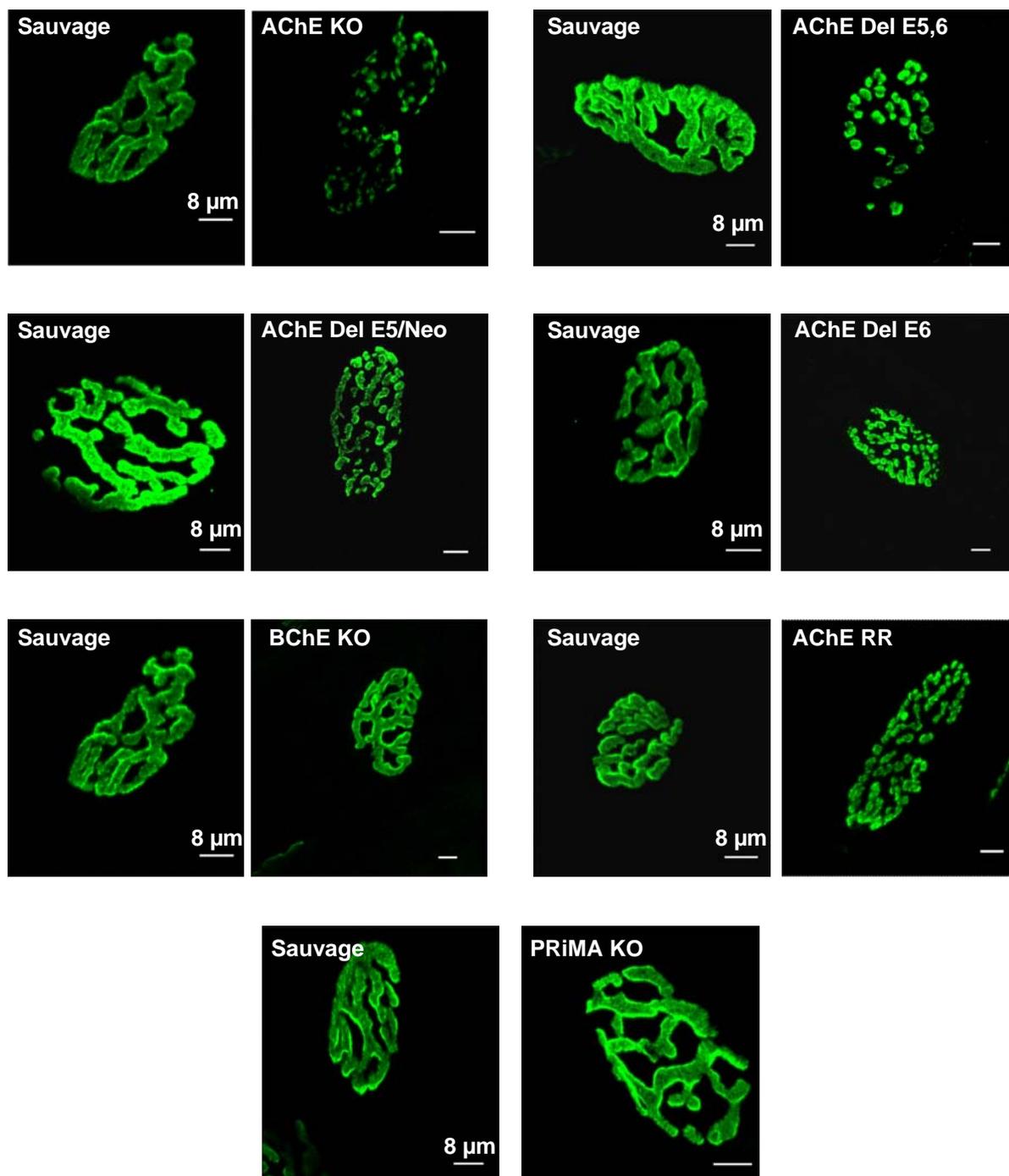
Souris	Conditions contrôles	Inhibition de l'AChE	Inhibition la BChE
 <p>Sauvages</p>		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;">           Augmentation des cours temporels des ppmm, comparés aux conditions contrôles (Fig. 48)         </div>	Pas de modification des cours temporels des ppmm, comparés aux conditions contrôles (Fig. 48)
 <p>AChE KO</p>	Augmentation des cours temporels des ppmm, des cpmm et des cpm, comparés aux souris sauvages (Fig. 49A, 53 et 55)		Pas de modification des cours temporels des cpm, comparés aux conditions contrôles (Fig. 54B)
 <p>AChE Del E5,6</p>	Augmentation des cours temporels des cpmm, comparés aux souris sauvages (Fig. 53)	Pas de modification des cours temporels des ppmm, comparés aux conditions contrôles (Fig. 50A)	Pas de modification des cours temporels des ppmm et des ppm, comparés aux conditions contrôles (Fig. 50B et 52A)
 <p>BChE KO</p>		Augmentation des cours temporels des ppmm et des ppm, comparés aux conditions contrôles (Fig. 49B et 52B)	
 <p>AChE Del E5/neo</p>	Augmentation des cours temporels des cpmm, comparés aux souris sauvages (Fig. 53)		

**Tableau 13.** Récapitulatif des résultats obtenus concernant la caractérisation des cours temporels des réponses synaptiques enregistrées au niveau des préparations neuromusculaires des différentes souches de souris.

neuromusculaires néonatales a montré que les processus de bourgeonnement du nerf et de la cellule de Schwann se prolongent au delà du périmètre de la plaque pour recouvrir les régions de la membrane pauvres en RnACh. Au même moment, certaines régions de la plaque ne sont pas occupées par des terminaisons nerveuses. La perte de zones où les RnACh sont présents transforme la plaque en une forme de « bretzel » [Marques et al., 2000]. Cette perte se produit parallèlement à un phénomène présynaptique régressif, appelé « élimination de la poly-innervation », dans lequel tous les axones, sauf un, innervant la jonction neuromusculaire sont éliminés [Sanes and Lichtman, 1999]. Cette corrélation temporelle mène naturellement à l'idée que les remodelages pré- et postsynaptiques ont un rapport de cause à effet. Lors de la maturation de la plaque, les sites regroupant des RnACh qui ne sont pas activés par l'ACh sont éliminés des jonctions neuromusculaires alors que les RnACh activés par l'ACh sont retenus au niveau des sites où le contact entre le nerf et le muscle est stable. La conséquence directe en est l'alignement parfait entre les amas de RnACh et la terminaison nerveuse dans les jonctions neuromusculaires matures. En résumé, la présence des terminaisons nerveuses est nécessaire au maintien des amas postsynaptiques de RnACh. Cependant, la stabilité de la jonction neuromusculaire chez l'adulte repose, en amont, sur l'action de l'agrine [Pun et al., 2002]. En effet, les terminaisons nerveuses motrices et les cellules de Schwann pérисynaptiques semblent organiser la différenciation postsynaptique par la libération de cette protéine ; l'agrine, qui active ses propres récepteurs tyrosine kinase qui sont des récepteurs kinase spécifiques aux muscles (MuSK) à la surface des myotubes. L'activation des récepteurs MuSK par l'agrine déclenche la formation des amas de RnACh [Sanes and Lichtman, 2001].

Il a été démontré qu'après dénervation, pendant la première semaine postnatale, les plaques neuromusculaires se désagrègent rapidement [Slater, 1982] [Sanes and Lichtman, 2001]. Par contre, chez l'adulte, les amas de RnACh restent en place pendant plusieurs semaines après dénervation, même si les fibres musculaires sont devenues atrophiques [Frank et al., 1976] [Sanes and Lichtman, 2001]. Il est à noter que les amas des RnACh des jonctions neuromusculaires matures sont stables et moins susceptibles de se désagréger.

Cette stabilité acquise n'exclue pas la possibilité que la jonction neuromusculaire subisse des modifications morphologiques après un traitement particulier ou selon l'état fonctionnel de cette jonction. Par exemple, l'exposition de la jonction neuromusculaire à une dose sub-létale de toxines clostridiales, comme la toxine létale de *Clostridium sordellii*, engendre le remodelage synaptique de la structure de la jonction neuromusculaire [Barbier et al., 2006].



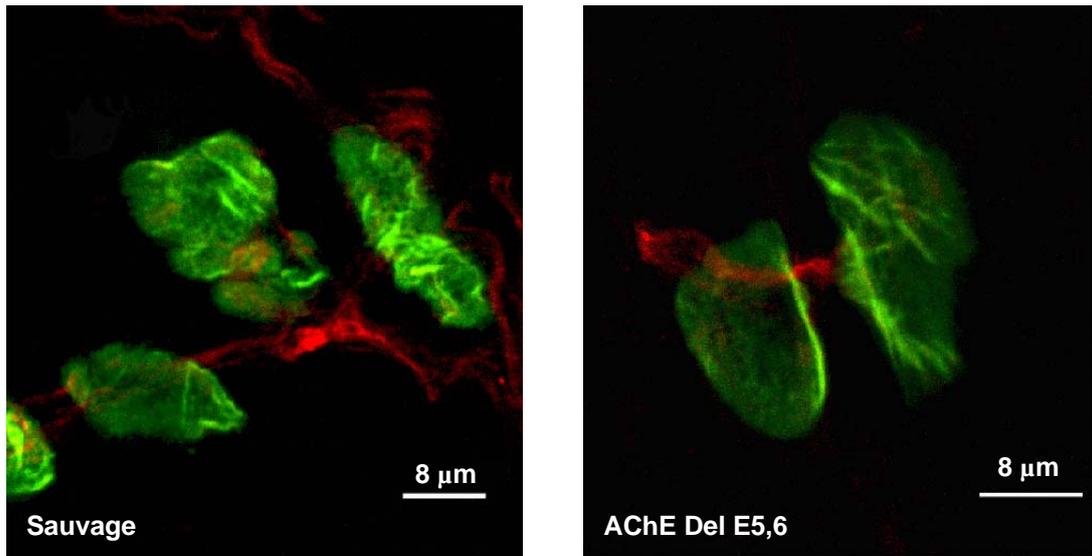
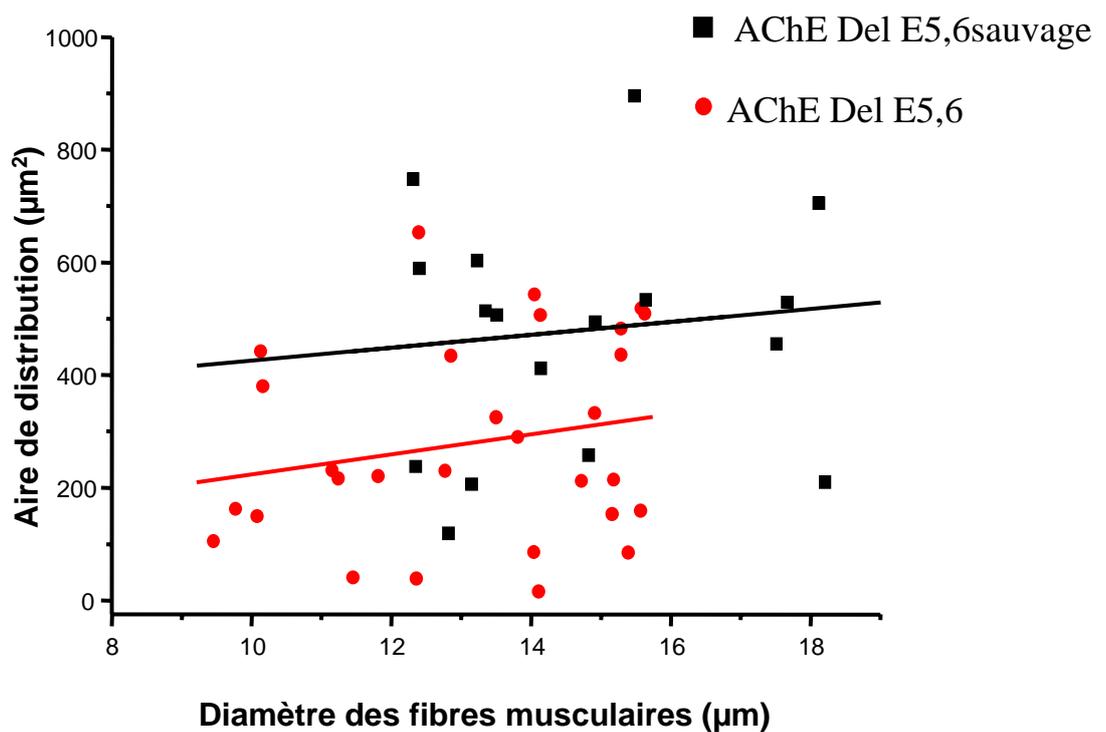
**Figure 56.** Distribution des récepteurs nicotiniques à l'ACh des muscles (LAL) des différents types de souris génétiquement modifiées et de leurs témoins respectifs à l'âge adulte. Les récepteurs nicotiniques sont marqués par l' $\alpha$ -bungarotoxine couplée à l'AlexaFluor® 488.

Nous avons caractérisé la distribution des RnACh, au cours du développement et chez l'adulte, ainsi que la distribution des terminaisons nerveuses motrices, chez l'adulte, au niveau des jonctions neuromusculaires des muscles des différentes souches de souris génétiquement modifiées.

### 3.2.2. Distribution des récepteurs nicotiques à l'ACh

Il a été mis en évidence que les muscles squelettiques des souris adultes AChE KO ont une distribution des RnACh différente de celle des souris sauvages [Adler et al., 2004] [Minic, 2004]. En effet, une différence importante au niveau de la distribution des RnACh entre les souris sauvages issues de la souche AChE KO et les souris AChE KO est observée (Fig. 56). Chez ces dernières, les récepteurs se présentent sous la forme de petits amas en nombre important alors que ceux chez les souris sauvages issues de la souche AChE KO ont une distribution classique en forme dite de « bretzel ». Cette fragmentation apparente de la distribution des RnACh chez les souris AChE KO réduit, de façon remarquable, l'aire de distribution des RnACh au niveau de la jonction neuromusculaire. La distribution des RnACh a été aussi étudiée chez les souris AChE Del E5,6, AChE Del E5/neo, AChE Del E6, BChE KO, AChE-RR et PRiMA KO. Des observations similaires ont été faites sur ces souris génétiquement modifiées (Fig. 56).

Les jonctions neuromusculaires des souris BChE KO et PRiMA KO ne présentent pas de différence, par rapport aux jonctions neuromusculaires de souris sauvages, au niveau de la distribution des RnACh, contrairement aux jonctions neuromusculaires de souris AChE KO, AChE Del E5,6, AChE Del E5/Neo, AChE Del E6 et AChE RR. En effet, la distribution des RnACh de ces dernières a une apparence plus ou moins fragmentée. La cassette de néomycine empêchant l'expression de l'AChE chez les souris AChE Del E5/Neo, il aurait été logique que ce soit ces souris qui, comme les souris AChE KO, soient également très touchées par ce remaniement de distribution des RnACh. Cependant, il semble que ce remaniement soit plus important chez les souris AChE Del E5,6 qui ne possèdent que la BChE et la forme moléculaire soluble de l'AChE. En effet, l'aire de distribution des RnACh est fortement diminuée chez les souris AChE Del E5,6 comparées aux souris AChE Del E5/Neo et AChE Del E6 mais cette diminution est moins importante que celle observée chez les souris AChE KO, totalement dépourvues d'AChE.

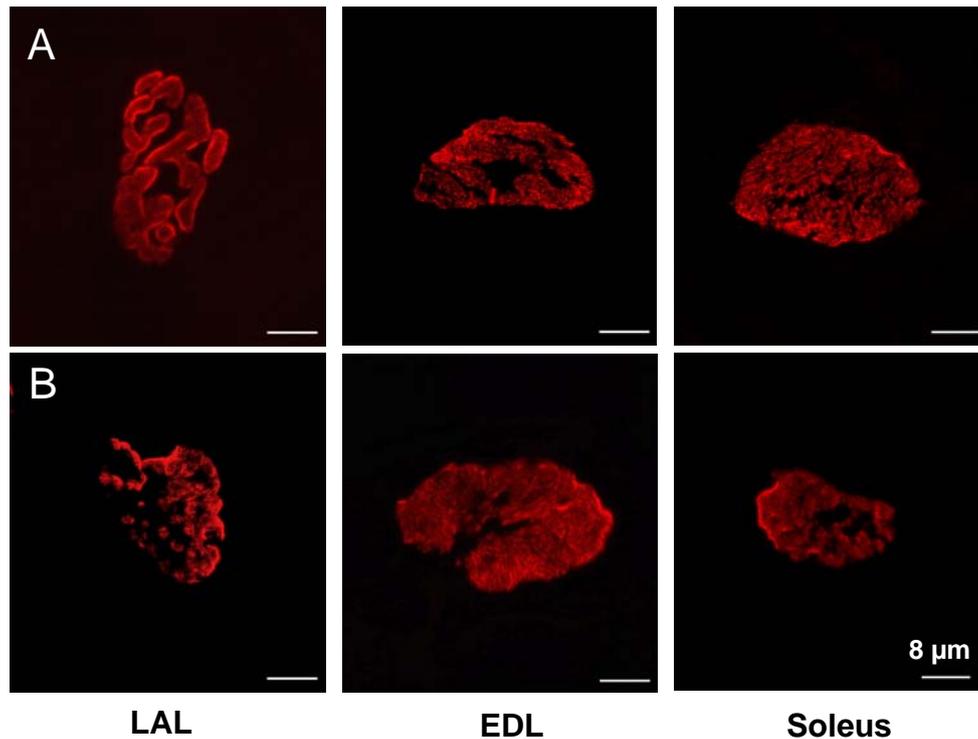
**A****B**

**Figure 57.** (A) Immunomarquage de jonctions neuromusculaires âgées de 5 jours chez des souris AChE Del E5,6 et des souris sauvages de la même souche. Les récepteurs nicotiniqes sont marqués par l'a-bungarotoxine couplée à l'AlexaFluor® 488 et l'élément présynaptique est marquée grâce à l'anticorps anti-NF 200 couplé à l'anticorps secondaire Cy3. (B) Quantification de la surface des récepteurs nicotiniqes en fonction du diamètre apparent de la fibre musculaire chez des souris sauvages (n= 17) et AChE Del E5,6 (n= 29) âgées de 5 jours. Les droites obtenues par régression linéaire montrent que l'aire de distribution des récepteurs nicotiniqes à l'ACh est proportionnelle au diamètre des fibres musculaires.

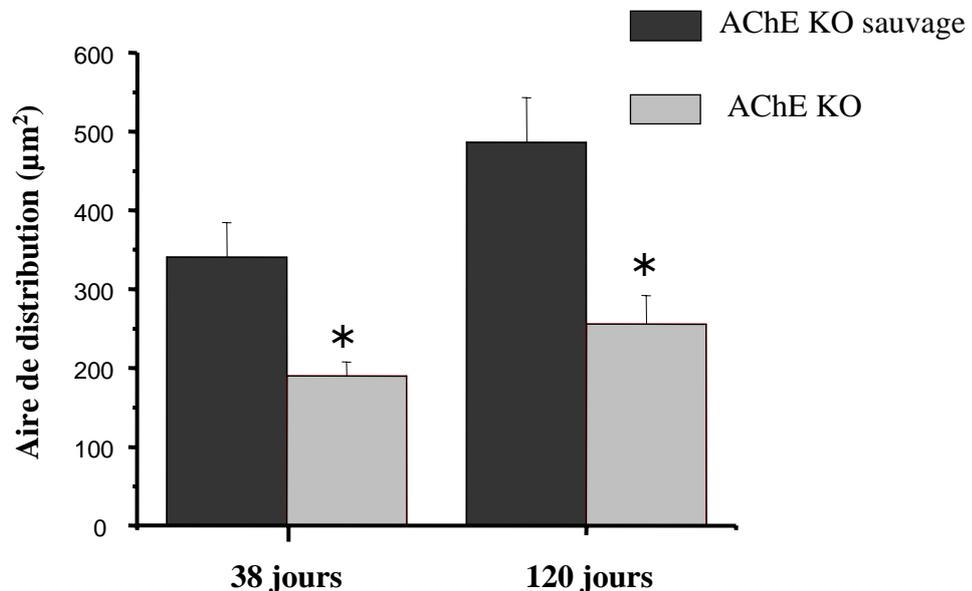
Une question à laquelle nous avons voulu répondre est si cette diminution de l'aire de distribution des RnACh se produit à la naissance ou lors de la maturation des jonctions neuromusculaires.

Pour cela, nous avons comparé l'aire de distribution des RnACh au niveau des jonctions neuromusculaires de différents muscles de souris AChE Del E5,6, AChE KO et de leurs souris témoins à différentes périodes postnatales. Les immunomarquages des RnACh, effectués sur des animaux âgés de 5 jours montrent que la morphologie des jonctions neuromusculaires des souris AChE Del E5,6 est semblable à celle des souris témoins (Fig. 57A). De plus, il apparaît de façon évidente que la surface des RnACh est proportionnellement liée au diamètre des fibres musculaires pour les souris sauvages comme pour les souris AChE Del E5,6 (Fig. 57B). Cependant, la quantification de l'aire de distribution des RnACh montre que la surface des RnACh des souris AChE Del E5,6 est de  $280,97 \pm 32,79 \mu\text{m}^2$  alors que celle des souris sauvages est de  $457,04 \pm 47,50 \mu\text{m}^2$ . La surface des RnACh des souris génétiquement modifiées est inférieure d'environ 40% à celle des souris sauvages. Nous avons ensuite comparé l'aire de distribution des RnACh au niveau de jonctions neuromusculaires de souris AChE KO et de leurs souris témoins à d'autres périodes postnatales (Fig. 58). Des immunomarquages des RnACh, effectués sur des animaux âgés de 15 et 21 jours, montrent que la morphologie des jonctions neuromusculaires des souris sauvages est encore, à ce stade là, semblable à celle des souris AChE KO. La morphologie des jonctions neuromusculaires au jour postnatal 15, bien qu'elle soit variable en fonction de la jonction et du muscle étudiés, est très semblable dans les muscles de l'EDL et du soleus, où la distribution des RnACh a un aspect normal dit de « plaque perforée ». Au jour postnatal 21, la maturation sous forme de « bretzel » de la jonction neuromusculaire est plus évidente dans les jonctions neuromusculaires des LAL de souris sauvages que dans celles des souris AChE KO. Cependant, au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO, la maturation se fait apparemment de façon plus rapide car, à ce stade, une fragmentation des branches des RnACh peut être observée. Cette fragmentation précoce des amas de récepteurs nicotiniques traduit probablement une distribution distincte des récepteurs.

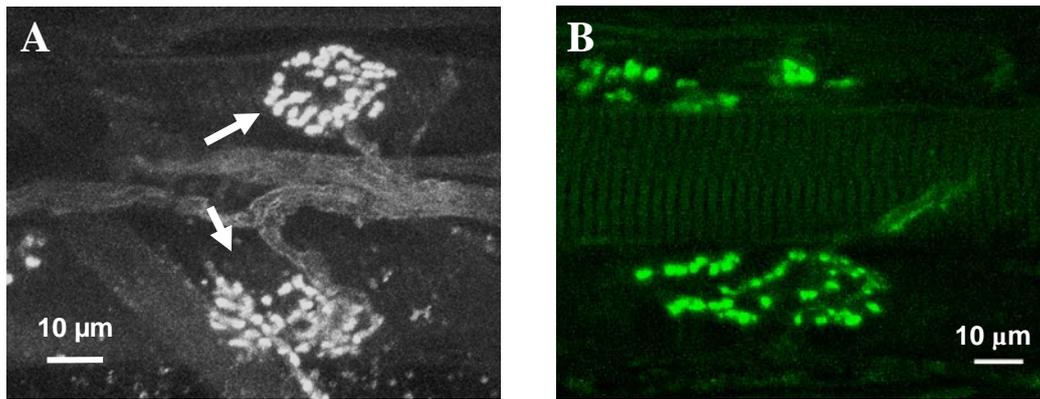
L'aire de distribution des RnACh a été quantifiée au niveau des souris sauvages issues de la souche AChE KO et des souris AChE KO âgées de 38 et 120 jours. Quel que soit l'âge des animaux, une réduction très marquée de l'aire de distribution des RnACh des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO est observée comparées aux souris sauvages (Fig. 59). En effet, l'aire de distribution des RnACh est de  $340 \pm 43,7 \mu\text{m}^2$  ( $n =$



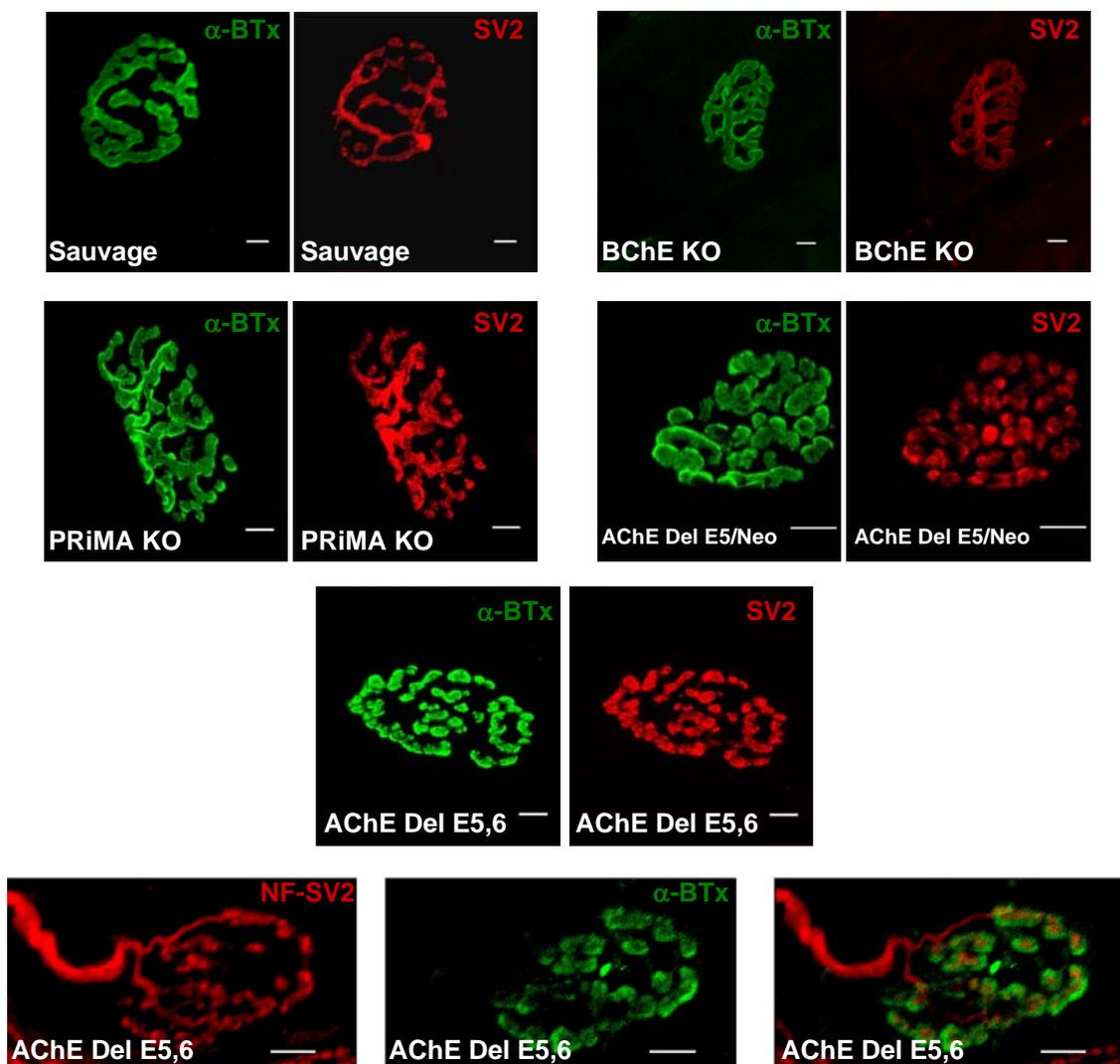
**Figure 58.** Jonctions neuromusculaires de différents muscles (**A**) de souris sauvages issues de la souche AChE KO et (**B**) de souris AChE KO à différentes périodes postnatales. Les récepteurs nicotiniques sont marqués par l' $\alpha$ -bungarotoxine couplée au TRITC. Pour l'EDL et le Soleus, le marquage a été effectué sur des muscles de souris âgées de 15 jours; pour le LAL, les souris étaient âgées de 21 jours.



**Figure 59.** Quantification de l'aire de distribution des récepteurs nicotiniques à l'ACh des muscles (LAL) de souris AChE KO et de souris sauvages issues de la même souche, 38 et 120 jours après la naissance. \*:  $p < 0,05$  ;  $n = 60$ .



**Figure 60.** Terminaisons nerveuses motrices (A) d'une souris AChE KO âgée de 120 jours et (B) d'une souris AChE Del E5,6 âgée de 90 jours, mises en évidence par le marquage avec le FM1-43.



**Figure 61.** Immunomarquages des récepteurs nicotiques à l'ACh et des éléments présynaptiques des muscles adultes (LAL) des différentes souris génétiquement modifiées. Les récepteurs nicotiques sont marqués par l' $\alpha$ -bungarotoxine couplée à l'AlexaFluor® 488, l'élément présynaptique est marqué grâce à l'anticorps anti-SV2 et les terminaisons nerveuses par l'anti-corps NF-200 couplés à l'anticorps secondaire Cy3. Echelle: 8 µm.

60) et de  $485,6 \pm 57,4 \mu\text{m}^2$  ( $n = 60$ ) chez les souris sauvages âgées, respectivement, de 38 et 120 jours alors qu'elle est de  $189 \pm 18,1 \mu\text{m}^2$  ( $n = 60$ ) et de  $256 \pm 36,1 \mu\text{m}^2$  ( $n = 60$ ) chez les souris AChE KO, soit une diminution de, respectivement, 45% et 47%.

Il semble donc que les changements de distribution des RnACh au niveau de l'élément postsynaptique se produisent après la naissance et qu'ils deviennent évidents dans la période postnatale, pendant le phénomène où la poly-innervation est éliminée. Il est important de noter, que pendant cette période critique du développement, les souris AChE KO sont plus susceptibles de mourir que les souris sauvages.

Ces changements de distribution des RnACh sont-ils accompagnés de changements affectant l'élément présynaptique ?

### 3.2.3. Distribution des terminaisons nerveuses motrices

Pour déterminer si les terminaisons nerveuses motrices des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO sont également remaniées, des marquages avec le FM1-43 (une sonde fluorescente permettant de visualiser les processus d'endo-exocytose) ont été réalisés sur des muscles (LAL), *ex vivo*, placés dans une chambre spécialement conçue pour s'adapter au microscope confocal droit. Les marquages des terminaisons nerveuses des souris sauvages issues de la souche AChE KO sont similaires à ceux précédemment décrits chez les souris sauvages [Betz et al., 1992] [Ribchester et al., 1994] : les terminaisons nerveuses sont co-localisées avec les RnACh des fibres musculaires. Les marquages avec le FM1-43 chez des souris AChE KO et chez des souris AChE Del E5,6 sont similaires (Fig. 60). Ils montrent des amas fluorescents bien définis dans toutes les jonctions observées. Les terminaisons nerveuses de ces souris génétiquement modifiées ont donc une apparence fragmentée contrairement à celles des souris sauvages issues de la souche AChE KO. De plus, nous pouvons observer, grâce au marquage passif des axones myélinisés, que ces jonctions sont toutes mono-innervées.

Ces observations sont confirmées par les résultats obtenus par immunomarquage avec l'anticorps reconnaissant la protéine SV2, protéine intégrale des vésicules synaptiques. En effet, le marquage des vésicules synaptiques est co-localisé avec celui des RnACh chez toutes les souches de souris étudiées (i.e. BChE KO, PRiMA KO, AChE Del E5/neo et AChE Del E5,6) (Fig. 61).

L'ensemble des résultats obtenus met en évidence que des changements à la fois de la distribution des RnACh et de la morphologie des terminaisons nerveuses motrices se produisent, ce qui suggère que les jonctions neuromusculaires des muscles squelettiques des souris dépourvues d'AChE ou de certaines de ses formes se sont adaptées, au cours de la période postnatale, à l'absence d'AChE et à l'excès d'ACh, en provoquant un remodelage des éléments pré- et postsynaptiques de la jonction neuromusculaire.

Cependant, la question qui se pose et à laquelle nous n'avons pas pu répondre est de savoir si les changements des terminaisons nerveuses se produisent avant ou après ceux de la distribution des RnACh ou alors en même temps.

# *Discussion*

## 4.1. Implication de la BChE dans les réponses contractiles développées par les souris génétiquement modifiées

L'analyse de la contraction musculaire induite par la stimulation nerveuse est une approche initiale importante puisqu'elle permet d'obtenir des informations générales sur la transmission synaptique.

Les résultats obtenus indiquent que les préparations neuromusculaires isolées à partir des souris PRiMA KO (qui ne possèdent pas de cholinestérases ancrées à la membrane par PRiMA) répondent aux stimulations nerveuses intermittentes par des contractions téaniques dans une gamme de fréquences comprises entre 10 et 200 Hz sans faille évidente. Cependant, l'inhibition des autres formes moléculaires d'AChE, par un traitement avec la néostigmine, provoque une dépression très marquée de la réponse et même pour de faibles fréquences. Les préparations neuromusculaires isolées des souris sauvages répondent de manière identique aux stimulations nerveuses lorsque les cholinestérases sont inhibées (voir Tableau 10).

Les préparations neuromusculaires isolées des souris AChE KO, AChE Del E5,6, AChE Del E6 et AChE Del E5/neo répondent aux stimulations nerveuses intermittentes par des contractions téaniques dans une gamme de fréquences physiologique. Cependant, les hémi-diaphragmes de ces souris génétiquement modifiées développent moins de force lors des contractions téaniques et la dépression de ces réponses se produit à des fréquences de stimulation plus faibles que celle observée chez les souris sauvages. En effet, les muscles des souris AChE KO et AChE Del E6 sont incapables de maintenir les réponses téaniques au-delà de 60 Hz, et ceux des souris AChE Del E5,6 et AChE Del E5/neo sont incapables de les maintenir au-delà de, respectivement, 50 et 40 Hz.

Les préparations neuromusculaires isolées des souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6 sont incapables de développer des réponses téaniques au-delà de 10 Hz lorsque l'AChE est inhibée par 3  $\mu$ M de néostigmine. Ces résultats confirment le rôle important de l'AChE dans la contraction musculaire provoquée par la stimulation nerveuse et donc dans le fonctionnement de la jonction neuromusculaire. Cependant, il est très surprenant que les réponses contractiles provoquées par la stimulation nerveuse soient mieux maintenues par les muscles des souris génétiquement modifiées que par ceux des souris sauvages traités avec des agents anticholinestérasiques. En effet, la décroissance des réponses téaniques est plus perceptible après l'inhibition de l'AChE chez les souris

sauvages que chez les souris où l'AChE, ou certaines de ses formes moléculaires, sont absentes. Ceci nous mène à penser que la BChE pourrait agir en tant que substitut de l'AChE dans les muscles des souris génétiquement modifiées. Il a été mis en évidence que la BChE était présente dans de nombreux tissus chez des souris sauvages [Li et al., 2000]. Cependant, l'activité enzymatique de la BChE représente un très faible pourcentage de l'activité totale des cholinestérases dans les muscles, le cerveau et les autres tissus [Li et al., 2000] [Li et al., 2003]. Il a été également montré que les tissus des souris AChE KO, et notamment leurs muscles, expriment des taux de BChE similaires à ceux exprimés chez les souris sauvages [Li et al., 2000] [Xie et al., 2000].

Nous avons mis évidence que l'inhibition de la BChE accentue la dépression des réponses téaniques des muscles de souris AChE KO et AChE Del E5,6, alors qu'elle n'a aucun effet sur les muscles des souris sauvages lorsque l'AChE est active. Selon la souche de souris, cette dépression est plus ou moins importante, les effets de l'inhibition de la BChE étant plus rapidement perceptibles chez les souris AChE Del 5,6 que chez les souris AChE KO. Par ailleurs, il a été montré que l'administration par voie intra-péritonéale de 0,3 mg/kg de bambutérol, un inhibiteur spécifique de la BChE, à des animaux AChE KO entraîne leur mort en 10 minutes [Xie et al., 2000]. Ceci nous mène à penser qu'en l'absence d'AChE, l'essentiel de l'activité enzymatique est fourni par la BChE. Il est fortement probable que la BChE, en hydrolysant l'ACh, joue un rôle dans la survie des souris totalement dépourvues d'AChE [Li et al., 2000] [Mesulam et al., 2002]. Ce point sera discuté ci-dessous (cf. paragraphe 4.3).

## **4.2. Implication des cholinestérases dans la libération quantique d'ACh**

### **4.2.1. La libération quantique spontanée d'ACh n'est pas régulée par les cholinestérases**

La fréquence des potentiels de plaque motrice miniatures (ppmm), enregistrés au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris AChE Del E5,6, est similaire à celle observée au niveau des muscles de souris sauvages (voir Tableau 11). De plus, l'inhibition de la BChE ne modifie pas de façon significative la fréquence des ppmm enregistrés au niveau de ces muscles. Ces résultats sont confortés par le fait que

l'inhibition de la BChE n'entraîne pas de modification significative de la fréquence des ppm au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO [Minic et al., 2003]. La libération quantique spontanée de neurotransmetteur n'est donc pas affectée lorsque la BChE est inactive au niveau des préparations neuromusculaires où l'AChE, ou certaines de ses formes moléculaires, sont absentes.

L'inhibition de l'AChE au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris BChE KO n'entraîne pas de diminution significative de la fréquence des ppm. La libération quantique spontanée d'ACh n'est donc pas modifiée lorsque l'AChE est inactive et que la BChE est absente.

L'ensemble de ces résultats montre que la libération quantique spontanée d'ACh ne dépend pas de l'activité des cholinestérases, *i.e.* de l'hydrolyse de l'ACh.

Les effets d'inhibiteurs spécifiques de l'AChE et de la BChE sur le contenu quantique, estimé à partir des ppm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages et de souris génétiquement modifiées, ont été comparés afin d'avoir des informations sur le rôle physiologique de la BChE au niveau des muscles squelettiques.

#### **4.2.2. Le contenu quantique est modulé par les cholinestérases**

Les résultats des expériences qui ont consisté à inhiber l'AChE par la fasciculine-1 ou la néostigmine ou la galanthamine, au niveau des préparations neuromusculaires isolées de souris sauvages, montrent une augmentation significative du contenu quantique estimé à partir des ppm par rapport aux conditions contrôles [Minic et al., 2003]. Par ailleurs, il a été décrit que la néostigmine bloque les canaux  $K^+$  des terminaisons nerveuses motrices [Braga et al., 1993] et que la galanthamine agit allostériquement sur les récepteurs nicotiques neuronaux à l'ACh au niveau du système nerveux central des mammifères [Santos et al., 2002]. Ces actions pourraient contribuer à faciliter la libération de l'ACh lors de l'inhibition de l'AChE par des faibles doses de ces inhibiteurs, ce qui expliquerait l'augmentation du contenu quantique observé par Minic et al. (2003). Ces résultats sont confortés par les différences décrites entre les valeurs des contenus quantiques obtenues au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages et celles de souris ColQ KO qui ne possèdent pas d'AChE et de BChE ancrées dans la membrane par la queue collagénique

[Minic et al., 2002]. En effet, le contenu quantique des réponses synaptiques est plus élevé au niveau des jonctions neuromusculaires de souris ColQ KO qu'au niveau de celles des souris sauvages. L'inhibition de l'activité enzymatique de l'AChE provoque, chez les souris sauvages, une augmentation du contenu quantique (voir Tableau 12). Cependant, cette augmentation n'a pas lieu lorsque l'activité de la BChE est également inhibée. De plus, l'inhibition de la BChE, dans un milieu faible en calcium, produit une diminution du contenu quantique au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6. Une telle diminution a également été décrite lors de l'inhibition de la BChE au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages par Minic et al. (2003). L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle probable de la BChE en tant que modulateur de la libération quantique d'ACh au niveau de la jonction neuromusculaire.

Il est surprenant de constater que l'absence d'AChE ne modifie pas le contenu quantique au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO alors que l'inhibition de l'AChE au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages augmente le contenu quantique. Cette observation n'est pas la seule à être surprenante. En effet, le contenu quantique au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 est plus faible que celui déterminé au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages. Il semble donc que des phénomènes compensateurs existent chez les différentes souches de souris totalement dépourvues d'AChE ou de certaines de ses formes moléculaires. Ces phénomènes, seraient différents selon la mutation, auraient des conséquences différentes sur l'hydrolyse de l'ACh et mettraient en jeu des intervenants autres que les cholinestérases.

Les effets de l'inhibition de la BChE ont également été observés sur les muscles des souris AChE Del E5,6. Cette inhibition, qui provoque une diminution du contenu quantique, a également été observée au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO [Minic et al., 2003].

Par contre, l'inhibition de l'AChE au niveau des jonctions neuromusculaires de souris BChE KO ne modifie pas le contenu quantique, bien que seule l'AChE soit présente chez ces souris. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus au niveau des muscles de souris sauvages où l'inhibition de l'AChE ne modifie pas le contenu quantique lorsque la BChE est également inhibée.

L'inhibition de l'AChE, qui a un rôle central dans la transmission cholinergique, au niveau des muscles de souris BChE KO, n'entraîne ni une modification de la fréquence des

ppmm ni un changement du contenu quantique. Ces résultats indiquent que la libération quantique d'ACh, au niveau des jonctions neuromusculaires dépourvues de BChE, ne dépend donc pas de l'activité de l'AChE. L'AChE ne semble pas donc pas être impliquée dans les phénomènes présynaptiques de régulation de la libération quantique d'ACh.

Il a été démontré que la BChE pouvait hydrolyser l'ACh dans les cerveaux de rats normaux. Cette hydrolyse de l'ACh, effectuée par la BChE, permettrait aux souris AChE KO, totalement dépourvues d'AChE, d'échapper aux conséquences dévastatrices, voire létales, de l'hyperactivité cholinergique et d'établir des voies cholinergiques centrales même en absence d'AChE [Mesulam et al., 2002]. Ces hypothèses sont étayées par le fait que les souris AChE KO succombent à une injection intra-péritonéale de bambutérol alors que la même dose de cet inhibiteur sélectif de la BChE n'est pas toxique chez les souris sauvages [Xie et al., 2000]. Ceci souligne le fait que la BChE a été décrite comme pouvant moduler la transmission synaptique au niveau des muscles lisses [Adler and Filbert, 1990] [Norel et al., 1993] [Li et al., 2000]. La diminution du contenu quantique estimé à partir des ppm enregistrés au niveau des souris AChE Del E5,6 et AChE KO, suite à l'inhibition de la BChE par un traitement avec 100  $\mu$ M d'iso-OMPA, suggère la responsabilité de la BChE dans le processus de modulation présynaptique de la libération quantique d'ACh. Mais la BChE ne semble pas être la seule composante de la régulation présynaptique de la libération quantique. En effet, il a été mis en évidence que les récepteurs muscariniques à l'ACh ont un rôle dans la régulation d'un large nombre de fonctions physiologiques importantes, comme la modulation de la libération quantique d'ACh dans les systèmes nerveux central et périphérique [Caulfield, 1993] [Nathanson, 2000] [Parnas et al., 2000]. Il semblerait que ces récepteurs muscariniques présynaptiques puissent exercer à la fois une action facilitatrice et une action inhibitrice sur la libération quantique d'ACh [Van der Kloot and Molgo, 1994] [Li et al., 2003]. De plus, des études pharmacologiques ont permis d'émettre l'hypothèse que ces récepteurs muscariniques pouvaient être stimulés lorsque l'AChE était rendue inactive et que les taux d'ACh dans la fente synaptique étaient suffisamment élevés pour activer la régulation de la libération de neurotransmetteur [Bowman et al., 1984]. L'implication des récepteurs muscariniques dans la régulation présynaptique de la libération quantique d'ACh pourrait expliquer le fait qu'il n'y ait pas de différence au niveau des valeurs du contenu quantique obtenues chez les souris AChE KO et les souris sauvages issues de la même souche et que par contre, les valeurs du contenu quantique estimées à partir des ppm enregistrés au niveau des muscles de souris AChE Del E5,6 soient beaucoup plus faibles que celles de leurs souris témoins.

Il existe 4 sous-types de récepteurs muscariniques ( $M_1$  à  $M_4$ ) présents dans la jonction neuromusculaire et plus particulièrement dans les zones innervées. Ils sont localisés à la terminaison nerveuse motrice et/ou au niveau des cellules de Schwann pérисynaptiques entourant la terminaison nerveuse. Les sous-types  $M_1$  et  $M_2$  ont été décrits comme ayant des fonctions présynaptiques différentes pour la modulation de la libération quantique d'ACh ; la régulation de la libération de neurotransmetteur par les sous-types  $M_1$  et  $M_2$  dépendrait également de l'état fonctionnel de l'AChE dans la jonction neuromusculaire [Minic et al., 2002]. Le rôle prédominant des récepteurs muscariniques à l'ACh, en présence de l'AChE, est la diminution, régulée par le sous-type  $M_2$ , de la libération de l'ACh. Alors que lorsque l'AChE est absente ou que son activité est inhibée, il en résulte une augmentation de la libération d'ACh par le sous-type  $M_1$ . Ces observations sont corrélées avec nos résultats concernant les valeurs du contenu quantique obtenues chez les souris AChE KO et AChE Del E5,6, la première souche de souris étant totalement dépourvues d'AChE et la deuxième ne possédant que la forme soluble de l'AChE. Cette différence de l'état fonctionnel de l'AChE dans la jonction neuromusculaire permettrait probablement d'activer des sous-types différents de récepteurs muscariniques et cette activation de l'un ou l'autre sous-type de récepteurs muscariniques permettrait la facilitation ou la réduction de la libération quantique d'ACh. Ceci suggère que la seule présence des formes solubles de l'AChE permet l'activation des récepteurs muscariniques de type  $M_2$ . Par contre, l'absence totale de l'AChE chez les souris AChE KO ne permet pas l'activation des récepteurs de type  $M_1$ . Il se peut que ces récepteurs  $M_1$  puissent être internalisés par l'excès d'ACh dans la fente synaptique.

Ceci souligne le fait que le phénomène compensateur, se produisant chez les souris AChE KO, permettrait de garder un taux normal d'ACh dans la fente synaptique et donc que le surplus d'ACh dû à l'absence d'AChE diffuserait probablement hors de la fente synaptique. Cependant, cette diffusion ne peut pas être expliquée seulement par le processus de fuite moléculaire de l'ACh [Katz and Miledi, 1977] [Yu and Van der Kloot, 1990], un autre processus doit probablement intervenir.

### **4.3. La BChE n'est pas impliquée dans la régulation de la concentration d'ACh donnant lieu aux réponses synaptiques**

L'inhibition de l'AChE au sein des jonctions neuromusculaires de souris sauvages engendre des modifications au niveau des cours temporels des ppm (voir Tableau 13). En effet, leurs cours temporels sont prolongés de manière très marquée, ce qui signifie que les récepteurs nicotiques à l'ACh sont plusieurs fois sollicités au niveau de l'élément postsynaptique. En effet, le cours temporel des réponses synaptiques est essentiellement dû à la durée d'action de l'ACh sur l'élément postsynaptique. La prolongation du cours temporel des réponses synaptiques spontanées, lorsque l'AChE est inactive, est indépendante de la composition du milieu extra-cellulaire et de sa teneur en calcium. Par contre, l'inhibition de la BChE n'affecte pas, de façon significative, le cours temporel des ppm enregistrés au niveau des jonctions neuromusculaires de souris sauvages issues de la souche AChE Del E5,6. Ceci suggère que la BChE ne permet pas de maintenir une concentration suffisamment élevée d'ACh dans la fente synaptique pour que ces molécules de neurotransmetteur puissent activer plusieurs fois les récepteurs nicotiques à l'ACh postsynaptiques.

Le cours temporel des ppm enregistrés au niveau des préparations neuromusculaires de souris génétiquement modifiées est plus prolongé que celui des souris sauvages. Ceci a été également décrit par Minic et al. (2003). La prolongation du cours temporel est dû à l'absence d'AChE au sein de la jonction neuromusculaire des souris génétiquement modifiées et aux interactions répétitives entre l'ACh et les récepteurs nicotiques à l'ACh [Katz and Miledi, 1973] [Minic et al., 2003].

L'inhibition de l'AChE au niveau de la jonction neuromusculaire de souris BChE KO entraîne une augmentation du cours temporel des ppm comme celui des ppm. L'inhibition de l'AChE permet à l'ACh de rester plus longtemps dans la fente synaptique et donc de prolonger son action activatrice sur les récepteurs nicotiques postsynaptiques à l'ACh. L'inhibition de l'AChE au sein des jonctions neuromusculaires de souris BChE KO entraîne une augmentation du cours temporel des réponses synaptiques.

L'inhibition de l'AChE au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 n'entraîne pas de modifications significatives des cours temporels des ppm. Ce résultat est surprenant puisque l'absence d'AChE ou son inhibition provoque une augmentation des cours temporels au niveau des jonctions neuromusculaires des souris

AChE KO ou des sauvages. Ces résultats confirment ceux des analyses biochimiques qui spécifient que les formes moléculaires solubles d'AChE, seules formes présentes chez les souris AChE Del E5,6, ne sont pas principalement localisées au niveau de la jonction neuromusculaire mais essentiellement dans le sérum [Camp et al., 2004] [Camp et al., 2005]. Par conséquent, les effets de l'inhibition de l'AChE ne sont pas perceptibles au niveau de la jonction neuromusculaire des souris AChE Del E5,6 et particulièrement sur l'élément postsynaptique. Ces résultats suggèrent la faible importance du rôle des formes moléculaires solubles AChE<sub>R</sub> au niveau de la jonction neuromusculaire et ce qui remet en cause celui qu'il pourrait jouer dans les syndromes de myasthénie congénitale décrit par Brenner *et al.* (2003). De plus, l'inhibition de la BChE au sein des jonctions neuromusculaires de souris AChE Del E5,6 n'entraîne pas de modifications significatives du cours temporel des réponses synaptiques spontanées et provoquées par la stimulation nerveuse. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO [Minic et al., 2003]. Ils suggèrent que l'inhibition de la BChE ne prolonge pas l'action de l'ACh sur les récepteurs nicotiniques postsynaptiques.

L'analyse des courants de plaque motrice miniatures (cpmm) et des courants de plaque motrice (cpm) nous permettent de s'affranchir des propriétés passives de la membrane des fibres musculaires qui pourraient influencer le cours temporel des ppmm et des ppm et donc d'être sûr que les effets observés au niveau postsynaptique sont réellement dus à la concentration d'ACh dans la fente synaptique. Une augmentation du cours temporel des cpmm a été observée au niveau des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO, AChE Del E5,6 et AChE Del E5/neo, comparées aux souris sauvages. Cette augmentation est à relier à l'absence d'AChE dans la fente synaptique, ce qui permettrait à l'ACh d'activer plusieurs fois les récepteurs nicotiniques postsynaptiques. Cette observation est valable également pour les cpm où la constante de temps de la décroissance exponentielle est bien plus importante que celle décrite pour les cpmm. De plus, comme cela a été observé pour les ppmm et les ppm, l'inhibition de la BChE n'engendre pas de modification du cours temporel des courants synaptiques.

Nous pouvons conclure que la BChE n'est apparemment pas impliquée dans la régulation de la concentration de l'ACh au niveau des récepteurs nicotiniques postsynaptiques localisés en face des zones de libération du transmetteur (zones actives). Cependant, nos résultats ne peuvent pas exclure la possibilité que la BChE se trouve localisée dans le fond des plis sous-synaptiques de l'élément postsynaptique, et surtout au

niveau présynaptique (cellule de Schwann et terminaison nerveuse) où elle aurait un rôle protecteur de la terminaison nerveuse vis-à-vis des excès d'ACh.

#### **4.4. Remodelage synaptique chez les souris génétiquement modifiées**

Nos résultats mettent en évidence que les muscles squelettiques des souris génétiquement modifiées s'adaptent face à l'absence d'activité enzymatique de l'AChE en provoquant un remodelage synaptique des éléments pré- et postsynaptiques de la jonction neuromusculaire.

Bien que les jonctions neuromusculaires soient fonctionnelles très tôt [Sanes and Lichtman, 2001], elles continuent ensuite d'« évoluer » de la seconde à la troisième semaine postnatale. La maturation postsynaptique n'est apparemment pas modifiée dans les muscles AChE KO au stade du 15<sup>e</sup> jour postnatal, ce qui est en accord avec la description de l'ultra structure des jonctions neuromusculaires de souris AChE KO âgées de 12 jours [Xie et al., 2000]. Contrairement à cette observation, il a été mis en évidence qu'une abondante nécrose sub-synaptique existe dans les muscles issus des souris Col Q KO âgées de 20 jours quand l'AChE et la BChE ancrées par Col Q sont alors absentes de la jonction neuromusculaire [Feng et al., 1999].

Dans les jonctions neuromusculaires de rats nouveaux-nés, la BChE et l'AChE sont initialement actives de façon équivalente puis les niveaux de BChE diminuent entre le 7<sup>e</sup> jour et le 15<sup>e</sup> jour postnatal [Chapron et al., 1997]. Lors de cette phase de développement postnatal, la présence de la BChE ancrée par ColQ prévient probablement la nécrose sub-synaptique des muscles AChE KO, comme celle des muscles des autres souris dépourvues de certaines formes moléculaires d'AChE. Lors de la période associée à la plaque perforée, les amas de récepteurs nicotiques à l'ACh (RnACh) sont similaires au niveau de l'EDL et du soleus des souris AChE KO et des souris sauvages issues de la même souche. Cependant, la présence des branches fragmentées de RnACh est frappante au sein des jonctions neuromusculaires des souris AChE KO, AChE Del E5,6, AChE Del E5/neo, AChE Del E6 et AChE RR. Les changements inattendus de la distribution des RnACh au niveau des muscles AChE KO persistent dans les plaques motrices matures, comme cela l'a été vérifié sur des souris âgées de 38 et 120 jours. Il est possible que les mouvements des RnACh avec le sarcolemme ou que le recyclage des RnACh entre les compartiments

internes et la membrane soient à l'origine de ces amas de RnACh dans des zones restreintes de la plaque. Ce point reste à préciser.

Le remodelage des RnACh est accompagné d'un remodelage similaire des terminaisons nerveuses motrices, comme le montrent les marquages avec le FM1-43 et le confirment les immunomarquages des vésicules synaptiques (SV<sub>2</sub>).

## **4.5. Conclusion**

L'ensemble de nos résultats met en évidence que les muscles squelettiques des souris génétiquement modifiées des souches AChE KO, AChE Del E5,6, AChE Del E5/neo s'adaptent face à l'absence d'AChE ou de certaines de ses formes moléculaires, en remodelant les éléments pré et postsynaptiques de la jonction neuromusculaire.

Mais comment la redistribution des terminaisons nerveuses et des RnACh affecte-t-elle le fonctionnement des jonctions neuromusculaires dans les muscles de souris lorsque l'AChE, ou certaines de ses formes moléculaires, sont totalement absentes ?

La petite taille des aires de distribution des RnACh ainsi que la discontinuité des amas de ces récepteurs et de celle des terminaisons nerveuses pourraient permettre à l'ACh de diffuser facilement et rapidement hors de la fente synaptique. Cette diffusion d'ACh permettrait de réduire : (i) le nombre de canaux synaptiques ouverts par l'ACh, (ii) la désensibilisation probable des RnACh et (iii) l'activation des auto-récepteurs présynaptiques, ces récepteurs étant connus pour interagir, probablement physiquement et peut-être indirectement, avec une ou plusieurs protéines impliquées dans la libération d'ACh afin d'exercer un contrôle sur cette libération de neurotransmetteur [Parnas et al., 2000]. La plupart de ces effets peuvent expliquer le fait que la tension téτανique est mieux maintenue dans les muscles des souris génétiquement modifiées que ceux des souris sauvages traités avec des inhibiteurs d'AChE.

*Références  
bibliographiques*

**A**

- Adler M, Filbert MG. (1990). Role of butyrylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle function. *FEBS Lett*; 267: 107-110.
- Adler M, Manley HA, Purcell AL, Deshpande SS, Hamilton TA, Kan RK, Oyler G, Lockridge O, Duysen EG, Sheridan RE. (2004). Reduced acetylcholine receptor density, morphological remodeling, and butyrylcholinesterase activity can sustain muscle function in acetylcholinesterase knockout mice. *Muscle Nerve*; 30: 317-327.
- Alvarez A, Alarcon R, Opazo C, Campos EO, Munoz FJ, Calderon FH, Dajas F, Gentry MK, Doctor BP, De Mello FG, Inestrosa NC. (1998). Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J Neurosci*; 18: 3213-3223.
- Alvarez A, Opazo C, Alarcon R, Garrido J, Inestrosa NC. (1997). Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J Mol Biol*; 272: 348-361.
- Anderson MJ, Cohen MW. (1977). Nerve-induced and spontaneous redistribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. *J Physiol*; 268: 757-773.
- Andreu R, Barrett EF. (1980). Calcium dependence of evoked transmitter release at very low quantal contents at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*; 308: 79-97.
- 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.
- Appleyard ME. (1992). Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. *Trends Neurosci*; 15: 485-490.
- Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, Yamada Y. (2002). Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci*; 5: 119-123.
- Arpagaus M, Fedon Y, Cousin X, Chatonnet A, Berge JB, Fournier D, Toutant JP. (1994). cDNA sequence, gene structure, and in vitro expression of ace-1, the gene encoding acetylcholinesterase of class A in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*; 269: 9957-9965.
- Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, La Du BN, Lockridge O. (1990). Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*; 29: 124-131.
- Augustine GJ. (2001). How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol*; 11: 320-326.

## B

- Balice-Gordon RJ, Lichtman JW. (1990). In vivo visualization of the growth of pre- and postsynaptic elements of neuromuscular junctions in the mouse. *J Neurosci*; 10: 894-908.
- Barbier J, Popoff MR, Molgo J. Neuromuscular alterations and synaptic remodelling after exposure to clostridial toxins. (2006). In: L. GDaJ, editor. *Toxins from bacteria and other organisms*, 301-326.
- Berridge MJ. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*; 499 ( Pt 2): 291-306.
- Betz H, Bourgeois JP, Changeux JP. (1980). Evolution of cholinergic proteins in developing slow and fast skeletal muscles in chick embryo. *J Physiol*; 302: 197-218.
- Betz WJ, Mao F, Bewick GS. (1992). Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci*; 12: 363-375.
- Bezakova G, Lomo T. (2001). Muscle activity and muscle agrin regulate the organization of cytoskeletal proteins and attached acetylcholine receptor (AChR) aggregates in skeletal muscle fibers. *J Cell Biol*; 153: 1453-1463.
- Bon S, Ayon A, Leroy J, Massoulie J. (2003). Trimerization domain of the collagen tail of acetylcholinesterase. *Neurochem Res*; 28: 523-535.
- Bon S, Coussen F, Massoulie J. (1997). Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. *J Biol Chem*; 272: 3016-3021.
- Bon S, Massoulie J. (1978). Collagenase sensitivity and aggregation properties of Electrophorus acetylcholinesterase. *Eur J Biochem*; 89: 89-94.
- Bon S, Massoulie J. (1997). Quaternary associations of acetylcholinesterase. I. Oligomeric associations of T subunits with and without the amino-terminal domain of the collagen tail. *J Biol Chem*; 272: 3007-3015.
- Bon S, Rosenberry TL, Massoulie J. (1991). Amphiphilic, glycoposphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC)-insensitive monomers and dimers of acetylcholinesterase. *Cell Mol Neurobiol*; 11: 157-172.
- Bon S, Toutant JP, Meflah K, Massoulie J. (1988a). Amphiphilic and nonamphiphilic forms of Torpedo cholinesterases: I. Solubility and aggregation properties. *J Neurochem*; 51: 776-785.
- Bon S, Toutant JP, Meflah K, Massoulie J. (1988b). Amphiphilic and nonamphiphilic forms of Torpedo cholinesterases: II. Electrophoretic variants and phosphatidylinositol phospholipase C-sensitive and -insensitive forms. *J Neurochem*; 51: 786-794.
- Botti SA, Felder CE, Sussman JL, Silman I. (1998). Electrotactins: a class of adhesion proteins with conserved electrostatic and structural motifs. *Protein Eng*; 11: 415-420.

- Bourne Y, Taylor P, Marchot P. (1995). Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. *Cell*; 83: 503-512.
- Bowe MA, Fallon JR. (1995). The role of agrin in synapse formation. *Annu Rev Neurosci*; 18: 443-462.
- Bowman W, Marshall I, Gibb A. (1984). Is there functional feedback control of transmitter release at the neuromuscular junction? *Seminars Anesthesia*; III: 275-283.
- Braga MF, Rowan EG, Harvey AL, Bowman WC. (1993). Prejunctional action of neostigmine on mouse neuromuscular preparations. *Br J Anaesth*; 70: 405-410.
- Brandan E, Maldonado M, Garrido J, Inestrosa NC. (1985). Anchorage of collagen-tailed acetylcholinesterase to the extracellular matrix is mediated by heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol*; 101: 985-992.
- Brenner T, Hamra-Amitay Y, Evron T, Boneva N, Seidman S, Soreq H. (2003). The role of readthrough acetylcholinesterase in the pathophysiology of myasthenia gravis. *Faseb J*; 17: 214-222.
- Buchanan J, Sun YA, Poo MM. (1989). Studies of nerve-muscle interactions in *Xenopus* cell culture: fine structure of early functional contacts. *J Neurosci*; 9: 1540-1554.
- Burden SJ. (1998). The formation of neuromuscular synapses. *Genes Dev*; 12: 133-148.
- Burden SJ. (2002). Building the vertebrate neuromuscular synapse. *J Neurobiol*; 53: 501-511.
- 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.

## **C**

- Cajal R. Deeneration and regeneration of the nervous system. (1928). London.
- Calderon FH, von Bernhardt R, De Ferrari G, Luza S, Aldunate R, Inestrosa NC. (1998). Toxic effects of acetylcholinesterase on neuronal and glial-like cells in vitro. *Mol Psychiatry*; 3: 247-255.
- Camp S, Zhang L, Marquez M. (2004). In: Campos NCIEO, editor. *Cholinesterases in the Second Millenium: Biomolecular and Pathological Aspects*, 43-47.
- Camp S, Zhang L, Marquez M, de la Torre B, Long JM, Bucht G, Taylor P. (2005). Acetylcholinesterase (AChE) gene modification in transgenic animals: functional consequences of selected exon and regulatory region deletion. *Chem Biol Interact*; 157-158: 79-86.
- Carson KA, Geula C, Mesulam MM. (1991). Electron microscopic localization of cholinesterase activity in Alzheimer brain tissue. *Brain Res*; 540: 204-208.

- Cartaud A, Strohlic L, Guerra M, Blanchard B, Lambergeon M, Krejci E, Cartaud J, Legay C. (2004). MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol*; 165: 505-515.
- Castonguay A, Robitaille R. (2001). Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca<sup>2+</sup> internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci*; 21: 1911-1922.
- Caulfield MP. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther*; 58: 319-379.
- Chan SL, Shirachi DY, Bhargava HN, Gardner E, Trevor AJ. (1972). Purification and properties of multiple forms of brain acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). *J Neurochem*; 19: 2747-2758.
- Chapron J, De La Porte S, Delepine L, Koenig J. (1997). Schwann cells modify expression of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase at rat neuromuscular junctions. *Eur J Neurosci*; 9: 260-270.
- Charvin N, L'Eveque C, Walker D, Berton F, Raymond C, Kataoka M, Shoji-Kasai Y, Takahashi M, De Waard M, Seagar MJ. (1997). Direct interaction of the calcium sensor protein synaptotagmin I with a cytoplasmic domain of the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *Embo J*; 16: 4591-4596.
- Chesnoy-Marchais D, Tritsch D. Les canaux calcium. (1999). In: Trisch D, Chesnoy-Marchais D and Feltz A, editors. *Physiologie du neurone*, 229-258.
- Cohen I, Rimer M, Lomo T, McMahan UJ. (1997). Agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle fibers in vivo. *Mol Cell Neurosci*; 9: 237-253.
- Combes D, Fedon Y, Grauso M, Toutant JP, Arpagaus M. (2000). Four genes encode acetylcholinesterases in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. cDNA sequences, genomic structures, mutations and in vivo expression. *J Mol Biol*; 300: 727-742.
- Corringer PJ, Le Novere N, Changeux JP. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 40: 431-458.
- Cousin X, Bon S, Duval N, Massoulie J, Bon C. (1996a). Cloning and expression of acetylcholinesterase from *Bungarus fasciatus* venom. A new type of cooh-terminal domain; involvement of a positively charged residue in the peripheral site. *J Biol Chem*; 271: 15099-15108.
- Cousin X, Bon S, Massoulie J, Bon C. (1998). Identification of a novel type of alternatively spliced exon from the acetylcholinesterase gene of *Bungarus fasciatus*. Molecular forms of acetylcholinesterase in the snake liver and muscle. *J Biol Chem*; 273: 9812-9820.
- Cousin X, Creminon C, Grassi J, Meflah K, Cornu G, Saliou B, Bon S, Massoulie J, Bon C. (1996b). Acetylcholinesterase from *Bungarus* venom: a monomeric species. *FEBS Lett*; 387: 196-200.

- Cousin X, Strahle U, Chatonnet A. (2005). Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models. *Bioessays*; 27: 189-200.
- Coussen F, Ayon A, Le Goff A, Leroy J, Massoulie J, Bon S. (2001). Addition of a glycoposphatidylinositol to acetylcholinesterase. Processing, degradation, and secretion. *J Biol Chem*; 276: 27881-27892.
- Couteaux R. Motor endplate structure. (1973). In: Bourne G, editor. *Structure and function of muscle*. Vol 2. New York, 483-530.
- Couteaux R, Pecot-Dechavassine M. (1974). [Specialized areas of presynaptic membranes]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*; 278: 291-293.
- Covault J, Sanes JR. (1986). Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J Cell Biol*; 102: 716-730.

## **D**

- Darboux I, Barthalay Y, Piovant M, Hipeau-Jacquotte R. (1996). The structure-function relationships in *Drosophila* neurotactin show that cholinesterasic domains may have adhesive properties. *Embo J*; 15: 4835-4843.
- Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci*; 4: 131-138.
- Darvesh S, Kumar R, Roberts S, Walsh R, Martin E. (2001). Butyrylcholinesterase-Mediated enhancement of the enzymatic activity of trypsin. *Cell Mol Neurobiol*; 21: 285-296.
- Davis AF, Bai J, Fasshauer D, Wolowick MJ, Lewis JL, Chapman ER. (1999). Kinetics of synaptotagmin responses to Ca<sup>2+</sup> and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron*; 24: 363-376.
- Day NC, Wood SJ, Ince PG, Volsen SG, Smith W, Slater CR, Shaw PJ. (1997). Differential localization of voltage-dependent calcium channel  $\alpha 1$  subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci*; 17: 6226-6235.
- De la Escalera S, Bockamp EO, Moya F, Piovant M, Jimenez F. (1990). Characterization and gene cloning of neurotactin, a *Drosophila* transmembrane protein related to cholinesterases. *Embo J*; 9: 3593-3601.
- DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell*; 85: 501-512.
- Dennis MJ. (1981). Development of the neuromuscular junction: inductive interactions between cells. *Annu Rev Neurosci*; 4: 43-68.

- Deprez P, Doss-Pepe E, Brodsky B, Inestrosa NC. (2000). Interaction of the collagen-like tail of asymmetric acetylcholinesterase with heparin depends on triple-helical conformation, sequence and stability. *Biochem J*; 350 Pt 1: 283-290.
- Deprez P, Inestrosa NC, Krejci E. (2003). Two different heparin-binding domains in the triple-helical domain of ColQ, the collagen tail subunit of synaptic acetylcholinesterase. *J Biol Chem*; 278: 23233-23242.
- Deprez PN, Inestrosa NC. (1995). Two heparin-binding domains are present on the collagenic tail of asymmetric acetylcholinesterase. *J Biol Chem*; 270: 11043-11046.
- Descarries L. (1998). The hypothesis of an ambient level of acetylcholine in the central nervous system. *J Physiol Paris*; 92: 215-220.
- Dubovy P, Haninec P. (1990). Non-specific cholinesterase activity of the developing peripheral nerves and its possible function in cells in intimate contact with growing axons of chick embryo. *Int J Dev Neurosci*; 8: 589-602.
- Duclert A, Changeux JP. (1995). Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiol Rev*; 75: 339-368.
- Duval N, Massoulie J, Bon S. (1992). H and T subunits of acetylcholinesterase from Torpedo, expressed in COS cells, generate all types of globular forms. *J Cell Biol*; 118: 641-653.
- Duysen EG, Stribley JA, Fry DL, Hinrichs SH, Lockridge O. (2002). Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse. *Brain Res Dev Brain Res*; 137: 43-54.

## **E**

- Edwards C, Frisch HL. (1976). A model for the localization of acetylcholine receptors at the muscle endplate. *J Neurobiol*; 7: 377-381.
- Eisenhaber B, Maurer-Stroh S, Novatchkova M, Schneider G, Eisenhaber F. (2003). Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins. *Bioessays*; 25: 367-385.
- Emmerling MR, Johnson CD, Mosher DF, Lipton BH, Lilien JE. (1981). Cross-linking and binding of fibronectin with asymmetric acetylcholinesterase. *Biochemistry*; 20: 3242-3247.
- ESTHER (banque de données): <http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER/general?what=index>
- Evers J, Laser M, Sun YA, Xie ZP, Poo MM. (1989). Studies of nerve-muscle interactions in *Xenopus* cell culture: analysis of early synaptic currents. *J Neurosci*; 9: 1523-1539.

## F

- Fambrough DM. (1979). Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Physiol Rev*; 59: 165-227.
- Feng G, Krejci E, Molgo J, Cunningham JM, Massoulié J, Sanes JR. (1999). Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol*; 144: 1349-1360.
- Feng Z, Koirala S, Ko CP. (2005). Synapse-glia interactions at the vertebrate neuromuscular junction. *Neuroscientist*; 11: 503-513.
- Ferguson MA, Duszenko M, Lamont GS, Overath P, Cross GA. (1986). Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. N-glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. *J Biol Chem*; 261: 356-362.
- Fernandez HL, Moreno RD, Inestrosa NC. (1996). Tetrameric (G4) acetylcholinesterase: structure, localization, and physiological regulation. *J Neurochem*; 66: 1335-1346.
- Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Sudhof TC. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*; 410: 41-49.
- Fitzpatrick-McElligott S, Stent GS. (1981). Appearance and localization of acetylcholinesterase in embryos of the leech *Helobdella triserialis*. *J Neurosci*; 1: 901-907.
- Flucher BE, Daniels MP. (1989). Distribution of Na<sup>+</sup> channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron*; 3: 163-175.
- Fournier D, Karch F, Bride JM, Hall LM, Berge JB, Spierer P. (1989). *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutations. *J Mol Biol*; 210: 15-22.
- Fox MA, Umemori H. (2006). Seeking long-term relationship: axon and target communicate to organize synaptic differentiation. *J Neurochem*; 97: 1215-1231.
- Frank E, Fischbach GD. (1979). Early events in neuromuscular junction formation in vitro: induction of acetylcholine receptor clusters in the postsynaptic membrane and morphology of newly formed synapses. *J Cell Biol*; 83: 143-158.
- Frank E, Gautvik K, Sommerschild H. (1976). Persistence of junctional acetylcholine receptors following denervation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 40: 275-281.
- Frobert Y, Creminon C, Cousin X, Remy MH, Chatel JM, Bon S, Bon C, Grassi J. (1997). Acetylcholinesterases from Elapidae snake venoms: biochemical, immunological and enzymatic characterization. *Biochim Biophys Acta*; 1339: 253-267.
- Froehner SC, Luetje CW, Scotland PB, Patrick J. (1990). The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron*; 5: 403-410.

Futerman AH, Low MG, Michaelson DM, Silman I. (1985). Solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Neurochem*; 45: 1487-1494.

## G

Galli T, Martinez-Arca S, Paumet F. (2002). Mécanisme de la fusion membranaire. *Médecine/Sciences*; 18: 1113-1119.

Gatley SJ. (1991). Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase. *Biochem Pharmacol*; 41: 1249-1254.

Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, Sanes JR, Merlie JP. (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*; 377: 232-236.

Gennari K, Brunner J, Brodbeck U. (1987). Tetrameric detergent-soluble acetylcholinesterase from human caudate nucleus: subunit composition and number of active sites. *J Neurochem*; 49: 12-18.

Gesemann M, Cavalli V, Denzer AJ, Brancaccio A, Schumacher B, Ruegg MA. (1996). Alternative splicing of agrin alters its binding to heparin, dystroglycan, and the putative agrin receptor. *Neuron*; 16: 755-767.

Giacobini E. Cholinesterases and cholinesterases inhibitors. (2000). In: Giacobini E, editor. London, 181-226.

Gibney G, Taylor P. (1990). Biosynthesis of Torpedo acetylcholinesterase in mammalian cells. Functional expression and mutagenesis of the glycopospholipid-anchored form. *J Biol Chem*; 265: 12576-12583.

Giles K. (1997). Interactions underlying subunit association in cholinesterases. *Protein Eng*; 10: 677-685.

Gilson MK, Straatsma TP, McCammon JA, Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. (1994). Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science*; 263: 1276-1278.

Gisiger V, Belisle M, Gardiner PF. (1994). Acetylcholinesterase adaptation to voluntary wheel running is proportional to the volume of activity in fast, but not slow, rat hindlimb muscles. *Eur J Neurosci*; 6: 673-680.

Gisiger V, Jasmin B, Sherker S, Gardiner P. The pool of G4 acetylcholinesterase characterizing rodent fast muscles is differentially regulated by the predominant type, dynamic or tonic, of natural activity. (1991a). In: Massoulie J, Bacou F, Barnard E, Chatonnet A, Doctor BP and Quinn DM, editors. Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology. Washington.

- Gisiger V, Sherker S, Gardiner PF. (1991b). Swimming training increases the G4 acetylcholinesterase content of both fast ankle extensors and flexors. *FEBS Lett*; 278: 271-273.
- Gisiger V, Stephens HR. (1988). Localization of the pool of G4 acetylcholinesterase characterizing fast muscles and its alteration in murine muscular dystrophy. *J Neurosci Res*; 19: 62-78.
- Glicksman MA, Sanes JR. (1983). Differentiation of motor nerve terminals formed in the absence of muscle fibres. *J Neurocytol*; 12: 661-671.
- Grauso M, Culetto E, Combes D, Fedon Y, Toutant JP, Arpagaus M. (1998). Existence of four acetylcholinesterase genes in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *FEBS Lett*; 424: 279-284.
- Graveley BR. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet*; 17: 100-107.
- Green TL, Hunter DD, Chan W, Merlie JP, Sanes JR. (1992). Synthesis and assembly of the synaptic cleft protein S-laminin by cultured cells. *J Biol Chem*; 267: 2014-2022.
- Greig NH, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway HW, Perry T, Lee B, Ingram DK, Lahiri DK. (2001). A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin*; 17: 159-165.
- Grifman M, Galyam N, Seidman S, Soreq H. (1998). Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroigin in mammalian neuritogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95: 13935-13940.
- Grisaru D, Deutsch V, Shapira M, Pick M, Sternfeld M, Melamed-Book N, Kaufer D, Galyam N, Gait MJ, Owen D, Lessing JB, Eldor A, Soreq H. (2001). ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant, has hematopoietic growth promoting activities. *Mol Med*; 7: 93-105.
- Grisaru D, Lev-Lehman E, Shapira M, Chaikin E, Lessing JB, Eldor A, Eckstein F, Soreq H. (1999). Human osteogenesis involves differentiation-dependent increases in the morphogenically active 3' alternative splicing variant of acetylcholinesterase. *Mol Cell Biol*; 19: 788-795.

## **H**

- Haas R, Brandt PT, Knight J, Rosenberry TL. (1986). Identification of amine components in a glycolipid membrane-binding domain at the C-terminus of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochemistry*; 25: 3098-3105.
- Hall LM, Spierer P. (1986). The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *Embo J*; 5: 2949-2954.

- Hall ZW. (1973). Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. *J Neurobiol*; 4: 343-361.
- Harel M, Kryger G, Rosenberry TL, Mallender WD, Lewis T, Fletcher RJ, Guss JM, Silman I, Sussman JL. (2000). Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci*; 9: 1063-1072.
- Harel M, Sussman JL, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulie J, Silman I. (1992). Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 89: 10827-10831.
- Hochner B, Parnas H, Parnas I. (1991). Effects of intra-axonal injection of Ca<sup>2+</sup> buffers on evoked release and on facilitation in the crayfish neuromuscular junction. *Neurosci Lett*; 125: 215-218.
- Holmes C, Jones SA, Budd TC, Greenfield SA. (1997). Non-cholinergic, trophic action of recombinant acetylcholinesterase on mid-brain dopaminergic neurons. *J Neurosci Res*; 49: 207-218.
- Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B. (2000). How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie*; 82: 427-446.
- Huh KH, Fuhrer C. (2002). Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses. *Mol Neurobiol*; 25: 79-112.
- Hume RI, Role LW, Fischbach GD. (1983). Acetylcholine release from growth cones detected with patches of acetylcholine receptor-rich membranes. *Nature*; 305: 632-634.
- Hunter DD, Shah V, Merlie JP, Sanes JR. (1989). A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature*; 338: 229-234.

## **I**

- Inestrosa NC, Alarcon R. (1998). Molecular interactions of acetylcholinesterase with senile plaques. *J Physiol Paris*; 92: 341-344.
- Inestrosa NC, Alvarez A, Perez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J. (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*; 16: 881-891.
- Inestrosa NC, Roberts WL, Marshall TL, Rosenberry TL. (1987). Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterases in other tissues. *J Biol Chem*; 262: 4441-4444.

## J

- Jasmin BJ, Gisiger V. (1990). Regulation by exercise of the pool of G4 acetylcholinesterase characterizing fast muscles: opposite effect of running training in antagonist muscles. *J Neurosci*; 10: 1444-1454.
- Jennings CG, Dyer SM, Burden SJ. (1993). Muscle-specific trk-related receptor with a kringle domain defines a distinct class of receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90: 2895-2899.

## K

- Katona G, Berglund GI, Hajdu J, Graf L, Szilagyi L. (2002). Crystal structure reveals basis for the inhibitor resistance of human brain trypsin. *J Mol Biol*; 315: 1209-1218.
- Katz B. The release of neurotransmitter substances. (1969). Vol: Liverpool Univ. Press, Liverpool U.K.
- Katz B, Miledi R. (1973). The binding of acetylcholine to receptors and its removal from the synaptic cleft. *J Physiol*; 231: 549-574.
- Katz B, Miledi R. (1977). Transmitter leakage from motor nerve endings. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*; 196: 59-72.
- Katz B, Thesleff S. (1957). On the factors which determine the amplitude of the miniature end-plate potential. *J Physiol*; 137: 267-278.
- Kaufer D, Friedman A, Seidman S, Soreq H. (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*; 393: 373-377.
- Kawashima K, Fujii T. (2000). Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther*; 86: 29-48.
- Knight D, Tolley LK, Kim DK, Lavidis NA, Noakes PG. (2003). Functional analysis of neurotransmission at beta2-laminin deficient terminals. *J Physiol*; 546: 789-800.
- Krejci E, Coussen F, Duval N, Chatel JM, Legay C, Puype M, Vandekerckhove J, Cartaud J, Bon S, Massoulie J. (1991). Primary structure of a collagenic tail peptide of Torpedo acetylcholinesterase: co-expression with catalytic subunit induces the production of collagen-tailed forms in transfected cells. *Embo J*; 10: 1285-1293.
- Krejci E, Legay C, Thomine S, Sketelj J, Massoulie J. (1999). Differences in expression of acetylcholinesterase and collagen Q control the distribution and oligomerization of the collagen-tailed forms in fast and slow muscles. *J Neurosci*; 19: 10672-10679.
- Krejci E, Thomine S, Boschetti N, Legay C, Sketelj J, Massoulie J. (1997). The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J Biol Chem*; 272: 22840-22847.

- Kreutzberg GW. (1969). Neuronal dynamics and axonal flow. IV. Blockage of intra-axonal enzyme transport by colchicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 62: 722-728.
- Kronman C, Ordentlich A, Barak D, Velan B, Shafferman A. (1994). The "back door" hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase challenged by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*; 269: 27819-27822.
- Kryger G, Harel M, Giles K, Toker L, Velan B, Lazar A, Kronman C, Barak D, Ariel N, Shafferman A, Silman I, Sussman JL. (2000). Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*; 56: 1385-1394.
- Kullberg RW, Lentz TL, Cohen MW. (1977). Development of the myotomal neuromuscular junction in *Xenopus laevis*: an electrophysiological and fine-structural study. *Dev Biol*; 60: 101-129.

## **L**

- Land BR, Harris WV, Salpeter EE, Salpeter MM. (1984). Diffusion and binding constants for acetylcholine derived from the falling phase of miniature endplate currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 81: 1594-1598.
- Layer PG. (1990). Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. *Bioessays*; 12: 415-420.
- Layer PG. (1991). Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cell Mol Neurobiol*; 11: 7-33.
- Layer PG, Weikert T, Alber R. (1993). Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res*; 273: 219-226.
- Lee SL, Heinemann S, Taylor P. (1982). Structural characterization of the asymmetric (17 + 13) S forms of acetylcholinesterase from *Torpedo*. I. Analysis of subunit composition. *J Biol Chem*; 257: 12282-12291.
- Legay C, Bon S, Massoulie J. (1993a). Expression of a cDNA encoding the glycolipid-anchored form of rat acetylcholinesterase. *FEBS Lett*; 315: 163-166.
- Legay C, Bon S, Vernier P, Coussen F, Massoulie J. (1993b). Cloning and expression of a rat acetylcholinesterase subunit: generation of multiple molecular forms and complementarity with a *Torpedo* collagenic subunit. *J Neurochem*; 60: 337-346.
- Legay C, Huchet M, Massoulie J, Changeux JP. (1995). Developmental regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization. *Eur J Neurosci*; 7: 1803-1809.
- Lev-Lehman E, Deutsch V, Eldor A, Soreq H. (1997). Immature human megakaryocytes produce nuclear-associated acetylcholinesterase. *Blood*; 89: 3644-3653.

- Li B, Duysen EG, Volpicelli-Daley LA, Levey AI, Lockridge O. (2003). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor function in acetylcholinesterase knockout mice. *Pharmacol Biochem Behav*; 74: 977-986.
- Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond P, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O. (2000). Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J Neurochem*; 75: 1320-1331.
- Li RA, Tsushima RG, Kallen RG, Backx PH. (1997). Pore residues critical for mu-CTX binding to rat skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels revealed by cysteine mutagenesis. *Biophys J*; 73: 1874-1884.
- Li Y, Camp S, Rachinsky TL, Getman D, Taylor P. (1991). Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J Biol Chem*; 266: 23083-23090.
- Li Y, Camp S, Taylor P. (1993). Tissue-specific expression and alternative mRNA processing of the mammalian acetylcholinesterase gene. *J Biol Chem*; 268: 5790-5797.
- Linden DC, Jerian SM, Letinsky MS. (1988). Neuromuscular junction development in the cutaneous pectoris muscle of *Rana catesbeiana*. *Exp Neurol*; 99: 735-760.
- Llinas RR, Greenfield SA. (1987). On-line visualization of dendritic release of acetylcholinesterase from mammalian substantia nigra neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 84: 3047-3050.
- Lockridge O, Masson P. (2000). Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*; 21: 113-126.
- Lockridge O, Mottershaw-Jackson N, Eckerson HW, La Du BN. (1980). Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther*; 215: 1-8.
- Lupa MT, Gordon H, Hall ZW. (1990). A specific effect of muscle cells on the distribution of presynaptic proteins in neurites and its absence in a C2 muscle cell variant. *Dev Biol*; 142: 31-43.
- Lupa MT, Hall ZW. (1989). Progressive restriction of synaptic vesicle protein to the nerve terminal during development of the neuromuscular junction. *J Neurosci*; 9: 3937-3945.

## **M**

- Magazanik L. Postsynaptic potentiation in neuromuscular junction. (1989). In: Sellin L, Libelius R and Thesleff S, editors. *Neuromuscular junction*. Vol 13, 259-272.
- Magazanik L, Fedorov V, Giniatullin R, Nikolsky E, Snetkov V. Functional role of cholinesterase in different types of neuromuscular junctions. (1984a). In: Brzin M, Barnard E, Sket D and Berlin W, editors. *Fundamental and applied aspects*, 229-242.

- Magazanik LG, Nikolsky EE, Giniatullin RA. (1984b). End-plate currents evoked by paired stimuli in frog muscle fibres. *Pflugers Arch*; 401: 185-192.
- Mallender WD, Szegletes T, Rosenberry TL. (2000). Acetylthiocholine binds to asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway. *Biochemistry*; 39: 7753-7763.
- Marchot P, Ravelli RB, Raves ML, Bourne Y, Vellom DC, Kanter J, Camp S, Sussman JL, Taylor P. (1996). Soluble monomeric acetylcholinesterase from mouse: expression, purification, and crystallization in complex with fasciculin. *Protein Sci*; 5: 672-679.
- Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW. (2000). From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J Neurosci*; 20: 3663-3675.
- Masson P. (1989). A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. *Biochim Biophys Acta*; 998: 258-266.
- Masson P, Froment MT, Fortier PL, Visicchio JE, Bartels CF, Lockridge O. (1998). Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. *Biochim Biophys Acta*; 1387: 41-52.
- Massoulie J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*; 11: 130-143.
- Massoulie J, Anselmet A, Bon S, Krejci E, Legay C, Morel N, Simon S. (1998). Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *J Physiol Paris*; 92: 183-190.
- Massoulie J, Bon S. (1982). The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neurosci*; 5: 57-106.
- Massoulie J, Bon S, Perrier N, Falasca C. (2005). The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact*; 157-158: 3-14.
- Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. (1993a). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*; 41: 31-91.
- Massoulie J, Sussman J, Bon S, Silman I. (1993b). Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog Brain Res*; 98: 139-146.
- Massoulie J, Sussman J, Doctor BP, Soreq H, Velan B, Cygler M, Rotundo RL, Shafferman A, Silman I, Taylor P. (1992). In: Shafferman A and Velan B, editors. *Multidisciplinary Approaches to cholinesterase function*, 285-288.
- Matteoli M, Balbi S, Sala C, Chini B, Cimino M, Vitadello M, Fumagalli G. (1990a). Developmentally regulated expression of calcitonin gene-related peptide at mammalian neuromuscular junction. *J Mol Neurosci*; 2: 175-184.

- Matteoli M, Haimann C, De Camilli P. (1990b). Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience*; 37: 271-275.
- Maulet Y, Camp S, Gibney G, Rachinsky TL, Ekstrom TJ, Taylor P. (1990). Single gene encodes glycopospholipid-anchored and asymmetric acetylcholinesterase forms: alternative coding exons contain inverted repeat sequences. *Neuron*; 4: 289-301.
- McMahan UJ. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 55: 407-418.
- McMahan UJ, Horton SE, Werle MJ, Honig LS, Kroger S, Ruegg MA, Escher G. (1992). Agrin isoforms and their role in synaptogenesis. *Curr Opin Cell Biol*; 4: 869-874.
- Merlie JP, Sanes JR. (1985). Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibres. *Nature*; 317: 66-68.
- Meshorer E, Erb C, Gazit R, Pavlovsky L, Kaufer D, Friedman A, Glick D, Ben-Arie N, Soreq H. (2002). Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity. *Science*; 295: 508-512.
- Meshorer E, Toiber D, Zurel D, Sahly I, Dori A, Cagnano E, Schreiber L, Grisaru D, Tronche F, Soreq H. (2004). Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and protein products. *J Biol Chem*; 279: 29740-29751.
- Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, Quinn B. (2002a). Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol Dis*; 9: 88-93.
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. (2002b). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*; 110: 627-639.
- Miner JH, Cunningham J, Sanes JR. (1998). Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *J Cell Biol*; 143: 1713-1723.
- Minic J, Barbier, J., Chatonnet, A., Krejci, E., Molgo, J. (2004). Synaptic transmission at AChE<sup>-/-</sup> and ColQ<sup>-/-</sup> knockout mouse neuromuscular junctions. *Cholinesterase in the Second Millenium: Biomolecular and Pathological Aspects*; N. Inestrosa, E.O. Campos (Eds): 19-23.
- Minic J, Chatonnet A, Krejci E, Molgo J. (2003). Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol*; 138: 177-187.
- Minic J, Molgo J, Karlsson E, Krejci E. (2002). Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci*; 15: 439-448.
- Mirsky R, Jessen KR. (1996). Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr Opin Neurobiol*; 6: 89-96.

- Moran P, Caras IW. (1992). Proteins containing an uncleaved signal for glycosylphosphatidylinositol membrane anchor attachment are retained in a post-ER compartment. *J Cell Biol*; 119: 763-772.
- Morel N, Leroy J, Ayon A, Massoulie J, Bon S. (2001). Acetylcholinesterase H and T dimers are associated through the same contact. Mutations at this interface interfere with the C-terminal T peptide, inducing degradation rather than secretion. *J Biol Chem*; 276: 37379-37389.
- Moscoso LM, Chu GC, Gautam M, Noakes PG, Merlie JP, Sanes JR. (1995). Synapse-associated expression of an acetylcholine receptor-inducing protein, ARIA/heregulin, and its putative receptors, ErbB2 and ErbB3, in developing mammalian muscle. *Dev Biol*; 172: 158-169.

## **N**

- Nachon F, Nicolet Y, Viguie N, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Lockridge O. (2002). Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization. *Eur J Biochem*; 269: 630-637.
- Naguib M, Flood P, McArdle JJ, Brenner HR. (2002). Advances in neurobiology of the neuromuscular junction: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology*; 96: 202-231.
- Nakajima Y, Kidokoro Y, Klier FG. (1980). The development of functional neuromuscular junctions in vitro: an ultrastructural and physiological study. *Dev Biol*; 77: 52-72.
- Nathanson NM. (2000). A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97: 6245-6247.
- Neville LF, Gnatt A, Loewenstein Y, Soreq H. (1990). Aspartate-70 to glycine substitution confers resistance to naturally occurring and synthetic anionic-site ligands on in-ovo produced human butyrylcholinesterase. *J Neurosci Res*; 27: 452-460.
- Nishimune H, Miner JH, Sanes JR. Roles of individual synaptic laminin chains in presynaptic differentiation at the neuromuscular junction. (2005). Abstract Viewer/Itinerary Planner. Program No. 368.2. Society for Neuroscience. Washington, DC.
- Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS. (2004). A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature*; 432: 580-587.
- Norel X, Angrisani M, Labat C, Gorenne I, Dulmet E, Rossi F, Brink C. (1993). Degradation of acetylcholine in human airways: role of butyrylcholinesterase. *Br J Pharmacol*; 108: 914-919.

## **O**

Oliver LJ, Chatel JM, Massoulie J, Vigny M, Vallette FM. (1992). Molecular forms of acetylcholinesterase in dystrophic (mdx) mouse tissues. *Neuromuscul Disord*; 2: 87-97.

Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, et al. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*; 5: 197-211.

## **P**

Paoletti F, Mocali A, Vannucchi AM. (1992). Acetylcholinesterase in murine erythroleukemia (Friend) cells: evidence for megakaryocyte-like expression and potential growth-regulatory role of enzyme activity. *Blood*; 79: 2873-2879.

Parnas H, Dudel J, Parnas I. (1986). Neurotransmitter release and its facilitation in crayfish. VII. Another voltage dependent process beside Ca entry controls the time course of phasic release. *Pflugers Arch*; 406: 121-130.

Parnas H, Segel L, Dudel J, Parnas I. (2000). Autoreceptors, membrane potential and the regulation of transmitter release. *Trends Neurosci*; 23: 60-68.

Patton BL. (2003). Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses. *J Neurocytol*; 32: 883-903.

Patton BL, Cunningham JM, Thyboll J, Kortessmaa J, Westerblad H, Edstrom L, Tryggvason K, Sanes JR. (2001). Properly formed but improperly localized synaptic specializations in the absence of laminin alpha4. *Nat Neurosci*; 4: 597-604.

Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR. (1997). Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol*; 139: 1507-1521.

Peng HB, Xie H, Rossi SG, Rotundo RL. (1999). Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J Cell Biol*; 145: 911-921.

Perrier AL, Cousin X, Boschetti N, Haas R, Chatel JM, Bon S, Roberts WL, Pickett SR, Massoulie J, Rosenberry TL, Krejci E. (2000). Two distinct proteins are associated with tetrameric acetylcholinesterase on the cell surface. *J Biol Chem*; 275: 34260-34265.

Perrier AL, Massoulie J, Krejci E. (2002). PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*; 33: 275-285.

Perrier NA, Salani M, Falasca C, Bon S, Augusti-Tocco G, Massoulie J. (2005). The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *J Neurochem*; 94: 629-638.

Peters MF, Sadoulet-Puccio HM, Grady MR, Kramarcy NR, Kunkel LM, Sanes JR, Sealock R, Froehner SC. (1998). Differential membrane localization and intermolecular associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. *J Cell Biol*; 142: 1269-1278.

- Phillips WD, Kopta C, Blount P, Gardner PD, Steinbach JH, Merlie JP. (1991). ACh receptor-rich membrane domains organized in fibroblasts by recombinant 43-kildalton protein. *Science*; 251: 568-570.
- Porter BE, Weis J, Sanes JR. (1995). A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin. *Neuron*; 14: 549-559.
- Poulain B. Libération de neurotransmetteurs. (1999). In: Trisch D, Chesnoy-Marchais D and Feltz A, editors. *Physiologie du neurone*, 529-578.
- Pun S, Sigrist M, Santos AF, Ruegg MA, Sanes JR, Jessell TM, Arber S, Caroni P. (2002). An intrinsic distinction in neuromuscular junction assembly and maintenance in different skeletal muscles. *Neuron*; 34: 357-370.

## **R**

- Radic Z, Pickering NA, Vellom DC, Camp S, Taylor P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*; 32: 12074-12084.
- 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.
- Ribchester RR, Mao F, Betz WJ. (1994). Optical measurements of activity-dependent membrane recycling in motor nerve terminals of mammalian skeletal muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*; 255: 61-66.
- Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. (1993). An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90: 5128-5132.
- Rizo J, Sudhof TC. (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci*; 3: 641-653.
- Roberts WL, Doctor BP, Foster JD, Rosenberry TL. (1991). Bovine brain acetylcholinesterase primary sequence involved in intersubunit disulfide linkages. *J Biol Chem*; 266: 7481-7487.
- Robertson RT, Mostamand F. (1988). Development of 'non-specific' cholinesterase-containing neurons in the dorsal thalamus of the rat. *Brain Res*; 469: 43-60.
- Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Charlton MP. (1993). Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron*; 11: 645-655.
- Rosenberry TL, Richardson JM. (1977). Structure of 18S and 14S acetylcholinesterase. Identification of collagen-like subunits that are linked by disulfide bonds to catalytic subunits. *Biochemistry*; 16: 3550-3558.

Rossi SG, Rotundo RL. (1996). Transient interactions between collagen-tailed acetylcholinesterase and sulfated proteoglycans prior to immobilization on the extracellular matrix. *J Biol Chem*; 271: 1979-1987.

Rotundo RL, Carbonetto ST. (1987). Neurons segregate clusters of membrane-bound acetylcholinesterase along their neurites. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 84: 2063-2067.

## **S**

Salpeter MM, Loring RH. (1985). Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Prog Neurobiol*; 25: 297-325.

Salpeter MM, Marchaterre M, Harris R. (1988). Distribution of extrajunctional acetylcholine receptors on a vertebrate muscle: evaluated by using a scanning electron microscope autoradiographic procedure. *J Cell Biol*; 106: 2087-2093.

Sanes JR. (2003). The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem*; 278: 12601-12604.

Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, Hunter DD. (1990). Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol*; 111: 1685-1699.

Sanes JR, Hall ZW. (1979). Antibodies that bind specifically to synaptic sites on muscle fiber basal lamina. *J Cell Biol*; 83: 357-370.

Sanes JR, Lichtman JW. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci*; 22: 389-442.

Sanes JR, Lichtman JW. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci*; 2: 791-805.

Sanes JR, Marshall LM, McMahan UJ. (1978). Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J Cell Biol*; 78: 176-198.

Santos MD, Alkondon M, Pereira EF, Aracava Y, Eisenberg HM, Maelicke A, Albuquerque EX. (2002). The nicotinic allosteric potentiating ligand galantamine facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Mol Pharmacol*; 61: 1222-1234.

Schaeffer L, de Kerchove d'Exaerde A, Changeux JP. (2001). Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron*; 31: 15-22.

Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*; 101: 657-669.

- Schivell AE, Batchelor RH, Bajjalieh SM. (1996). Isoform-specific, calcium-regulated interaction of the synaptic vesicle proteins SV2 and synaptotagmin. *J Biol Chem*; 271: 27770-27775.
- Scott LJ, Bacou F, Sanes JR. (1988). A synapse-specific carbohydrate at the neuromuscular junction: association with both acetylcholinesterase and a glycolipid. *J Neurosci*; 8: 932-944.
- Sealock R, Wray BE, Froehner SC. (1984). Ultrastructural localization of the Mr 43,000 protein and the acetylcholine receptor in Torpedo postsynaptic membranes using monoclonal antibodies. *J Cell Biol*; 98: 2239-2244.
- Shafferman A, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Grosfeld H, Ordentlich A, Gozes Y, Cohen S, Ariel N, Barak D, et al. (1992). Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J Biol Chem*; 267: 17640-17648.
- Shafferman A, Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Ber R, Bino T, Ariel N, Osman R, Velan B. (1994). Electrostatic attraction by surface charge does not contribute to the catalytic efficiency of acetylcholinesterase. *Embo J*; 13: 3448-3455.
- Shapira YA, Sadeh ME, Bergtraum MP, Tsujino A, Ohno K, Shen XM, Brengman J, Edwardson S, Matoth I, Engel AG. (2002). Three novel COLQ mutations and variation of phenotypic expressivity due to G240X. *Neurology*; 58: 603-609.
- Sikorav JL, Duval N, Anselmet A, Bon S, Krejci E, Legay C, Osterlund M, Reimund B, Massoulie J. (1988). Complex alternative splicing of acetylcholinesterase transcripts in Torpedo electric organ; primary structure of the precursor of the glycolipid-anchored dimeric form. *Embo J*; 7: 2983-2993.
- Silver A. (1963). A Histochemical Investigation of Cholinesterases at Neuromuscular Junctions in Mammalian and Avian Muscle. *J Physiol*; 169: 386-393.
- Simon S, Krejci E, Massoulie J. (1998). A four-to-one association between peptide motifs: four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway. *Embo J*; 17: 6178-6187.
- Sketelj J, Brzin M. (1985). Asymmetric molecular forms of acetylcholinesterase in mammalian skeletal muscles. *J Neurosci Res*; 14: 95-103.
- Slater CR. (1982). Neural influence on the postnatal changes in acetylcholine receptor distribution at nerve-muscle junctions in the mouse. *Dev Biol*; 94: 23-30.
- Small DH, Michaelson S, Sberna G. (1996). Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem Int*; 28: 453-483.
- Small DH, Reed G, Whitefield B, Nurcombe V. (1995). Cholinergic regulation of neurite outgrowth from isolated chick sympathetic neurons in culture. *J Neurosci*; 15: 144-151.
- Song JY, Ichtchenko K, Sudhof TC, Brose N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96: 1100-1105.

- Sorensen K, Gentinetta R, Brodbeck U. (1982). An amphiphile-dependent form of human brain caudate nucleus acetylcholinesterase: purification and properties. *J Neurochem*; 39: 1050-1060.
- Soreq H, Seidman S. (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*; 2: 294-302.
- Soreq H, Zakut H. *Human cholinesterases and anticholinesterases*. (1993). San Diego, California.
- Sudhof TC. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*; 27: 509-547.
- Sugiura Y, Woppmann A, Miljanich GP, Ko CP. (1995). A novel omega-conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurocytol*; 24: 15-27.
- Sun H, El Yazal J, Lockridge O, Schopfer LM, Brimijoin S, Pang YP. (2001). Predicted Michaelis-Menten complexes of cocaine-butyrylcholinesterase. Engineering effective butyrylcholinesterase mutants for cocaine detoxication. *J Biol Chem*; 276: 9330-9336.
- Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*; 253: 872-879.
- Szegletes T, Mallender WD, Thomas PJ, Rosenberry TL. (1999). Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry*; 38: 122-133.

## **T**

- Tan RC, Truong TN, McCammon JA, Sussman JL. (1993). Acetylcholinesterase: electrostatic steering increases the rate of ligand binding. *Biochemistry*; 32: 401-403.
- Taylor P, Luo ZD, Camp S. (2000). In: E. G, editor. *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. London, 63-79.
- Tello F. (1907). Dégénération et régénération des plaques motrices après la section des nerfs. *Trav. Laboratory Recherches Biol.*; 5: 117-149.

## V

- Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, Rojas E, Mattsson K, Compton DL, Nunez L, Park JS, Stark JL, Gies DR, et al. (1995). Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron*; 15: 573-584.
- Van der Kloot W, Molgo J. (1994). Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev*; 74: 899-991.
- Vellom DC, Radic Z, Li Y, Pickering NA, Camp S, Taylor P. (1993). Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*; 32: 12-17.

## W

- Wallace BG. (1989). Agrin-induced specializations contain cytoplasmic, membrane, and extracellular matrix-associated components of the postsynaptic apparatus. *J Neurosci*; 9: 1294-1302.
- Weitnauer E, Ebert C, Hucho F, Robitzki A, Weise C, Layer PG. (1999). Butyrylcholinesterase is complexed with transferrin in chicken serum. *J Protein Chem*; 18: 205-214.
- Wenthold RJ, Mahler HR, Moore WJ. (1974). Properties of acetylcholinesterase from rat brain. *J Neurochem*; 22: 945-949.
- Wood SJ, Slater CR. (1997). The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles. *J Physiol*; 500 ( Pt 1): 165-176.
- Wood SJ, Slater CR. (1998). beta-Spectrin is colocalized with both voltage-gated sodium channels and ankyrinG at the adult rat neuromuscular junction. *J Cell Biol*; 140: 675-684.
- Wright CI, Geula C, Mesulam MM. (1993a). Neurological cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann Neurol*; 34: 373-384.
- Wright CI, Geula C, Mesulam MM. (1993b). Protease inhibitors and indoleamines selectively inhibit cholinesterases in the histopathologic structures of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90: 683-686.

## **X**

Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, Taylor P, Hinrichs SH, Lockridge O. (2000). Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther*; 293: 896-902.

Xie W, Wilder PJ, Stribley J, Chatonnet A, Rizzino A, Taylor P, Hinrichs SH, Lockridge O. (1999). Knockout of one acetylcholinesterase allele in the mouse. *Chem Biol Interact*; 119-120: 289-299.

Xie ZP, Poo MM. (1986). Initial events in the formation of neuromuscular synapse: rapid induction of acetylcholine release from embryonic neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 83: 7069-7073.

## **Y**

Young SH, Poo MM. (1983a). Rapid lateral diffusion of extrajunctional acetylcholine receptors in the developing muscle membrane of *Xenopus* tadpole. *J Neurosci*; 3: 225-231.

Young SH, Poo MM. (1983b). Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurones. *Nature*; 305: 634-637.

Yu SP, Van der Kloot W. (1990). Non-quantal acetylcholine release at mouse neuromuscular junction: effects of elevated quantal release and aconitine. *Neurosci Lett*; 117: 111-116.

## **Z**

Zhu X, Lai C, Thomas S, Burden SJ. (1995). Neuregulin receptors, erbB3 and erbB4, are localized at neuromuscular synapses. *Embo J*; 14: 5842-5848.

Zucker RS. (1996). Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron*; 17: 1049-1055.

# *Annexe*

## **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**

---

### **Publications dans des revues à comité de lecture**

1. GIRARD E., MINIC J., BERNARD V., CHATONNET A., KREJCI E. & MOLGO J. Butyrylcholinesterase and the control of quantal acetylcholine release from motor nerve terminals. **Life Sci.** (soumis). \*
2. BOURNAUD R., HIDALGO J., YU H., GIRARD E. & SHIMAHARA T. Catecholamine secretion from rat foetal adrenal chromaffin cells and hypoxia sensitivity. (accepté pour publication à "European Journal of Physiology – Pflügers Archiv"). \*
3. GIRARD E., BERNARD V., CAMP S., TAYLOR T., KREJCI E. & MOLGO J. (2006). Remodeling of the neuromuscular junction in mice with deleted exons 5 and 6 of acetylcholinesterase. **J. Mol. Neurosci.**, 30: 99-100. \*
4. ROUX S., SAINT CLOMENT C., CURIE T., GIRARD E., MIANA-MENA F.J., BARBIER J., OSTA R., MOLGO J. & BRULET P. (2006). Brain-derived neurotrophic factor facilitates in vivo internalization of tetanus neurotoxin C-terminal fragment's fusion proteins in mature mouse motor nerve terminals. **Eur. J. Neurosci.**, 24: 1546-1554. \*
5. GIRARD E., BARBIER J., CHATONNET A., KREJCI E. & MOLGO J. (2005). Synaptic remodeling at the skeletal neuromuscular junction of acetylcholinesterase knockout mice and its physiological relevance. **Chem. Biol. Inter.**, 157–158: 87–96. \*
6. ROUX S., SAINT CLOMENT C., CURIE T., GIRARD E., BRÛLET P. & MOLGÓ J. (2005). Utilisation du fragment C-terminal de la neurotoxine tétanique pour visualiser et analyser des connexions neuronales et pour le transfert d'une activité biologique associée. **J. Soc Biol.**, 199 : 35-44. \*
7. ROUX S., COLASANTE C., SAINT CLOMENT C., BARBIER J., CURIE T., GIRARD E., MOLGO J. & BRULET P. (2005). Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. **Mol. Cell. Neurosci.**, 30: 572-582. \*

### **Chapitres d'ouvrage**

1. MOLGO J., GIRARD E. & BENOIT E. (2006). The cyclic imines: an insight into this emerging group of bioactive marine toxins. In **Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry**, L.M. Botana López (Ed.), Blackwell Publishing, Iowa, USA (sous presse). \*
2. MOLGO J., GIRARD E., BENOIT E. (2006). Les imines cycliques d'origine marine et la pharmacopée naturelle. Dans **Toxines et cancer**, Collection Rencontres en Toxinologie, Goudey-Perrière F., Benoit E., Goyffon M. & Marchot P. (Eds.), Librairie Lavoisier, Paris, France, p. 107-116 (ISBN 2-7430-0958-6) (sous presse). \*
3. GIRARD E., JAIMOVICH E., VERGNE C., AL-MOURABIT A., LAURENT D. & MOLGO J. (2004). Alcaloïdes bioactifs extraits d'éponges : les xestospongines dans l'étude de la signalisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire dépendante de l'inositol 1,4,5-triphosphate. Dans **Envenimations, intoxications**, Collection Rencontres en Toxinologie, Goudey-Perrière F., Benoit E., Puisseux-Dao S. & Bon C. (Eds.), Librairie Lavoisier, Paris, France, p. 141-152 (ISBN 2-7430-0749-4). \*

4. GIRARD E., BARBIER J., BENOIT E., LAURENT D. & MOLGO J. (2003). Implication des réserves intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> dans l'augmentation de la libération d'acétylcholine indépendante du Ca<sup>2+</sup> externe et provoquée par la brevétoxine-3. Dans **Toxinogénèse, biosynthèse, ingénierie, polymorphisme, neutralisation des toxines**, Goudey-Perrière F., Bon C., Ménez A. & Puisieux-Dao S. (Eds.), Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, France p. 81-86 (ISBN 2-84299-481-7). \*

#### **Actes de colloques publiés dans des revues à comité de lecture**

1. MOLGO J., ROUX S., COLASANTE C., SAINT CLOMENT C., BARBIER J., CURIE T., GIRARD E. & BRULET P. (2006). Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. **Neurotoxicity Res.**, 9: 241.
2. GIRARD E., BARBIER J., CAMP S., TAYLOR P., CHATONNET A., KREJCI E. & MOLGO J. (2006). Synaptic efficacy and remodeling at the neuromuscular junction of knockout mice deficient in acetylcholinesterase. **J. Physiol. – Paris**, 99: 254–255. \*
3. STUM M., GIRARD E., MOLGO J., TABTI N., WILLER J.C., FONTAINE B., KREJCI E. & NICOLE S. (2006). Generation of a mouse model for Schwartz-Jampel syndrome. **J. Physiol. – Paris**, 99: 275.

#### **Communications écrites à des congrès, symposia, workshops ou colloques**

1. STUM M., GIRARD E., BERNARD V., MARQUES H., CORMIER J.G., BARON VAN EVERCOOREN A.S., FONTAINE B., MOLGO J, KREJCI E. & NICOLE S. (2006). Perlecan deficiency leads to abnormal neuromuscular junction in a mouse model of Schwartz-Jampel syndrome. **Neuroscience 2006**, Atlanta, Georgia World Congress Center (14-18 octobre), Abstract n° 823.17/BB8.
2. GIRARD E., BENOIT E., SASAKI M., FUWA H., CAGIDE E., LOUZAO M.C., BOTANA L.M. & MOLGO J. (2006). Gambierol markedly enhances evoked quantal acetylcholine release from motor nerve terminals at vertebrate skeletal neuromuscular junctions. **15<sup>th</sup> World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins**, Glasgow, Ecosse (23-28 juillet), Abstract P18 p. 192.
3. KHARRAT R., SERVENT D., GIRARD E., OUANOUNOU G. & MOLGO J. (2006). Gymnodimine-A targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptors with high affinity. **15<sup>th</sup> World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins**, Glasgow, Ecosse (23-28 juillet), Abstract p. 93.
4. GIRARD E., BERNARD V., CHATONNET A., KREJCI E. & MOLGO J. (2005). Remodelage synaptique postnatal chez des souris (KO) dépourvues d'acétylcholinestérase. **III<sup>èmes</sup> Journées Annuelles de la Société Française de Myologie**, Paris (20-21 octobre).
5. GIRARD E. BERNARD V., CAMP S., TAYLOR P., KREJCI E. & MOLGO J. (2005). Remodeling of the neuromuscular junction in mice with deleted exons 5 and 6 of acetylcholinesterase. **XII International Symposium on Cholinergic Mechanisms**, Alicante, Espagne (1-5 octobre), Abstract P041 p. 109.

6. MOLGO J., ROUX S., COLASANTE C., SAINT CLOMENT C., BARBIER J., CURIE T., GIRARD E. & BRULET P. (2005). Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. **International conference 2005 “Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins”**, Denver, Colorado, USA (23-25 juin), Abstract n°57.
7. STUM M., GIRARD E., DAVOINE C.S., MOLGO J., TABTI N., WILLER J.C., FONTAINE B., KREJCI E. & NICOLE S. (2005). Generation of a mouse model for Schwartz-Jampel syndrome: role of perlecan in neuromuscular junction formation and/or maintenance. **Congrès International de Myologie**, Cité des Congrès, Nantes (9-13 mai), Abstract n° 640 p. 125.
8. GIRARD E., CAMP S., TAYLOR P., KREJCI E. & MOLGO J. (2005). Neuromuscular transmission and synaptic remodeling at the neuromuscular junction of knockout mice with partial deletions in the acetylcholinesterase gene. **Congrès International de Myologie**, Cité des Congrès, Nantes (9-13 mai), Abstract n° 559 p. 150.
9. GIRARD E., BARBIER J., BENOIT E., LAURENT D. & MOLGO J. (2004). Intracellular Ca<sup>2+</sup> stores are involved in the increase of external Ca<sup>2+</sup>-independent quantal acetylcholine release induced by brevetoxin-3. **15<sup>th</sup> European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins**, Brdo Estate (Kranj), Slovénie (19-23 juin), Abstract p. 73.
10. ROUX S., SAINT CLOMENT C., GIRARD E., CURIE T., BARBIER J., COLASANTE C., MIANA-MENA F-J., MOLGO J. & BRULET P. (2004). Modulation par des facteurs neurotrophiques d'un trafic membranaire pré-synaptique visualisé *in vivo* à la jonction neuromusculaire par l'utilisation de traceurs dérivés de la neurotoxine tétanique. **7<sup>ème</sup> Réunion du Club Exocytose-Endocytose**, Paris (24-26 mai), Résumé p. 11.
11. GIRARD E., BARBIER J., CHATONNET A., CAMP S., TAYLOR P., VAN DER KLOOT W., KREJCI E. & MOLGO J. (2004). Caractérisation de la distribution des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine à l'aide de l' $\alpha$ -bungarotoxine fluorescente, au niveau de la jonction neuromusculaire de souris mutantes dépourvues en cholinestérases. **12<sup>èmes</sup> Rencontres en Toxinologie « Envenimations, intoxications »**, Paris (2-3 décembre), Résumé p. 39-40.

### **Communications orales à des congrès, symposia, workshops ou colloques**

1. Les cholinestérases: leurs rôles fonctionnels au niveau de la jonction neuromusculaire de souris. Séminaire dans le cadre des séminaires du **Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire**, CNRS, Gif sur Yvette (mai 2005).
2. Application de l'imagerie confocale en biologie. Séminaire dans le cadre de l'**enseignement de l'institut d'optique**, CNRS, Gif sur Yvette (mai 2005).
3. Implication des réserves intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> dans l'augmentation de la libération d'acétylcholine indépendante du Ca<sup>2+</sup> externe et provoquée par la brévéttoxine-3. Communication orale dans le cadre des **11<sup>èmes</sup> Rencontres en Toxinologie « Toxinogénèse naturelle, toxinogénèse anthropique »**, Paris (décembre 2003).

## Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice

Emmanuelle Girard<sup>1</sup>, Véronique Bernard<sup>2</sup>, Jasmina Minic<sup>1</sup>, Arnaud Chatonnet<sup>4</sup>, Eric Krejci<sup>2</sup> and Jordi Molgó<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire – UPR9040, 1, avenue de la Terrasse, Gif sur Yvette, F-91198, France

<sup>2</sup> INSERM U686, Biologie des Jonctions Neuromusculaires Normales et Pathologiques, Université René Descartes, 45 rue des Saints-Pères, Paris, F-75006, France

<sup>3</sup> INRA, Place Viala, Département de Physiologie Animale, F-34060 Montpellier, France.

\*Corresponding author: Jordi Molgó, Telephone: Fax: + 33 1 69 82 94 66

E-mail address: [Jordi.Molgo@nbcn.cnrs-gif.fr](mailto:Jordi.Molgo@nbcn.cnrs-gif.fr)

---

### ABSTRACT

At the neuromuscular junction (NMJ) acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) can hydrolyse acetylcholine (ACh). Released ACh quanta are known to diffuse rapidly across the narrow synaptic cleft and pairs of ACh molecules cooperate to open endplate channels. During their diffusion through the cleft, or after being released from muscle nicotinic ACh receptors (nAChRs), most ACh molecules are hydrolyzed by AChE highly concentrated at the NMJ. Advances in mouse genomics offered new approaches to assess the role of specific cholinesterases involved in synaptic transmission. AChE knockout mice (AChE-KO) provide a valuable tool for examining the complete abolition of AChE activity and the role of BChE. AChE-KO mice live to adulthood, and exhibit an increased sensitivity to BChE inhibitors, suggesting that BChE activity facilitated their survival and compensated for AChE function. Our results show that BChE is present at the endplate region of wild-type and AChE-KO mature muscles. The time course of synaptic potentials or currents remained unaffected by BChE-specific inhibitors, indicating that BChE is not limiting ACh duration on endplate nAChRs. Inhibition of BChE decreased evoked quantal ACh release in AChE-KO NMJs. This reduction in ACh release can explain the greatest sensitivity of AChE-KO mice to BChE inhibitors. BChE is known to be localized in perisynaptic Schwann cells which are endowed with muscarinic receptors. Our results strongly suggest that BChE's role at the NMJ is to protect nerve terminals from an excess of ACh.

**Keywords:** butyrylcholinesterase, acetylcholinesterase, acetylcholinesterase knockout mice; muscarinic receptors; cholinesterase inhibitors; acetylcholine release.

### Introduction

The vertebrate neuromuscular junction (NMJ) is one of the most studied and understood fast chemical synapse comprising a pre-synaptic element (the motor nerve terminal and perisynaptic Schwann cells) and a post-synaptic component (the skeletal muscle fiber). These pre- and post-synaptic elements of the NMJs are separated by a narrow synaptic cleft containing a synaptic basal lamina to which acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7.) molecules are anchored (Massoulie, 2002; Rotundo, 2003).

It is well accepted that acetylcholine (ACh) molecules are released from motor nerve terminals either by molecular leakage, or in quantal form (reviewed (Van der Kloot and

Molgó, 1994)); ACh then diffuses across the synaptic cleft and pairs of ACh molecules bind and cooperate to open endplate channels in the muscle fibre (Van der Kloot et al., 1994). During their diffusion through the cleft, or after being released from muscle nicotinic ACh receptors (nAChRs), most ACh molecules are rapidly hydrolyzed by AChE, which is highly concentrated at the NMJ (Aldunate et al., 2004). Interestingly, not only muscle nAChRs of the NMJ are receptive to ACh, but also motor nerve terminals and perisynaptic Schwann cells. Indeed, ACh can control its own release from nerve terminals through activation of pre-synaptic (nicotinic or muscarinic) receptors (reviewed by (Wessler, 1996)). Also, perisynaptic Schwann cells respond to ACh and to synaptic activity with  $Ca^{2+}$  elevation derived from their intracellular  $Ca^{2+}$  stores (Rochon et al., 2001), and that depends on muscarinic, not nicotinic, receptor activation (reviewed by (Auld and Robitaille, 2003)).

The classical function of AChE in regulating the duration of ACh action in the synaptic cleft is well established. However, the diversity of molecular forms participating to this action is not yet completely understood. Also, the physiological role of butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8.) present at the NMJ has not been fully determined. BChE is present in many animal species (reviewed in (Cousin et al., 2005)), and is likely to participate in the hydrolysis of ACh at vertebrate NMJs. However, the information on its precise localization in junctions' pre- and post-synaptic elements remains scarce, mainly due to the lack of selective immunological markers. Furthermore, genetic variants in the human population lacking BChE activity show no phenotype, except for their prolonged neuromuscular block after succinylcholine (Kalow, 2004; Levano et al., 2005).

Progress in mouse genomics offered new possibilities for studying the role of AChE and BChE involved in neuromuscular transmission. AChE knockout mice (AChE-KO) provided valuable tool for examining the long-term effects of complete and selective abolition of AChE activity (Xie et al., 2000), and for studying the role(s) of BChE. AChE-KO mice are able to live to adulthood, and exhibited an increased sensitivity to BChE-specific inhibitors, despite the fact that AChE-inhibitors are highly lethal to wild-type mice. In the present study we have further examined the physiological consequences of BChE inhibition at mature AChE-KO skeletal NMJs expressing only BChE. For this purpose, we analyzed the effects BChE inhibitors on quantal transmitter release and on the time course of synaptic responses, and further examined the pattern of nAChR distribution and the ultrastructure of AChE-KO NMJs.

## **Material and Methods**

### ***Transgenic mice***

The AChE-KO mice originally generated in the laboratory of Prof. O. Lockridge (Eppley Institute, Nebraska, USA) (Xie et al., 2000) were obtained by mating heterozygous male and females, in order to produce wild-type and nullizygote littermates. Original founders of the colony were kindly provided by Prof. O. Lockridge, and maintained in a 129Sv genetic background. Animals were housed in the transgenic facilities of the INRA (Montpellier) and the CNRS (Gif sur Yvette Campus). Animals were kept under standard conditions as previously detailed (Minic et al., 2003). The detailed phenotype of adult AChE-KO mice has been previously reported and discussed (Li et al., 2003). All mice used in experiments were genotyped by polymerase chain reaction, as previously detailed (Girard et al., 2005).

### ***Histochemical staining of cholinesterases***

Mice were deeply anesthetized with sodium chloral hydrate and were perfused transcardiacally with a mixture of 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH7.4) and 0.2% glutaraldehyde. The diaphragm and the tibialis anterior muscle were dissected out

and fixed overnight in 2% paraformaldehyde. Some pieces of muscle fibers were dissected and treated free-floating. Whole muscle-mounts were stained for cholinesterase activity by the method of Koelle-Friedenwald, using butyrylthiocholine or acetylthiocholine acid as substrates. Before probing, normal preparations were incubated for 30 min at room temperature with either 0.05  $\mu\text{M}$  1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-one (BW284C51) (Sigma-Aldrich Chimie (St.Quentin-Fallavier, France) to suppress AChE activity or 0.05  $\mu\text{M}$  tetraisopropylpyro-phosphoramidate (Iso-OMPA) (Sigma-Aldrich Chimie) to suppress BChE activity. Muscles were incubated for 10 min for AChE or overnight for BChE staining. The reaction was revealed for 1 min with sodium sulfide (160 mM, pH 7.5). Preparations were washed and fixed with 2% paraformaldehyde for 1 h. Images of randomly selected endplates were collected using an Olympus upright microscope (BX61) equipped with an oil-immersion lens ( $\times 60$ ) and a cooled video camera (Qimaging, Retiga 2000R, Burnaby, Canada) with a color conversion filter. Digitizing was performed with a PC computer using the image analysis system Image-Pro Plus (Silver Spring, USA).

### ***Labeling of the neuromuscular junction***

Staining of endplate nAChRs was performed with Alexa Fluor® 488 conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BTX) (Molecular Probes, Europe BV, Leiden, The Netherlands) (1 mg/ml; 1:1,000 dilution) on whole-mount preparations, fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), and rinsed several times in PBS. For the immunofluorescence of motor nerve terminals non-specific antibody binding sites were blocked by incubating fixed muscles for 1-hour in PBS containing 10% normal goat serum, 2% bovine serum albumin and 0.02% Triton X-100. Nerve terminals were immunostained with an anti-neurofilament (1:1000 dilution, NF-200, Sigma) in PBS containing 2% BSA/0.02% Triton X-100 (overnight), washed with PBS several times, followed by incubation (3 hours) with the appropriate Cy3-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Labs, Baltimore, PA, USA). Preparations were mounted on glass slides with Vectashield medium (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) and imaged with a laser scanning confocal multiphoton system (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

### ***Electrophysiological recordings***

Electrophysiological recordings were performed using conventional techniques (Minic et al., 2003). In brief, isolated phrenic-hemidiaphragm muscles were mounted in silicone-lined organ baths superfused with an oxygenated standard physiological solution of the following composition (mM): 154 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5.0 HEPES buffer, pH 7.4 and 11 glucose. Synaptic potentials and currents were recorded from endplate regions either with intracellular microelectrodes (filled with 3 M KCl solution, 8-12 M $\Omega$  resistance) or with extracellular microelectrodes (filled with 1 M NaCl solution, 1-3 M $\Omega$  resistance) and an Axoclamp-2A system (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Studies on nerve-evoked quantal transmitter release were performed either in solutions containing low Ca<sup>2+</sup> and high Mg<sup>2+</sup> concentration, or in the standard physiological solution containing 2.2  $\mu\text{M}$   $\mu$ -conotoxin GIIIB (Calbiochem (San Diego, CA, USA) to block voltage-dependent sodium channels in muscle fibers. The motor nerve was stimulated *via* a suction electrode with current pulses of 0.1 ms duration and supramaximal voltage (typically 3-8 V) at different frequencies. In experiments with bambuterol hydrochloride (kindly provided by AstraZeneca R & D, Lund, Sweden), preparations were equilibrated for 60 min with the inhibitor before recordings. In some experiments preparations were pretreated for 20 min with (iso-OMPA) and then washed out of the inhibitor for 30 min with the physiological medium before recordings.

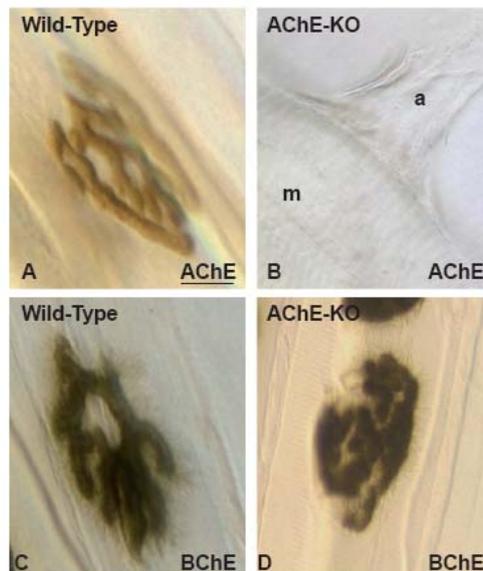
### ***Electron microscopy***

The diaphragm and tibialis of perfused mice (see above) was processed for electron microscopy as follows: junctions were identified by detecting nicotinic AChRs with  $\alpha$ -bungarotoxin coupled to biotin ( $\alpha$ -BTX-biot) using a pre-embedding immunogold method. Muscle fibers were incubated in  $\alpha$ -BTX-biot (10  $\mu$ g/ml PBS) for 3 days at 4°C. After washing, muscles were incubated for 2 hr in streptavidin coupled to gold particles (0.8 nm in diameter; Nanoprobes, New York, USA; 1:100 in PBS/BSA). The fibers were then washed and post-fixed in 1% glutaraldehyde for 10 min. After washing in acetate buffer (0.1M, pH 7), the signal of the gold immunoparticles was increased using a silver enhancement kit (HQ silver; Nanoprobes) for 2 min at room temperature in the dark. Finally, after washing in acetate buffer sections were treated with 1% osmium, dehydrated and embedded in resin. Ultra thin sections were cut, stained with lead citrate and examined in a Philips CM120 EM (Eindhoven, The Netherlands).

### **Results**

#### ***Endplate BChE in wild-type and AChE-KO muscles***

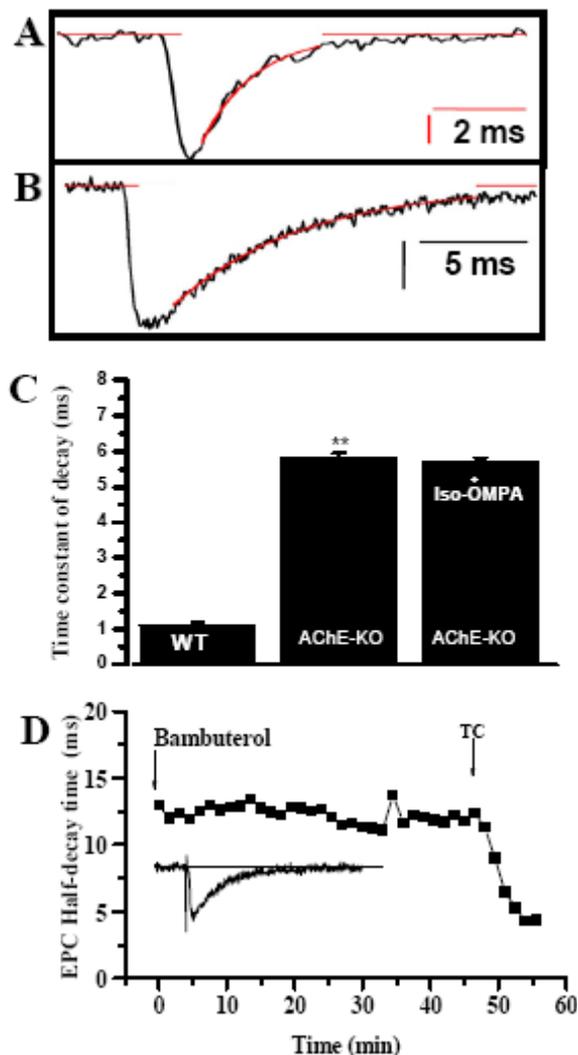
Since BChE in skeletal muscle has been reported to fall during muscle maturation, it was of interest to examine by histochemical methods its presence in mature NMJs from wild-type and AChE-KO muscles. For probing BChE and AChE activity whole-mounts of the tibialis anterior muscle were used. In wild-type muscle BChE could be revealed after blockade of AChE with the selective AChE inhibitor BW284C51 (10  $\mu$ M), while AChE was detected in muscles pretreated with 100  $\mu$ M iso-OMPA to inactivate BChE (Fig. 1). Treatment of wild-type muscles with both inhibitors suppressed the endplate staining, as expected. In AChE-KO muscles, BChE staining at the endplate was clearly evident as shown in Fig. 1, while AChE staining was lacking. These observations clearly indicate that BChE is present at the endplate region of wild-type and AChE-KO muscles. However, they do not indicate the precise localization of the enzyme at the NMJ.



**Fig. 1.** Histochemical detection of AChE and BChE in the endplate region of the Tibialis anterior muscle of wild-type and AChE-KO mice. (A) AChE is detected at the NMJ (incubation time 5 min). (B) Note the disappearance of the labeling in the AChE-KO junction, even after 24 h of incubation with the substrate, showing the specificity of the labeling. (C) In wild-type and AChE-KO junctions, BChE is detected at the NMJ. Some labeling resembling processes are seen at the periphery of the NMJ. Note the spots of labeling in AChE-KO mice. a : axon, m : muscle fiber. Calibration (A-D) 12  $\mu$ m.

### ***BChE and the time course of synaptic potentials and currents***

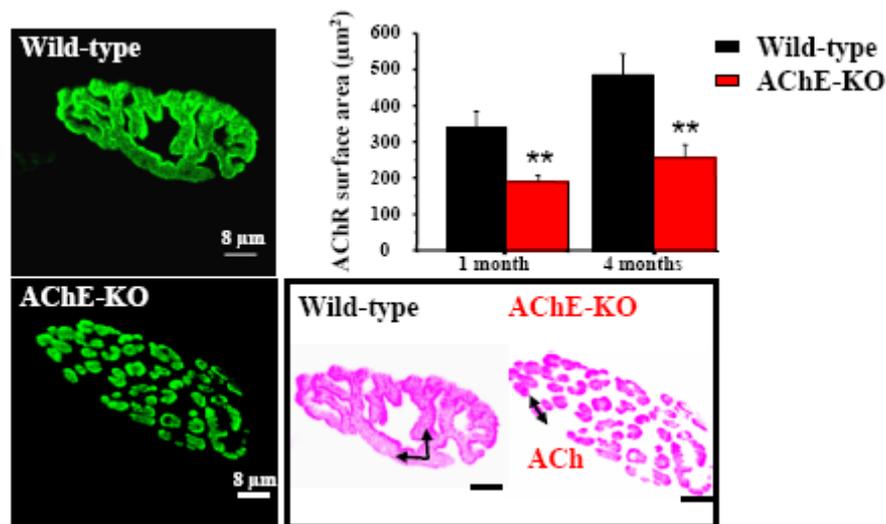
It is well established that synaptic potentials and currents exhibit a prolonged decay after AChE inhibition, that is due to the lack of ACh hydrolysis allowing ACh to persist in the synaptic cleft, and to activate endplate nicotinic AChRs repetitively, as proposed by (Katz and Miledi, 1973). Therefore, if BChE is localized in the synaptic cleft and exerts its hydrolytic activity on ACh, one would expect that its inhibition would prolong the time course of synaptic potentials. Extracellular focal recordings allowed characterizing the kinetics of the current flowing through the endplate membrane in response to an ACh quantum released spontaneously in wild-type and AChE-KO junctions. As shown in Fig. 2, miniature endplate currents (MEPCs) recorded in AChE-KO junctions, exhibited a significant slower decay than in wild-type junctions, and their decay phase could be fitted by a single exponential function. Inhibition of BChE by pretreatment with 100  $\mu$ M iso-OMPA neither prolonged the decay phase of MEPCs in AChE-KO, nor in wild-type junctions. These results suggest that BChE does not prolong ACh action on endplate receptors. This was further substantiated by analyzing the action of another BChE inhibitor, on the time course of endplate currents (EPCs) in AChE-KO junctions. Thus, as shown in Fig. 2D, bambuterol (0.15  $\mu$ M) neither modified the half-decay time of focally recorded EPCs. Tubocurarine (1.5  $\mu$ M) in concentrations that reduced EPP amplitudes, by partially blocking endplate nicotinic AChR, reduced the half-decay time of EPPs indicating that rebinding of ACh with AChRs plays an important role in the prolongation of synaptic potentials in AChE-KO junctions.



**Fig. 2.** Representative spontaneous focally recorded MEPCs in wild-type (A) and AChE-KO junction (B) and the lack of effect of BChE inhibition on the time course of MEPCs and EPCs. Note in AChE-KO junctions, the prolongation of the decay phase of MEPC, while BChE inhibition by iso-OMPA (100  $\mu$ M) does not affect MEPC decay (histograms). The decay phase of MEPCs was fitted (between 90 % and 10 % of maximal amplitude) by a single exponential (continuous red line). (C) Mean values of the decay time constant of MEPCs are indicated by the histograms. (C) Lack of effect of bambuterol (150 nM) on the half-decay time of focally recorded EPCs and the effect of 1.5  $\mu$ M tubocurarine (TC) in an AChE-KO NMJ. EPCs were recorded in standard physiological solution containing 2.2  $\mu$ M  $\mu$ -conotoxin GIIIB to block sodium channels.

### ***Endplate characteristics in AChE-KO junctions***

Fluorescence analysis of endplate regions stained with Alexa Fluor® 488 conjugated  $\alpha$ -BTX from mature AChE-KO muscles revealed alterations in the distribution of nAChRs, when compared to endplates from wild-type muscles. Fragmented clustering of nAChRs stained with fluorescent  $\alpha$ -BTX were typical in AChE-KO junctions, as shown in the three-dimensional projections, and the quantitative analysis performed in muscles from 1 and 4 month old mice (Fig. 3). These results clearly show that endplate nAChR distribute in a smaller surface area and that there is discontinuity in the nAChR clustering.



**Fig. 3.** Typical staining-pattern of nAChRs with Alexa Fluor® 488 conjugated  $\alpha$ -BTX from adult wild-type (A) and AChE-KO (B) junctions of Levator auris longus muscles examined by confocal laser scanning microscopy, and the quantitative image analysis of nAChRs staining (C). Note the number of fragmented and disconnected nAChR clusters in AChE-KO junctions (B), when compared to wild-type junctions (A). Images represent projections of series of optical sections.

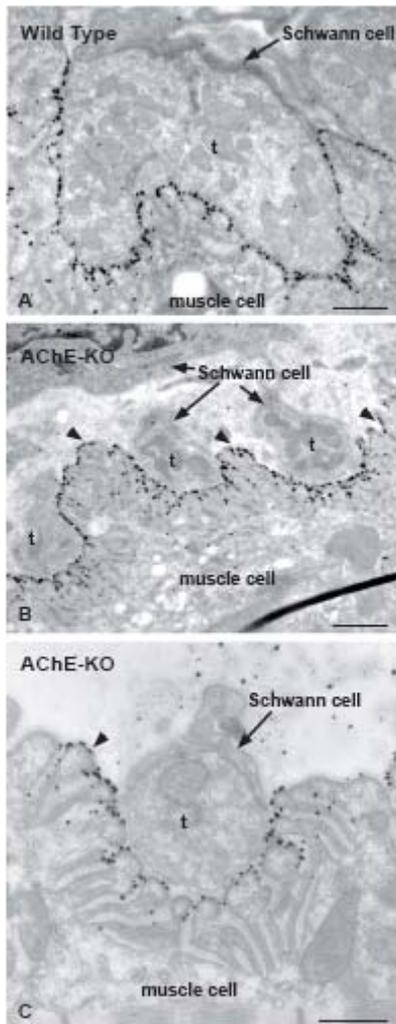
### ***Quantal transmitter release and BChE***

Spontaneous quantal transmitter release, recorded as MEPP frequency, was not significantly altered in AChE-KO junctions ( $n = 32$ ) when compared to wild-type junctions, with the exception of the appearance of a proportion of large amplitude MEPPs (the so called giant MEPPs) in the former. The spontaneous Giant MEPPs were more prominent in muscles from young animals ( $> 20$  days old), representing about  $10.5 \pm 3.6\%$  ( $n = 5$ ) of the total population of events recorded, probably because most of the synaptic remodeling occurs at that time. The frequency of these events was much lower in muscles from older mice ( $< 3$  months) when remodeling has stabilized. G-MEPPs were little affected by nerve terminal depolarization evoked by a high  $K^+$  medium, or by a hypertonic medium (400-500 mOsmoles), and G-MEPPs did not enter in the composition of endplate potentials (EPP) evoked by a few ACh quanta. Furthermore, the % of spontaneous G-MEPPs was not significantly modified by BChE inhibition with 100 Iso-OMPA treatment ( $9.5 \pm 3.7\%$ ;  $n = 5$ ;  $P < 0.1$ ). Inhibition of BChE by (iso-OMPA) caused a reduction in quantal transmitter release in wild-type junctions bathed in a low  $Ca^{2+}$  (0.4 mM) high  $Mg^{2+}$  (5 mM) medium in which the probability of quantal release was markedly reduced, as well as in junction bathed in standard Krebs-Ringer solution in which quantal release was normal.

### ***Ultrastructure of AChE-KO NMJs***

The analysis of the ultrastructure of the NMJ in AChE-KO muscles revealed that motor nerve terminals were smaller when compared to that of wild-type muscles and often grouped in

small clusters of 3 or 4 terminals (Fig. 4). In contrast, the morphology of the post-synaptic muscle cell seems to be similar in control and AChE-KO mice. nAChs were detected in control and in AChE-KO mice at the post-synaptic membrane in the primary cleft and in secondary folds. In AChE-KO mice, nAChRs were also located in regions in which there was no nerve terminals. at extra- junctional regions.



**Fig. 4.** Ultrastructure of diaphragm and tibialis junctions from wild-type and AChE-KO mice. In AChE-KO junctions, nerve terminals are smaller compared to control and are wrapped with Schwann cell processes.  $\alpha$ -BTX was used as a marker of the NMJ. Nicotinic AChRs are located at the post-synaptic membrane of primary clefts and secondary folds. Note that in AChE-KO junctions nicotinic AChRs are also seen at extra-synaptic sites (arrow heads). Calibration bars A and B = 1  $\mu$ m, C = 0.5  $\mu$ m.

## Discussion

Our histochemical staining of BChE (Fig. 1) provided evidence that BChE was expressed at mature motor endplates of AChE-KO and wild-type muscles. Although, these experiments do not allow concluding on the precise localization of the enzyme, they suggest that BChE is located on perisynaptic Schwann cells. Further studies are needed at the ultrastructural level to confirm this suggestion.

In AChE-Ko junctions MEPCs were found to be prolonged, as compared to wild-type junctions (Fig. 2). However, inhibition of BChE with specific inhibitors, like iso-OMPA, neither prolonged the decay phase of MEPCS in AChE-KO, nor in wild-type junctions and similar results were obtained on EPCs with bambuterol, which also inhibits BChE (Minic et al., 2002). These results suggest that BChE is not located in the synaptic cleft and does not limit the interaction of ACh with nAChRs. It is worth noting that reduction of the number of available receptors with tubocurarine (Fig. 2D) markedly reduced the amplitude and half-decay time of EPCs indicating that in AChE-KO junctions in which there is no expression of

AChE the decay phase of EPC is governed in part by the repetitive binding of ACh with nAChRs.

Clear changes in the distribution of nAChRs at the endplate (Fig 3) were observed in AChE-KO junctions when compared to wild-type junctions indicating that skeletal muscles from AChE-KO mice adapt to the absence of AChE enzymatic activity by triggering a postnatal synaptic remodelling as previously discussed (Girard et al., 2005).

Spontaneous quantal transmitter release was little affected by inhibition of BChE with iso-OMPA in both wild-type and AChE-KO junctions. In contrast, BChE inhibition reduced evoked quantal transmitter release indicating that BChE may be involved in a presynaptic modulatory step of the release process and can play a constitutive physiological role at mature NMJs.

### Acknowledgements

*We thank Prof. O. Lockridge for the gift of the knockout AChE founders and for constant support. We thank Miss P. Villeneuve and Miss V. Lavallée (Transgenic facility, Gif sur Yvette), and Miss N. Barougier and Miss B. Bonnafos (INRA, Montpellier) for taking care of animals used in the present study. Our research was supported in part by the Association Française contre les Myopathies (J. M. and E. K.), by the C.N.R.S, by Inserm, by Agence Nationale de la Recherche. J. Minic and E.G. were supported by fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale and the ICSN-C.N.R.S. We thank Dr P. Guicheney and A. Rouche (INSERM U582, Institut de myologie, Paris, France) for electron microscopy facilities. Confocal microscopy studies were performed on the facility of the CNRS Campus (Plate-forme Imagerie et Biologie Cellulaire) supported in part by the ASTRE program of the Conseil Général de l'Essonne.*

### References

- Aldunate, R., Casar, J. C., Brandan, E., and Inestrosa, N. C. (2004). Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain Res Brain Res Rev* 47, 96-104.
- Auld, D. S., and Robitaille, R. (2003). Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *Neuroscientist* 9, 144-157.
- Cousin, X., Strahle, U., and Chatonnet, A. (2005). Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models. *Bioessays* 27, 189-200.
- Girard, E., Barbier, J., Chatonnet, A., Krejci, E., and Molgó, J. (2005). Synaptic remodeling at the skeletal neuromuscular junction of acetylcholinesterase knockout mice and its physiological relevance. *Chem Biol Interact* 157-158, 87-96.
- Kalow, W. (2004). Human pharmacogenomics: the development of a science. *Hum Genomics* 1, 375-380.
- Katz, B., and Miledi, R. (1973). The binding of acetylcholine to receptors and its removal from the synaptic cleft. *J Physiol* 231, 549-574.
- Levano, S., Ginz, H., Siegemund, M., Filipovic, M., Voronkov, E., Urwyler, A., and Girard, T. (2005). Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with prolonged neuromuscular block after succinylcholine. *Anesthesiology* 102, 531-535.
- Li, B., Duysen, E. G., Volpicelli-Daley, L. A., Levey, A. I., and Lockridge, O. (2003). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor function in acetylcholinesterase knockout mice. *Pharmacol Biochem Behav* 74, 977-986.
- Massoulie, J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* 11, 130-143.
- Minic, J., Chatonnet, A., Krejci, E., and Molgó, J. (2003). Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol* 138, 177-187.
- Minic, J., Molgó, J., Karlsoon, E., and krejci, E. (2002). Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depend on activity of acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci* 15, 439-448.
- Rochon, D., Rousse, I., and Robitaille, R. (2001). Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21, 3819-3829.
- Rotundo, R. L. (2003). Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* 32, 743-766.
- Van der Kloot, W., Balezina, O. P., Molgó, J., and Naves, L. A. (1994). The timing of channel opening during miniature endplate currents at the frog and mouse neuromuscular junctions: effects of fasciculon-2, other anti-cholinesterases and vesamicol. *Pflugers Arch* 428, 114-126.
- Van der Kloot, W., and Molgó, J. (1994). Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev* 74, 899-991.
- Wessler, I. (1996). Acetylcholine release at motor endplates and autonomic neuroeffector junctions: a comparison. *Pharmacol Res* 33, 81-94.
- Xie, W., Stribley, J. A., Chatonnet, A., Wilder, P. J., Rizzino, A., McComb, R. D., Taylor, P., Hinrichs, S. H., and Lockridge, O. (2000). Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 896-902.

# Remodeling of the Neuromuscular Junction in Mice With Deleted Exons 5 and 6 of Acetylcholinesterase

Emmanuelle Girard,<sup>1</sup> Véronique Bernard,<sup>2</sup> Shelley Camp,<sup>3</sup> Palmer Taylor,<sup>3</sup>  
Eric Krejci,<sup>2</sup> and Jordi Molgó\*,<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR 9040, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France; <sup>2</sup>INSERM U686, Biologie des Jonctions Neuromusculaires, UFR Biomédical Paris V, 75006 Paris, France; and <sup>3</sup>Department of Pharmacology, University of California at San Diego, La Jolla, CA 92093

## Introduction

At the vertebrate skeletal neuromuscular junction (NMJ), two closely related enzymes can hydrolyze acetylcholine (ACh): acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). Advances in mouse genomics offer new approaches to assess the role of specific cholinesterases involved in neuromuscular transmission (Minic et al., 2003). AChE knockout mice provide a valuable tool for examining the effects of long-term complete and selective abolition of AChE activity (Xie et al., 2000). *AChE* and *BChE* genes encode two functional domains—the catalytic domain (exons 2, 3, and 4 of AChE, or exon 2 of BChE) and a C-terminal domain (exon 5 or 6 of AChE, or exon 3 of BChE)—that dictate the targeting of the enzymes (Massoulié, 2002). In mammals, the *AChE* gene produces three types of coding regions by deleting 5'-splice acceptor sites, which generate proteins; these proteins possess the same catalytic domain associated with distinct C-terminal peptides. AChE subunits of type R (readthrough) produce soluble monomers; they are expressed during development and are thought to be induced in the mouse brain by stress (Kaufer et al., 1998). AChE subunits of type H (hydrophobic) produce GPI-anchored dimers, mainly in blood cells. Subunits of type T (tailed) exist for both AChE and BChE. They represent the predominant AChE variant expressed in cholinergically innervated

tissues (muscle and nerve). These subunits generate a variety of quaternary structures, including homomeric oligomers (monomers, dimers, tetramers), as well as hetero-oligomeric assemblies with anchoring proteins ColQ (Krejci et al., 1997) and PRiMA (Perrier et al., 2002). At the NMJ, AChE is clustered by the interaction of the coding sequence of exon 6 with ColQ (Feng et al., 1999). The deletion of exons 5 and 6 in the *AChE* gene transforms anchored AChE into a soluble enzyme (Camp et al., 2004). The present study was designed to evaluate neuromuscular transmission and nicotinic ACh receptor (nAChR) distribution in muscles from mutant mice with deletions of these two spliced exons (*AChE*-del-exons-5+6<sup>-/-</sup>).

## Materials and Methods

*AChE*-del-exons-5+6<sup>-/-</sup> knockout-mouse constructs were reported previously (Camp et al., 2004) and were maintained in a C57/BL6 genetic background. Miniature end-plate currents and nerve-evoked muscle tension were recorded using conventional techniques. End-plate nAChRs were stained with Alexa-488-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -Bgt).

## Results and Discussion

Isolated hemidiaphragm muscles (maintained at 32°C) from mature *AChE*-del-exons-5+6<sup>-/-</sup> mice

\*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed. E-mail: Jordi.Molgo@nbcn.cnrs-gif.fr

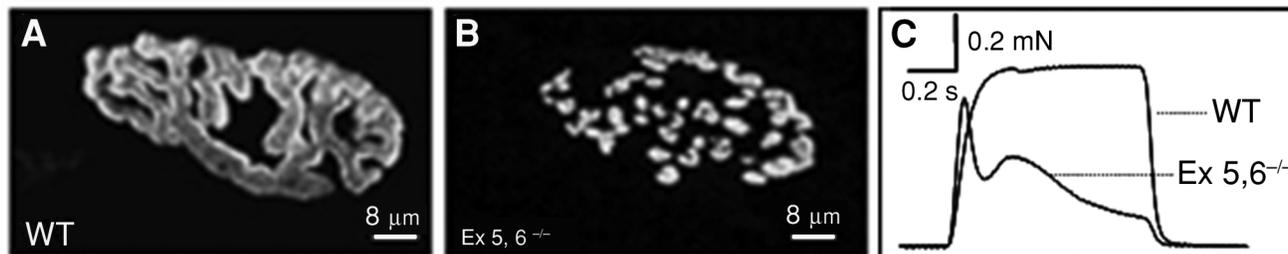


Fig. 1. Typical pattern of nAChR staining with Alexa-488-conjugated  $\alpha$ -Bgt in NMJs of the *levator auris longus* muscle from age-matched WT (A) and AChE-del-exons-5+6<sup>-/-</sup> mice (B). (C) Tetanic contractions evoked at 100-Hz nerve stimulation in hemidiaphragm muscles from WT and AChE-del-exons-5+6<sup>-/-</sup> (2 mo-old) mice. Note the fragmented clustering of nAChRs (B) and the tetanic fade (C) in muscles from the mutant mice.

responded to intermittent phrenic nerve stimulation, with twitches and tetanic contractions, but developed less force and a pronounced tetanic fade compared with age-matched wild-type (WT) muscles (Fig. 1). Interestingly, nerve-evoked contractions were better maintained in AChE-del-exons-5+6<sup>-/-</sup> than in WT muscles treated with AChE inhibitors. No AChE expression was demonstrable in end-plate regions of AChE-del-exons-5+6<sup>-/-</sup> muscles using histochemical techniques, in agreement with the prolongation of focally recorded miniature end-plate currents. This suggests that soluble AChE (read through) cannot replace anchored enzyme in the synaptic cleft in contrast to a model of cholinergic imbalance (Brenner et al., 2003). The distribution of nAChRs, revealed by  $\alpha$ -Bgt staining, in AChE-del-exons-5+6<sup>-/-</sup> during postnatal days 5–7 was not significantly different from that of WT muscles but was markedly modified thereafter in mature end plates (Fig. 1). Serum AChE expression in AChE-del-exons-5+6<sup>-/-</sup> mice was about twice that in WT mice (Camp et al., 2004). However, these changes did not prevent synaptic remodeling at the NMJ. Our findings indicate that despite higher AChE levels in the serum, the neuromuscular system reconfigures the size of nAChR clusters, so that ACh can rapidly escape from the synaptic cleft in the chronic absence of AChE activity.

## References

Brenner T., Hamra-Amitay Y., Evron T., Boneva N., Seidman S., and Soreq H. (2003) The role of readthrough

- acetylcholinesterase in the pathophysiology of myasthenia gravis. *FASEB J.* **17**, 214–222.
- Camp S., Zhang L., Marquez M., de la Torre B., and Taylor P. (2004) Knockout mice with deletions of alternatively spliced exons of acetylcholinesterase, in *Cholinesterase in the Second Millennium: Biomolecular and Pathological Aspects*, Inestrosa N., and Campos E. O., eds., Diseño e Impresiones J&J Ltda, Santiago, pp. 43–47.
- Feng G., Krejci E., Molgó J., Cunningham J. M., Massoulié J., and Sanes J. R. (1999) Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J. Cell. Biol.* **144**, 1349–1360.
- Kaufer D., Friedman A., Seidman S., and Soreq H. (1998) Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* **393**, 373–377.
- Krejci E., Thomine S., Boschetti N., Legay C., Sketelj J., and Massoulié J. (1997) The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J. Biol. Chem.* **272**, 22,840–22,847.
- Massoulié J. (2002) The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* **11**, 130–143.
- Minic J., Chatonnet A., Krejci E., and Molgó J. (2003) Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. *Br. J. Pharmacol.* **138**, 177–187.
- Perrier A., Massoulié J., and Krejci E. (2002) PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* **33**, 275–285.
- Xie W., Stribley J. A., Chatonnet A., Wilder P. J., Rizzino A., McComb R. D., et al. (2000) Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 896–902.

# Synaptic remodeling at the skeletal neuromuscular junction of acetylcholinesterase knockout mice and its physiological relevance

Emmanuelle Girard<sup>a</sup>, Julien Barbier<sup>a,1</sup>, Arnaud Chatonnet<sup>b</sup>,  
Eric Krejci<sup>c</sup>, Jordi Molgó<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR 9040, CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, Bâtiments 32–33, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France*

<sup>b</sup> *Département de Physiologie Animale, INRA, Place Viala, 34060 Montpellier, France*

<sup>c</sup> *INSERM U686, Biologie des Jonctions Neuromusculaires, UFR Biomédicale Paris 5, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France*

Available online 7 November 2005

## Abstract

Acute inhibition of synaptic acetylcholinesterase (AChE) is fatal to normal animals, but AChE-knockout mice (AChE<sup>-/-</sup>) expressing normal levels of butyrylcholinesterase (BChE) could live to adulthood without AChE expression. The present study was undertaken to determine whether compensatory mechanisms occur in the mutant that allow an effective neuromuscular transmission in the chronic absence of AChE. For this we evaluated neuromuscular transmission and the distribution of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and motor nerve terminals on isolated nerve-muscle preparations from AChE<sup>-/-</sup> mice. AChE<sup>-/-</sup> hemidiaphragm muscles maintained at 32 °C can support muscle twitches, and tetanic contractions during intermittent nerve-stimulation over a wide range of physiological frequencies, even though they develop less force, than age-matched wild-type (AChE<sup>+/+</sup>) muscles. Tetanic fade in AChE<sup>-/-</sup> muscles was temperature-sensitive and more marked at 22 °C than at 32 °C. Inhibition of BChE by tetraisopropylpyrophosphoramidate (Iso-OMPA) intensified tetanic fade in AChE<sup>-/-</sup> muscles, but had no effect on AChE<sup>+/+</sup> muscles, suggesting that BChE plays a protective role in nerve terminals. Skeletal muscles from AChE<sup>-/-</sup> mice adapted to the lack of AChE enzymatic activity by triggering a synaptic remodeling that critically occurred between the second and third week of postnatal development, during synapse elimination. In AChE<sup>-/-</sup> muscles nAChRs distributed in a smaller and fragmented surface area, that mirrored the branching pattern of motor nerve terminals. These findings indicate that the neuromuscular system exhibits a remarkable plasticity and adaptive responses to the chronic absence of AChE activity that has important consequences for the functioning of the neuromuscular junction.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Neuromuscular junction; Nicotinic acetylcholine receptors; Nerve terminals; Acetylcholinesterase knockout mic; Synaptic remodeling; Muscle tension

## 1. Introduction

At cholinergic synapses two closely related enzymes acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7.) and butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8.) can hydrolyse acetylcholine (ACh) (reviewed in [1,2]). The usual picture is that at fast synapses like the vertebrate neuromuscular junction (NMJ), ACh quanta are released abruptly by exocytosis from synaptic vesicles; ACh then diffuses

\* Corresponding author. Tel.: +33 1 69 82 36 42;  
fax: +33 1 69 82 41 41.

E-mail address: [Jordi.Molgo@nbcn.cnrs-gif.fr](mailto:Jordi.Molgo@nbcn.cnrs-gif.fr) (J. Molgó).

<sup>1</sup> Present address: Département d'Ingénierie et d'Etude des Protéines (DIEP), Bâtiment 152, CEA SACLAY 91191, Gif-sur-Yvette Cedex, France.

rapidly across the narrow synaptic cleft and pairs of ACh molecules cooperate to open endplate channels. During their diffusion through the cleft, or after being released from muscle nicotinic ACh receptors (nAChRs), most ACh molecules are hydrolyzed by AChE, which is highly concentrated at the neuromuscular junction [3,4]. Thus, the role of AChE at cholinergic synapses in regulating the duration of ACh action in the synaptic cleft is well established. However, the role of BChE is still unknown since genetic variants in the human population, who lack BChE activity, show no phenotype except their increased sensitivity to the muscle relaxant succinylcholine [5,6]. However, BChE is present in many animal species (reviewed in [7]), and may participate in the hydrolysis of ACh at the neuromuscular junction of living animals.

Advances in mouse genomics offered new approaches to assess the role of specific cholinesterases involved in synaptic transmission. AChE knockout mice (AChE<sup>-/-</sup>) provide a valuable tool for examining the effects of long-term complete and selective abolition of AChE activity [8,9], and for studying the role of BChE. These mice were able to live to adulthood [10], despite the fact that AChE-inhibitors are highly lethal to wild-type mice. An increased sensitivity to BChE-specific inhibitors of AChE<sup>-/-</sup> mice suggested that (i) BChE activity which remained normal in AChE<sup>-/-</sup> knockout mice facilitated their survival, and (ii) the role of BChE was to compensate for the function of AChE [9,11]. BChE apparently is not involved in regulating ACh duration on muscle nAChRs from wild-type and AChE<sup>-/-</sup> muscles, since the time course of synaptic potentials or currents was unaffected by BChE inhibitors. However, the fact that these inhibitors decreased evoked-quantal release suggested that BChE may be a presynaptic modulator of synaptic transmission at mature NMJs [12].

The present study was designed to evaluate the characteristics of nerve-evoked muscle contractions, and the effect of BChE inhibitors in AChE<sup>-/-</sup> muscles. In addition, we examined the distribution of nAChRs and motor nerve terminals in AChE<sup>-/-</sup> neuromuscular junctions at different postnatal periods.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Transgenic mice

The AChE<sup>-/-</sup> knockout mice originally generated in the laboratory of Prof. O. Lockridge (Eppley Institute, Nebraska, USA) [9] were obtained by mating heterozygous male and females, in order to produce wild-type and nullizygote littermates. Original founders of the colony were kindly provided by Prof. O. Lockridge, and main-

tained in a 129Sv genetic background. Animals were housed in the transgenic facilities of the INRA (Montpellier) and the CNRS (Gif sur Yvette Campus). Animals were kept under standard conditions of constant temperature (24 °C), and a 12:12 daylight cycle. Food and water were provided ad libitum. Rearing conditions were in keeping with the guidelines of the French Ministry for Research and Industry for the use and storage of transgenic animals. All experiments were performed in accordance with French and European Community guidelines for laboratory animal handling. In our first attempt to raise a colony of AChE<sup>-/-</sup> mice by breeding AChE<sup>+/-</sup> mice, we obtained a low rate of animal survival as previously published [9] i.e., the majority of AChE<sup>-/-</sup> mice remained alive at day 12, but most AChE<sup>-/-</sup> mice died between postnatal days 14–21, and only 1–2% lived to adulthood. The emaciated appearance and absence of body fat suggested that the cause of death of AChE<sup>-/-</sup> mice might be starvation. Consequently, efforts were made to facilitate their feeding and caloric intake. For this purpose, several approaches were used: (i) feeding of pregnant and lactating dams with a liquid diet; (ii) isolation and early weaning (on postnatal day 14) of AChE<sup>-/-</sup> mice and feeding with a liquid diet (Renutryl, Nestlé Clinical Nutrition, France) delivered in Petri dishes at the bottom of the cage and (iii) use of surrogate lactating mothers. The use of approaches (i) and (ii) considerably extended the life span of our AChE<sup>-/-</sup> mice. Thus, 33% of our AChE<sup>-/-</sup> mice survived over 120 days, and 25% over 240 days, but they remained small at all ages, compared to their littermates. The increased life span of AChE<sup>-/-</sup> mice fed with a high-fat liquid food diet supplemented with essential nutrients, similar to the one used in the present study, and the detailed phenotype of adult AChE<sup>-/-</sup> mice have been reported previously and discussed [13].

All mice used in experiments were genotyped by polymerase chain reaction. Primers for wild type AChE were 21mer sense (5'AATGACACCGAGCTGATAGCC) and 22mer antisense (5'CCAGTATTGATGAGAGCCTCCG) both located within exon 2 of the AChE gene. Primers for the AChE knockout allele were in the NEO gene, 25mer sense (5'AATGGGCAGGTAGCCGATCAAGCG) and 25mer antisense (5'AACAGACAATCGGCTGCTCTGATGC).

### 2.2. Mechanical recordings on isolated mouse hemidiaphragm

Left and right hemidiaphragms muscles with their associated phrenic nerves were isolated from AChE<sup>+/+</sup> and AChE<sup>-/-</sup> mice killed by dislocation of the cervi-

cal vertebrae followed by immediate exsanguination. The two hemidiaphragms were separated and each was mounted in a silicone (Rhodorsil<sup>®</sup>, Rhône-Poulenc, St. Fons, France)-lined thermo-regulated ( $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) chamber (4 ml volume) bathed in a standard mouse physiological solution gassed with pure  $\text{O}_2$  and composed of 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 11 mM glucose and 5 mM HEPES (buffered at pH 7.4 with NaOH). In some experiments the bath temperature was maintained at  $22^\circ\text{C}$ .

For twitch tension measurements, the central tendon of the hemidiaphragm muscle was tied with silk thread, via an adjustable stainless-steel hook, to an FT03 isometric transducer (Grass Instruments, West Warwick, USA), and the other tendon (at the rib side) was pinned onto the silicone-coated bath. Muscle twitches were evoked by stimulating the phrenic nerve via a suction microelectrode adapted to the diameter of the nerve with supramaximal current pulses of 0.15 ms duration at frequencies indicated in the text. For each preparation investigated, the resting tension was adjusted at the beginning of the experiment (to obtain maximal contractile responses), and was monitored during the whole duration of the experiment. Signals from the isometric transducer were amplified, collected, and digitized with the aid of a computer equipped with a DT2821 analogue to digital interface board (Data Translation, Marlboro, USA). Data acquisition and analysis were performed with a program kindly provided by Dr. John Dempster (University of Strathclyde, Scotland).

### 2.3. Staining of living motor nerve terminals *in situ*

To stain motor nerve terminals the vital styryl dye FM1-43 (Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands) was used. This dye has proven useful to label motor nerve terminals in an activity-dependent manner in studies of synaptic vesicle exocytosis, and endocytosis [14,15]. For this, isolated *Levator auris longus* (LAL) muscles were depolarized with an isotonic high  $\text{K}^+$  (45 mM) solution containing  $4 \mu\text{M}$  FM1-43, and  $1 \mu\text{M}$  tetrodotoxin (TTX) for 10 min at room temperature ( $22^\circ\text{C}$ ). TTX was used to block sodium channels in muscle and nerve, and to avoid movements of the preparation. Thereafter, preparations were rinsed with dye-free standard solution containing  $1 \mu\text{M}$  TTX for 10 min, and imaged with a confocal microscope.

### 2.4. Labeling of nAChRs with fluorescent $\alpha$ -bungarotoxin

Staining of nAChRs was performed on whole-mount preparations, fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde

in phosphate-buffered saline (PBS), and rinsed several times in PBS. Preparations were incubated for 45 min at  $37^\circ\text{C}$  either with tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BTX) (1 mg/ml; 1:1000 dilution), or with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugated  $\alpha$ -BTX (1 mg/ml; 1:1,000 dilution) (both from Molecular Probes), and mounted on glass slides with Vectashield antifading mounting medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA).

### 2.5. Confocal laser scanning microscopy and morphological analysis

Neuromuscular preparations were observed with a laser scanning confocal multiphoton system (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Mannheim, Germany) mounted on an upright microscope controlled through the manufacturer-supplied software and workstation. Images were collected using either a water-immersion lens in FM1-43 experiments ( $\times 40$ , numerical aperture = 0.75), or an oil-immersion lens ( $\times 40$ , numerical aperture = 1.25). The 488 nm wavelength line of an Argon-ion laser was used for Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugated  $\alpha$ -BTX and FM1-43 excitation, and the 543 nm wavelength line of the He-NE laser for TRITC-conjugated  $\alpha$ -BTX excitation. Series of optical sections were collected using a standard scanning mode format of  $1024 \times 1024$  pixels, and three-dimensional projections of the images were constructed and analyzed.

The area of nAChR staining was quantified using Metamorph v4.0 software (Universal Imaging Corporation, Washington, USA) using standard procedures that included threshold-selection for identifying regions with higher fluorescence than the surrounding ones in the projections of optical series.

### 2.6. Statistics

Values in the text are expressed as mean  $\pm$  S.D. Differences between means were tested using Student's *t*-test, and *p*-values  $< 0.05$  were taken to indicate significance.

## 3. Results

### 3.1. Nerve-evoked twitch and tetanic contraction in $\text{AChE}^{+/+}$ and $\text{AChE}^{-/-}$ muscles

The ability to evoke twitches and tetanic contractions in response to phrenic-nerve stimulation at different frequencies was investigated in isolated  $\text{AChE}^{+/+}$  and  $\text{AChE}^{-/-}$  hemidiaphragm muscles from

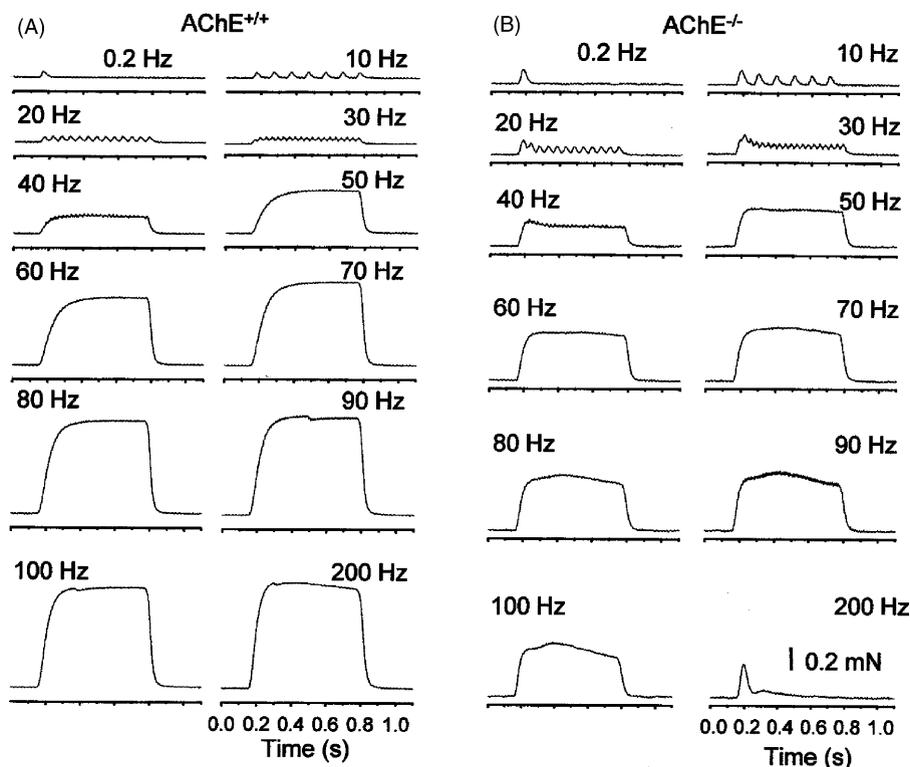


Fig. 1. Representative examples of twitch and tetanic tension recordings, evoked by single or repetitive nerve stimulation at the indicated frequencies, in AChE<sup>+/+</sup> (left panel) and AChE<sup>-/-</sup> (right panel) isolated hemidiaphragms from 4-months-old mice. The phrenic nerve was stimulated either with single pulses (0.15-ms duration at 0.2 Hz), or with trains of stimuli (600-ms duration) at the indicated frequencies. The interval between trains was 30 s. Temperature 32 °C. Time-calibration scales and tension calibration bar (right panel) apply to all recordings.

4 months-old mice. As shown in Fig. 1A, AChE<sup>+/+</sup> muscles can develop and maintain tetanic contractions, in a wide range of nerve-stimulation frequencies. Hemidiaphragms from AChE<sup>-/-</sup> mice were also capable of evoking twitches and tetanic contractions, but over a limited nerve-stimulation frequency range (Fig. 1B). Thus, AChE<sup>-/-</sup> muscles were unable to maintain nerve-evoked tetanic contractions at frequencies higher than 100 Hz. Tetanic fade was markedly dependent on the temperature at which isolated AChE<sup>-/-</sup> hemidiaphragms were maintained. In contrast to results obtained at 32 °C (Fig. 1), tetanic fade occurred at lower nerve-stimulation frequencies (comprised between 40–100 Hz) in AChE<sup>-/-</sup> hemidiaphragms kept at 22 °C. It should be noted that at 22 °C, tetanic contractions in AChE<sup>+/+</sup> muscles were well maintained at 100 Hz. The tetanus-to-twitch ratio was about 50% lower in AChE<sup>-/-</sup> muscles maintained at 32 °C ( $2.0 \pm 0.3$  and  $4.1 \pm 0.3$  at 40 and 100 Hz, respectively,  $n=4$ ) when compared to AChE<sup>+/+</sup> muscles ( $4.3 \pm 0.4$  and  $8.8 \pm 0.8$  at 40 and 100 Hz, respectively;  $n=4$ ,  $p < 0.001$ ).

It is worth noting that AChE<sup>+/+</sup> hemidiaphragms maintained at 32 °C and treated with AChE inhibitors (0.35  $\mu$ M fasciculin-1, or 3  $\mu$ M neostigmine), were unable to sustain nerve-evoked tetanic tensions in a stimulation frequency range of 40–200 Hz (data not shown). These results indicated that tetanic fade was much more perceptible after acute inhibition of AChE in AChE<sup>+/+</sup> muscles, than in AChE<sup>-/-</sup> muscles which chronically do not express AChE. Also, these results suggested that hemidiaphragms from AChE<sup>-/-</sup> mice either compensate, or adapt to the lack of AChE.

### 3.2. Effects of BChE inhibition on nerve-evoked muscle contractions in AChE<sup>+/+</sup> and AChE<sup>-/-</sup> muscles

To test the possibility that BChE could contribute to ACh hydrolysis in AChE<sup>-/-</sup> muscles, we investigated the effect of tetraisopropylpyrophosphoramidate (Iso-OMPA), a selective irreversible inhibitor of BChE. In AChE<sup>+/+</sup> muscles pre-incubation for 30 min with 10 or 100  $\mu$ M Iso-OMPA, and then washout of the inhibitor

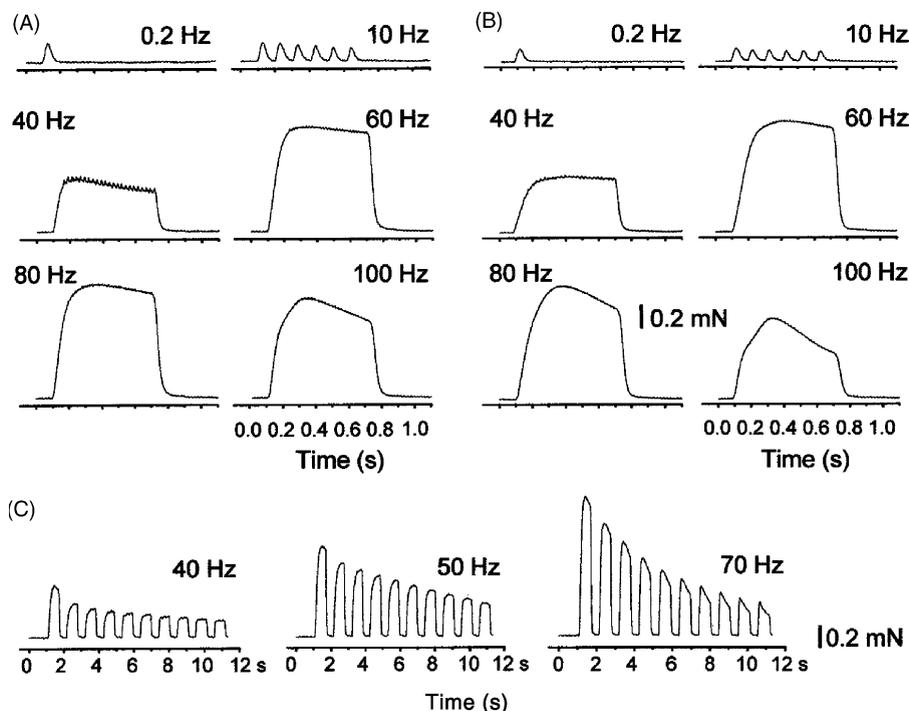


Fig. 2. Effect of BChE inhibition on tensions evoked by phrenic-nerve stimulation in isolated AChE<sup>-/-</sup> hemidiaphragms from 180 days old mice. (A) Control recordings of tensions elicited by a single stimulus (0.15 ms duration, 0.2 Hz), and by trains of stimuli (600 ms duration, at the indicated frequencies) delivered every 30 s. (B) Same muscle and conditions as in A, after treatment with 10  $\mu$ M Iso-OMPA (the muscle was treated for 30 min with the BChE-inhibitor and thereafter washed out with the physiological medium for additional 20 min before recordings). (C) The fade of tetanic responses evoked at 40, 50 and 70 Hz nerve stimulation (repetition rate 1 Hz) in an AChE<sup>-/-</sup> hemidiaphragm treated with 100  $\mu$ M Iso-OMPA. Each train was evoked at 1 Hz. Each tetanic response was evoked by repetitive phrenic-nerve stimulation during 600 ms. Temperature 32 °C.

with physiological medium for 20 min, did not change the pattern of nerve evoked twitch and tetanic responses in AChE<sup>+/+</sup> muscles (data not shown). In contrast, when AChE<sup>-/-</sup> muscles were pre-treated with the same concentrations of Iso-OMPA to inhibit BChE a noticeable effect was the depression of nerve-evoked tetanic responses at 80 and 100 Hz (Fig. 2B). Furthermore, a clear decrement of successive nerve-evoked tetanic contractions that was more marked at 70 Hz than at 40 and 50 Hz was evident in AChE<sup>-/-</sup> muscles (Fig. 2C). These results indicate that inhibition of BChE accentuates tetanic fade in AChE<sup>-/-</sup> muscles, while it has no noticeable effect on AChE<sup>+/+</sup> muscles in which AChE is active.

### 3.3. Age-dependence of changes in nAChR distribution in AChE<sup>-/-</sup> muscles

Mature skeletal muscles from AChE<sup>-/-</sup> mice have been reported to have a lower density of nAChRs [16,17]. Therefore, it was of interest to ask whether the transformation occurred during the maturation of the neu-

romuscular junction. To address this, we compared the staining-pattern of nAChRs with TRITC  $\alpha$ -BTX in various muscles removed from age-matched AChE<sup>+/+</sup> and AChE<sup>-/-</sup> mice. AChE<sup>-/-</sup>-neonate neuromuscular junctions exhibited a similar fluorescent  $\alpha$ -BTX staining-pattern of nAChRs as AChE<sup>+/+</sup> junctions ( $n=4$ ).

The geometry pattern, although variable from junction to junction and from muscle to muscle at postnatal day 15, was roughly similar in EDL and soleus muscles, exhibiting a normal “perforated-plaque” appearance (Fig. 3). At that time, the maturation into a pretzel-like array of distinct nAChR branches was more evident in LAL junctions from AChE<sup>+/+</sup> than from AChE<sup>-/-</sup> muscles. However, LAL junctions from AChE<sup>-/-</sup> muscles during the transformation of the plaque into a pretzel exhibited fragmented branches of nAChR staining, which probably translates an initial loss of nAChRs, as shown in Fig. 3. These changes appear to occur after birth and started to become evident at postnatal day 15, during the regressive pre-synaptic phenomenon of elimination of the polyneuronal innervation (synapse elimination). It is worth noting that

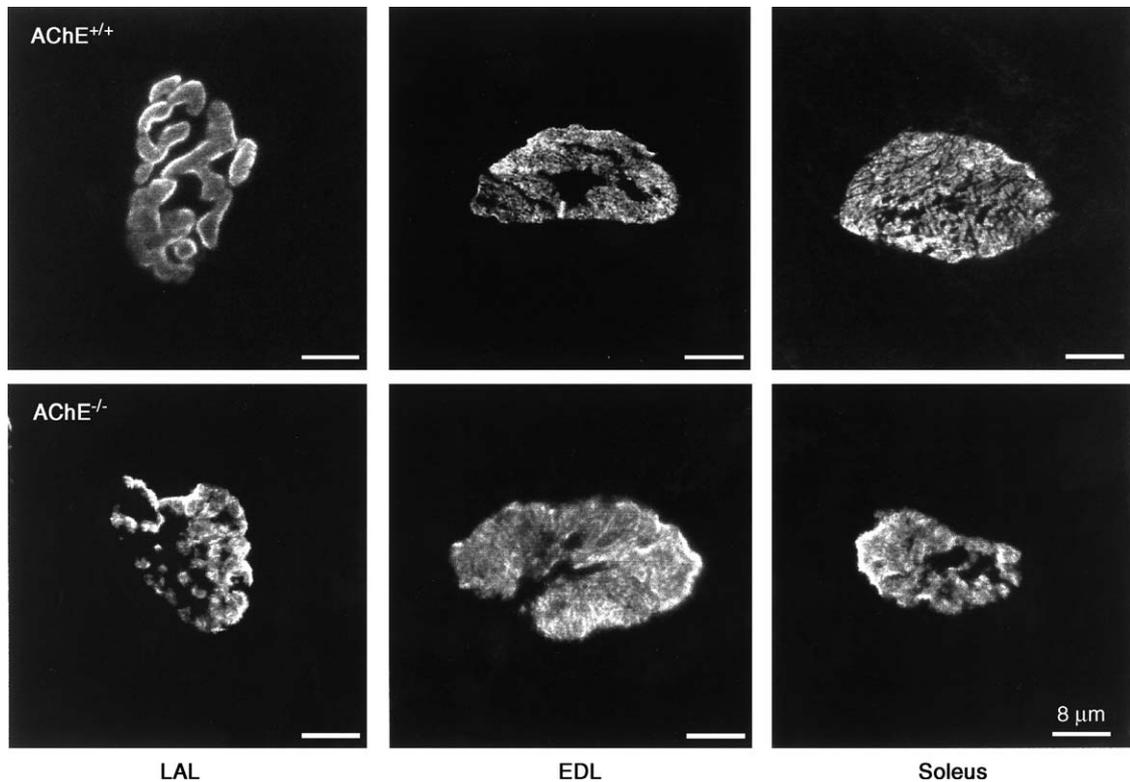


Fig. 3. Pattern of nAChR staining in neuromuscular junctions of the *Levator auris longus* (LAL), *Extensor digitorum longus* (EDL) and *Soleus* muscles from AChE<sup>+/+</sup> (upper panels) and AChE<sup>-/-</sup> (lower panels) mice, at postnatal day 15 (EDL and soleus) and at postnatal day 21 (LAL). Whole-mounted muscles were labelled with TRITC  $\alpha$ -BTX as specified in Section 2. Images represent projections of series of 15 optical sections spaced 0.1  $\mu$ m apart from each muscle. Note in the AChE<sup>-/-</sup> LAL junctions (left lower panel) a fragmented branch of stained nAChRs. Each scale bar represents 8  $\mu$ m.

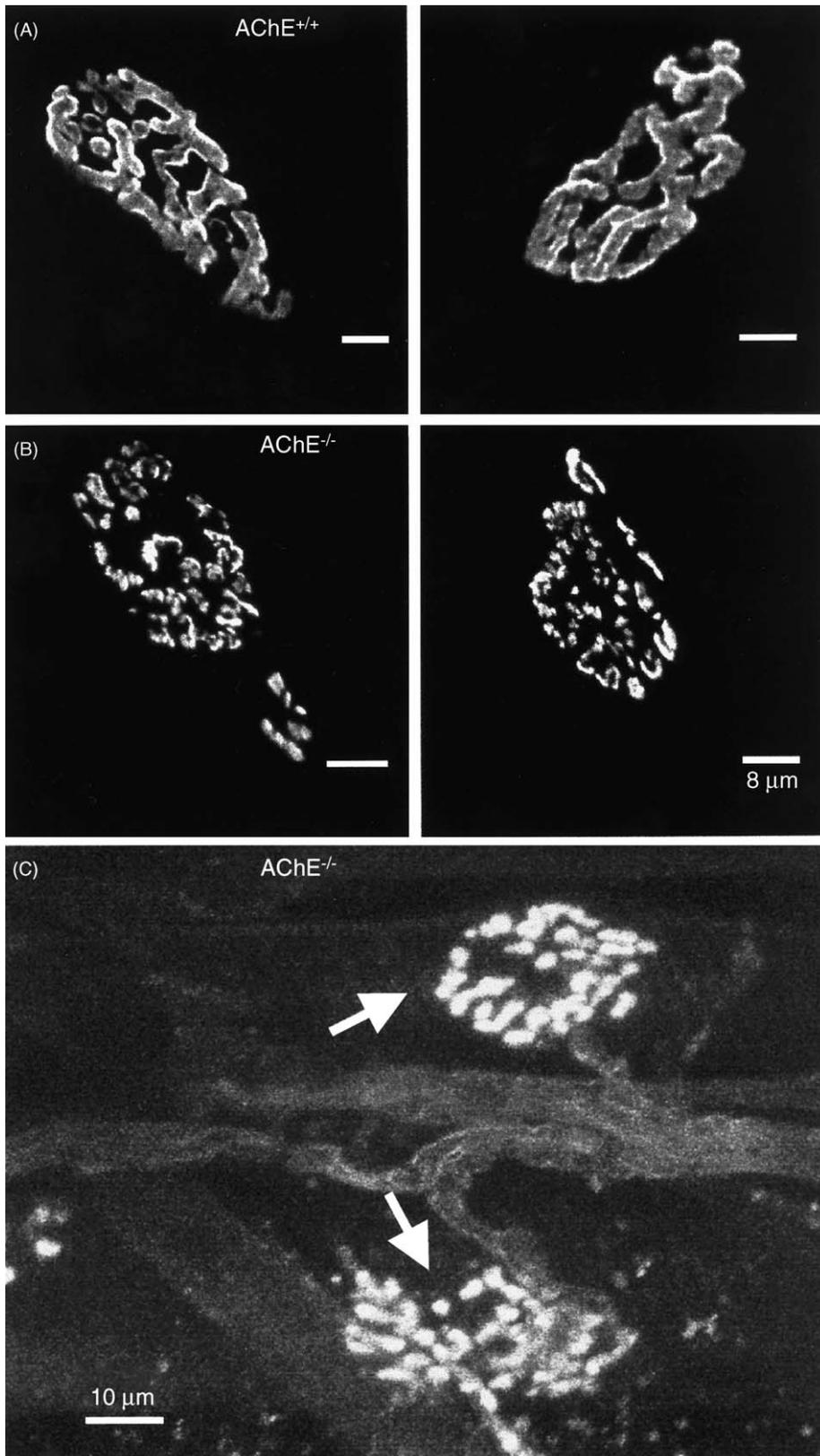
during this critical developmental period AChE<sup>-/-</sup> mice were more susceptible to death than their wild-type littermates.

As development progressed, at postnatal day 21, the majority of junctions exhibited nAChRs that distributed in a smaller and fragmented surface area in AChE<sup>-/-</sup> junctions (Fig. 4B), when compared to AChE<sup>+/+</sup> junctions (Fig. 4A). Quantitative image analysis of nAChRs staining at both postnatal day 38 and postnatal day 120, revealed a surface area of  $340.7 \pm 43.7$  and  $485.6 \pm 57.4 \mu\text{m}^2$  for wild-type endplates and  $189.8 \pm 18.1$  and  $256.0 \pm 36.1 \mu\text{m}^2$  for AChE<sup>-/-</sup> endplates, indicating a decrease in nAChR surface area of 45% and 47%, respectively ( $p < 0.05$ ;  $n = 60$ ).

#### 3.4. Imaging motor nerve terminals in situ from AChE<sup>-/-</sup> muscles

To determine whether in AChE<sup>-/-</sup> muscles changes of nAChRs distribution were accompanied by changes in motor nerve terminals, living mature LAL muscles were placed in a special chamber designed to fit on an upright confocal microscope and depolarized with a high K<sup>+</sup> medium in the presence of the vital styryl dye FM1-43 (see Section 2). Fluorescence images were obtained after substitution of the standard medium by one containing 45 mM K<sup>+</sup> (replacing Na<sup>+</sup>) and FM1-43 dye for 10 min (to trigger transmitter release and synaptic vesicle endocytosis from nerve terminals), followed

Fig. 4. Representative fluorescent images of endplates showing the distribution of nAChRs from AChE<sup>+/+</sup> (A) and AChE<sup>-/-</sup> (B) mouse LAL muscles, at postnatal day 21. Muscles were fixed, stained with Alexa Fluor 488  $\alpha$ BTX conjugate, and examined by confocal laser scanning microscopy. Note in AChE<sup>-/-</sup> junctions the number of fragmented disconnected nAChRs clusters, when compared to AChE<sup>+/+</sup> junctions. Motor nerve terminals in an AChE<sup>-/-</sup> LAL muscle stained with the vital dye FM1-43 (C). Before imaging, the neuromuscular preparation was depolarized with an isotonic high K<sup>+</sup> (45 mM) medium containing FM1-43 dye, followed by washout with a standard dye-free solution (see text for details). Note the spotted nerve terminal's appearance (arrows). All images represent projections of series of optical sections. In A and B each scale bar represents 8  $\mu$ m.



by washout with a standard dye-free solution for 10 min. The pattern of nerve terminal staining in AChE<sup>+/+</sup> muscles was similar to that previously described for wild-type junctions [14,15], and co-localized well with nAChRs in muscle fibers (data not shown). As shown in a typical imaging experiment (Fig. 4C), motor nerve terminals from AChE<sup>-/-</sup> muscles loaded with the FM1-43 dye displayed a fragmented appearance, with well delineated and separated fluorescent spots in all junctions examined. The passive staining of intramuscular myelinated axons allowed establishing that all junctions were monoinnervated. The fluorescent nerve terminal spots abutted muscle fibers, and overlapped fragmented nAChRs (data not shown). These results indicate that in AChE<sup>-/-</sup> junctions motor nerve terminals have a distinct pattern of distribution compared to AChE<sup>+/+</sup> junctions, and suggest that they have adapted to the excess of ACh by reducing their extension over the muscle. The results obtained in active motor nerve terminals of AChE<sup>-/-</sup> junctions are consistent with data obtained by immunolabeling nerve terminals with synaptophysin and SV2 antibodies, integral proteins of synaptic vesicles (unpublished data).

#### 4. Discussion

Present results indicate that isolated hemidiaphragm muscles from AChE<sup>-/-</sup> mice respond to intermittent phrenic-nerve stimulation with twitches and tetanic contractions in a wide range of physiological frequencies. However, AChE<sup>-/-</sup>-hemidiaphragms maintained at 32 °C developed less force in tetanic contractions, and tetanic fade occurred at lower nerve-stimulation frequencies ( $\geq 100$  Hz) than age-matched wild-type (AChE<sup>+/+</sup>) muscles. Interestingly, tetanic fade occurred at nerve-stimulation frequencies  $\geq 40$  Hz in AChE<sup>-/-</sup> muscles maintained at 22 °C. Similar findings have been reported in hemidiaphragm muscles from ColQ<sup>-/-</sup> knockout mouse [16]. These data indicate that mechanisms involved in tetanic fade are temperature-sensitive, with a greater decrement at cold than at warm temperatures. Pre- and post-synaptic factors may contribute to the different tetanic fade observed at the two temperatures studied. However, pre-synaptic depression at 22 °C is a major factor contributing to tetanic fade. A higher depression of successive endplate potentials has been reported at lower than at higher temperatures [18]. Synaptic depression at the lower temperature (22 °C) may be related to the higher number of ACh quanta released [19], and to a less efficient synaptic-vesicle/ACh-quanta mobilization from reserve-to-releasable nerve terminal pools [18]. Although, it can

not be excluded that desensitization [20] of post-synaptic nAChRs may also participate in the tetanic fade.

The fact that nerve-evoked contractions were better maintained in AChE<sup>-/-</sup> muscles than in wild-type muscles treated with AChE inhibitors was surprising, and prompted us to test the possibility that BChE could act as an AChE surrogate in AChE<sup>-/-</sup> muscles. Previous studies have shown that AChE<sup>-/-</sup> muscles express a similar BChE activity as AChE<sup>+/+</sup> muscles [12]. In the present study inhibition of BChE by Iso-OMPA intensified tetanic fade in AChE<sup>-/-</sup> muscles, while it has no noticeable effect on AChE<sup>+/+</sup> muscles expressing AChE. These results can be interpreted as indicating that in the absence of AChE expression, BChE plays a role in hydrolyzing ACh during tetanic nerve stimulation. However, BChE inhibition did not prolong synaptic potentials or currents, but decreased evoked transmitter release from nerve endings in AChE<sup>-/-</sup> muscles [12]. Therefore, it is likely that after BChE inhibition the enhanced tetanic fade observed in AChE<sup>-/-</sup> muscles could be related to the pre-synaptic regulatory effect of BChE on evoked transmitter release. Our results suggest that the main role of BChE at the NMJ is to protect nerve terminals from the excess of ACh in the synaptic cleft.

Also our results provide evidence that skeletal muscles from AChE<sup>-/-</sup> mice adapt to the absence of AChE enzymatic activity by triggering a synaptic remodeling involving both pre- and post-synaptic elements of the NMJ. Although mouse NMJs are functional soon after they form, they continue to mature at least till the second to third postnatal week. Postsynaptic maturation was not apparently modified at postnatal day 15 in AChE<sup>-/-</sup> muscles, in good agreement with the normal description of the NMJ ultrastructure in 12 days-old AChE<sup>-/-</sup> mice [9]. In contrast, an abundant subsynaptic necrosis was reported in ColQ<sup>-/-</sup> muscles from ColQ knockout mice (20 days of age) in which AChE was also absent [21]. In newborn NMJs, BChE and AChE activities are initially present in equal amounts, but BChE levels decrease between postnatal day 7 and 15 [22]. During this phase of postnatal development, the presence of BChE anchored by ColQ possibly prevents subsynaptic necrosis in AChE<sup>-/-</sup> muscles.

During the perforated plaque stage nAChR clusters were similar in EDL and soleus muscles examined from AChE<sup>+/+</sup> and AChE<sup>-/-</sup> mice. However, as soon as the elaboration of the pretzel-shaped branches progressed in AChE<sup>-/-</sup> muscles (between the second and third week of postnatal development), the presence of fragmented branches of nAChRs was striking. The unexpected changes of nAChRs distribution

in AChE<sup>-/-</sup> muscles persisted at mature endplates as determined in junctions from 38 and 120 days-old mice. Whether movements of nAChR within the sarcolemma, or recycling of nAChRs between internal compartments and the membrane occur to form the nAChRs clusters in restricted areas of the endplate, is not yet determined.

The remodeling of nAChRs was accompanied by a redistribution of motor nerve terminals that precisely mirrored the distribution of nAChRs. The presence of fragmented nerve terminals, as revealed by our vital FM1-43 staining of motor nerve terminals, is consistent with our immunolabeling data with the integral proteins of synaptic vesicles (synaptophysin and SV2), and with ultrastructural data showing fragmented nerve terminal profiles in AChE<sup>-/-</sup> muscles [17]. An important issue that was not addressed by our studies is to know whether the changes in nerve terminal profiles paved the way, or followed the changes in nAChRs distribution.

How do nerve terminal and nAChR redistribution affect the functioning of the NMJ in AChE<sup>-/-</sup> muscles? The smaller surface area in patches and the discontinuity of nAChR clusters and overlying nerve terminals have the advantage to allow ACh to rapidly escape from the narrow synaptic cleft. The quickness of ACh diffusion is expected to reduce: (i) the number of channels opened by ACh (speeding the decay-time of synaptic responses and the K<sup>+</sup> efflux from ACh-activated endplate channels); (ii) the probability of nAChRs desensitisation; (iii) the activation of pre-synaptic ACh auto-receptors and (iv) the stimulus-induced antidromic backfiring of motor nerves. Most of these effects can account for the finding that tetanic tension is better maintained in AChE<sup>-/-</sup> muscles than in normal muscles treated with AChE inhibitors.

## Acknowledgements

We thank Miss P. Villeneuve and Miss V. Lavallée (Transgenic facility, Gif sur Yvette), and Miss N. Barougier and Miss B. Bonnafos (INRA, Montpellier) for taking care of animals used in the present study. This study was supported by grants from the Action Concertée Incitative: Biologie du Développement et Physiologie Intégrative (grant no. 02 2 529), the Association Française contre les Myopathies, and the Direction des Systèmes de Forces et de la Prospective (grant no. 026065093). Confocal microscopy studies were performed on the facility of the CNRS Campus (Plate-forme Imagerie et Biologie Cellulaire) supported in part by the ASTRE program of the Conseil Général de l'Essonne.

## References

- [1] J. Massoulié, The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases, *Neurosignals* 11 (2002) 130–143.
- [2] R.L. Rotundo, Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction, *J. Neurocytol.* 32 (2003) 743–766.
- [3] W. Van der Kloot, O.P. Balezina, J. Molgó, L.A. Naves, The timing of channel opening during miniature endplate currents at the frog and mouse neuromuscular junctions: effects of fasciculin-2, other anti-cholinesterases and vesamicol, *Pflügers Arch.* 428 (1994) 114–126.
- [4] W. Van der Kloot, J. Molgó, Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction, *Physiol. Rev.* 74 (1994) 899–991.
- [5] W. Kalow, Human pharmacogenomics: the development of a science, *Hum. Genomics* 1 (2004) 375–380.
- [6] S.L. Primo-Parmo, C.F. Bartels, B. Wiersema, A.F. Van der Spek, J.W. Innis, B.N. La Du, Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (BCHE) gene, *Am. J. Hum. Genet.* 58 (1996) 52–64.
- [7] X. Cousin, U. Strahle, A. Chatonnet, Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models, *Bioessays* 27 (2005) 189–200.
- [8] W. Xie, P.J. Wilder, J. Stribley, A. Chatonnet, A. Rizzino, P. Taylor, S.H. Hinrichs, O. Lockridge, Knockout of one acetylcholinesterase allele in the mouse, *Chem. Biol. Interact.* (1999) 119–120, 289–299.
- [9] W. Xie, J.A. Stribley, A. Chatonnet, P.J. Wilder, A. Rizzino, R.D. McComb, P. Taylor, S.H. Hinrichs, O. Lockridge, Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene targeted mice lacking acetylcholinesterase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293 (2000) 896–902.
- [10] B. Li, E.G. Duysen, L.A. Volpicelli-Daley, A.I. Levey, O. Lockridge, Regulation of muscarinic acetylcholine receptor function in acetylcholinesterase knockout mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74 (2003) 977–986.
- [11] B. Li, J.A. Stribley, A. Ticu, W. Xie, L.M. Schopfer, P. Hammond, S. Brimijoin, S.H. Hinrichs, O. Lockridge, Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse, *J. Neurochem.* 75 (2000) 1320–1331.
- [12] J. Minic, A. Chatonnet, E. Krejci, J. Molgó, Butyrylcholinesterase, acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions, *Br. J. Pharmacol.* 138 (2003) 177–187.
- [13] E.G. Duysen, J.A. Stribley, D.L. Fry, S.H. Hinrichs, O. Lockridge, Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse, *Dev. Brain Res.* 137 (2002) 43–54.
- [14] W.J. Betz, F. Mao, G.S. Bewick, Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals, *J. Neurosci.* 12 (1992) 363–375.
- [15] R.R. Ribchester, F. Mao, W.J. Betz, Optical measurements of activity-dependent membrane recycling in motor nerve terminals of mammalian skeletal muscle, *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 255 (1994) 61–66.
- [16] J. Minic, J. Barbier, A. Chatonnet, E. Krejci, J. Molgó, in: N. Inestrosa, E.O. Campos (Eds.), *Cholinesterase in the Second Millennium: Biomolecular and Pathological Aspects*, Synaptic transmission at AChE<sup>-/-</sup> and CoQ<sup>-/-</sup> knockout mouse neuro-

- muscular junctions, *Diseño e Impresiones J&J Ltda*, Chile, 2004, pp. 19–23.
- [17] M. Adler, H.A. Manley, A.L. Purcell, S.S. Deshpande, T.A. Hamilton, R.K. Kan, G. Oyler, O. Lockridge, E.G. Duysen, R.E. Sheridan, Reduced acetylcholine receptor density, morphological remodeling, and butyrylcholinesterase activity can sustain muscle function in acetylcholinesterase knockout mice, *Muscle Nerve* 30 (2004) 317–327.
- [18] M. Moyer, E. van Lunteren, Effect of temperature on endplate potential rundown and recovery in rat diaphragm, *J. Neurophysiol.* 85 (2001) 1270–1275.
- [19] M. Nishimura, Y. Shimizu, E. Satoh, T. Yokoyama, O. Yagasaki, The effect of a reduction in temperature on the quantal release of transmitter at the mouse neuromuscular junction, *Gen. Pharmacol.* 24 (1993) 1235–1239.
- [20] J. Dudel, M. Heckmann, Desensitization reduces amplitudes of quantal end-plate currents after a single preceding end-plate current in mouse muscle, *Pflügers Arch.* 437 (1999) 569–576.
- [21] G. Feng, E. Krejci, J. Molgó, J.M. Cunningham, J. Massoulié, J.R. Sanes, Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function, *J. Cell Biol.* 144 (1999) 1349–1360.
- [22] J. Chapron, S. De La Porte, L. Delepine, J. Koenig, Schwann cells modify expression of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase at rat neuromuscular junctions, *Eur. J. Neurosci.* 2 (1997) 260–270.

# Catecholamine secretion from rat foetal adrenal chromaffin cells and hypoxia sensitivity

R. Bournaud · J. Hidalgo · H. Yu · E. Girard ·  
T. Shimahara

Received: 28 April 2006 / Revised: 21 July 2006 / Accepted: 26 October 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** The adrenal medulla chromaffin cells (AMCs) secrete catecholamines in response to various types of stress. We examined the hypoxia-sensitivity of catecholamine secretion by rat foetal chromaffin cells in which the innervation by the splanchnic nerve is not established. The experiments were performed in primary cultured cells from two different ages of foetuses (F15 and F19). Membrane potential of AMCs was monitored with the patch clamp technique, and the catecholamine secretion was detected by amperometry. We found that: (1) AMCs from F19 foetuses showed hypoxia-induced catecholamine release. (2) This hypoxia-induced secretion is produced by membrane depolarization generated by an inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  current [ $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ ] current. (3) Chromaffin precursor cells from F15 foetuses secrete catecholamine. The quantal release is calcium-dependent, but the size of the quantum is reduced. (4) In the precursor cells, a hypoxia-induced membrane hyperpolarization is originated by an ATP-sensitive  $\text{K}^+$  current [ $I_{\text{K}(\text{ATP})}$ ] activation. (5) During the prenatal period, at F15, the percentage of the total outward current for  $I_{\text{K}(\text{ATP})}$  and  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  was 50 and 29.5%, respectively, whereas at F19,  $I_{\text{K}(\text{ATP})}$  is reduced to 14%, and  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  became 64% of the total current. We conclude that before birth, the age-dependent hypoxia response of chromaffin

cells is modulated by the functional activity of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  and  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels.

**Keywords** Catecholamine · Secretion · Chromaffin cells · Foetal rat · Hypoxia ·  $\text{K}^+$  current

## Introduction

Catecholamine secretion from adrenal medulla chromaffin cells (AMCs) plays a key role in the protective response to diverse physiological stresses originated by hypoglycemia, hemorrhage and hypoxia, among others. In AMCs from adult animals, this secretion is controlled by the cholinergic splanchnic nerve. Also, catecholamine secretion plays a crucial role during the perinatal period. For instance, at birth, the foetus is exposed to hypoxia, and this stress triggers catecholamine secretion that is involved in the initiation of air breathing by inducing the lung epithelium cells to switch from a net fluid secretion to a net fluid absorption mode [15]. However, in most animals, (rats, calves and also in humans), the splanchnic innervation is absent at birth [19, 21]. Therefore, the control of secretion in foetal cells which lacks control by innervation, is solely the result of non-neurogenic mechanisms [19]. The non-neurogenic response to hypoxia has been well studied in the carotid body Type 1 cells that are also neuroectodermal-derived cells. In the case of carotid Type 1 cells, the arterial partial pressure of oxygen ( $\text{pO}_2$ ) modulates the gating of  $\text{K}^+$  channels. The reduction of  $\text{K}^+$  conductance by low  $\text{pO}_2$  triggers a membrane depolarization that evokes  $\text{Ca}^{2+}$  influx and neurotransmitter secretion [12, 13, 18]. In this case, the nature of the oxygen sensing and the coupling molecule mechanisms fall into two closely related classes: the redox hypothesis and the heme hypothesis. In both cases,

R. Bournaud (✉) · H. Yu · E. Girard · T. Shimahara (✉)  
Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire,  
Institut Alfred Fessard CNRS UPR 9040,  
Avenue de la Terrasse,  
91198 Gif sur Yvette Cedex, France  
e-mail: bournaud@nbcn.cnrs-gif.fr  
e-mail: shimahara@nbcn.cnrs-gif.fr

J. Hidalgo  
Program of Physiology and Biophysics, ICBM,  
Faculty of Medicine, University of Chile,  
Santiago, Chile

# Brain-derived neurotrophic factor facilitates *in vivo* internalization of tetanus neurotoxin C-terminal fragment fusion proteins in mature mouse motor nerve terminals

Sylvie Roux,<sup>1</sup> Cécile Saint Clément,<sup>2</sup> Thomas Curie,<sup>2</sup> Emmanuelle Girard,<sup>1</sup> Francisco-Javier Miana Mena,<sup>3</sup> Julien Barbier,<sup>1</sup> Rosario Osta,<sup>3</sup> Jordi Molgó<sup>1</sup> and Philippe Brûlet<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR9040, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France

<sup>2</sup>Unité d'Embryologie Moléculaire, Institut Pasteur, Unités de Recherche Associées 2578, Centre National de la Recherche Scientifique, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France

<sup>3</sup>Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos, Facultad de Veterinaria, C/Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

**Keywords:** green fluorescent protein, neuromuscular junction, neurotrophic factors,  $\beta$ -galactosidase

## Abstract

In a previous study it was reported that fusion proteins composed of the atoxic C-terminal fragment of tetanus toxin (TTC) and green fluorescent protein or  $\beta$ -galactosidase (GFP-TTC and  $\beta$ -gal-TTC, respectively) rapidly cluster at motor nerve terminals of the mouse neuromuscular junction (NMJ). Because this traffic involves presynaptic activity, probably via the secretion of active molecules, we examined whether it is affected by brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Quantitative confocal microscopy and a fluorimetric assay for  $\beta$ -gal activity revealed that co-injecting BDNF and the fusion proteins significantly increased the kinetics and amount of the proteins' localization at the NMJ and their internalization by motor nerve terminals. The observed increases were independent of synaptic vesicle recycling because BDNF did not affect spontaneous quantal acetylcholine release. In addition, injecting anti-BDNF antibody shortly before injecting GFP-TTC, and before co-injecting GFP-TTC and BDNF, significantly reduced the fusion protein's localization at the NMJ. Co-injecting GFP-TTC with neurotrophin-4 (NT-4) or glial-derived neurotrophic factor (GDNF), but not with nerve growth factor, neurotrophin-3 or ciliary neurotrophic factor, also significantly increased the fusion protein's localization at the NMJ. Thus, TTC probes may use for their neuronal internalization endocytic pathways normally stimulated by BDNF, NT-4 and GDNF binding. Different tyrosine kinase receptors with similar signalling pathways are activated by BDNF/NT-4 and GDNF binding. Thus, activated components of these signalling pathways may be involved in the TTC probes' internalization, perhaps by facilitating localization of receptors of TTC in specific membrane microdomains or by recruiting various factors needed for internalization of TTC.

## Introduction

The atoxic C-terminal fragment of tetanus toxin (designated 'TTC') is efficiently internalized by nerve endings and is transported retrogradely along axons to the spinal cord. The fragment's *in vivo* internalization and transport is maintained even when it is fused to a reporter gene such as LacZ, which encodes for  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) activity, or to green fluorescent protein (GFP), either after direct injection of the hybrid protein (Coen *et al.*, 1997; Miana-Mena *et al.*, 2003; Sapir *et al.*, 2004) or when expressed as a transgene in mice (Maskos *et al.*, 2002; Miana-Mena *et al.*, 2004; Sakurai *et al.*, 2005). Roux *et al.* (2005) previously reported that TTC fusion proteins localize quickly, via clathrin-coated pits and axolemmal infoldings associated with lipid microdomains, in nerve terminals of the mouse neuromuscular junction (NMJ). Moreover, in cultured neuronal cells, evidence has been presented for a co-trafficking between TTC and the p75 neurotrophin receptor (p75<sup>NTR</sup>) (Lalli & Schiavo, 2002). Furthermore, tetanus toxin and TTC mediate activation of intracellular

pathways involving neurotrophin tyrosine kinase receptors (Trk) (Gil *et al.*, 2003; Chaïb-Oukadour *et al.*, 2004). Thus, these results suggest a relationship between TTC trafficking, neurotrophins and neurotrophin receptors.

Neuronal activity influences the synthesis, release and effectiveness of neurotrophins (Funakoshi *et al.*, 1995; Wang & Poo, 1997; Xie *et al.*, 1997; Gomez-Pinilla *et al.*, 2001). Thus, presynaptic depolarization greatly facilitates modulation of synaptic transmission at developing NMJs by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Boulanger & Poo, 1999). Also, high-frequency neuronal activity and synaptic transmission have been found (Du *et al.*, 2000) to elevate the number of specific tyrosine kinase receptors of BDNF (TrkB) on the surface of cultured hippocampal neurons, apparently by recruiting extra TrkB receptors to the plasma membrane (Meyer-Franke *et al.*, 1998). Neuronal activity also influences the rapid clustering of TTC probes at the NMJ (Miana-Mena *et al.*, 2002). However, the mechanism underlying this activity-dependent clustering remains unknown, and may involve activity-dependent secretion and/or action of various signalling molecules at the synapse.

The studies described in this paper were designed to determine whether neurotrophic factors, in particular BDNF, modulate *in vivo*

Correspondence: Dr S. Roux or Dr J. Molgó, as above.

E-mail: sroux@nbcn.cnrsgif.fr or Jordi.Molgo@nbcn.cnrsgif.fr

Received 16 January 2006, revised 22 May 2006, accepted 19 June 2006

## Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions

Sylvie Roux,<sup>a,b,\*</sup> Cesare Colasante,<sup>a,c</sup> Cécile Saint Clément,<sup>a</sup> Julien Barbier,<sup>b</sup> Thomas Curie,<sup>a</sup> Emmanuelle Girard,<sup>b</sup> Jordi Molgó,<sup>b</sup> and Philippe Brûlet<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unité d'Embryologie Moléculaire, Institut Pasteur, Unités de Recherche Associées 2578, Centre National de la Recherche Scientifique, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, Unité Propre de Recherche 9040, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Fédératif de Neurobiologie Alfred Fessard, 91198 Gif-sur-Yvette, France

<sup>c</sup>Laboratorio de Fisiología de La Conducta, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela

Received 12 January 2005; revised 13 May 2005; accepted 27 May 2005

Available online 14 July 2005

**The distribution, dynamics, internalization, and retrograde axonal traffic of a fusion protein composed of green fluorescent protein (GFP) and the atoxic C-terminal fragment of tetanus toxin (TTC) were studied after its in vivo injection. Confocal microscopy and immunogold electron microscopy revealed that the fusion protein (GFP-TTC) rapidly clustered in motor nerve terminals of the neuromuscular junction. Clathrin-coated pits, and axolemma infoldings located between active zones appeared to be involved in the internalization of the fusion protein. Biochemical analysis of detergent-extracted neuromuscular preparations showed that the GFP-TTC fusion protein was associated with lipid microdomains. We suggest that GFP-TTC clustering in these lipid microdomains favors the recruitment of other proteins involved in its endocytosis and internalization in motor nerve terminals. During its retrograde trafficking, GFP-TTC accumulated in different axonal compartments than those used by cholera toxin B-subunit suggesting that these two proteins are transported by different pathways and cargos.**

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Tetanus neurotoxin (TeNT), produced by the anaerobic bacterium *Clostridium tetani*, is one of the most potent, naturally

occurring bioactive compounds known, and it is responsible for the severe neurological illness known as tetanus. TeNT enters the nervous system at the neuromuscular junction (NMJ), where it is internalized and retrogradely transported along the motoneuron axons by an unknown mechanism (Schiavo et al., 2000). After reaching the cell body, TeNT is transcytosed into adjacent inhibitory interneurons where it blocks the release of inhibitory neurotransmitters (i.e.,  $\gamma$ -aminobutyric acid and glycine), leading to spastic paralysis. In its active form, TeNT is a dichain protein, consisting of an  $\sim$ 100-kDa heavy chain and an  $\sim$ 50-kDa light chain associated with a single disulfide bond and non-covalent interactions, that targets the vesicle-associated membrane protein (VAMP/synaptobrevin), an essential element of the neuroexocytosis apparatus (reviewed by Schiavo et al., 2000). The three-dimensional crystal structure of TeNT's carboxy-terminal domain has been determined (Umland et al., 1997), which has provided a basis for understanding the relationship between TeNT's structure and mechanism of action. The N-terminal domain of TeNT's heavy chain is responsible for the membrane translocation of the toxin's light chain into the neuronal cytosol, and the C-terminal domain is mainly responsible for the toxin's neurospecific binding (Montecucco and Schiavo, 1995; Schiavo et al., 2000). It has been well documented that TeNT binding to neurons occurs within particular regions of the plasma membranes that are enriched in cholesterol, gangliosides, and glycosphosphoinositol (GPI)-anchored proteins (Herrerros et al., 2000a,b; Munro et al., 2001). Therefore, it is likely that TeNT uses constitutive mechanisms for its internalization and traffic. TeNT has been suggested to use the synaptic vesicle recycling pathway for its internalization in cultured hippocampus neurons (Matteoli et al., 1996). In differentiated PC-12 cells and cultured spinal cord neurons, the C-terminal fragment of TeNT or TTC fragment displays a punctuate binding pattern, which is similar to the one displayed by lipid raft markers (Harder et al., 1998), and associates with

*Abbreviations:*  $\alpha$ -BTX,  $\alpha$ -bungarotoxin;  $\beta$ -gal,  $\beta$ -galactosidase;  $\beta$ -gal-TTC, fusion protein of  $\beta$ -gal and C-terminal fragment of tetanus toxin; CT-B, AlexaFluor 594-conjugated B-subunit of cholera toxin; GFP, green fluorescent protein; GFP-TTC, fusion protein of GFP and C-terminal fragment of tetanus toxin; NMJ, neuromuscular junction; TeNT, tetanus neurotoxin; TTC, C-terminal fragment of tetanus toxin.

\* Corresponding author. Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR 9040, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette cedex, France. Fax: +33 169 82 41 41.

E-mail address: sroux@nbcn.cnrs-gif.fr (S. Roux).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

## Les imines cycliques d'origine marine et la pharmacopée naturelle

---

Jordi MOLGÓ, Emmanuelle GIRARD, Evelyne BENOIT \*

CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard - FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire - UPR9040, Gif sur Yvette, F-91198, France.

\* Tél. : (33) 1 69 82 36 52. Fax : (33) 1 69 82 41 41. Courriel : benoit@nbcn.cnrs-gif.fr

### *The situation of cyclic imines of marine origin in natural pharmacopoeia*

#### Summary

*The present chapter intends to review research on an emerging group of novel marine toxins, the cyclic imines, all of which share a functional imine group as part of a heterocyclic ring system within their molecular framework. The origins, structures, synthesis as well as the toxicity and pharmacological activity of these compounds are briefly detailed. As the result of their significant and specific biological effects, the cyclic imines are often useful as probes for physiological studies, and represent an important source of leads for drug discovery.*

#### Introduction

Un des enjeux de la pharmacopée est de trouver de nouvelles molécules ou de découvrir les propriétés insoupçonnées de molécules connues, destinées à soigner l'être humain ou l'animal. Les substances naturelles, de par leur incroyable diversité moléculaire, représentent un réservoir unique de molécules aux vertus potentiellement thérapeutiques. Il n'est donc pas étonnant qu'elles soient à l'origine de plus de 50% des médicaments. En particulier, la recherche de traitement des maladies par des substances d'origine végétale a conduit à la découverte de nouveaux remèdes dont certains sont actuellement des classiques de la pharmacopée naturelle.

De ce point de vue, le monde marin est resté longtemps inexploré et l'étude des substances d'origine marine n'a véritablement commencé que dans les années 50. Elle a abouti à la description de quelques 3000 à 4000 molécules nouvelles, produites par des micro-organismes, des algues et des invertébrés marins, et a permis non seulement de caractériser près de 500 molécules biologiquement actives (antitumorales, antivirales, immunomodulatrices, antibiotiques, antifongiques ou encore anti-inflammatoires), mais aussi de commercialiser de nouveaux médicaments tels que les céphalosporines (des antibiotiques issus d'un champignon marin), la vidarabine (un antiviral provenant d'une éponge) et la cytarabine (un antitumoral de même origine). Il est à souligner qu'en raison de contraintes écologiques, il est extrêmement rare de pouvoir obtenir, à partir d'un organisme marin, des produits en quantité suffisante pour une exploitation industrielle. La synthèse est donc privilégiée. En outre, cette méthode présente l'avantage de pouvoir améliorer les

## **Alcaloïdes bioactifs extraits d'éponges: les xestospongines dans l'étude de la signalisation du $\text{Ca}^{2+}$ intracellulaire dépendante de l'inositol 1,4,5-triphosphate**

---

Emmanuelle GIRARD<sup>1</sup>, Enrique JAIMOVICH<sup>2</sup>, Carine VERGNE<sup>3</sup>,  
Ali AL-MOURABIT<sup>3</sup>, Dominique LAURENT<sup>4</sup>, Jordi MOLGO<sup>1\*</sup>

1. Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR 9040, Institut Fédératif de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS, bât. 32-33, 91198 Gif sur Yvette cedex, France.

2. Centro de Estudios Moleculares de la Célula, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, Santiago 7, Chile.

3. Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, bât. 27, 91198 Gif sur Yvette cedex, France.

4. Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox, UMR 152, IRD-Université Paul Sabatier, Centre IRD de Nouméa, BP A5, 98848 Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

\* Tél. : (33) 1 69 82 36 42. Fax : (33) 1 69 82 41 41. Courriel : molgo@nbcn.cnrs-gif.fr

### ***Bioactive alkaloids extracted from sponges: the xestospongins in the study of intracellular $\text{Ca}^{2+}$ signalling mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate***

#### **Summary**

*The marine environment has proven to be a rich source of biologically active natural compounds that have demonstrated significant value as research tools. Among structural components of the sea floor, marine sponges are of great interest because they contain a significant number of complex molecules that have potent pharmacological activities, and potential therapeutic value. Marine sponges exist in all sizes, shapes, and colours and most of them live attached to coral reefs (figure 1). In this review, we provide a brief survey of some of the alkaloids discovered from Xestospongia species, with special emphasis on the chemical structure (figure 2) and mode of action of the Xestospongin/araguspongin family. These alkaloids were first shown, in 1997, to be potent membrane-permeable inhibitors of the inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ )-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release. At present, xestospongin alkaloids constitute essential pharmacological tools for studying intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  events mediating a wide range of cellular responses involving the  $\text{IP}_3$  signalling cascade. High levels of  $\text{IP}_3$  receptors are expressed in excitable and non-excitable cells, and in sub-cellular organelles, and  $\text{IP}_3$  is known to exert an important second messenger role in the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores in response to membrane-receptor activation. Because xestospongin C blocked  $\text{IP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release*

## Implication des réserves intracellulaires de $\text{Ca}^{2+}$ dans l'augmentation de la libération d'acétylcholine indépendante du $\text{Ca}^{2+}$ externe et provoquée par la brevétoxine-3

Emmanuelle GIRARD<sup>1</sup>, Julien BARBIER<sup>1</sup>, Evelyne BENOIT<sup>1</sup>, Dominique LAURENT<sup>2</sup>, Jordi MOLGO<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR 9040, Institut Fédératif de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS, bât. 32-33, 91198 Gif sur Yvette cedex, France ;

<sup>2</sup>Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles, IRD/UNC, Centre IRD, BP A5, 98848 Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

\* Tél. : (33) 1 69 82 36 42. Fax : (33) 1 69 82 94 66.

Courriel : molgo@nbcn.cnrs-gif.fr

***Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores are involved in the increase of external  $\text{Ca}^{2+}$ -independent quantal acetylcholine release induced by brevetoxin-3***

### Summary

Brevetoxin-3 (PbTx-3) is a potent lipid-soluble polyether toxin, produced by the marine dinoflagellate *Karenia brevis* (formerly *Gymnodinium breve*), that targets receptor-site 5 of voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels [1, 9]. In isolated frog neuromuscular preparations, PbTx-3, in the nanomolar range and in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , increases spontaneous quantal acetylcholine (ACh) release from nerve terminals, measured as the frequency of miniature endplate potentials (MEPPs) [6]. In the present study, we have studied whether the ability of PbTx-3 to increase external  $\text{Ca}^{2+}$ -independent quantal transmitter release is due to a direct action of  $\text{Na}^+$  on the transmitter release process, or to an indirect action mediated by  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilization from intraterminal  $\text{Ca}^{2+}$  stores. For this purpose, we have used various drugs that affect intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in both isolated frog cutaneous pectoris nerve-muscle preparations and cultured neuroblastoma (NG108-15) cells. The ability of 50 nM PbTx-3 to enhance quantal ACh release, in a nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium containing EGTA (2 mM), was reduced by 98% by pretreatment of isolated neuromuscular preparations with 400 nM thapsigargin (figure 1A and B), a blocker of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase pump that depletes and prevents refilling of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores [14]. A similar marked reduction of PbTx-3 effect (of 90-99%) was observed (figure 1B) with the permeant 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, 40  $\mu\text{M}$ ), an inhibitor of inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ )-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release [2], and with 32  $\mu\text{M}$  of the  $\text{IP}_3$ -receptor blocker xestospongin B [4]. Thus, pharmacological manipulation of  $\text{IP}_3$  signalling markedly reduced PbTx-3-induced external  $\text{Ca}^{2+}$ -independent quantal ACh release. In neuroblastoma (NG108-15) cells loaded with fluo-3 and bathed in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium containing EGTA (2 mM), 500 nM PbTx-3 induced a time-dependent increase of

GPR54 in the mouse, peripheral or central KiSS-1 injection and two other descriptions of GPR54 loss of function mutations in human have confirmed the key role of this receptor in the regulation of LH and FSH synthesis. These results open a new field in the physiology of the onset of the puberty and lead to suggest a new pharmacological modulation of this axis, which may occur at the level of the hypothalamus or the pituitary.

doi:10.1016/j.jphysparis.2005.12.033

De Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 100, 10972–10976.

### Two-component action of ATP on transmitter release from the motor nerve endings at the neuromuscular junction

Rachid Giniatullin, Serguey Grishin, Arthur Giniatullin

State Medical University, 420012 Kazan, Tatarstan, Russia

E-mail address: rashid@sissa.it (R. Giniatullin)

Neuromuscular junction is composed by three active partners such as the motor nerve ending, the postsynaptic specialization of the muscle fiber and the perisynaptic glial Schwann cells (Auld and Robitaille, 2003). ATP coreleased from the motor nerve endings with ACh could potentially activate any of these three partners culminating in modulation of synaptic efficacy. We previously showed that, on skeletal muscle, ATP inhibited ACh release via presynaptic P2 receptors. The receptor identification (P2X or P2Y), and receptor transduction mechanism remained, however, unknown. In the present study using the voltage-clamp technique and imaging technique we analyzed the properties of presynaptic ATP receptors, its subsequent effector mechanisms and potential involvement of postsynaptic membrane and glia. ATP depressed multiquantal end-plate currents without changes in the amplitude of miniature currents indicating reduced quantal release. This depressant effect of ATP had a longer latency than similar inhibitory action of adenosine operating via P1 receptors suggesting a multistep or multicomponent activation. ATP $\gamma$ S, agonist at P2X receptors, or Bz-ATP, agonist at P2X<sub>7</sub> receptors, were ineffective. The action of ATP was prevented by suramin and unchanged by PPADS or TNP-ATP, antagonists of P2X receptors, RB-2, a blocker of certain P2Y receptors, or MRS-2179, a specific blocker of P2Y<sub>1</sub> receptors. The depressant action of ATP was reproduced by UTP, metabotropic P2Y receptor agonist. Pertussis toxin, antagonist of Gi/o-proteins, and inhibitors of phosphatidylcholine specific PLC and PKC prevented the effect of ATP. The blockers of PLA<sub>2</sub> and COX significantly attenuated the depressant action of ATP. Similar attenuation of depression was obtained with several antioxidants. Imaging technique with dichlorofluorescein revealed an increased production

of reactive oxygen species in Schwann cells overwhelming the fluorescence of motor nerve terminal and muscle fiber. However, upon activation by ATP muscle fiber became a major source of fluorescence suggesting that reactive oxygen species produced by muscle could retrogradely participate in presynaptic inhibitory effect. Thus, our data indicate, the existence at the neuromuscular junction of inhibitory PTX-sensitive P2Y receptors probably coupled to two distinct executive cascades one of which includes PLA<sub>2</sub> and COX with subsequent generation of reactive oxygen species, new messengers mediating the action of extracellular ATP. This divergent presynaptic P2 signalling could provide feedback inhibition of transmitter release and perhaps be involved in presynaptic plasticity.

doi:10.1016/j.jphysparis.2005.12.034

Auld, D.S., Robitaille, R., 2003. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40, 389–400.

### Synaptic efficacy and remodeling at the neuromuscular junction of knockout mice deficient in acetylcholinesterase

Emmanuelle Girard<sup>a</sup>, Julien Barbier<sup>a</sup>, Shelley Camp<sup>b</sup>, Palmer Taylor<sup>b</sup>, Arnaud Chatonnet<sup>c</sup>, Eric Krejci<sup>d</sup>, Jordi Molgó<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS UPR 9040, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, University of California at San Diego La Jolla, CA 92093, USA

<sup>c</sup> Département de Physiologie Animale, INRA, 34060 Montpellier, France

<sup>d</sup> Biologie des synapses cholinergiques, IFR 95, UFR Biomédicale, 75006 Paris, France

E-mail address: girard@nbcn.cnrs-gif.fr (E. Girard)

At the vertebrate skeletal neuromuscular junction two closely related enzymes can hydrolyze acetylcholine (ACh): acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The classical function of AChE in regulating the duration of ACh action in the synaptic cleft is well established. However, the function of BChE remains controversial. Therefore, the present study was designed to evaluate neuromuscular transmission and the eventual role of BChE in knockout mice deficient in AChE activity. For this purpose we used AChE knockout mice (AChE<sup>-/-</sup>) (Xie et al., 2000; Minic et al., 2003), transgenic mice with deletions of alternatively spliced exons of the *AChE* gene (deleted exons 5 + 6, and deleted exon 5/Neo) (Feng et al., 1999), collagen Q-deficient mice (ColQ<sup>-/-</sup>) (Feng et al., 1999), and PRiMA (Camp et al., 2004) knockout mice (PRiMA<sup>-/-</sup>).

The kinetics of the current flowing through the endplate membrane in response to an ACh quantum was analyzed in isolated phrenic-hemidiaphragm neuromuscular preparations from the various transgenic mice, as well as nerve-

evoked synaptic responses, muscle twitch and tetanic tensions. In addition, complementary information was obtained by confocal laser scanning microscopical examination of the endplate region of the various transgenic muscles in order to determine the characteristics of muscle nicotinic ACh receptor clustering.

The results obtained indicate that focally recorded miniature endplate currents (MEPC) exhibit a prolonged decay time in all transgenic mice examined with the exception of PRiMA<sup>-/-</sup> mutant muscles in which MEPCs were not affected.

Complementary morphological examination revealed that there is an important remodeling and different clustering of muscle nicotinic ACh receptors at junctions lacking AChE activity in which MEPCs were prolonged. These results will be discussed in terms of physiological adaptation or compensation for the absence of AChE activity, and in relation to the expression of AChE and BChE at the neuromuscular junction.

Supported by the AFM and by ACI # 0220530.

doi:10.1016/j.jphysparis.2005.12.035

Camp, S., Zhang, L., Marquez, M., et al., 2004. In: Inestrosa, N.C., Campos, E.O. (Eds.), *Cholinesterases in the Second Millennium: Biomolecular and Pathological Aspects*. p. 43.

Feng, G., Krejci, E., Molgó, J., Cunningham, J.M., Massoulié, J., Sanes, J.R., 1999. Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J. Cell. Biol.* 144, 1349–1360.

Minic, J., Chatonnet, A., Krejci, E., Molgó, J., 2003. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. *Br. J. Pharmacol.* 138, 177–187.

Perrier, A.L., Massoulié, J., Krejci, E., 2002. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* 33 (2), 275–285.

Xie, W., Stribley, J.A., Chatonnet, A., Wilder, P.J., Rizzino, A., McComb, R.D., Taylor, P., Hinriches, S.H., Lockridge, O., 2000. Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 896–902.

### The possible contribution of mast cells in the methylmercury-evoked effects

Elizabeth E. Graevskaya

*Biophysical Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Vorobevy Gory, Moscow 119992, Russia*

*E-mail address: graevsk@biophys.msu.ru*

Methylmercury (MeHg) is a well-established significant environmental neurotoxic agent, known as the cause of Minamata disease (IPCS, 1990). As it is known MeHg penetrates the blood-brain barrier to cause severe neurological symptoms in human beings and experimental animals, destructs neurons and glial cells, and disrupts neuronal migration. At the same time, increasing evidence indicates that neuroimmune interactions, including neuroinflamma-

tory processes, may involve also mast cells. Mast cells and their transmitter content play a role in triggering an immune response in the brain. In our study we tried to define the possible contribution of mast cells in the development of methylmercury-evoked effects. As a model we used rat peritoneal mast cells, because it is easier to get the requisite amount of mast cells for measuring modifications of transmitter release. We investigated the effects of MeHg on mast cell degranulation induced by non-immunological stimuli (the selective inductor of histamine release): the compound 48/80 and the calcium ionophore A23187, both in vivo and in vitro. Eight, 12 and 15 days after administration of MeHg (10 mg/kg/day) we observed that the calcium ionophore A23187- and 48/80-induced histamine release gradually decreased. Mast cells from rat exposed 24 or 72 h to a single dose of MeHg (20 mg/kg) showed a significant inhibition of the A23187-stimulated histamine secretion, but no change in the compound 48/80-stimulated release. In vitro incubation of peritoneal mast cells with MeHg alone ( $10^{-8}$ – $10^{-6}$  M) did not induce mast cell degranulation, but modified the activation of mast cells by compound 48/80 and calcium ionophore A23187. We observed a facilitation of stimulated secretion by prior incubation with low dose of MeHg ( $10^{-8}$  M) and an inhibition at  $10^{-6}$  M MeHg. These results show that MeHg treatment can modify mast cell function in vivo and in vitro and provide insight into the understanding what role this cell has in the pathogenesis of Minamata disease-connected disorders.

doi:10.1016/j.jphysparis.2005.12.036

International Programm of Chemical Safety (IPCS), 1990. *Environmental health criteria 101, methylmercury*. World Health Organization, Geneva, p. 144.

### Effect of delta sleep inducing peptide on NMDA and GABA evoked ion currents in cortical, cerebellar and hippocampal neurons

Vladimir V. Grigoriev, Alexi E. Redkozubov, Elena A. Kustova, Tamara A. Ivanova, Serguey O. Bachurin

*Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow district 142432, Russia*

*E-mail address: grigor@ipac.ac.ru (V.V. Grigoriev)*

Delta sleep inducing peptide (DSIP) is an endogenous substance that induces sleep in human and animal and blocks the NMDA elicited seizures in rats in vivo. Effect of DSIP on NMDA and GABA-evoked ion currents in cortical, cerebellar and hippocampal neurons was studied using whole-cell patch clamp technique. DSIP in range of concentrations 0.1 pM–1 nM inhibited partially the ion currents elicited by NMDA in cortical neurons. DSIP reduced the

reasons for the differential effect of the tetanisations we have compared several properties of the connections belonging to each group. We found that on average, evoked IPSCs in the connections facilitated by the tetanisations have smaller amplitude and larger coefficient of variation (CV) of IPSC amplitude compared to connections depressed by the tetanisation. We also estimated quantal parameters for both groups of the connections assuming that transmitter release is reasonably described by a binomial distribution. We have found that the background release probability ( $P$ ) is substantially lower in the connections facilitated by the tetanisation ( $P \sim 0.5$ ) than in the connections depressed by the tetanisation ( $P \sim 0.9$ ) and suggest that this difference underlies the differential effect of the tetanisation.

We have also found that tetanisation induces opposite effects on connections made by distinct presynaptic neurons with the same postsynaptic cell (convergent connections) in a fraction of postsynaptic neurons studied (3 out of 9). These results support the idea that properties of the presynaptic neuron are of primary importance for the observed differential effect of the tetanisation, but do not exclude a role of the postsynaptic neuron in this effect.

Supported partially by an INTAS grant (No. 01-2117) to M. Storozhuk.

doi:10.1016/j.jphysparis.2005.12.072

### Generation of a mouse model for Schwartz–Jampel syndrome

Morgane Stum<sup>a</sup>, Emmanuelle Girard<sup>b</sup>, Jordi Molgo<sup>b</sup>, Nacira Tabti<sup>a</sup>, Jean-Claude Willer<sup>c</sup>, Bertrand Fontaine<sup>a</sup>, Eric Krejci<sup>d</sup>, Sophie Nicole<sup>a</sup>

<sup>a</sup> INSERM U546, Paris, France

<sup>b</sup> CNRS UPR9040, Gif-sur-Yvette, France

<sup>c</sup> Département de Physiologie Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière and UPMC, Paris, France

<sup>d</sup> ENS UMR 8544, Paris, France

E-mail address: [mstum@chups.jussieu.fr](mailto:mstum@chups.jussieu.fr) (M. Stum)

Schwartz–Jampel syndrome (SJS) is a rare human disease transmitted with an autosomal recessive mode of inheritance. Patients suffer from functional handicap with myotonia and chondrodystrophy, but their lifespan is not affected (Nicole and Fontaine, 2004). This syndrome is genetically homogeneous and results from hypomorph mutations in the perlecan gene. We observed that SJS homozygous truncating mutations were gathered in the C-terminal domain of perlecan. Perlecan is a heparan sulfate proteoglycan present in basal lamina (BL), where it is necessary for its structural maintenance. In skeletal muscle, perlecan has been involved in acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction (NMJ) (Arikawa-Hirasawa et al., 2002). To understand the physiopathological mechanism leading to muscle hyperexcitability in SJS, we have developed a mouse model for this human disease.

For this, we used a line of embryonic stem cells generated by a secretory gene trap approach (Skarnes et al., 1995). In this line, the insertion of the reporter LacZ gene occurred in the 3' end of the perlecan gene at position similar to one SJS truncating mutation, leading to deletion of the C-terminal end of perlecan. Heterozygous mice were normal, whereas the homozygous were lethal in utero. We used this line to study perlecan expression during muscle development by X-Gal staining in vivo. We observed a down regulation of perlecan expression, as it was strongly expressed by myoblasts, whereas it was no more expressed by muscle fibers. Interestingly, a sustained expression at the adult NMJ by other cell type than the muscle fiber was observed.

The embryonic lethality of homozygous mice might result from the fusion between truncated perlecan and  $\beta$ -Gal. We therefore deleted the LacZ reporter gene (flanked by two FRT sequences) by crossing the heterozygous with transgenic mice expressing the FLP recombinase. We obtained homozygous deleted mice that were viable up to 6 months and suffered from chondrodystrophy and locomotor defects, strongly suggesting that they reproduce the SJS phenotype. If EMG analyses failed to reveal myotonia, electrophysiological recordings of synaptic transmission revealed slight modifications including higher frequency of giant miniature end plate potentials. Preliminary morphological data revealed major modifications of NMJ from 6-month-old mutants, suggesting a role of perlecan in NMJ formation and/or maintenance. Works are in progress to further characterize this mouse model and understand the role of perlecan in NMJ.

doi:10.1016/j.jphysparis.2005.12.073

Arikawa-Hirasawa, E., Rossi, S.G., Rotundo, R.L., Yamada, Y., 2002.

Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat. Neurosci.* 5 (2), 119–123.

Nicole, S., Fontaine, B., 2004. Perlecan: Schwartz–Jampel syndrome (SJS, MIM 255800) and dyssegmental dysplasia, Silverman–Handmaker type (DDSH, MIM 224410). In: Epstein, C., Erickson, R., Wynshaw-Boris, A. (Eds.), *Molecular Basis of Inborn Errors of Development*. Oxford University Press, Oxford, pp. 957–965.

Skarnes, W.C., Moss, J.E., Hurtley, S.M., Beddington, R.S., 1995.

Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 92, 6592–6596.

### René Couteaux (1907–1999): The first histologist who introduced the physiological term *synapse* in histology with successful staining of “subneural apparatus” and the first electron microscopist who observed an exocytotic opening of synaptic vesicles at the presynaptic “active zone”

Shigeru Tsuji

Département de Cytologie, Université Pierre et Marie Curie 75005 Paris, France

E-mail address: [ShgrTsuji@aol.com](mailto:ShgrTsuji@aol.com)

During a historical research, we realized that R. Couteaux (1907–1999) was the first histologist who stained

Au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM) squelettique de Vertébrés, deux enzymes d'une remarquable efficacité peuvent hydrolyser l'acétylcholine (ACh) : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). L'hydrolyse de l'ACh dépend non seulement de l'activité enzymatique de l'AChE et de la BChE mais également de leur localisation. Ces deux enzymes semblent posséder des capacités fonctionnelles différentes dont l'importance relative n'a pas encore été établie.

Nous avons choisi une approche génétique pour analyser le rôle des cholinestérases dans la transmission neuromusculaire. Nous disposons de plusieurs lignées de souris qui présentent un déficit dans l'hydrolyse de l'ACh à la jonction neuromusculaire. Certaines de ces souris génétiquement modifiées n'ont plus d'activité enzymatique AChE (souris AChE KO) dans tous les tissus, d'autres ne possèdent que la forme moléculaire soluble de l'AChE (souris AChE Del E5,6), d'autres sont dépourvues de la forme ancrée à la membrane par un glycophospholipide (souris AChE Del E5/neo) ou des formes ancrées à la membrane par PRiMA (souris PRiMA KO) ou totalement de BChE (souris BChE KO). La caractérisation des JNM de ces souris par des approches électrophysiologiques et de microscopie confocale nous a permis d'appréhender les rôles des différentes formes moléculaires des cholinestérases dans la transmission neuromusculaire ainsi que les éventuelles adaptations pré- et postsynaptiques qui conditionnent l'efficacité synaptique.

Malgré l'absence totale ou partielle d'AChE, les souris développent des contractions téaniques dans une gamme de fréquences physiologiques (10 à 100 Hz) mais ne peuvent pas les maintenir constantes à des fréquences supérieures à 30 Hz. Chez ces souris, l'inhibition de la BChE entraîne une accentuation de la dépression de ces réponses, ce qui suggère que la BChE joue un rôle de modulateur dans la transmission synaptique. De plus, les cours temporels des réponses synaptiques enregistrées au niveau des JNM sont augmentés de par l'activation répétitive des récepteurs nicotiques de l'ACh (RnACh) par l'ACh. Enfin, des remodelages pré- et postsynaptiques post-nataux ont été mis en évidence au niveau des JNM. Ces remodelages synaptiques sont probablement dus à l'adaptation des RnACh et des terminaisons nerveuses motrices face à l'absence d'activité enzymatique de l'AChE.

Nous proposons que, chez ces souris génétiquement modifiées, la petite taille des aires de distribution des RnACh ainsi que la discontinuité des amas de ces récepteurs et de celle des terminaisons nerveuses permettent à l'ACh de diffuser facilement et rapidement hors de la fente synaptique.

Mots-clefs : Transmission synaptique, jonction neuromusculaire (JNM), acétylcholinestérase (AChE), butyrylcholinestérase (BChE), remodelage synaptique, récepteurs nicotiques musculaires, électrophysiologie, microscopie confocale.