



Thèse

2004

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Contrôle présynaptique de la libération du glutamate par les fibres
moussues de l'hippocampe de rat : zinc, canaux K[ATP] et neuroprotection

Bancila, Victor

How to cite

BANCILA, Victor. Contrôle présynaptique de la libération du glutamate par les fibres moussues de l'hippocampe de rat : zinc, canaux K[ATP] et neuroprotection. Doctoral Thesis, 2004. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:291

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:291>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:291](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:291)

Université de GENEVE

Faculté de MEDECINE
Section de médecine Fondamentale
Département de Neurosciences
Fondamentales

Thèse préparée sous la direction du Professeur Yves DUNANT
effectué en Cotutelle avec l'Université Paris 6

Contrôle présynaptique de la libération du glutamate par
les fibres moussues de l'hippocampe de rat : zinc, canaux
 K_{ATP} et neuroprotection.

THESE

Présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine
par

Victor BANCILA

originaire de Balti (Moldavie)

Thèse n°10402

Genève 2004

Membres du Jury :	Pr. Dominique MULLER	Rapporteur
	Pr. Didier ORSAL	Rapporteur
	Pr. Michel CUENOD	Examineur
	Dr. Alain BLOC	Examineur
	Pr. Yves DUNANT	Directeur de thèse
	Pr. André CALAS	co-Directeur de thèse

RESUME

Nous avons étudié, chez le rat, les mécanismes de régulation présynaptique de la libération de glutamate (Glu) et leurs répercussions physiologiques et pathologiques.

En utilisant des synaptosomes des fibres moussues de l'hippocampe, nous avons établi la relation liant la variation du potentiel de membrane et la quantité de Glu libéré. La nicotine (1-25 μM) exerce une action inattendue car elle déclenche la libération du Glu apparemment sans affecter le potentiel de membrane des synaptosomes. Le zinc (1-20 μM) inhibe la libération de Glu en s'opposant à la dépolarisation des fibres moussues. De plus, dans un modèle expérimental d'ischémie sur des cultures organotypiques d'hippocampe, nous avons démontré un effet neuroprotecteur du Zn, découlant de son action inhibitrice sur la libération du Glu par les fibres moussues. Cette action inhibitrice résulte de l'activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}), activation que nous avons analysée au niveau moléculaire par des techniques d'expression de canaux recombinants et de mutagenèse dirigée, couplées à l'électrophysiologie. Nous avons ainsi identifié les acides-aminés histidines H326 et H332, présents dans un secteur extracellulaire de la sous-unité SUR1, comme déterminants responsables de l'effet activateur du Zinc extracellulaire sur le canal K_{ATP} .

Presynaptic control of glutamate release from rat hippocampus mossy fibers: zinc, K_{ATP} channels and neuroprotection

ABSTRACT

We have investigated the presynaptic regulations of glutamate (Glu) release and their repercussions on physiological and pathological processes.

Using rat hippocampus mossy fibre synaptosomes, we have determined the relationships between changes in membrane potential and amount of Glu released. Surprisingly, nicotine (1-25 μ M) triggered Glu release without causing significant alteration of membrane potential. Zinc (1-20 μ M) inhibited Glu release by exerting a hyperpolarizing action on the synaptosomes. Furthermore, using hippocampal organotypic cultures submitted to ischemia, we showed a neuroprotective effect of Zn through inhibition of Glu release. This inhibition of transmitter release resulted from an activation of ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}). This action was investigated at the molecular level by using recombinant channels, site-directed mutagenesis and patch-clamp approaches. In this way, we have identified histidine residues H326 and H332, present in an extracellular region of the SUR1 subunit, as the determinants responsible for Zn-induced activation of K_{ATP} channels.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur Michel Cuenod d'avoir trouvé le temps pour faire partie du jury de cette thèse ainsi que le Professeur Didier Orsal, d'avoir accepté en être le rapporteur.

Je remercie le Professeur Dominique Muller pour ses conseils, son soutien, ses critiques objectives et d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

En faisant une thèse en cotutelle entre Paris et Genève j'ai eu la chance d'avoir deux directeurs de thèse, que je souhaite à tous, auxquels je suis très reconnaissant.

Je remercie le Professeur André Calas d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de m'avoir donné la chance qui m'a permis de tracer mon chemin dans la recherche, pour son soutien sans frontières et pour ses qualités humaines.

Au Professeur Yves Dunant de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir dirigé tout au long de ce travail et d'en avoir été un excellent directeur. Je lui souhaite de recevoir au moins la moitié de l'amour, de l'attention, de l'humanisme et de la bonne humeur qu'il en partage avec les autres. Son vrai titre doit être Professeur Exemplaire, voir Extraordinaire. Merci Yves !

Au Professeur Maurice Israel de m'avoir appris la manipulation des fibres moussues, pour ses conseils précieux et ses encouragements.

Merci à Alain Bloc pour ses qualités scientifiques, sa disponibilité, de m'avoir appris l'électrophysiologie, la patience, la relativité du temps, l'amour pour le foot (OM) et bien sur pour son amitié.

A Irina Nikonenko pour sa sagesse, son espoir, ses encouragements et son organisation « horlogique » et son regard objectif dans toutes les circonstances.

A Marie Conrath d'avoir eu la confiance au moment de mes premiers pas dans la recherche, pour sa disponibilité et pour son amitié.

Dominique Monnier et Fred Chanson qui ont contribué à la réalisation de ce travail et pour tous les bons moments passés au laboratoire. Mes amitiés.

A Tatiana Ivanova pour son amitié ses conseils et son soutien.

A Jonathan G. Gore pour les corrections de l'anglais, pour son soutien, pour son humour et bien sur pour sa grande amitié.

A Miguel qui nous a amené le soleil du Portugal, ainsi que sa bonne humeur.

A Geneviève, Rozenn et à Julien pour leur soutien et d'avoir donné des couleurs à ma vie parisienne.

A Stefano, dit monsieur SIGMA, pour ses conseils précieux durant la rédaction mais aussi pour sa disponibilité, pour les longues discussions, sa bonne humeur et son amitié.

A Françoise Loctin, Lorena Parisi et Marlyse Moosmayer pour leur excellent travail et leur savoir faire qui m'a été très précieux.

Un grand merci pour Ago, Anna, Sylvianne, Nicole, Fred, Philippe, Agathe, Jean-Pierre et Domenica sans lesquels le labo serait pas pareil.

Merci à Mircea pour son soutien sa disponibilité sans limite son enthousiasme, sa fraternité « fraternelle ».

A tous mes amis,

A mes parents,

A toi ma chère et tendre épouse qui a eu la patience et la disponibilité.

TABLES ET MATIERES

1. INTRODUCTION	10
1.1. Le glutamate	12
Activation des récepteurs au glutamate	14
Transports de glutamate	17
Mécanisme et régulation de la libération du glutamate	19
1.2. Régulation cholinergique de la libération du glutamate	21
1.3. Le zinc	23
Interactions du zinc avec des canaux ioniques, récepteurs et transporteurs	25
Zinc et K_{ATP}	27
1.4. Les canaux K_{ATP}	28
Généralités	28
Structure	30
K_{ATP} dans le SNC	32
1.5. L'hippocampe	35
Les fibres moussues	39
2. MATERIEL ET METHODES	45
2.1. Animaux	46
2.2. Préparation des synaptosomes des fibres moussues d'hippocampe	46
2.3. Mesure de la libération du glutamate	48
2.4. Dosage des protéines	49
2.5. Microscopie Electronique	49
2.6. Marquage à l'or colloïdal en microscopie électronique	50
2.7. Mesure du potentiel de membrane	51
2.8. Culture cellulaire	53
2.9. Transfection de canaux K_{ATP} recombinants	54
2.10. Mutagenèse dirigée	55
2.11. Enregistrements électrophysiologiques	56
2.12. Culture organotypique d'hippocampe	57
2.13. Epreuve d'hypoglycémie-anoxie	58
2.14. Coloration au iodure de propidium (Propidium Iodide ou PI)	58

2.15. Marquage du zinc	59
Coloration Timm	59
Coloration TSQ	61
3. RESULTATS et DISCUSSIONS	62
3.1. Les synaptosomes des fibres moussues d'hippocampe, morphologie et fonctionnement	63
Microscopie électronique	63
Le potentiel de membrane	66
La libération de glutamate par le KCl	68
Corrélation entre la dépolarisation et la quantité de glutamate libéré	68
La 4-aminopyridine (4-AP)	72
Discussion : Les fibres moussues comme outil expérimental	72
3.2. Régulation de la libération de Glu par des récepteurs nicotiniques pré-synaptiques	76
Effet de la nicotine sur la libération de glutamate	76
Effet de la nicotine sur le PM des fibres moussues	76
Sous-types de récepteurs nicotiniques	80
Identification morphologique des récepteurs sur les fibres moussues	80
Discussion : La nicotine et la libération du glutamate	82
3.3. Régulation de la libération de glutamate par le zinc et les canaux K_{ATP}	85
Potentiel de membrane	85
Libération du glutamate	87
Discussion : zinc et transmission FM-CA3	89
3.4. Effet du zinc sur les canaux K_{ATP}. Analyse moléculaire	93
Sous-unités du canal K_{ATP} impliquées dans l'effet du zinc	93
Identification du site de liaison par mutagenèse dirigée	100
Discussion : action moléculaire du zinc sur les canaux K_{ATP}	106
3.5. Le zinc une substance neuroprotectrice endogène	113
Effet aigu (zinc présent pendant l'ischémie)	113
Effet chronique : zinc ajouté au milieu de culture	116
Discussion : Zinc et neuroprotection	119
4. CONCLUSION et PERSPECTIVES	125
5. PUBLICATIONS	128
6. LISTE DES REFERENCES	130

LISTE DES ABREVIATIONS

4-AP	4-amynopiridine
A	alanine
ABC	ATP-Binding Cassette
ACh	acétylcholine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AMPA	acide α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
Asp	aspartate
BHE	barrière hématoencéphalique
BSA	albumine sérique bovine
Ca	calcium
CA	corne d'Ammon
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DTM	domaine transmembranaire
EAAT	Excitatory Amino Acid Transporter
ED ₅₀	dose correspondant à 50% de l'effet maximum
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
E-GFP	Enhanced-Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylene Glycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'- Tetra Acetic acid
FM	fibres moussues
GABA	acide γ -amino-butérique
GD	gyrus denté
Gln	glutamine
Glu	glutamate
H	histidine
HEK	human embryonic kidney
IC ₅₀	concentration correspondant à 50% de l'inhibition maximum

IgG	immunoglobuline de type G
INS-1E	ligné de cellules β -pancréatiques clonale
K	potassium
K _{ATP}	canal potassique ATP dépendant
KCOs	K ⁺ channel openers
Kir	K ⁺ inward rectifiers
KO	knock-out
LTP	potentiation à long terme
Mg	magnésium
MT	métallothionéines
Na	sodium
nAChR	récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique
NBD	nucleotid binding domain
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NR	sous-unité de récepteur NMDA
PAF	paraformaldéhyde
PB	tampon phosphate de sodium
PBS	tampon phosphate salin
PI	l'iodure de propidium
PM	potentiel de membrane
RINm5F	cellules d'insulinone de rat
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SFM	synaptosomes des fibres moussues
SNC	système nerveux central
STM	segment transmembranaire
SUR	sulfonylurea receptor
TSQ	N-[6-methoxy-8-quinolyl]-p-toluenesulfonamide
Zn	zinc
ZnT	transporteur de zinc

1. INTRODUCTION

Avant propos

Notre laboratoire s'intéresse aux mécanismes de libération des neurotransmetteurs de type rapide, comme l'acétylcholine (ACh) et le glutamate. Pour étudier la libération de l'ACh, l'organe électrique de la torpille s'est révélé une préparation de choix, permettant mieux que toute autre d'établir des corrélations entre différentes disciplines (électrophysiologie, morphologie, biochimie et biologie). C'est en effet à partir d'organes électriques qu'ont été isolés, ou clonés pour la première fois les récepteurs nicotiques, la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, le médiatophore, le transporteur VAcHT, la VAMP-synaptobrevine et bien d'autres protéines. Pour la transmission glutamatergique, les terminaisons géantes des fibres moussues dans la région CA3 de l'hippocampe pourraient représenter un modèle équivalent, offrant une préparation unique pour investiguer les mécanismes cellulaires et moléculaires, ainsi que les régulations de la transmission dans le système nerveux central. L'objectif de cette thèse est donc d'analyser et de caractériser la libération du glutamate par les fibres moussues, en portant une attention particulière aux régulations passant par les récepteurs nicotiques présynaptiques, ainsi qu'au rôle des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}).

1.1. Le glutamate

Le glutamate est un acide aminé, synthétisé par l'organisme et présent en grande quantité dans le système nerveux central (SNC). Historiquement, c'est Hayashi qui en 1954 (cité par (Krnjevic 1970)) décrit l'effet excitateur du glutamate en appliquant l'acide aminé sur la surface du cortex cérébral. Quelques années plus tard, les travaux de Curtis (Curtis and Watkins 1960) ont montré que certains neurones de la moelle épinière sont stimulés par l'application de glutamate ou d'aspartate. Malgré des réticences initiales, ces observations furent confirmées par de nombreuses études ultérieures, conduisant au concept selon lequel le glutamate aurait, en plus de ses multiples rôles dans le métabolisme cellulaire, une fonction de neurotransmetteur.

Le glutamate répond effectivement aux critères exigés pour être considéré comme un neurotransmetteur : a) il est présent dans les terminaisons des cellules présynaptiques ; b) il est libéré de manière dépendante du calcium suite à la stimulation des afférences ; c) il agit sur des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules postsynaptiques. D'autres critères renforcent l'idée que le glutamate est un neurotransmetteur, comme par exemple sa recapture par les neurones et les cellules gliales après la libération (Fig.1.1.1.). Aujourd'hui, on sait que le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du SNC chez les vertébrés (Fonnum 1984). Toutefois, il est intéressant de noter que chez la plupart des espèces d'invertébrés, le glutamate est le neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire (système nerveux périphérique) (Usherwood et al. 1968). Dans les conditions normales le glutamate ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (BHE). Il est, en fait, synthétisé au niveau des terminaisons présynaptiques des neurones par la glutamate-deshydrogénase, à partir de l'acide α -cétoglutarique. Toutefois, le glutamate peut aussi être produit par transamination à partir de l'acétyl-aspartyl-glutamate, de l'acide aspartique, ainsi que par déamination de la glutamine élaborée par les cellules gliales.

L'arrivée d'un potentiel d'action dans les terminaisons synaptiques glutamatergiques induit une entrée de calcium via les canaux calciques sensibles au voltage. L'augmentation brève de calcium intracellulaire qui s'ensuit déclenche à son tour la brusque libération de glutamate dans l'espace synaptique.

Récepteurs Ionotropes	Sous-unités	Perméabilité	Agonistes	Antagonistes et bloqueurs du canal	Modulateurs
AMPA	GluR1-4 <i>appelé aussi</i> GluR A-D	Na ⁺ , K ⁺ , (Ca ²⁺) ^a	Quisqualate, AMPA, domoate, fluorowillardiine, ATPA, LY262466, (kainate)	CNQX, NBQX, DNQX, JST, barbiturates (e.g. GYKI 52466, GYKI53655), GDEE, LY326325, LY215490, SYM 2206, YM90K	Aniracetam, cyclothiazide, IDRA 21, CX516, 1-BCP
Kaïnate	GluR5-7, KA1&2	Na ⁺ , K ⁺ , (Ca ²⁺) ^b	Kaïnate, domoate, ATPA, iodowillardiine, acide acromélique, (AMPA)	CNQX, NBQX, DNQX, GAMS, AMOA, NS-102	Lectines, e.g. concanavalin A (ConA)
NMDA	NR1, NR2A-D, NR3A-B	Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	NMDA, iboténate, quinolinate, AMAA	AP5, AP7, MK-801, PCP/TCP, dextrométhorphan, kétamine, mémantine, ifenprodil (NR2B), CGP37849, CGP39551, CGS19755, LY233536	Positifs: glycine, D-sérine, DCS, polyamines (e.g. spermine); négatifs: Zn ²⁺ , H ⁺ , Mg ²⁺ , 7Cl Kyn, HA-966, arcaïne
'Orphelin'	Delta 1&2	?			
Récepteurs Métabotropes	Sous-unités	Couplé	Agonistes	Antagonistes	
Groupe I	1(a-d), 5(a et b)	PLC↑→OIP3_DAG→P KC↑→Ca _i ²⁺	Quisqualate, ACPD, DHPG, CHPG, 3-HPG, tADA	MCPG, 4-CPG, MPEP, LY367385, CPCCOEt, AIDA, AP3	
Groupe II	2,3	AC↓→cAMP↓	ACPD, DCG-IV, L-CCG-1, 4-CPG, APDC, LY354740	MCPG, MTPG, LY341495	
Groupe III	4 (a et b), 6, 7(a et b), 8	AC↓→cAMP↓	AP4	(MCPG), MPPG, MAP4, MSOP	
Autres	?	PLD↑, tyrosine kinase↑	DHPG		

ACPD, 1S,3R-1-aminocyclopentane dicarboxylate; AIDA (=UPF 523), acide (RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxylique; AMAA, acide 2-amino-2-(3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolyl)acétique; AMOA, acide 2-amino-3-(3-(carboxyméthoxy)-5-méthylisoxazol-4-yl)propionique; AMPA, acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolépropionique; AP3, acide DL-2-amino-3-phosphonopropionique; AP4, acide L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyrique; AP5, acide D-2-amino-5-phosphonovalérique; AP7, acide 2-amino-7-phosphonoheptanoïque; APDC, acide (2R,4R)-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylique; ATPA, acide DL-amino-3-hydroxy-5-tertbutyl-4-isoxazolepropionique; 1-BCP, 1-(1,3-benzodioxol-5-ylcarbonyl) pipéridine; L-CCG-1, (2S,1'S,2'S)-2-(carboxycyclopropyl)glycine; CGS 19755, acide *cis*-4-phosphonométhyl-2-pipéradine carboxylique; CHPG, (R,S)-2-chloro-5-hydroxyphényl]glycine; 7Cl Kyn, acide 7-chlorokynurénique; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; 4-CPG, (RS)-a-éthyl-4-carboxyphényl]glycine; CPP, acide *cis* (±)-3-(2-carboxypiperazine-4-yl)propyl-1-phosphonic; CPCCOEt, 7-(hydroxyimino)cyclopropa[b]chromen-1a-carboxylate éthyle ester; cyclothiazide, 6-chloro-3,4-dihydro-3-(2-norbornen-5-yl)-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulphonamide-1,1-dioxide; CX516, 1-(quinoxalin-6-ylcarbonyl)-pipéridine; DCG-IV, (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxycyclopropyl)glycine; DCS, D-cycloserine DHPG, (S)-3,5-dihydroxyphényl]glycine; DNQX, 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione; domoate, acide [2S-[2a,3b,4b(1Z,3E,5R)]]-2-carboxy-4-(5-carboxy-1-méthyl-1,3-hexadienyl)-3-pyrrolidineacétique; GAMS, g-D-glutamylaminométhyl sulfonique acide; GDEE, L-glutamic acid-diéthylester; GYKI 52466, 1-(4-aminophényl)4-méthyl-7,8-méthylenedioxy-5H-2,3-benzodiazépine; GYKI53655 (=LY300168; LY303070, isomère active de GYKI53655), 1-(4-aminophényl)-4-méthyl-7,8-méthylenedioxy-5H-(3N-méthylcarbamate)-2,3-benzodiazépine; HA966 (±)-3-amino-1-hydroxypyrrrolit-2-one; 3-HPG, (RS)-3-hydroxyphényl]glycine; IDRA 21, 7-chloro-3-méthyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine S,S-dioxide; JST, toxine de l'arregne Joro; LY215490, acide (3SR,4aRS,6RS,8aRS)-6-[2-(1H-tétrazol-5-yl)éthyl]décahydroisquinoline-3-carboxylique; LY262466, acide DL-2-amino-3-(4-hydroxy-1,2,5-thiadiazol-3-yl)-propanoïque; LY326325, acide (3S,4aR,6-R,8aR)-6-[2-(1(2)H-tétrazole-5-yl)éthyl]décahydroisquinoline-3-carboxylique; LY354740, acide (2)-aminobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylique; LY367385, acide (S)-(+)-a-amino-4-carboxy-2-méthylbenzèneacétique; MAP4, acide (S)-2-amino-2-phosphonobutanoïque; MCPG, (+)-alpha-méthyl-4-carboxyphényl]glycine; mémantine, 1-amino-3,5-diméthyladamantane; MPEP, 6-méthyl-2-(phényléthynyl)-pyridine; MPPG, (RS)-a-méthyl-4-phosphonophényl]glycine; MSOP, (RS)-a-méthylserine-O-phosphate; MTPG, (RS)-a-méthyl-4-tétrazolylphényl]glycine; MK-801, (+)-5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzof[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate; NBQX, 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(F)quinoxaline; NMDA, N-méthyl-D-aspartate; NPC 12626, acide 2-amino-4,5-(1,2-cyclohexyl)-7-phosphonoheptanoïque; NS-102, 5-nitro-6,7,8,9-tetrahydrobenzo[g]indole-2,3-dione-3-oxime; PCP, phéncyclidine; SYM 2206, (9)-4-(4-aminophényl)-1,2-dihydro-1-méthyl-2-propylcarbamoyle-6,7-méthylenedioxyphthalazine; tADA, acide trans-azétidine-2,4-dicarboxylique; TCP, 1-(2-thienyl)-cyclohexyl pipéridine, YM90K, 6-(1H-imidazol-1-yl)-7-nitro-2,3(1H,4H)-quinoxalinedione. Autres abréviations : PLC, (phospholipase C); PLD, (phospholipase D); cAMP (aminotrisphosphate cyclique).

^a Ca²⁺ perméabilité pour les récepteurs AMPA contenant pas la sous-unité GluR2. ^b Ca²⁺ perméabilité pour les récepteurs kainate formés de la sous-unité GluR6.

Tableau 1.1.1

Activation des récepteurs au glutamate

Le glutamate libéré par les terminaisons nerveuses agit sur deux types de récepteurs : les *récepteurs ionotropes*, qui comportent un canal ionique intrinsèque activé par le ligand et ont une cinétique d'activation très rapide, et les *récepteurs métabotropes*, couplés à différents messagers intracellulaires via l'activation des protéines G. La cinétique d'action des métabotropes est beaucoup plus lente que celle des ionotropes (voir Tableau 1.1.1.).

Récepteurs ionotropes

Les récepteurs ionotropes au glutamate forment une famille de canaux cationiques qui sont perméables principalement aux ions sodium (Na^+) et potassium (K^+). Comme nous le verrons plus bas, certains d'entre eux sont aussi perméables aux ions calcium (Ca^{2+}). Lorsque la cellule est à son potentiel de repos, le gradient électrochimique va entraîner les ions Na^+ (et Ca^{2+}) vers l'intérieur de la cellule, alors que les ions K^+ vont, eux, sortir de la cellule. L'entrée de Na^+ et la sortie concomitante de K^+ dépolarisent la cellule jusqu'à un potentiel proche de 0 mV.

Les récepteurs ionotropes au glutamate sont subdivisés sur la base de leur affinité pour différents agents pharmacologiques (agonistes et antagonistes), en deux groupes principaux : *les récepteurs NMDA* (activables sélectivement par le N-méthyl-D-aspartate) et les récepteurs de type non-NMDA (insensibles au N-méthyl-D-aspartate). Les récepteurs non-NMDA sont subdivisés en deux sous-groupes, *les récepteurs AMPA* (activés sélectivement par l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique) et *les récepteurs Kaïnate* (qui présentent une plus grande affinité pour l'acide kaïnique).

Récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont les récepteurs glutamatergiques les mieux étudiés. Ce sont des récepteurs-canaux activés par un ligand, c'est à dire que le récepteur comporte non seulement le site de liaison pour l'agoniste mais aussi le canal ionique. Les récepteurs NMDA fonctionnels sont des hétéromères, composés de l'assemblage de plusieurs sous-unités : NR_1 , $\text{NR}_{2\text{A-D}}$ et $\text{NR}_{3\text{A-B}}$. Ces sous-unités forment une structure pentamérique, où la sous-unité NR_1 se combine à $\text{NR}_{2\text{A-D}}$ ou à $\text{NR}_{3\text{A-B}}$. Watkins et ses collaborateurs ont été parmi les premiers à décrire le fonctionnement du récepteur NMDA (Curtis et al. 1959). L'agoniste ouvre un canal cationique avec une cinétique relativement lente et une conductance élevée (40-50 pS). Le

canal est perméable aux ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} et possède une structure complexe qui lui confère des propriétés singulières. En effet, le récepteur NMDA contient un site de liaison pour le Mg^{2+} dans le canal ionique. L'action du Mg^{2+} dépend du potentiel de membrane (PM) de la cellule : à un PM proche du potentiel de repos, le Mg^{2+} extracellulaire à sa concentration physiologique (1-2 mM) bloque le canal (par un effet d'« open channel blocker ») et empêche le passage des cations (K^+ , Na^+ et Ca^{2+}) auxquels il serait normalement perméable. Pour que l'activation du récepteur NMDA donne lieu à un courant trans-membranaire il faut donc, en plus de la liaison d'un ligand agoniste, soit une diminution quasi totale de la concentration de Mg^{2+} extracellulaire (rare/impossible dans les conditions physiologiques), soit que la cellule soit suffisamment dépolarisée (potentiel de membrane ≥ 0 mV). En outre, ces récepteurs possèdent un site de liaison pour les co-agonistes glycine et sérine, un site de modulation par les polyamines ainsi qu'un site de liaison pour le zinc (voir pour revue (Cull-Candy et al. 2001)). Finalement, soulignons le rôle primordial que les récepteurs NMDA jouent dans les phénomènes physiologiques de plasticité synaptique et les conditions pathologiques liées à l'excitotoxicité.

Le récepteur AMPA

Le récepteur AMPA constitue un canal perméable principalement aux ions Na^+ et K^+ qui véhiculent les courants glutamatergiques excitateurs rapides (Ascher and Nowak 1988). Le récepteur AMPA est un pentamère formé de sous-unités différentes. A ce jour, quatre sous-unités distinctes ont été clonées, appelées GluR₁₋₄ (Dingledine et al. 1999; Hollmann and Heinemann 1994; Keinänen et al. 1990). Les propriétés du canal changent en fonction des sous-unités qui le composent. En effet, alors que la plupart des récepteurs du SNC contiennent la sous-unité GluR₂ il existe des récepteurs résultant de l'assemblage des sous-unités GluR₁, GluR₃ et GluR₄ entre elles, ce qui confère aux récepteurs AMPA une perméabilité aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} et une action rectificatrice. La présence de la sous-unité GluR₂ rend au contraire le canal imperméable au Ca^{2+} (Burnashev et al. 1995). Notons encore que la cinétique d'ouverture de ces récepteurs est très rapide et que la réponse induite se désensibilise rapidement (Tang et al. 1989; Trussell and Fischbach 1989). La densité des récepteurs AMPA à une synapse définit sa force synaptique (synaptic strength) ; ce récepteur est donc aussi impliqué dans la plasticité synaptique.

Le récepteur kaïnate

Le récepteur kaïnate aussi est associé à un canal. Il résulte de l'assemblage de cinq sous-unités, nommées GluR₅₋₇, KA₁₋₂ (Bettler et al. 1990). Les récepteurs kaïnate peuvent former des complexes homomériques fonctionnels à partir des sous-unités GluR₅ et GluR₆ (Egebjerg et al. 1991; Sommer et al. 1992). Ils sont principalement perméables aux ions Na⁺ et K⁺. Néanmoins les récepteurs homomériques composés de GluR₆ sont aussi perméables au Ca²⁺ (Dingledine et al. 1999). Les récepteurs kaïnate sont localisés aussi bien au niveau postsynaptique (Castillo et al. 1997), que présynaptique (Represa et al. 1987; Schmitz et al. 2001). L'activation des récepteurs présynaptiques inhibe la libération des neurotransmetteurs tels que le glutamate (Chittajallu et al. 1996; Kamiya and Ozawa 1998) ou le GABA (Clarke et al. 1997; Rodriguez-Moreno et al. 1997). Récemment, le groupe de Lerma a proposé que l'activation de récepteurs kaïnate présynaptiques inhiberait la libération de neurotransmetteur via une protéine G, ce qui ferait de ce type de récepteur un récepteur métabotrope (Rozas et al. 2003).

Récepteurs métabotropes

Les récepteurs métabotropes au glutamate, nommés mGluR, sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés à des protéines G. A ce jour, huit d'entre eux ont été clonés (mGluR₁₋₈). Sur la base de similarités de séquence, de leur profil pharmacologique et de leur mode de signalisation intracellulaire, ils ont été classés en trois groupes (I, II et III). Le groupe I comprend les récepteurs mGluR₁ et mGluR₅; le groupe II, les mGluR₂ et mGluR₃; et le groupe III, les mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇ et mGluR₈. Les récepteurs du groupe I sont positivement couplés à la phospholipase C et ainsi à la production de diacylglycérol et d'inositol trisphosphate; les groupes II et III sont négativement couplés à l'adénylyl-cyclase et leur stimulation conduit donc à une diminution des taux intracellulaire d'AMPc (Baskys 1992; Fagni et al. 2000; Nicoletti et al. 1996).

Il est intéressant de noter que les mGluR sont localisés au niveau pérисynaptique sur les neurones, mais également à la surface des cellules gliales (Blumcke et al. 1996; Masu et al. 1991). Bien que leur rôle reste encore en partie mal défini, les mGluR sont connus pour moduler l'excitabilité neuronale. En effet, leur activation inhibe la transmission synaptique excitatrice et/ou inhibitrice, en bloquant les canaux calciques présynaptiques responsables de la libération de neurotransmetteur (voir pour revue (Nakanishi 1994)). Au niveau

postsynaptique, l'activation des mGluRs régule un certain nombre de canaux cationiques (p.ex. fermeture de canaux potassiques ou ouverture de canaux cationiques non-spécifiques) et ont donc un effet excitateur (Charpak et al. 1990; Raggenbass et al. 1997).

Transports de glutamate

Le glutamate n'a pas de système de dégradation enzymatique dans la fente synaptique. Suite à sa libération, il est activement recapté par les neurones et les cellules gliales. La capture est assurée par un transporteur à haute affinité qui utilise, comme source d'énergie, les gradients de Na^+ et de K^+ . Des protons ou des ions OH^- seraient également co-transportés, et une conductance anionique (chlore), non couplée thermodynamiquement au transport de glutamate a aussi été identifiée. Cependant, la stœchiométrie exacte du transport de glutamate est encore sujette à discussion.

Le glutamate capturé par les cellules gliales est métabolisé en glutamine sous l'action de la glutamine-synthétase, une enzyme présente exclusivement dans les cellules gliales. Ensuite la glutamine est livrée aux neurones où elle est utilisée comme précurseur pour la synthèse de glutamate. La figure 1.1.1. représente schématiquement le cycle du glutamate dans les neurones et la glie. Le système de recapture a pour rôle de maintenir basse la concentration de glutamate dans l'espace synaptique et pérисynaptique, condition nécessaire à une transmission synaptique efficace, et de protéger les cellules d'un excès de glutamate extracellulaire. En effet, une concentration trop importante de l'acide aminé excitateur peut suractiver les récepteurs glutamatergiques et provoquer ainsi la mort cellulaire. Ce phénomène est appelé excito-toxicité.

De façon plus générale, les échanges de glutamate entre les neurones et les astrocytes au travers du cycle des acides tricarboxyliques seraient également impliqués dans le support métabo-énergétique (lactate) que les astrocytes apportent aux neurones (Pellerin and Magistretti 1994).

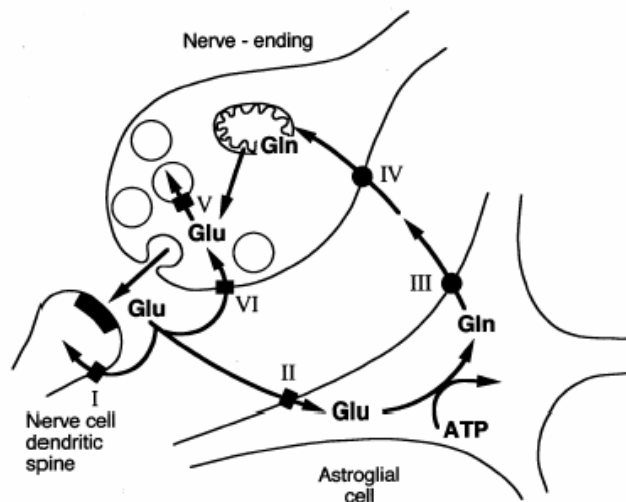


Figure 1.1.1. Cycle du glutamate dans les régions synaptiques du SNC. Glu : glutamate ; Gln : glutamine ; I-VI : les différents transporteurs de glutamate. D'après (Danbolt 2001).

Comme pour les autres neurotransmetteurs, on distingue deux familles de molécules transportant le glutamate : *les transporteurs vésiculaires* (V dans la Fig. 1.1.1.), qui concentrent l'acide aminé dans les vésicules synaptiques et *les transporteurs de la membrane plasmique* qui, eux, procèdent à la recapture à haute affinité décrite plus haut. Ces derniers appartiennent à une même famille, (voir pour revue (Danbolt 2001), comprenant plusieurs types dont cinq ont été clonés à ce jour (se référer à (Saier, Jr. 1999; Slotboom et al. 1999)). La nomenclature actuelle utilise le terme de EAAT pour « Excitatory Amino Acid Transporter ». On distingue ainsi :

- EAAT1 (ou GLAST) (Storck et al. 1992; Tanaka 1993)
- EAAT2 (ou GLT-1) (Pines et al. 1992)
- EAAT3 (ou EAAC₁) (Kanai and Hediger 1992)
- EAAT4 (Fairman et al. 1995)
- EAAT5 (Arriza et al. 1997)

Ces cinq protéines catalysent le transport de L-glutamate (mais aussi de L- et D-aspartate) couplé au Na⁺ et K⁺. Le tableau ci-dessous représente leur localisation dans le SNC et les organes périphériques.

	<i>Localisation dans le CNS</i>	<i>Localisation dans les organes périphériques</i>
EAAT1	Astroglie (cervelet, oreille interne, rétine et organes périventriculaires)	Coeur, Os, Glande mammaire et Placenta
EAAT2	Astroglie (cerveau, moelle épinière, hippocampe, cervelet, néocortex, striatum et thalamus), Microglie et Terminaisons nerveuses des neurones (rétine)	Reins, Foie, Placenta et Pancréas
EAAT3	Neurones : Hippocampe, Caudé-putamen, cervelet et ganglions de la base, Cellules de Purkinje, Astrocytes (cortex) et Oligodendrocytes (matière blanche)	Reins, Intestin, Coeur, Foie, Placenta, Muscles et Poumons
EAAT4	Cellules de Purkinje (couche moléculaire du cervelet), Astrocytes et quelques neurones corticaux	
EAAT5	Rétine	

Mécanisme et régulation de la libération du glutamate

La libération synaptique de glutamate est un processus ultrarapide qui s'effectue en moins d'une ms après l'arrivée du potentiel d'action à la terminaison. On parle de libération quantique, car elle se fait par « paquets » multimoléculaires libérés de façon synchrone. L'hypothèse vésiculaire, adoptée sur la base des observations faites sur la libération d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire (Katz 1969), implique que la libération d'un quantum de neurotransmetteur correspond au contenu d'une vésicule synaptique délivré dans la fente synaptique par un mécanisme de fusion et d'exocytose. Bien que de nombreuses observations s'inscrivent en faux avec ce point de vue, l'hypothèse vésiculaire reste très populaire car elle donne une image simple d'un mécanisme difficile à étudier directement en raison de la petite taille des synapses et de la rapidité des phénomènes en jeu. Des modifications de l'hypothèse vésiculaire, ou des hypothèses franchement différentes sont invoquées actuellement pour rendre compte de la formation des quanta (elles seront reprises dans le chapitre *Conclusions et perspectives*).

D'autres éléments que les terminaisons nerveuses glutamatergiques sont capables de libérer le glutamate d'une manière calcium-dépendante (Bezzi et al. 2004). Les astrocytes en sont un exemple qui fait le sujet de nombreux travaux. Les mécanismes de la libération, dans ce cas, sont encore peu clairs. En outre, les transporteurs membranaires du glutamate peuvent fonctionner à l'envers lorsque les conditions ioniques et de potentiel le permettent ; la libération, alors, ne dépendrait pas de la présence de calcium dans le milieu extracellulaire.

Par ailleurs, le glutamate peut être co-libéré avec un autre transmetteur (Israel et al. 1993; Taupin et al. 1994a). Il l'est avec l'acétylcholine dans l'organe électrique de la torpille, les jonctions neuromusculaires et dans certaines régions du SNC. On a même décrit une co-libération de glutamate avec l'insuline dans les cellules β du pancréas et avec d'autres substances par d'autres cellules sécrétrices (Hinoi et al. 2004). Enfin nous verrons dans ce travail que le zinc est aussi libéré par des terminaisons glutamatergiques, telles les fibres moussues de l'hippocampe.

La libération synaptique de glutamate est à son tour modulée par divers neurotransmetteurs agissant sur des récepteurs présynaptiques : ACh, dopamine, GABA et glutamate lui-même (autorécepteurs présynaptiques que nous avons vus plus haut) (Vizi and Kiss 1998). J'ai particulièrement étudié dans ce travail l'influence des récepteurs nicotiniques à l'ACh sur les terminaisons glutamatergiques. Des résultats préliminaires ont fait l'objet d'une publication (Bancila, V., et al., sous-presse).

1.2. Régulation cholinergique de la libération du glutamate

L'ACh est un neurotransmetteur du SNC et du SN périphérique qui comme le glutamate agit sur des récepteurs métabotropes (*récepteurs muscariniques*) et des récepteurs ionotropes (*récepteurs nicotiniques*). Ces derniers sont des récepteurs-canaux de constitution pentamérique appartenant à la même superfamille que les récepteurs AMPA ou NMDA au glutamate. Les mieux connus sont situés à la membrane postsynaptique de la jonction neuromusculaire. La nicotine est un agoniste de ces récepteurs « musculaires », mais ses actions pharmacologiques principales s'exercent avec une plus grande affinité sur des récepteurs nicotiniques de type « neuronal » présents dans les ganglions du système nerveux autonome, et avec une affinité encore supérieure, sur les récepteurs nicotiniques du SNC. Là, l'ACh serait principalement un modulateur de la transmission ; agissant surtout au niveau présynaptique, et modifiant la libération de différents neurotransmetteurs comme la dopamine, le GABA et l'ACh elle-même (Wonnacott et al. 2000; Wonnacott 1997).

Les substances agissant sur les récepteurs à l'ACh du SNC influencent plusieurs phénomènes de plasticité synaptique (Huerta and Lisman 1993; Hasselmo et al. 1995) ; elles interfèrent en particulier avec la mémoire. L'atropine, un bloqueur des récepteurs muscariniques, exerce une action amnésiante bien connue. La nicotine stimule au contraire les processus de mémorisation (Deutsch and Rocklin 1967; Safer and Allen 1971).

Des récepteurs à l'ACh ont été identifiés dans l'hippocampe (Yamamura et al. 1985), formation qui reçoit des projections cholinergiques, via la fimbria-fornix, à partir de neurones situés dans le noyau septal médian et les complexes de la bande de Broca (Houser et al. 1983). En plus de cette innervation, des neurones cholinergiques intrinsèques ont été décrits dans l'hippocampe (Frotscher et al. 1986; Frotscher et al. 2000).

L'administration de nicotine dans la région CA3 de l'hippocampe augmente la fréquence des potentiels postsynaptiques enregistrés dans les cellules pyramidales. Cela fait penser que la nicotine stimule la libération de glutamate en activant des récepteurs présynaptiques à l'ACh (Gray et al. 1996). Il s'agit cependant d'observations indirectes qui pourraient s'expliquer par une action de la nicotine sur des neurones ou interneurones situés en amont des synapses en question (fibres myélinisées/cellules pyramidales du CA3). Il nous a donc paru important de démontrer par une méthode directe l'action de la nicotine sur la libération du glutamate en utilisant des terminaisons glutamatergiques isolées.

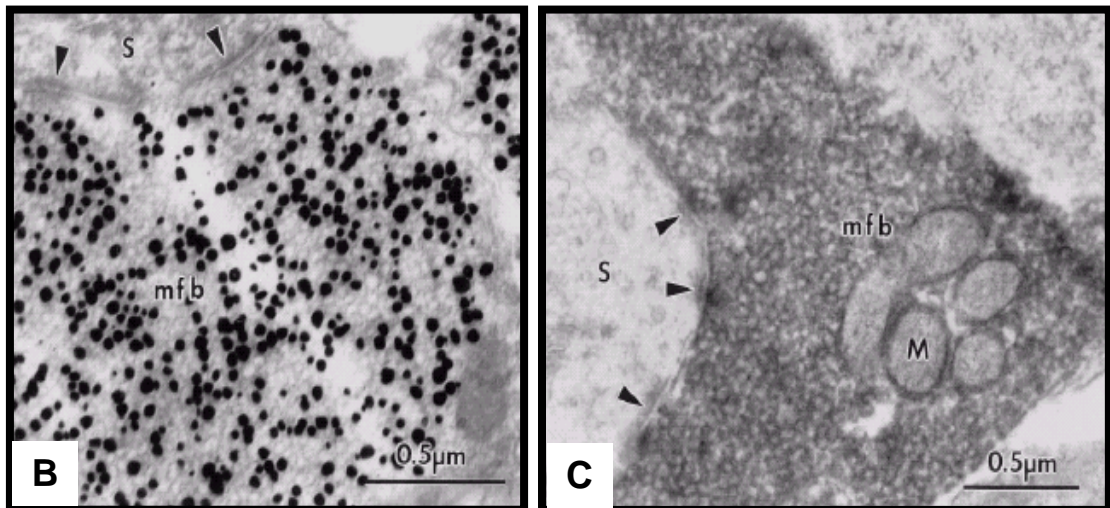
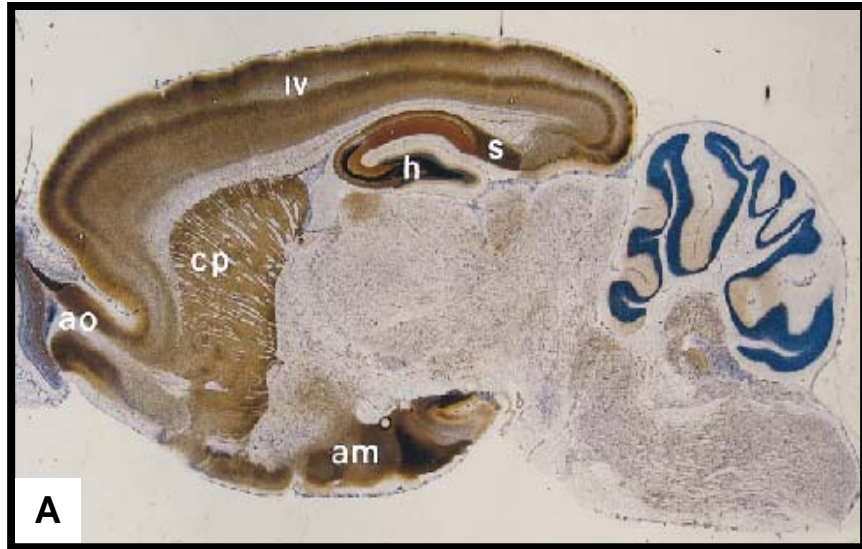


Figure 1.3.1. Localisation du zinc dans le SNC. **A.** Marquage du zinc par la méthode de Timm-Danscher. Coupe sagittale du cerveau de rat. En bleu, coloration de Nissl, Frederickson et al., (2000). **B.** Marquage du zinc en ME des fibres moussues d'hippocampe de rat, par la méthode de Timm-Danscher. Les points noirs correspondent aux vésicules contenant le zinc. **C.** Marquage du zinc en ME des fibres moussues d'hippocampe d'une souris Mocha. Les souris Mocha ne possèdent pas le transporteur vésiculaire ZnT3. Le marquage est négatif. **B.** et **C.** selon Wenzel et al, (1997).

1.3. Le zinc

Le zinc est un élément indispensable à la survie des êtres vivants (Outten and O'Halloran 2001). Dans les microorganismes, les plantes et les animaux, le zinc est impliqué dans la fonction de plus de 300 métallo-enzymes, où il remplit trois rôles principaux : catalytique, co-catalytique et structural (Vallee and Falchuk 1993; Vallee and Auld 1992) cité par (Takeda 2000). Ces métallo-enzymes sont impliquées dans une grande variété de fonctions, comme la régulation de l'expression des gènes, l'adressage des protéines ou la réponse métal-spécifique au stress (O'Halloran 1993). En tant qu'élément catalytique ou co-catalytique, le zinc est indispensable au fonctionnement d'enzymes telles que les carboxypeptidases pancréatiques, la phosphatase alcaline, diverses déshydrogénases ou encore la superoxyde-dismutase.

Chez les mammifères, le zinc est absorbé au niveau de la bordure en brosse de la muqueuse intestinale. Il est ensuite transporté par le sang vers les tissus où il est utilisé. Une alimentation appauvrie en zinc cause des perturbations chez l'animal et chez l'homme, et peut affecter le développement du SNC (O'Dell 1993; Sandstead 1994; Prasad 1995). Certaines affections pourraient également résulter d'une carence en zinc : acrodermatite entéropathique (ou syndrome de Danbolt et Closs), troubles de la cicatrisation, de la spermatogenèse ou du comportement alimentaire (diminution de l'appétit, altération du goût), dermites séborrhéiques, eczéma, psoriasis, alopecie, certains problèmes immunologiques, des surinfections mycosiques et bactériennes, des inflammations de la commissure des lèvres, etc. Par ailleurs, des troubles comportementaux comme la léthargie et la dépression pourrait aussi être liées à des déficiences en zinc (Harrison and Gibbons 1994). En outre, des apports excessifs de zinc (ouvriers travaillant en zinguerie) ou certaines maladies héréditaires (l'hyperzincémie familiale ou la maladie de Pick) conduisent aussi à des désordres du système nerveux central et à des anémies.

La quantité du zinc dans l'organisme varie entre 2-3 g et sa concentration dans le sérum et dans le liquide extracellulaire est estimé à 0.15 μM (Takeda 2000). À l'exception des îlots de Langerhans du pancréas, le SNC est l'organe le plus riche en zinc. La quantité du zinc dans le SNC est de 10 μg par gramme de tissu (Frederickson 1989). La teneur moyenne en zinc total des neurones est estimée à environ 150 $\mu\text{mol/L}$ (Wallwork 1987; Frederickson 1989; Harrison and Gibbons 1994; Takeda 2000); la plus grande partie du zinc dans le

cytosol n'est pas libre, mais liée à des métallothionéines et à d'autres protéines (Frederickson 1989). En utilisant des sondes fluorescentes, la quantité du zinc libre a été estimée à 1 nM (Canzoniero et al. 1997; Thompson et al. 2002).

La distribution du zinc dans le SNC n'est pas uniforme (Fig. 1.3.1) : dans la substance grise, il est plus concentré que dans la substance blanche et certaines régions du SNC, comme l'hippocampe, en sont particulièrement riches. Entre 5 et 15 % de la quantité du zinc total se trouve dans des neurones glutamatergiques (Haug 1967; Perez-Clausell and Danscher 1985; Frederickson 1989) où il se localise à l'intérieur des vésicules synaptiques (Frederickson and Moncrieff 1994).

Pendant l'activité synaptique ou suite à la dépolarisation des terminaisons nerveuses, le zinc est libéré dans la fente synaptique (Aniksztejn et al. 1987; Charton et al. 1985; Howell et al. 1984; Thompson et al. 2002). Là, sa concentration pourrait alors atteindre des dizaines ou même des centaines de micromoles/l dans les cas extrêmes (Li et al. 2001b; Thompson et al. 2002; Ueno et al. 2002). Cependant d'autres études suggèrent qu'après stimulation, la concentration du zinc ne dépasserait pas 1 nM (Kay 2003). Ce point reste donc sujet à controverses.

Les principales voies d'entrée du zinc dans les cellules sont : les transporteurs spécifiques du zinc et différents canaux ioniques (activés par le voltage ou des ligands) qui, sans être spécifiques au zinc, sont cependant perméables à ce ion. Parmi ces canaux on a identifié les canaux calciques dépendants du voltage, les récepteurs NMDA et les récepteurs AMPA perméables au calcium (Sheline et al. 2002; Weiss et al. 1993).

Les transporteurs spécifiques du zinc se classent en plusieurs groupes appelés ZnT 1-7 (voir pour revue (Colvin et al. 2003)):

- ZnT1 se trouve principalement dans les cellules intestinales, où il est responsable de l'absorption du zinc alimentaire (McMahon and Cousins 1998),
- ZnT2 est présent dans le rein (Palmiter et al. 1996a) mais aussi l'intestin, les vésicules séminales, les testicules et le placenta,
- ZnT3 a été identifié exclusivement dans le cerveau et les testicules (Palmiter et al. 1996b). Il est présent dans les membranes des vésicules synaptiques des neurones riches en zinc, ce qui suggère que ce transporteur est responsable du chargement des vésicules en zinc (Wenzel et al. 1997),

- ZnT4 est exprimé dans les cellules de la glande mammaire, où il est responsable de l'apport du zinc dans le lait (Michalczyk et al. 2002) ; on le trouve également dans le cerveau, l'intestin et les testicules,
- ZnT5 est abondant dans les cellules du pancréas, où il est responsable du chargement en zinc des granules de sécrétion (Kambe et al. 2002),
- ZnT6 a été cloné dans le rein, où il serait responsable du transport du zinc du cytoplasme vers l'appareil de Golgi (Huang et al. 2002),
- ZnT7 est surtout exprimé dans les poumons et l'intestin grêle.

Dans le cerveau, il apparaît donc que les types ZnT 1, 3, 4 et 6 sont présents. De nombreuses évidences expérimentales suggèrent que ZnT3 serait le transporteur responsable de l'accumulation de zinc dans les vésicules synaptiques des terminaisons glutamatergiques (Cole et al. 1999; Palmiter et al. 1996b; Wenzel et al. 1997).

Un grand rôle dans l'homéostasie du zinc est attribué aux métallothionéines (MT), un groupe de protéines de faible poids moléculaire, riches en résidus cystéines, qui présentent de nombreux sites de liaison pour le zinc et le cuivre. On a identifié plusieurs isoformes de ces protéines, appelées MT-I ; MT-II ; MT-III et MT-IV (Ebadi et al. 1995). Dans le cerveau les formes MT-I et MT-II ont été trouvées dans les astrocytes (Ebadi et al. 1995; Hidalgo and Carrasco 1998) tandis que le MT-III est présent dans les cellules neuronales et notamment dans les neurones glutamatergiques (Masters et al. 1994; Palmiter et al. 1992). Le MT-III est déficient chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Tsuji et al. 1992; Uchida 1994) mais son implication dans le développement de cette affection reste controversée.

Interactions du zinc avec des canaux ioniques, récepteurs et transporteurs

Le zinc interagit avec de nombreux types de canaux ioniques et transporteurs (Harrison and Gibbons 1994; Smart et al. 1994). Dans cette introduction nous nous sommes focalisé sur les actions du zinc qui ont été le mieux décrites et caractérisées dans le SNC, et en particulier sur les interactions entre le zinc et la transmission synaptique.

Etant donné que dans les synapses excitatrices, le zinc est systématiquement co-localisé avec le glutamate, il pourrait moduler la transmission glutamatergique en agissant sur les récepteurs au glutamate. Sur des cultures de néocortex et de neurones d'hippocampe, le

zinc, entre 10 et 100 μM , atténue l'activation des récepteurs NMDA et stimule légèrement l'activation des récepteurs AMPA. Les techniques d'enregistrement en canal unitaire (single-channel recording) suggèrent que le zinc bloque les récepteurs NMDA selon deux mécanismes différents. L'un, indépendant du voltage, affecte la probabilité d'ouverture du canal avec une IC_{50} de 3 μM ; l'autre, dépendant du voltage, cause un blocage rapide à des concentrations de 10 à 100 μM ; ce blocage est distinct de celui exercé par le Mg^{2+} . Pour des revues voir (Christine and Choi 1990; Legendre and Westbrook 1990; Mayer et al. 1989; McBain and Mayer 1994; Peters et al. 1987; Smart et al. 1994; Trombley and Shepherd 1996; Westbrook and Mayer 1987). Sur des récepteurs recombinants, l'effet inhibiteur du zinc sur les récepteurs NMDA dépend de la composition en sous-unités. Les récepteurs formés de la combinaison des sous-unités NR1 et NR2A sont plus sensibles au zinc que ceux formés de NR1 et NR2B, C ou D (Choi and Lipton 1999; Low et al. 2000). L'effet du zinc est lié à une augmentation de l'inhibition due aux protons. Des résidus histidines (plus exactement en position H42 H44 et H128 de la partie extracellulaire de la sous-unité NR2A du canal) sont impliqués dans la pH-dépendance de l'inhibition par le zinc (Choi and Lipton 1999; Low et al. 2000). Ces données suggèrent que le zinc pourrait jouer un rôle protecteur important en cas d'ischémie et que le blocage des récepteurs NMDA par le zinc protégerait les neurones de la surexcitation causée par un excès de glutamate.

Le zinc diminue aussi la réponse des récepteurs métabotropes au glutamate (Xie et al. 1993), mais potentialiserait au contraire celle des récepteurs AMPA (Dreixler and Leonard 1997; Mayer et al. 1989; Rassendren et al. 1990). Le zinc interfère également avec le processus d'inactivation synaptique du glutamate. En effet, il inhibe la recapture du glutamate en bloquant ses transporteurs (Spiridon et al. 1998; Vandenberg et al. 1998).

Le zinc inhibe les canaux calciques dépendants du voltage (Busselberg et al. 1994) ainsi que d'autres canaux dépendant du voltage (Harrison and Gibbons 1994; Smart et al. 1994).

Le zinc module certains récepteurs au GABA par une action qui varie, selon le sous-type de récepteur (Qian et al. 1996). Il atténue l'activation des récepteurs GABA_A dans les neurones immatures de l'hippocampe (Legendre and Westbrook 1991; Smart 1992). Cet effet diminue avec la maturation, probablement par l'augmentation de l'incorporation de la sous-unité gamma dans le récepteur GABA_A (Draguhn et al. 1990; Smart and Constanti 1990). Le zinc diminue aussi la réponse médiée par le récepteur GABA_B (Xie and Smart 1991).

Plusieurs rôles ont donc été attribués au zinc, par son action sur de multiples canaux et récepteurs. Des études montrent que le zinc pourrait induire une LTP dans les cellules CA3 de l'hippocampe (Li et al. 2001a; Lu et al. 2000). Le zinc pourrait être impliqué non seulement dans des fonctions physiologiques, mais aussi dans différentes conditions pathologiques.

Zinc et K_{ATP}

Dans les granules des cellules β -pancréatiques, le zinc est co-localisé avec l'insuline (Kristiansen et al. 2001), chaque hexamère d'insuline se liant à 2 atomes de zinc. La concentration du zinc à l'intérieur des vésicules de sécrétion est estimée à 20 mM (Foster et al. 1993; Hutton et al. 1983). C'est l'endroit de l'organisme où le zinc est le plus concentré mais il n'est très probablement pas libre à l'intérieur des vésicules mais complexé avec l'insuline et des éléments de la matrice.

Dans notre équipe, les travaux d'Alain Bloc ont démontré que le zinc, à des concentrations micromolaires, exerce un effet inhibiteur réversible sur l'excitabilité de cellules β -pancréatiques issues d'un insulinome de rat. Les caractéristiques électrophysiologiques et le profil pharmacologique de cet effet ont révélé qu'une conductance potassique était en jeu, impliquant de toute évidence un canal potassique ATP-dépendant (K_{ATP}). L'activation du K_{ATP} par le zinc induit une hyperpolarisation, réduisant ainsi l'excitabilité de la cellule et, par là, l'activation des canaux calciques dépendant du voltage (Bloc et al. 2000). Le zinc étant co-libéré avec l'insuline, ce mécanisme pourrait avoir une grande importance physiologique, en exerçant un feed-back négatif sur la sécrétion.

1.4. Les canaux K_{ATP}

Généralités

Les premières descriptions des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) datent des années 80 quand Noma et collaborateurs décrivent sur des cardiocytes un courant potassique se manifestant lorsque la concentration intracellulaire d'adénosine-5'-triphosphate (ATP) diminuait ; ils caractérisèrent ce courant au niveau du canal unitaire (Noma 1983). Les K_{ATP} sont présents dans plusieurs tissus comme le pancréas (dans les îlots de Langerhans) (Ashcroft et al. 1984; Cook and Hales 1984; Rorsman and Trube 1985), le cœur (Noma 1983), les muscles squelettiques (Spruce et al. 1985), les muscles lisses de vaisseaux (Standen et al. 1989) et dans le cerveau (Ashford et al. 1988; Amoroso et al. 1990; Bernardi et al. 1992). Ils assurent un couplage entre l'excitabilité et le métabolisme énergétique de la cellule et jouent un rôle crucial dans différentes fonctions cellulaires. Les K_{ATP} sont exprimés au niveau de la membrane plasmique ainsi que dans certaines organelles, notamment les mitochondries, dont ils régulent le potentiel.

C'est dans les cellules bêta du pancréas, dont la fonction principale est de sécréter l'insuline en réponse à l'augmentation de la glycémie, que le rôle physiologique des K_{ATP} est le mieux caractérisé (Cook et al. 1988; Ashcroft and Rorsman 1989). L'élévation de la concentration sanguine du glucose augmente l'entrée de ce sucre et sa métabolisation par les cellules bêta du pancréas, ce qui entraîne une augmentation de l'ATP intracellulaire et la fermeture des K_{ATP} , avec pour résultat la dépolarisation de la cellule. La dépolarisation déclenche l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage. L'influx de calcium extracellulaire a pour conséquence l'exocytose des granules de sécrétion et la libération de l'insuline. Le canal K_{ATP} joue donc un rôle critique dans la sécrétion évoquée de l'insuline par les cellules β -pancréatiques et les médicaments agissant sur ces canaux sont utilisés en clinique. Dans le traitement de diabète de type II, non insulino-dépendant (Sturgess et al. 1985) on utilise depuis longtemps des bloqueurs des K_{ATP} , anti-diabétiques de type sulfonylurées (tolbutamide, glibenclamide). En bloquant le canal, ces composés stimulent la sécrétion d'insuline, déficiente dans cette affection. Les substances qui activent le canal K_{ATP} dites KCO (pour « K^+ channel openers »), le diazoxide par exemple, inhibent au contraire la

libération de l'insuline (Dunne et al. 1987; Sturgess et al. 1988; Trube et al. 1986). Ils sont utilisés dans certaines pathologies hyperinsulinémiques.

Dans le système cardiovasculaire le K_{ATP} pourrait jouer un rôle protecteur, spécialement en cas d'hypoxie : la concentration de l'ATP diminuant (Fujita and Kurachi 2000), les K_{ATP} sont activés et l'efflux de potassium s'oppose à la dépolarisation des cardiocytes, raccourcissant ainsi la durée du potentiel d'action (Gasser and Vaughan-Jones 1990; Faivre and Findlay 1990; Nakaya et al. 1991). De même, l'activation des K_{ATP} dans les vaisseaux sanguins entraîne une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses, et la vasodilatation. Le relâchement des muscles lisses des vaisseaux par les KCOs est aussi lié avec l'activation des K_{ATP} (Quayle et al. 1995; Zhang and Bolton 1995).

Le phénomène de « pré-conditionnement » par lequel une première ischémie transitoire protège les cellules des dommages ischémiques induits par une seconde ischémie successive impliquerait, entre autres, l'activation des K_{ATP} . La perturbation métabolique associée à l'ischémie initiale conduit à l'ouverture des K_{ATP} qui permettent une repolarisation des cellules, les protégeant de la seconde atteinte ischémique.

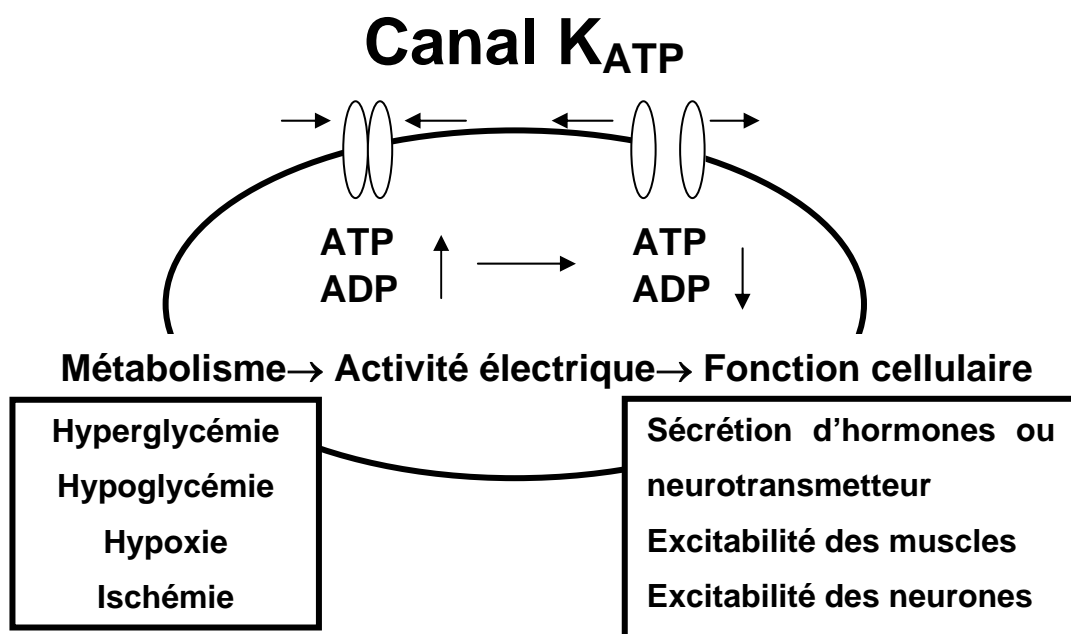


Figure 1.4.1. *Fonctionnement et régulations des canaux K_{ATP}* , adapté de (Seino and Miki 2003).

Structure

Les canaux K_{ATP} sont formés de 2 tetra-homomères, chaque tétramère comprenant deux types des sous-unités : les sous-unités Kir6.x (Kir6.1 ou Kir6.2) qui forment le pore, et les sous-unités régulatrices SUR (SUR1, SUR2A et SUR 2B) qui portent les sites de liaison des agents ouvreurs ou bloqueurs du canal.

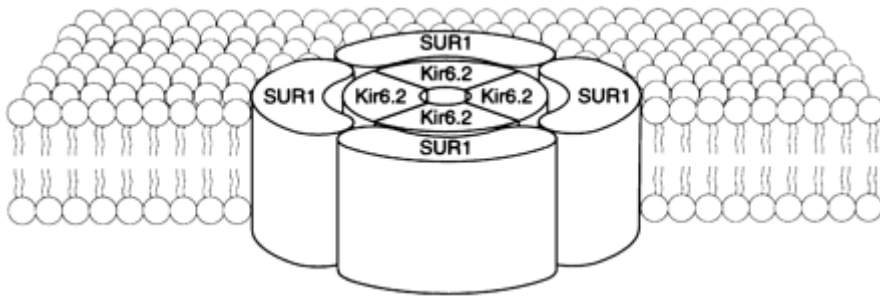


Figure 1.4.2: *Modèle de la structure du canal K_{ATP} de type β -pancréatique et neuronal, composé de la combinaison des quatre sous-unités SUR1 entourent le pore du canal qui est formé de quatre sous-unités Kir6.2. D'après (Seino 1999).*

Les sous-unités Kir sont membres de la famille des canaux " K^+ inward rectifiers" et possèdent deux domaines transmembranaires (M1 et M2). Les canaux Kir présentent une rectification entrante, c'est-à-dire qu'ils conduisent mieux le flux de potassium entrant dans la cellule que celui qui en sort. Il y a à peu près 71% d'homologie entre les acides aminés composant les sous-unités Kir6.1 et Kir6.2 (Inagaki et al. 1995). Dans la famille des Kir, le motif Gly-Tyr-Gly dans la boucle H5 est déterminant pour la sélectivité du canal au potassium. Dans le cas des Kir6.x c'est en réalité le motif Gly-Phe-Gly qui semble responsable de la sélectivité ionique des canaux. La protéine humaine Kir 6.2, d'un poids moléculaire de 43.5 kDa, est composée de 390 acides aminés.

Les sous-unités SUR, pour "sulfonylurea receptor", sont membres de la superfamille des protéines ABC, c'est à dire qu'elles possèdent au moins un domaine de liaison aux Mg nucléotides "ATP-Binding Cassette". La protéine humaine SUR1 est composée de 1582 acides aminés avec un poids moléculaire de 176 kDa.

La sous-unité SUR du canal bêta-pancréatique contient 17 segments transmembranaires (STM) formant trois domaines transmembranaires (DTM). Le DTM 0 est le domaine initial et contient l'extrémité amino-terminale extracellulaire et les STM 1-5. Les DTM 1 et DTM 2 sont composés de 6 segments transmembranaires chacun (6-11 et 12-17 respectivement) ainsi que de deux domaines de liaison aux nucléotides, appelés NBD 1 et NBD 2 (pour « nucleotid binding domain » 1 et 2). NBD 1 et 2 sont des sites de liaison pour le Mg-ATP, avec une préférence pour le NBD 1 (Nichols et al. 1996). Contrairement à la liaison de l'ion ATP^{4-} sur Kir, la fixation de MgATP ou ADP sur les NBD de la sous-unité SUR activerait le canal. Ceci nécessiterait l'hydrolyse du Mg-nucléotide.

Le site de liaison des sulfonylurées se trouve, d'après des études récentes, sur la surface intracellulaire du DTM 2 et notamment sur les STM 14-15 ainsi que sur la boucle intracellulaire du STM 16. Des travaux utilisant la mutagenèse dirigée ont permis d'identifier en position 1238 l'acide aminé déterminant l'affinité de SUR pour les sulfonylurées (Ashfield et al. 1999; Uhde et al. 1999).

A ce jour, on connaît chez les mammifères deux gènes qui encodent la sous-unité SUR. Le premier code pour le SUR pancréatique (SUR1), qui est très sensible aux sulfonylurées et peu sensible aux ouvreurs (à part le diazoxide) (Aguilar-Bryan et al. 1995; Inagaki et al. 1995). Le deuxième code pour le SUR des muscles (SUR2), dont l'épissage alternatif donne deux isoformes (SUR2A et SUR2B) qui ne diffèrent que dans les 40 derniers acides aminés (Inagaki et al. 1996; Isomoto et al. 1996). SUR2A est le récepteur des myocytes cardiaques et squelettiques (Inagaki et al. 1996), SUR2B celui des muscles lisses (Isomoto et al. 1996). Les récepteurs SUR2 diffèrent du SUR1 par leur grande sensibilité aux ouvreurs et leur sensibilité basse pour les sulfonylurées (Babenko et al. 1998; Seino 1999).

sous-unité SUR1 combinée avec la sous-unité Kir6.2, mais des canaux contenant Kir6.1 ont été identifiés dans les interneurons cholinergiques du striatum (Lee et al. 1999; Zawar et al. 1999).

L'hypothalamus joue un rôle critique dans l'homéostasie du glucose en régulant la sécrétion du glucagon et des catécholamines. Les K_{ATP} seraient impliqués dans ce contrôle de la glycémie, mais également dans celui de la prise alimentaire (Seino and Miki 2003). L'analyse par « single-cell RT-PCR » a montré que les K_{ATP} présents dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus sont composés des sous-unités Kir6.2 et SUR1, comme les canaux de type β -pancréatique. On peut remarquer que les cellules β -pancréatiques et celles de l'hypothalamus sont fonctionnellement interactives : le système de sécrétion de l'insuline et celui du glucagon participent tous deux au maintien de l'homéostasie du glucose en utilisant le même type de canal K_{ATP} .

Le marquage de haute affinité avec le [3H] glibenclamide suggère une forte expression des canaux de type β -pancréatique dans les neurones de la *Substantia Nigra*, ce qui a été confirmé par une analyse en « single-cell RT-PCR », révélant des canaux formés des sous-unités Kir6.2 et SUR1 (Liss et al. 1999). En réponse à la perfusion d'une solution hypoxique, le potentiel de membrane des neurones de la SNr exprime normalement une hyperpolarisation transitoire, qui est bloquée par l'administration de tolbutamide. Au contraire, chez l'animal KO pour la sous-unité Kir6.2 ($Kir6.2^{-/-}$), l'ischémie provoque une dépolarisation. Ainsi, les canaux K_{ATP} jouent un rôle de senseur métabolique et semblent avoir une implication critique dans les mécanismes de protection vis-à-vis de l'ischémie.

Une autre région que marque intensément le glibenclamide radioactif est l'hippocampe (Mourre et al. 1989; Tremblay et al. 1991). Des souris surexprimant la sous-unité SUR1 montrent une meilleure résistance à des lésions induites par l'acide kaïnique. Les animaux transgéniques ne présentent pas de perte significative de neurones pyramidaux après un stress ischémique, tandis que, chez des animaux témoins, la mort des cellules pyramidales est importante dans les régions CA1-3. La surexpression de la sous-unité SUR1 dans ces expériences, n'altère pas les fonctions cognitives mais joue un rôle neuroprotecteur dans les cas de stress métabolique ainsi que dans l'ischémie (Hernandez-Sanchez et al. 2001).

Le K_{ATP} est connu comme un canal capable de moduler la sécrétion des certaines hormones et neuromédiateurs, parmi lesquels des transmetteurs de type rapide comme le

GABA, l'ACh ou le glutamate (Amoroso et al. 1990; Margail et al. 1992; Ohno-Shosaku et al. 1993; Lee et al. 1997; Ben Ari 1990).

En résumé, le K_{ATP} étant impliqué dans le couplage entre métabolisme énergétique et potentiel de membrane, il joue un rôle important dans les conditions physiologiques et pathologiques. En étant un senseur métabolique il joue un rôle critique dans des situations de stress métabolique comme : l'hyperglycémie, l'hypoglycémie, l'ischémie et l'hypoxie. Plusieurs pathologies sont liées à la défaillance du canal K_{ATP} . Par exemple, des mutations sur les sous-unités Kir6.2 et SUR1 peuvent causer une hypoglycémie hyperinsulinémique, familiale infantile persistante (Seino 1999). Pour revue sur les canaux K_{ATP} voir (Aguilar-Bryan and Bryan 1999; Ashcroft 2000; Seino and Miki 2003).

1.5. L'hippocampe

L'hippocampe est une circonvolution bilatérale et symétrique, appartenant au télencéphale, qui s'est repliée sur elle-même. Il fait partie du système limbique et se trouve sous la région postérieure du cortex temporal. L'hippocampe est appelé ainsi pour sa ressemblance avec l'animal marin. A cause de sa forme recourbée, on l'appelle aussi la Corne d'Ammon, (Ammon : dieu égyptien qui porte des cornes de bélier sur la tête ; Fig.1.5.1.A). L'hippocampe représente la partie la plus importante de l'archicortex.

En coupe transversale (Fig.1.5.1.B), l'hippocampe des mammifères est formé de deux ensembles cellulaires principaux, en forme de U, qui s'imbriquent l'un dans l'autre: l'un comprend les cellules en grains qui forment *le gyrus denté* (GD) ou *fascia dentata*, et l'autre les cellules pyramidales qui constituent *la corne d'Ammon* (CA) proprement dite. Chaque partie peut être décomposée en plusieurs sous-couches distinctes.

La nomenclature proposée par Lorente de Nõ en 1934 (Lorente de No 1934) divise la corne d'Ammon en quatre zones: de CA1 à CA4. Actuellement, on utilise une distinction en trois zones CA1-3 et même, la plupart des auteurs utilisent la séparation de la corne d'Ammon en deux zones CA1 et CA3, en considérant la zone CA2 comme une partie de la zone CA3. La CA1 contient des cellules pyramidales de petite taille et constitue la région supérieure de l'hippocampe. Quant aux CA2 et 3, elles renferment des cellules pyramidales géantes et forment la région inférieure de l'hippocampe. Les couches cellulaires de l'hippocampe sont étroitement interconnectées.



Figure 1.5.1.A. Pièce de monnaie représentant Alexandre le Grand. Sa tête y est ornée de lourdes cornes de bélier qui l'assimilent à Ammon, dieu égyptien identifié à Zeus (300 av. J.C.).

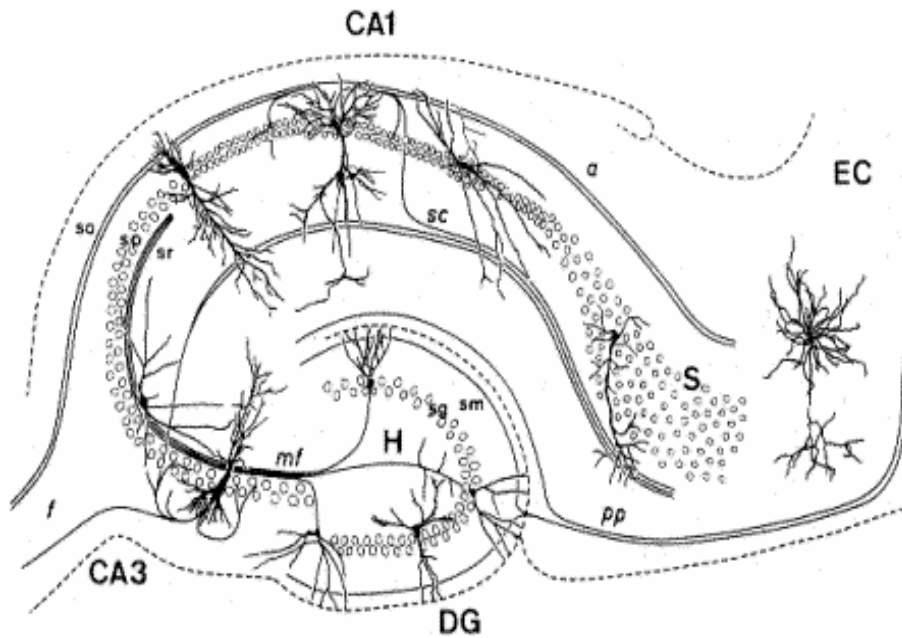


Figure 1.5.1.B. Représentation schématique d'une coupe transversale d'hippocampe.

DG: Gyrus denté ou fascia dentata, CA: corne d'Ammon, EC: Cortex entorhinal, pp: voie perforante, sm: stratum moleculare, sd: stratum granulosum, mf : fibres moussues, so: startum oriens, Sp: stratum pyramidale, sr: stratum radiatum, sc: collatérales de Schaffer, S: subiculum, H: hile.

Le gyrus denté est constitué de trois couches : la couche moléculaire ou *stratum moleculare*, la couche granulaire ou *stratum granulosum*, et le *hilus* ou couche polymorphe.

La corne d'Ammon est plus complexe car elle est faite de cinq couches distinctes: (1) l'*alveus*, contenant les axones des cellules pyramidales, (2) le *stratum oriens*, comprenant les dendrites basales de cellules pyramidales, ainsi que des cellules en corbeille et quelques afférences du septum, (3) le *stratum pyramidale* qui contient les corps cellulaires des cellules pyramidales de la corne d'Ammon et (4) les *stratum radiatum* et (5) *stratum lacunosum/moleculare* qui comprennent les segments respectivement proximaux et distaux de l'arbre dendritique apical. On distingue encore une couche supplémentaire, le *stratum lucidum*, dans la partie CA3. Le *stratum lucidum* est formé par les fibres moussues, c'est à dire les terminaisons des cellules en grains du GD. (Lopes da Silva 1990; Amaral and Witter 1994). L'hippocampe humain présente la même organisation générale que celui des rongeurs (Fig. 1.5.2.).

Les principales voies excitatrices de l'hippocampe sont unidirectionnelles et mettent en jeu quatre groupes de neurones, formant un système trisynaptique. Les cellules pyramidales du cortex entorhinal envoient leurs projections, formant la voie perforante, sur les cellules du gyrus denté. A leur tour les cellules granulaires du GD projettent leurs terminaisons, les fibres moussues, dans la région du CA3 où elles font synapse avec les cellules pyramidales. Les cellules pyramidales du CA3 émettent leurs prolongements axoniques, appelées collatérales de Schaffer, sur les cellules pyramidales du CA1. Les cellules du CA1 adressent leurs axones en dehors de l'hippocampe, vers le subiculum, qui, lui, contacte le cortex entorhinal, fermant ainsi la boucle.

L'inhibition dans l'hippocampe est assurée par des interneurones, qui utilisent le GABA comme neurotransmetteur. Plusieurs types d'interneurones ont été identifiés (Andersen et al. 1964; Freund and Buzsaki 1996) : les trois principaux sont les neurones en corbeille (basket), en chandelier (chandelier) et étoilés (stellate).

Il y a équilibre entre l'excitation et l'inhibition. Cet équilibre peut être rompu par une excitation excessive ou une inhibition trop faible. En plus, l'hippocampe entretient de nombreuses connexions avec les structures environnantes. Elles constituent soit des voies d'entrée amenant les informations vers l'hippocampe, soit des voies de sortie pour les informations traitées par l'hippocampe (Amaral and Witter 1994).

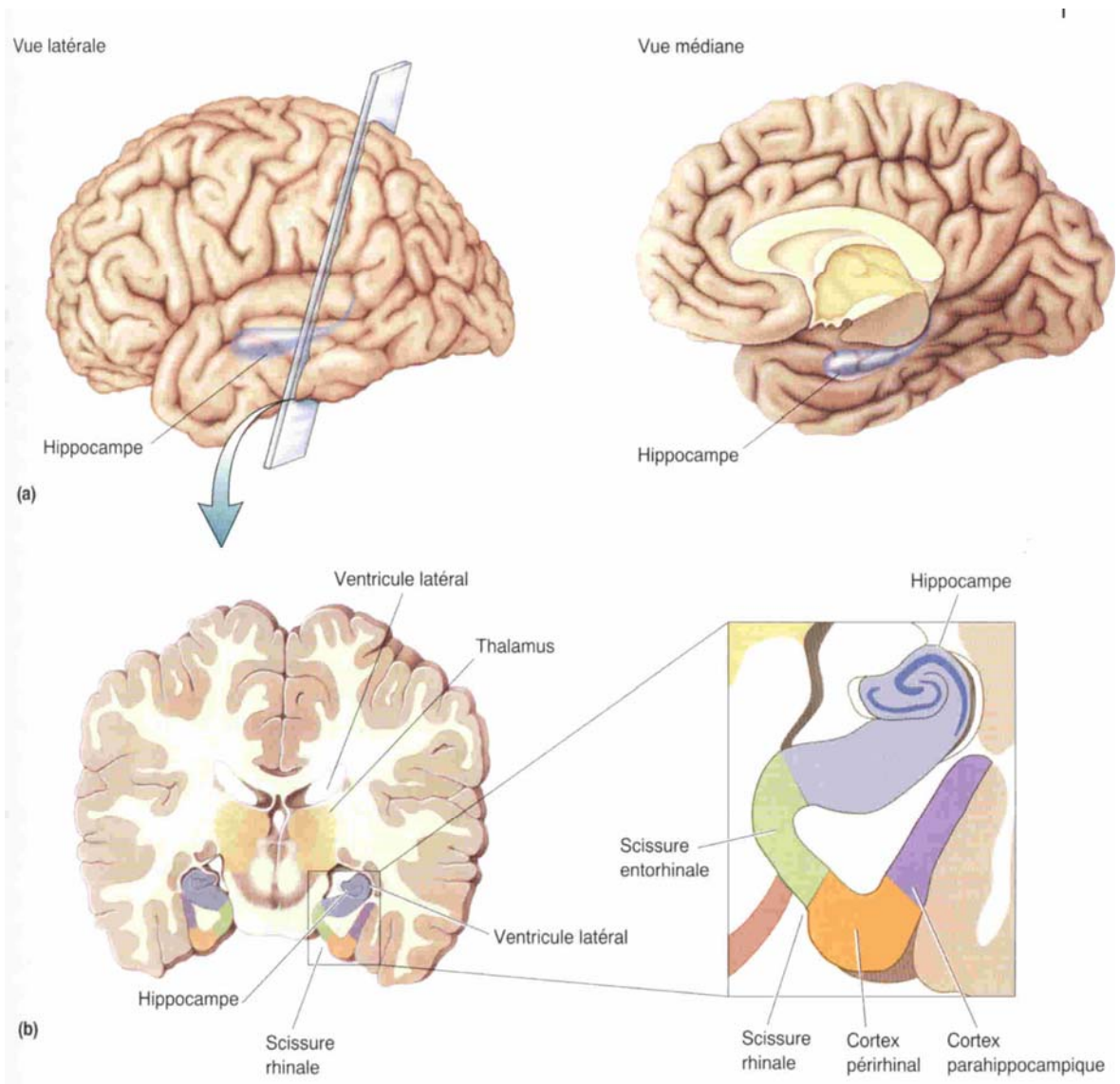


Figure 1.5.2. *Hippocampe du cerveau humain, d'après Zigmond M.J., Neuroscience édition 1999*

Les afférences de l'hippocampe

Les afférences principales de l'hippocampe proviennent du cortex entorhinal, qui est en relation directe avec les cortex préfrontal, cingulaire, temporal, piriforme et visuel (O'Keefe and Nadel 1978). Elles vont innerver, par l'intermédiaire de la voie perforante, les cellules granulaires du gyrus denté et les CA2 et CA3. Une autre partie innerve le CA1 et le subiculum. L'hippocampe reçoit également des afférences: a) de l'hippocampe controlatéral par l'intermédiaire de la fimbria, avec une certaine spécificité homotopique; b) de l'aire du septum médian, par la fimbria et le fornix, afférence cholinergique; c) de différents sites du tronc cérébral par la fimbria, comprenant des afférences sérotoninergiques inhibitrices issues du noyau du raphé médian, et des afférences noradrénergiques, également inhibitrices, venant du locus coeruleus.

Les efférences de l'hippocampe

La voie de sortie principale de l'hippocampe est le subiculum, par lequel l'hippocampe envoie les informations vers les structures extra-hippocampiques (Amaral et al. 1991). Les neurones pyramidaux projettent leurs axones vers le noyau accumbens, la formation réticulée, l'aire préoptique et le tronc cérébral, constituant le circuit de Papez. Le cortex entorhinal reçoit des projections provenant du subiculum d'une façon strictement organisée (Swanson and Cowan 1977). Par le fornix, le subiculum innerve également le thalamus, via les corps mamillaires, et le complexe de l'amygdale (Zigmond et al. 1999).

Les fibres moussues

Nous nous sommes particulièrement intéressé aux terminaisons des cellules granulaires du gyrus denté, les fibres moussues, car elles semblaient nous apporter une préparation de choix pour étudier la libération du glutamate et ses régulations.

Les descriptions initiales des fibres moussues datent de 1886, par Golgi (Golgi 1886), reprises ensuite plus en détail par son étudiant Sala en 1891 (Sala 1891). La première observation de contacts entre les fibres moussues et les épines dendritiques proximales des cellules pyramidales de CA3 revient à Ramon y Cajal en 1911 (Cajal 1911). La reconstitution partielle (coupes sériées en microscopie électronique) révèle une connectivité complexe et conforte l'idée que les fibres moussues forment des synapses excitatrices sur les cellules

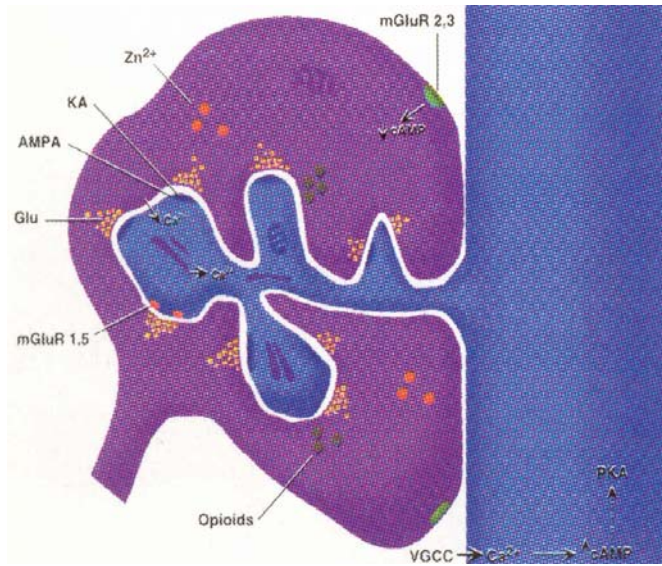


Figure 1.5.3. A. Représentation schématique d'une terminaison de fibre moussue de l'hippocampe, faisant synapse sur une excroissance épineuse dendritique d'une cellule pyramidale CA3.
Nature Neurosc vol2 N°7 july 1999

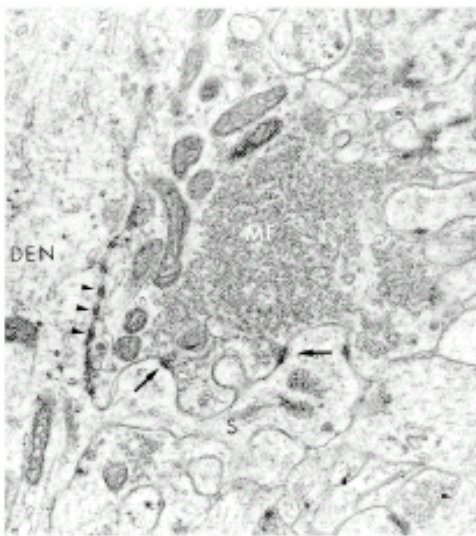


Figure 1.5.3. B. Image au microscope électronique et représentation schématique de la connexion fibre moussue-CA3 (d'après Amaral et Dent, 1981).



pyramidales du CA3 (Blackstad and Kjaerheim 1961). On considère les fibres moussues comme un "détonateur", signifiant qu'elles suffisent à elles seules à déclencher l'excitation des cellules pyramidales.

Les fibres moussues contiennent du glutamate (Terrian et al. 1988; Terrian et al. 1990), de l'ATP (Terrian et al. 1989), du zinc (Ibata and Otsuka 1969), du GABA (Sandler and Smith 1991) et des peptides du type dynorphine (McGinty et al. 1983; Hoffman and Zamir 1984; Terrian et al. 1988; Terrian et al. 1990).

Les fibres moussues ont été isolées sous forme de synaptosomes soit à partir du cervelet, soit à partir de l'hippocampe. Ces synaptosomes sont de grande taille et libèrent le glutamate de manière calcium-dépendante (Helme-Guizon et al. 1998; Israel and Whittaker 1965). Ils représentent donc un outil précieux dont nous nous sommes servis au cours de ce travail.

La synapse fibre moussue - cellule pyramidale dans le CA3

Il y a approximativement 10^6 cellules en grains dans le GD des rongeurs. Chacune émet un axone qui donne de nombreuses collatérales au niveau du hile. L'axone principal poursuit vers le CA3 où, au niveau du *stratum lucidum*, il fait synapse successivement sur environ 14 cellules pyramidales, situées en moyenne à 140 μm l'une de l'autre (Amaral et al. 1990). La plupart sont donc des synapses « en passant » (Fig. 1.5.3.).

La synapse fibre moussue – cellule pyramidale du CA3 est la deuxième synapse du circuit trisynaptique de l'hippocampe. La partie présynaptique est formée de l'élargissement géant d'un axone (fibre moussue) provenant d'une cellule en grain du gyrus denté. L'élargissement de la fibre moussue enveloppe littéralement l'élément post-synaptique. Celui-ci, de structure complexe, est formé d'une excroissance épineuse située à la base de la dendrite apicale d'un neurone pyramidal de la région CA3 (Cajal 1911; HAMLIN 1962; Amaral 1978; Stirling and Bliss 1978; Fitch et al. 1989). La microscopie électronique a permis de préciser que les connexions synaptiques se font sur les épines de l'excroissance. Un complexe fibre moussue - excroissance CA3 peut contenir de 1 à 16 contacts synaptiques (Blackstad and Kjaerheim 1961; Amaral and Dent 1981; Chicurel and Harris 1992). Chaque excroissance épineuse est en contact avec une seule fibre moussue, tandis qu'une fibre moussue établit des synapses sur plusieurs excroissances épineuses (Chicurel and Harris 1992; Acsady et al. 1998).

Transmission synaptique FM/CA3

La stimulation d'une seule cellule granulaire du gyrus denté évoque, au niveau d'un neurone pyramidal CA3, une réponse rapide (potentiel postsynaptique d'excitation dit « unitaire ») qui peut s'enregistrer au niveau du corps cellulaire pratiquement sans atténuation, car les complexes synaptiques FM/CA3 compacts décrits plus haut sont situés à la base de la dendrite apicale. En faisant baisser le rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, on a démontré que le potentiel unitaire est composé d'un nombre entier d'éléments dont les caractéristiques sont les mêmes que celles de potentiels miniatures spontanés, enregistrés en dehors de toute stimulation. La transmission FM/CA3 est donc quantique. Le potentiel unitaire se compose de 6 à 42 quanta, ce qui revient en gros au nombre d'épines postsynaptiques en contact avec une terminaison moussue (1-27). Mesurée en courant, la taille moyenne d'un quantum est de 10 pA (133 pS), ce qui correspond à l'activation simultanée d'une quinzaine de récepteurs de type AMPA. En effet, l'ouverture d'un récepteur laisse en moyenne passer, dans des conditions comparable à l'état *in situ*, un courant de 0.6 pA (8.5 pS) pendant 3 ms. Le temps d'ascension du courant est inférieur à la ms (0.2-0.8 ms pour monter de 20 à 80%), ce qui atteste d'un accollement intime entre les membranes pré et postsynaptiques. La vitesse moyenne du décours ($t_{1/2} = 4.8$ ms) n'est pas très éloignée du temps d'ouverture moyen des récepteurs (3 ms), indiquant que le glutamate disparaît très vite de la fente synaptique après la libération et que peu de molécules doivent avoir l'occasion d'activer plusieurs fois les récepteurs (Jonas et al. 1993).

La description ci-dessus concerne la transmission rapide FM/CA3. Il faut souligner qu'elle est soumise à de nombreuses modulations tant pré- que postsynaptiques, ainsi qu'aux influences des autres voies, inhibitrices ou excitatrices, qui convergent sur la cellule pyramidale du CA3. La plasticité synaptique, dont plusieurs formes ont été mises en évidence, joue un rôle important dans la transmission FM/CA3. Par exemple : l'efficacité de la transmission augmente considérablement lorsqu'on passe d'une très basse fréquence (0.05 Hz) à une fréquence moyenne (1 Hz) de stimulation, phénomène appelé « frequency facilitation ». Différents mécanismes pourraient concourir à l'augmentation de la « frequency facilitation », comme par exemple la levée d'une inhibition exercée par l'adénosine sur des récepteurs A1 présynaptiques (Moore et al. 2003) ou la désensibilisation progressive d'un canal K^+ présynaptique voltage-dépendant (Geiger and Jonas 2000).

Le passage d'un influx facilite celui d'un second, survenant après un bref intervalle («paired-pulse facilitation»). Enfin, une courte salve à haute fréquence potentialise de

manière durable la transmission ultérieure des influx, phénomène connu sous le nom de « long-term potentiation » (LTP) et considéré comme le substrat cellulaire des processus d'apprentissage et de mémorisation (Bliss and Collingridge 1993). Cette plasticité de la transmission semble être régie par des mécanismes distincts dans différentes régions du système nerveux. Celle des jonctions FM/CA3, par exemple, n'est pas la même que celle des jonctions CA3/CA1. En particulier, dans les synapses FM/CA3, la LTP ne dépend pas des récepteurs NMDA (Zalutsky and Nicoll 1990), et son induction résulterait d'une augmentation soutenue de l'activité présynaptique et non de mécanismes postsynaptiques, comme au niveau des autres synapses (Malenka and Nicoll 1993). Cette augmentation présynaptique serait due à l'activation des récepteurs KA présent sur les terminaisons des FM (Bortolotto et al. 2003) et s'accompagne d'une augmentation de la quantité de glutamate libéré (Helme-Guizon et al. 1998). Enfin, différents travaux suggèrent que le zinc libéré par les FM serait impliqué dans l'induction de la LTP à la synapse FM/CA3 (Weiss et al. 1989; Li et al. 2001a; Lu et al. 2000; Xie and Smart 1991).

Questions posées

Nous avons planifié nos expériences de manière à mieux comprendre les mécanismes de la libération du glutamate, et surtout de caractériser ses régulations par des récepteurs et des canaux ioniques présents sur les terminaisons nerveuses. Il s'est agi plus précisément de répondre aux questions suivantes dans une perspective physiologique mais aussi pathologique :

- Quelle relation lie-t-elle les variations du potentiel de membrane (PM) et la libération de glutamate au niveau des fibres moussues de l'hippocampe ?
- La nicotine influence-t-elle la libération du glutamate ? Si oui, dans quel sens, par quels récepteurs et par quels mécanismes ?
- Les K_{ATP} présynaptiques, abondants sur les fibres moussues de l'hippocampe, régulent-ils la libération du Glu comme ceux des cellules β -pancréatiques la sécrétion d'insuline ?
- Le zinc présent dans les fibres moussues et libéré lors de la stimulation pourrait-il activer des K_{ATP} , comme il le fait sur les K_{ATP} du pancréas dont la composition est similaire ?
- Peut-on définir, au niveau moléculaire, l'action du zinc sur les K_{ATP} ?
- Les régulations de la libération de glutamate, via le zinc endogène ou exogène et les K_{ATP} , ont-elles une influence sur les lésions cellulaires provoquées par l'ischémie ?

Nous avons pour but, au travers de l'ensemble de ces expériences, de faire progresser notre compréhension des mécanismes de la libération synaptique de glutamate dans le SNC et de certaines de ses régulations.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Animaux

Des rats males Wistar, âgées de 3-5 semaines sont utilisés pour la préparation des synaptosomes des fibres moussues d'hippocampe. Les tranches destinées aux cultures organotypiques d'hippocampe sont prélevées sur des rats Wistar âgés de 7 jours. Les rats sont fournis par l'animalerie du Centre Médical Universitaire, où ils ont libre accès à la nourriture (croquettes, régime « entretien rat - souris ») et à l'eau de boisson. L'éclairage suit une alternance lumière – obscurité selon des cycles de 12 h (lumière mise en marche à 8h00) et la température de la pièce est maintenue à 22°C.

2.2. Préparation des synaptosomes des fibres moussues d'hippocampe

Les synaptosomes des fibres moussues d'hippocampe sont préparés d'après la méthode d'Israel et al. (1965; Helme-Guizon et al. 1998), avec quelques modifications.

Sous anesthésie, le rat est décapité et le cerveau prélevé. Le bloc de cerveau contenant les hippocampes est placé dans une solution Krebs oxygénée (95 % O₂ et 5 % CO₂) de composition suivante (en mM) : NaCl 136; KCl 3; MgCl₂ 1.2; CaCl₂ 2.2; glucose 5.5; Na/Na₂ tampon phosphate 1.2; NaHCO₃ 16.2. Le pH est ajusté à 7.4 et la température maintenue à 4°C. Après le prélèvement des hippocampes, on façonne des petits cubes de 1-2 mm de côté et on les place dans un tube d'hémodialyse contenant 300 µl Krebs. La préparation est délicatement triturée par aspiration avec une pipette Gilson P-1000. L'homogénat obtenu est amené à un volume de 2 ml et ensuite filtré à travers une toile de gaze (mailles de 100 µm ; Millipore, Suisse). On laisse pendant 30-45 minutes un culot se former au fond du tube. Ce culot est resuspendu dans 1 ml de Krebs. Dès cette étape et pour le reste de l'expérience, la fraction obtenue est maintenue à 20-22°C.

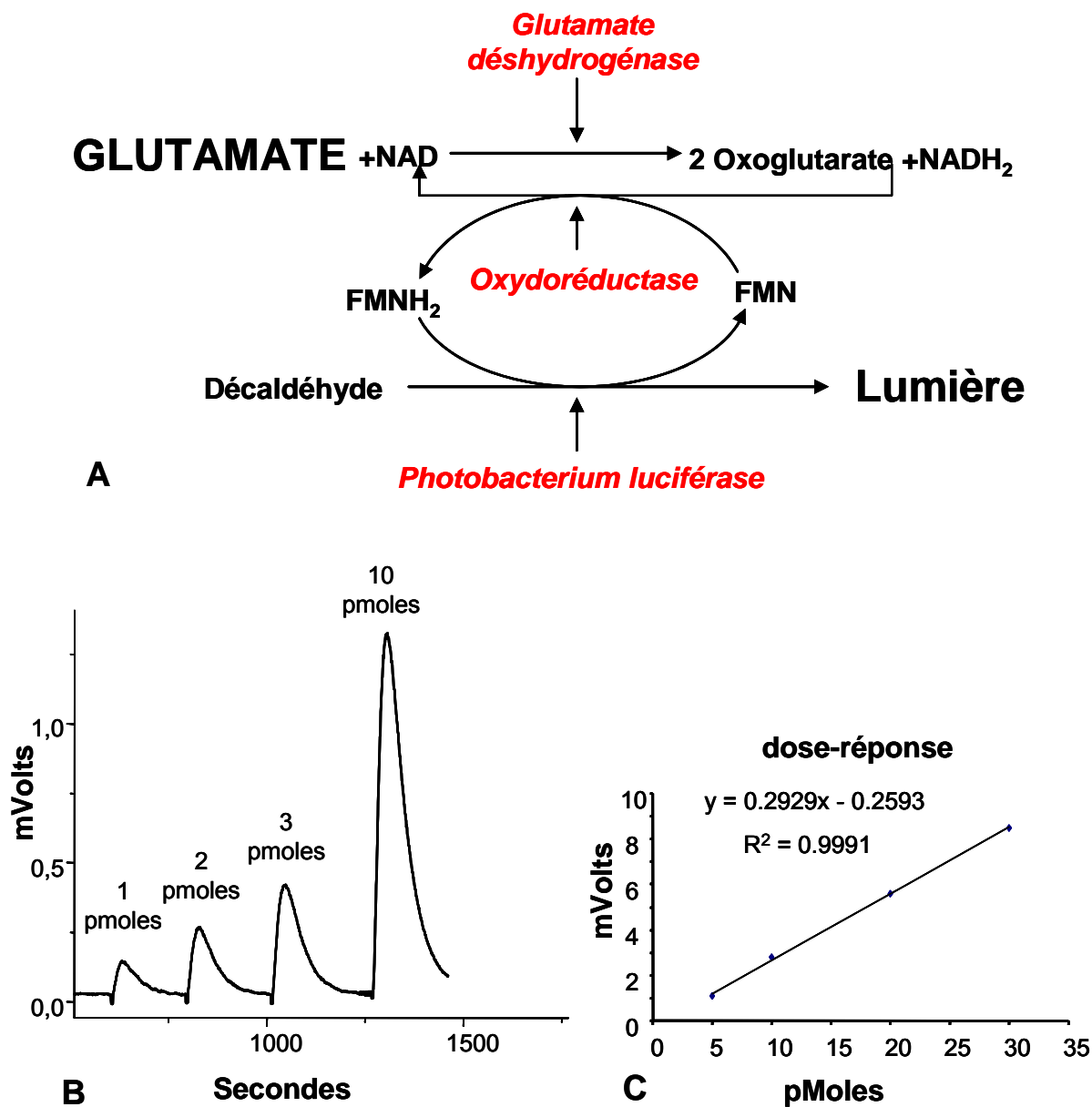


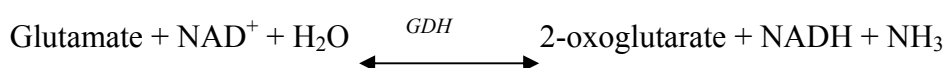
Figure 2.3.1. Dosage chimio-luminescent du glutamate. **A.** Représentation schématique des réactions. **B.** Trace exemple de réponses à des doses standards de glutamate. **C.** Relation entre la dose, entre 5 et 30 pMoles, et l'amplitude de la réponse luminométrique.

2.3. Mesure de la libération du glutamate

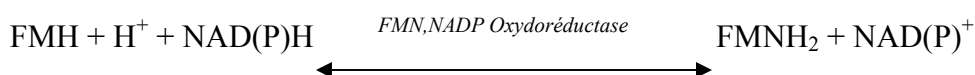
La libération du glutamate est quantifiée en utilisant la méthode de chimiluminescence décrite par (Israel and Lesbats 1982) et modifiée par Fosse (Fosse et al. 1986). Elle consiste à faire interagir le glutamate avec un mélange d'enzymes de manière à obtenir une production de lumière. Le mélange contient 250 µl de b-nicotinamide adénine dinucléotide coenzyme (b-NAD) (16.6 mg dissous dans 2.5 ml Tampon Tris 0.2 M; pH 8), 25 µl de flavine mononucléotide (FMN: 1 mg dans 8.3 ml H₂O), 100 µl de NADP(H)-FMN oxydoréductase (2.4 mg dans 1 ml H₂O), 80 µl de luciférase bactérienne (de *Vibrio fischeri*, 25 mg dans 1 ml H₂O) et 50 µl de glutamate déhydrogénase (2.66 unités/µl). Ce mélange est préparé à l'avance et stocké à -20°C.

La réaction de bioluminescence est une succession des trois réactions, illustrées dans la Figure 2.3.1.A. :

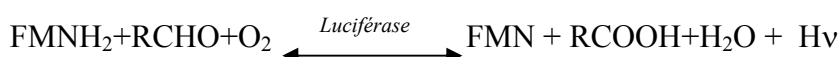
1. Le glutamate est oxydé en aldéhyde.



2. Les nucléotides réagissent avec la FMN/NADP-réductase



3. Ensuite a lieu la réaction de bioluminescence :



Tous les produits provient de Sigma (Sigma Chemical, Suisse) à l'exception de la NADP(H)-FMN oxydoréductase qui provient de Boehringer (Roche, Suisse). Le signal lumineux est amplifié à travers un photomultiplicateur Hamamatsu C3838 (Hamamatsu Photonics, Japan). Le signal est ensuite numérisé à travers une carte Lab PC Plus (National Instrument, USA) et traité par le programme Ophiucus, Version 1.1. La Figure 2.3.1.B. représente un exemple de détection du glutamate par la méthode de chimio-luminescence.

Pour la mesure de glutamate en continu, un échantillon de 5 µl, qui correspond approximativement à 0.1 à 0.5 mg de protéines, est placé dans le tube de mesure qui contient 50 µl du mélange d'enzymes dans soit 250 µl de tampon tris-saccharose (Tris 20 mM, Saccharose 0.3 M, pH 7.2), soit le milieu de Krebs modifié (sans calcium). Après stabilisation

de la ligne de base, les substances déclenchant la libération sont ajoutées. Pour calibrer la quantité de glutamate libérée, 2 ou 3 doses standards de glutamate sont ajoutées.

Pour la libération en mode discontinu, la réaction est effectuée dans des tubes Eppendorf contenant 30 μ l de synaptosomes et 270 μ l de Krebs. Cinq minutes après l'induction de la libération, on effectue une très brève centrifugation. Le surnageant est utilisé pour l'analyse du glutamate libéré et le culot pour doser les protéines. Pour chaque tube, la quantité de glutamate libérée est rapportée à la quantité de protéines. La libération est donc exprimée en nmoles de glutamate par mg de protéines (sous-entendu : en cinq minutes).

2.4. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par colorimétrie par la méthode à l'acide bicinchonique en utilisant le kit Pierce BCA Protein Assay. La courbe des standards est réalisée avec de l'albumine sérique de bœuf (BSA, SIGMA).

2.5. Microscopie Electronique

Pour la microscopie électronique les synaptosomes sont fixés dans une solution Krebs contenant 3 % de glutaraldéhyde et 2 % de paraformaldéhyde (PAF) pendant 30 min à 4°C. Ensuite, on rince 3 fois le culot pendant 10 min avec du tampon phosphate (PB 0.1 M / pH 7). La fixation est faite avec du OsO₄ 1 % / PB 0.1 M 7.4 pendant 1h à 20°C à l'abri de la lumière, suivie de 3 rinçages de 15 min avec du PB 0.1 M / pH 7.4. Pour la déshydratation, le culot passe dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes. 25 %; 50 %; 75 %; 95 %; 100 %, environ 10 min dans chaque bain. Le culot est ensuite placé dans une solution Ethanol: Oxyde de Propylène (PO) 1:1 suivie de 3 x 5 minutes dans du PO 100 %. On le laisse ensuite pendant 2 heures dans un mélange PO:EPON en rapport 1:1, suivi de 2 heures en rapport 1:3, puis pour la nuit dans de l'EPON pur. Le culot est placé dans une capsule de gélatine et enrobé dans de l'EPON pur à 60°C pendant 48 heures. Des coupes semi-fines de 1 à 2 μ m d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un couteau de verre, puis des coupes fines d'environ 70-80 nm avec un diamant monté sur un ultramicrotome (OM U3, Reichert, Autriche). Les coupes sont placées sur des grilles de cuivre à 300 mailles de 3 mm de diamètre (TEBRA 1GC300). Elles sont contrastées avec l'acétate d'uranyle, 6 % dans du

méthanol. Les grilles sont finalement rincées à l'eau et séchées. Les coupes sont examinées à l'aide d'un microscope à transmission, Philips CM 10 à 80 kV.

2.6. Marquage à l'or colloïdal en microscopie électronique

Afin de déterminer la localisation précise des récepteurs nicotiques sur les terminaisons des fibres moussues, nous avons effectué un marquage immuno-histochimique en utilisant un premier anticorps spécifique pour une sous-unité donnée du canal en question et un deuxième anticorps couplé à l'or colloïdal. Cette technique permet la visualisation de l'antigène cherché, en microscopie électronique. Elle a été développée par (Faulk and Taylor 1971).

Le marquage à l'or colloïdal est effectué selon un protocole adapté à notre type de préparation. Une fois préparés, les synaptosomes des fibres moussues d'hippocampe sont fixés pendant 60 min à 4°C dans une tampon phosphate (PB) contenant 4 % de glutaraldéhyde et 0.1 % de paraformaldéhyde, avant trois lavages de 20 min dans du PB 0,1 M. Un blocage des sites non spécifiques est effectué dans du PB 0.1M contenant de la BSA (bovine sérum albumine) 2%. L'anticorps primaire est dilué à 1 :500 dans du PB 0.1 M, contenant de la BSA 2%. Il est dirigé contre la sous-unité alpha-7 du récepteur nicotique de rat et provient de SIGMA (Monoclonal IgG, Anti Nicotinic AChR (α -7 subunits)). Ensuite trois lavages de 20 min chacun sont effectués dans du PB 0.1M. L'anticorps secondaire couplé à l'or colloïdal (15 nm de diamètre) (Immunogold conjugate Goat Anti-Mouse IgG, BBI, UK) est dilué à 1 :50 dans du PB 0.1 M et incubé pendant 24 heures à 4 °C. Trois lavages dans du PB 0.1M sont effectués ensuite. La procédure de postfixation et d'enrobage correspond à celle décrite dans le paragraphe précédant 2.5. Puisqu'il s'agit d'une suspension il est important de noter que des centrifugations courtes sont effectuées entre chaque étape dans le but de reconcentrer les synaptosomes.

2.7. Mesure du potentiel de membrane

Le potentiel de membrane est mesuré avec une sonde fluorescente de la famille des carbocyanines, la di-S-C3(5) (Sigma). Cette méthode a été décrite par Blaustein et Goldring (Blaustein and Goldring 1975) sur des synaptosomes de cerveau, et par Meunier (Meunier 1984) sur des synaptosomes de l'organe électrique de torpille. La fluorescence est mesurée sur un fluorimètre Perkin-Elmer, modèle LS-50 B, avec un échantillonnage de 1-2 Hz (excitation 620 nm, émission 670 nm).

Dans un tube contenant 900 μl de solution de Krebs et 100 μl de suspension des synaptosomes (concentration finale approximative de 5 mg/ml), on ajoute 5-8 μM de di-S-C3(5). La figure 2.7.1. schématise le principe de la mesure du PM en utilisant cette sonde. On enregistre un premier pic de fluorescence dû à la présence de la sonde libre. Après 5-10 minutes, la ligne de base se stabilise vers un niveau de fluorescence qui correspond à la valeur du potentiel de repos initial des synaptosomes. Pour calculer le potentiel de membrane des synaptosomes, on ajoute de la valinomycine (0.5 μM), un ionophore spécifique des ions K^+ . Le PM des synaptosomes atteint alors le potentiel d'inversion du K^+ et en utilisant l'équation de Nernst (Figure 2.7.1.C.), on peut calculer le PM en mV, en prenant en compte la concentration extracellulaire du K^+ au moment de la mesure et en considérant que la concentration intracellulaire est 140 mM. L'opération est ensuite répétée pour plusieurs concentrations de K^+ extracellulaire. A la fin, on ajoute de la gramicidine (2 μM), un antibiotique ionophore cationique non spécifique. La valeur du PM en présence de gramicidine est donc nulle ($\text{MP} = 0 \text{ mV}$). Une relation strictement linéaire ($R > 0,9$) est obtenue entre les valeurs de fluorescence (ΔF) mesurées en présence de valinomycine avec différentes concentrations de K^+ et le niveau atteint après gramicidine d'une part, et les valeurs du PM calculées en mV d'autre part. On peut donc convertir les ΔF en mV, et, par interpolation, déterminer toute autre valeur du PM.

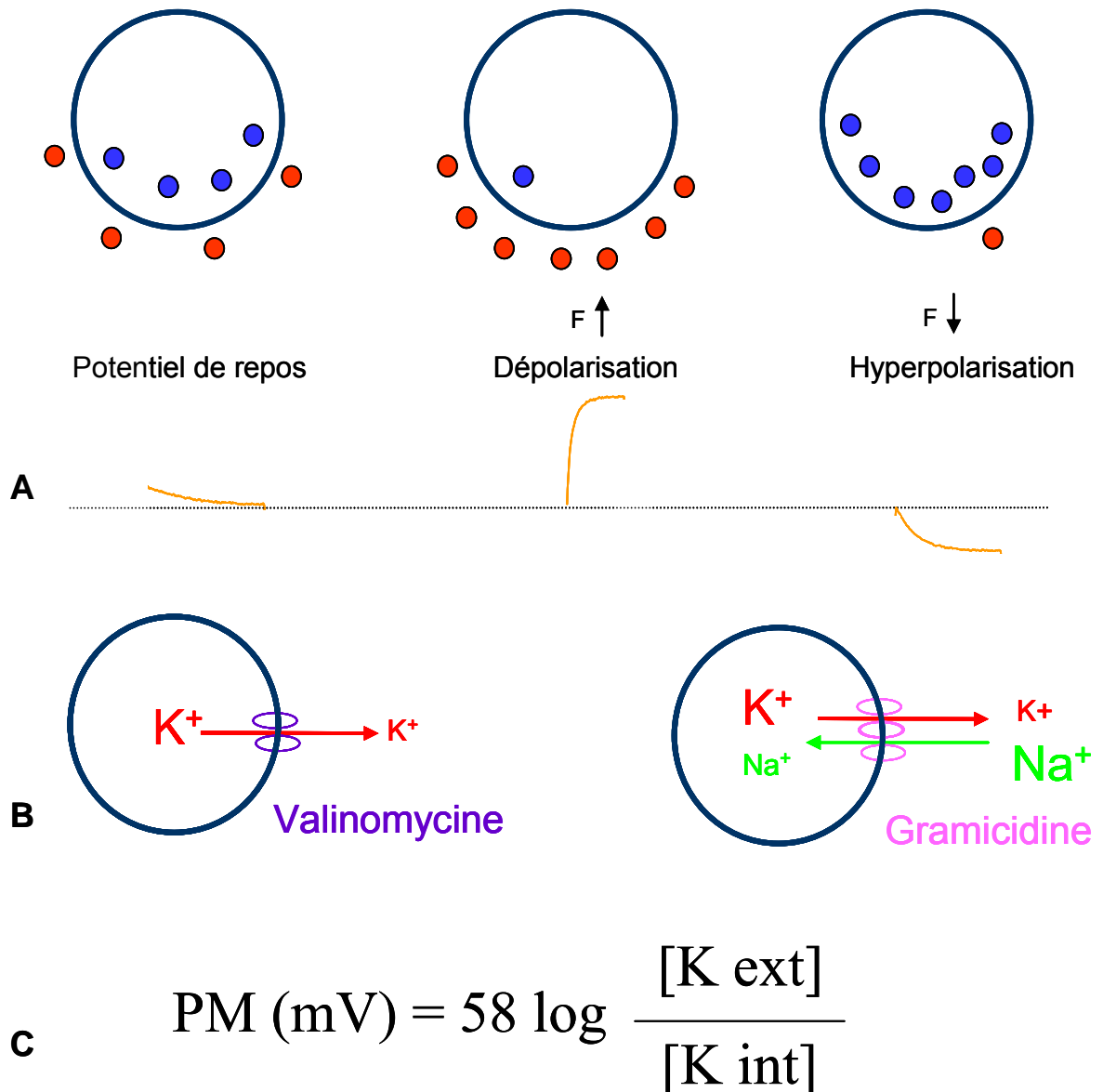


Figure 2.7.1. Mesure du potentiel de membrane PM par la sonde fluorescente di-S-C3(5)

A. La sonde se distribue de part et d'autre de la membrane en fonction de la différence de potentiel. Les cercles rouges symbolisent les molécules fluorescentes, les bleus, à l'intérieur de la membrane ne fluorescent pas. Une dépolarisation détache la sonde de la membrane et augmente la fluorescence; une hyperpolarisation favorise, au contraire, la pénétration de la sonde et se traduit par la diminution de la fluorescence. **B.** La valinomycine crée des pores perméables spécifiquement au K^+ et amène le PM au potentiel d'équilibre du K^+ . La gramicidine forme des canaux perméables à tous les cations et annihile le PM. **C.** Équation de Nernst permettant le calcul du PM en mV en fonction du gradient du K^+ .

2.8. Culture cellulaire

L'activité des canaux K_{ATP} a été mesurée en électrophysiologie soit sur des cellules qui expriment nativement le canal, comme les INS-1E, soit sur des cellules n'exprimant normalement pas de canaux K_{ATP} , comme les HEK293T, dans lesquelles nous avons surexprimé le canal par transfection au phosphate de calcium.

La lignée cellulaire INS-1E est issue d'un insulinome de rat. Ces cellules présentant des similitudes morphologiques et fonctionnelles avec les cellules β -pancréatiques (elles synthétisent et libèrent l'insuline), proviennent du laboratoire de biochimie clinique, CMU Genève. Elles sont cultivées dans un milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, UK) qui contient 5% de sérum de veau fœtal (FCS ; Gibco, UK) ; 50 μ M β -mercapto-éthanol (Sigma) ; 1 mM Pyruvate ; 1 IU/ml – 1 mg/ml Pénicilline-Streptomycine (Gibco, UK) et 2 mM Glutamine (Sigma).

Pour transfecter les canaux, nous avons utilisé la lignée cellulaire HEK293T (cellules de rein embryonnaire humain). Les cellules sont mises en culture jusqu'à confluence dans des boîtes de Petri (Falcon 3001) de 35 mm de diamètre (Becton Dickinson, UK) dans un milieu RPMI 1640 avec glutamax (Gibco, UK), contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FCS) dialysé et inactivé, ainsi que 100 UI/ml de pénicilline/streptomycine. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C dans 5 % CO₂ – 95 % air. Notre choix s'est porté sur cette lignée cellulaire parce qu'elle ne possède pas des canaux K_{ATP} endogènes (Yu and Kerchner 1998), qu'elle permet une forte expression de canaux à la membrane et qu'elle offre des conditions propices à l'enregistrement en « *patch-clamp* » en configuration « cellule entière ».

Pour enregistrer en temps réel la libération de glutamate, nous nous sommes servi de cellules HEK293 où le récepteur de type AMPA GluR1_{flip} (polyhomomère) est exprimé par transfection stable. Ces cellules nous ont été fournies par BASF, Ludwigshafen et le Max-Planck-Institute de Heidelberg où elles furent mises au point. Elles ont été cultivées dans les mêmes conditions que les cellules HEK293 sur lesquelles nous avons transfecté des canaux K_{ATP} , sauf que leur milieu de culture contenait 2mM de Glutamax I. De plus de la généticine (G418) a été rajoutée pour la purification des clones.

2.9. Transfection de canaux K_{ATP} recombinants

Afin d'obtenir une expression transitoire de canaux K_{ATP} , les cellules HEK293T ont été transfectées par la méthode au phosphate de calcium, développée en 1973 par Graham et van der Eb (Graham and van der Eb 1973). Cette méthode est très largement utilisée pour introduire un ADN exogène dans des cellules eucaryotes. L'incorporation d'ADN complémentaire à l'intérieur de cellules en culture est en effet particulièrement grande lorsque l'acide nucléique est présenté sous forme d'un co-précipité phosphate de calcium – ADN, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration de l'ADN à la surface des cellules. Bien que les mécanismes exacts de cette réaction restent inconnus, on pense que l'ADN complémentaire pénètre dans le cytoplasme de la cellule par endocytose. Selon le type cellulaire utilisé, plus de 20 % de la population de cellules peuvent être transfectées en une fois. Le rendement obtenu par la précipitation au phosphate de calcium sur les cellules HEK293T s'est avéré largement satisfaisant pour les expériences d'électrophysiologie, le taux de cellules transfectées atteignant 50 % dans certaines expériences.

Les plasmides introduits dans les cellules correspondent à des vecteurs pcDNA3 dans lesquels a été clonée la sous-unité Kir X ou la sous-unité SUR X (selon les conditions) du canal K_{ATP} de rat. Pour visualiser les cellules transfectées par l'un ou l'autre de ces ADNc, on les co-transfecte avec un plasmide codant pour une protéine fluorescente, la E-GFP (Enhanced-Green Fluorescent Protein, également clonée dans le vecteur pcDNA3). L'ADNc codant pour les protéines d'intérêt a été utilisé en excès par rapport au plasmide codant pour la E-GFP. De cette manière, lorsque nous avons « patché » les cellules positives pour la E-GFP, 100 % exprimaient le gène d'intérêt.

La transfection est réalisée de la manière suivante: on prépare un volume de 125 μ l contenant un mélange d'ADNc et de $CaCl_2$ (250 mM) auquel est ajouté goutte à goutte un volume de 125 μ l de tampon phosphate (NaCl 280 mM, HEPES 50 mM, Na_2HPO_4 1.5 M, pH 7.00) afin que se forme le précipité. Dans le mélange final (volume de 250 μ l), la quantité des plasmides est de 0.5 μ g pour les sous-unités Kir6.X et de 1.5 μ g pour celle des plasmides SURX, et en plus, 0.25 μ g de plasmide codant pour la E-GFP. Ainsi, le rapport de la concentration des plasmides Kir et SUR est de 1:3 étant donné que la protéine SUR a une masse environ trois fois plus élevée que la protéine Kir. La réaction de précipitation s'effectue à pH 7, à température ambiante pendant 10 à 15 minutes. Le précipité est examiné au cours du temps et doit ressembler à de petits grains couvrant la surface des cellules. Si le milieu est

trop acide, aucun précipité ne se forme; s'il est trop basique, le précipité flotte dans le milieu de culture. On applique ensuite le précipité goutte à goutte sur les cellules qui arrivent à confluence, maintenues dans 3 ml du milieu de culture utilisé pour les transfections (Milieu DMEM ; EuroBio), FCS (Amimed), 10 % Pénicilline-Streptomycine (Gibco), 1 IU/ml – 1 mg/ml Glutamine (Sigma) 2 mM) à 37°C, sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂, pendant une durée qui peut varier de 4 à 15 heures. Après cette période le milieu de culture est changé pour un milieu normal et les expériences d'électrophysiologie sont effectuées de préférence pendant les 48 heures qui suivent la transfection, afin d'obtenir une expression optimale.

2.10. Mutagenèse dirigée

Les mutations du canal K_{ATP} ont été réalisées au laboratoire par le Dr. Dominique Monnier et Frederic Chansson.

Par mutagenèse dirigée, nous avons créé des vecteurs d'expression du gène SUR1 de rat portant des mutations ponctuelles sur plusieurs résidus Histidine. Chaque vecteur muté a été généré à partir du vecteur d'origine pcDNA3/SUR1. Pour cela, nous avons utilisé le kit de mutagenèse dirigée, «*QuickChange site-directed mutagenesis kit*», de Stratagene et employé la stratégie suivante: Les mutations ponctuelles sont générées par l'utilisation d'oligonucléotides de synthèse, modifiés au niveau du codon d'intérêt et ceci pour chaque vecteur. Chaque paire d'oligonucléotides, sens et antisens, permet de remplacer un acide aminé histidine en alanine. Le changement d'une ou de deux bases dans le codon d'intérêt entraîne une modification dans la lecture du code génétique et autorise l'incorporation dirigée d'un acide aminé neutre en lieu et place de l'histidine natif.

La mutagenèse et l'amplification des vecteurs mutés sont réalisées dans un volume réactionnel de 50 ml suivant le protocole suivant:

1.5 mM MgCl₂

50 ng d'ADN pcDNA3/SUR1 comme matrice

125 ng de chaque oligonuléotide

1 ml de mélange dNTPs 10 mM

3 unités de *pfu* polymérase et de son tampon.

L'incorporation et l'extension des oligonucléotides mutés ont été faites par PCR: 30 secondes à 95°C puis 25 cycles (30 sec-95°C / 1 min-55°C/ 20 min-68°C). La matrice ADN parentale pcDNA3/SUR1 est ensuite détruite par digestion enzymatique (1 heure à 37°C en présence de Dpn1). Cinq µl de chaque réaction de PCR sont introduits dans des bactéries DH5α compétentes par choc thermique à 37°C. Les clones bactériens obtenus sont lysés puis purifiés pour être caractérisés par cartographie enzymatique. Les clones positifs sont entièrement séquencés pour confirmer chaque mutation et vérifier leur intégrité. Les vecteurs ADN mutants choisis sont amplifiés et purifiés pour les utiliser lors des expériences de transfections cellulaires.

2.11. Enregistrements électrophysiologiques

Pour les enregistrements électrophysiologiques, nous avons utilisé la technique de voltage imposé, dans la configuration dite "cellule entière" du patch-clamp (Whole-cell patch-clamp). A partir de capillaires en borosilicate, les micropipettes sont étirées et polies sur une étireuse DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instrument GmH, Munchen, Germany) afin d'obtenir une résistance de 2 à 3 MΩ. Les signaux sont amplifiés par un Axopatch 200 B (Axon Instruments, Inc., Forster City, CA, USA) et filtrés à 1 ou 2 kHz au travers d'un filtre Bessel passe-bas à 4 pôles, intégré à l'amplificateur. Les signaux sont ensuite digitalisés à 2 ou 5 kHz avec une interface Digidata 1200 (Axon Instruments, Inc.) et sauvegardés sous forme de fichiers sur un PC grâce au programme Clampex 8 (pClamp 8, Axon Instruments, Inc.). Leur analyse est effectuée "off line", également avec le programme pClamp 8 (Clampfit 8).

Les courants capacitifs transitoires (dus au chargement de la pipette et de la membrane cellulaire) ainsi que la résistance en série (résultant de la combinaison de la résistance de la pipette avec celle d'accès à la cellule) exercent une influence délétère sur la qualité et la précision des enregistrements en voltage-clamp sur cellule entière. Afin d'en minimiser l'influence, nous avons utilisé des circuits intégrés à l'amplificateur. L'électronique de l'Axopatch 200B permet en effet de réduire, voire d'annuler, l'amplitude des capacitances de pipette et de membrane par la technique de la "Negative capacitance" et également de compenser, en partie du moins, les erreurs dues à la résistance en série par deux méthodes connues sous les noms de "Positive feedback ou Correction" et de "Supercharging ou

Prediction". Comme les cellules en culture, utilisées pour l'enregistrement en électrophysiologie, ont une forme quasi-sphérique, les deux méthodes ont pu être appliquées efficacement pour compenser d'environ 75-80 % les résistances en série lors des enregistrements en cellule entière.

Afin d'enregistrer les courants potassiques présents sur les cellules, et en particuliers les courants K_{ATP} , nous avons choisi de travailler avec les solutions de compositions suivantes (en mM):

- solution extracellulaire: 145 NaCl; 3 KCl; 2 CaCl₂; 2 MgCl₂; 10 Hépès; 10 D-glucose, pH: 7.2 (NaOH).
- solution intra-pipette: 10 NaCl; 140 KCl; 1 MgCl₂; 10 Hépès; 1 EGTA; 1 Mg-ATP; pH: 7.2 (KOH).

Les substances sont diluées extemporanément dans la solution extracellulaire à partir de solutions stocks (x1000) congelées, et le pH ajusté si nécessaire. Elles sont administrées par un système de perfusion gravitationnelle fabriqué au laboratoire, commandé par des électrovannes, et qui permet l'application séquentielle de 2 à 10 solutions différentes avec une vitesse de changement inférieure à la seconde. Toutes les expériences sont effectuées à température ambiante (20-22°C). Dans les conditions expérimentales décrites, le potentiel d'équilibre pour les ions potassium (E_{K^+}) était d'environ de - 82 mV.

2.12. Culture organotypique d'hippocampe

Les cultures organotypiques d'hippocampe sont préparées d'après la méthode décrite par (Stoppini et al. 1991).

Sur des rats nouveau-nés de 7 jours, on prélève les hippocampes. On coupe au *chopper* chaque hippocampe en tranche de 200-400 µm d'épaisseur. Les tranches choisies sont placées sur des confettis de 8 mm (membrane Millipore FHLC 04700) qu'on pose sur un insert (millipore PICM 03050), puis dans une boîte à 6 puits (Falcon 3046), contenant 1 ml de milieu de culture avec la composition suivante:

MEM HS 25 %

	<u>100 ml</u>	
Mem 2x ^T	25 ml	(Amimed 1-33P05 %, Bioconcept, dans 500ml pour du 2X)
Tris 5mM final	60 mg	(Fluka 93362)
Penstrep	1 ml	(Gibco 043-05140H)
NaHCO ₃ 7,5 %	460 µl	
H ₂ O stérile	ad 50 ml	
Horse serum	25 ml	(Gibco 26050-047)
Hank's 1x	25 ml	(Gibco 14060-040 dilué 10x avec de l' H ₂ O)

La boîte de culture est placée dans un incubateur à 37°C avec 5 % de CO₂ pendant 4 jours et ensuite transférée dans un autre incubateur à 33°C avec 5 % de CO₂.

2.13. Epreuve d'hypoglycémie-anoxie

Les cultures organotypiques d'hippocampe croissent en culture pendant 11-14 jours avant l'expérience elle-même. On procède alors à l'épreuve d'anoxie - hypoglycémie dans une chambre interface air-liquide adaptée à ce type d'expérimentation. On dépose les cultures à l'intérieur de la chambre sur une membrane sous laquelle on peut perfuser des solutions, contrôler la température et diffuser des gaz. L'anoxie - ischémie consiste à substituer de l'azote (N₂) à l'oxygène (O₂) et du saccharose au glucose durant 10 minutes. Pour cela, on utilise une perfusion continue d'un milieu de composition suivante: (en mM, 124 NaCl, 1.6 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 24 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, 10 saccharose, et 2 acide ascorbique, pH 7.4, à 32°C). Après les 10 minutes d'anoxie - hypoglycémie les cultures retournent à leur milieu de culture habituel et sont remises dans l'incubateur.

2.14. Coloration au iodure de propidium (Propidium Iodide ou PI)

L'iodure de propidium (PI ; Sigma) est un marqueur fluorescent pour les acides nucléiques. Nous utilisons le PI pour estimer le taux de mort cellulaire dans les cultures organotypiques d'hippocampe.

Les cultures sont exposées au PI, 5 µg/ml, pendant 20 minutes et ensuite observées au microscope à fluorescences (Axioscop 2, Zeiss, Germany). Avant chaque expérience d'anoxie-ischémie les cultures sont colorées au PI pour évaluer leur état. Seules les cultures où les cellules n'étaient pas colorées, ou très faiblement colorées, ont été utilisées dans les expériences. On effectue une nouvelle coloration au PI et on examine les cultures 2, 24 et 48 heures après l'épreuve d'ischémie, pour estimer le degré de mort cellulaire. A chaque temps, une photo est prise à l'aide d'une caméra numérique (Axiocam, Zeiss, Germany) en maintenant strictement constant l'agrandissement et le temps d'exposition. L'intensité de la coloration est visualisée et analysée dans le programme Adobe PhotoShop® 7.

2.15. Marquage du zinc

Pour identifier les structures contenant du zinc deux méthodes ont été utilisées, la coloration de Timm et la coloration TSQ.

Coloration Timm

La coloration de Timm, décrite pour la première fois en 1958 (Timm 1958) consiste à marquer Zn, Cu, Fe et Pb dans le tissu nerveux, mais aussi dans les autres tissus par précipitation du complexe sulfure/argent (Danscher 1981; Haug 1967; Timm 1958). La perfusion avec du sulfure d'hydrogène provoque la formation des complexes insolubles de métal-sulfure. Les dépôts d'ions d'argent réduit permettent la visualisation de ces complexes en microscopie optique ainsi qu'en microscopie électronique (voir exemple de marquage dans la Fig.1.3.1.). On a utilisé cette technique afin d'évaluer la quantité de zinc présente dans les cultures organotypiques d'hippocampe traitées ou non de manière chronique avec du zinc (100 nM).

Solutions pour la coloration de Timm

Solution sulfure de sodium 0.37%

	1 Litre	500 ml	250 ml
Na ₂ S	11.7 g	5.85 g	2.925 g
NaH ₂ PO ₄	11.9 g	5.95 g	2.975 g

Gomme arabique

	1 Litre	500 ml	250 ml
	500 g	250 g	125 g

Solution citrate

	40 ml	20 ml	10 ml
Citrate de sodium	9.4 g	4.7 g	2.35 g
Acide citrique	10.2 g	5.1 g	2.55 g

Solution hydroquinone

	120 ml	60 ml	30 ml
	6.8 g	3.4 g	1.7 g

Nitrate d'argent

	2.5 ml	1.25 ml	0.625 ml
	425 mg	212.5 mg	106.25 mg

Développeur

	200 ml	100 ml	50 ml
Gomme arabique	120 ml	60 ml	30 ml
Sol. citrate	20 ml	10 ml	5 ml
Sol. hydroquinone	60 ml	30 ml	15 ml
* Nitrate d'argent	1 ml	0.5 ml	0.250 ml

*** Le nitrate d'argent est rajouté au dernier moment à l'abri de la lumière**

Les tranches des cultures organotypiques d'hippocampe sont tout d'abord fixées dans une solution de glutaraldehyde de 3% dans du PBS et ensuite incubées dans une solution de 0.37% de sulfure de sodium, puis soumises à 3 lavages au PBS d'une durée de 30 min chacun. La révélation s'effectue dans l'obscurité pendant 30-45 minutes à la température ambiante. Le précipité d'une couleur brun foncé se forme dans les structures contenant du zinc. Cette technique ne permet pas une appréciation quantitative du zinc contenu dans les structures étudiées.

Coloration TSQ

Un autre moyen d'apprécier la présence du zinc dans les tissus est la méthode de marquage en fluorescence TSQ, décrite précédemment par (Frederickson et al. 1987). Cette technique permet la visualisation semi-quantitative du zinc en fluorescence dans les tissus frais.

Le TSQ (N-[6-methoxy-8-quinoly]-p-toluenesulfonamide) provient de Molecular Probes, Eugene, OR. Le tissu non fixé est incubé dans une solution tampon (140 mM barbital de sodium et 140 mM ; acétate de sodium au pH 10) contenant 4,5 μ M de TSQ (dissous dans de l'éthanol chaud) pendant une période de 60 secondes. Après un rinçage dans du PBS, la fluorescence TSQ est révélée en utilisant un filtre ultraviolet (excitation 355-375 nm). L'image est prise à l'aide d'une caméra numérique (Axiocam, Zeiss, Germany) en maintenant strictement constant l'agrandissement et le temps d'exposition. L'avantage de cette technique est qu'on utilise du tissu non fixé.

3. RESULTATS et DISCUSSIONS

3.1. Les synaptosomes des fibres moussues d'hippocampe, morphologie et fonctionnement

Microscopie électronique

Les synaptosomes des fibres moussues de l'hippocampe de rat ont été identifiés en utilisant la microscopie électronique conventionnelle. Sur les coupes fines de la préparation, on peut voir de nombreuses terminaisons nerveuses de taille importante, en moyenne 3-5 μm de diamètre (Fig. 3.1.1.). Ces synaptosomes proviennent, selon toute vraisemblance, des terminaisons nerveuses des cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe, les fibres moussues, connues pour leur grande taille (Amaral and Witter 1989). A l'intérieur de ces synaptosomes, on observe une grande densité de vésicules synaptiques au centre clair, ainsi que des mitochondries. Une faible proportion des vésicules synaptiques sont d'une taille plus importante et apparaissent opaques en microscopie électronique. Il s'agit de vésicules "à cœur dense", présentes dans ces terminaisons et qui passent pour contenir des neuropeptides (Laslop and Mahata 2002). Certains synaptosomes enserrent un ou plusieurs éléments postsynaptiques qui présentent à leur surface des épaissements membranaires, ou "densités postsynaptiques", dus à la présence de récepteurs et d'autres protéines (Fig. 3.1.2.A. et B.). Ces éléments postsynaptiques sont certainement les excroissances dendritiques décrites pour la première fois par (Cajal 1911) appelées "thorny excrescences", et qui sont enveloppées par les fibres moussues. Ces formations épineuses postsynaptiques ont probablement été protégées par les terminaisons présynaptiques pendant la préparation des synaptosomes.

Le terme de fibres moussues est aussi utilisé pour les terminaisons géantes des neurones du pont aboutissant dans le cervelet (Glickstein 1997), en contact avec les cellules de Purkinje. La Figure 3.1.2.C. et D. montre des synaptosomes de fibres moussues du cervelet préparés suivant le même protocole.

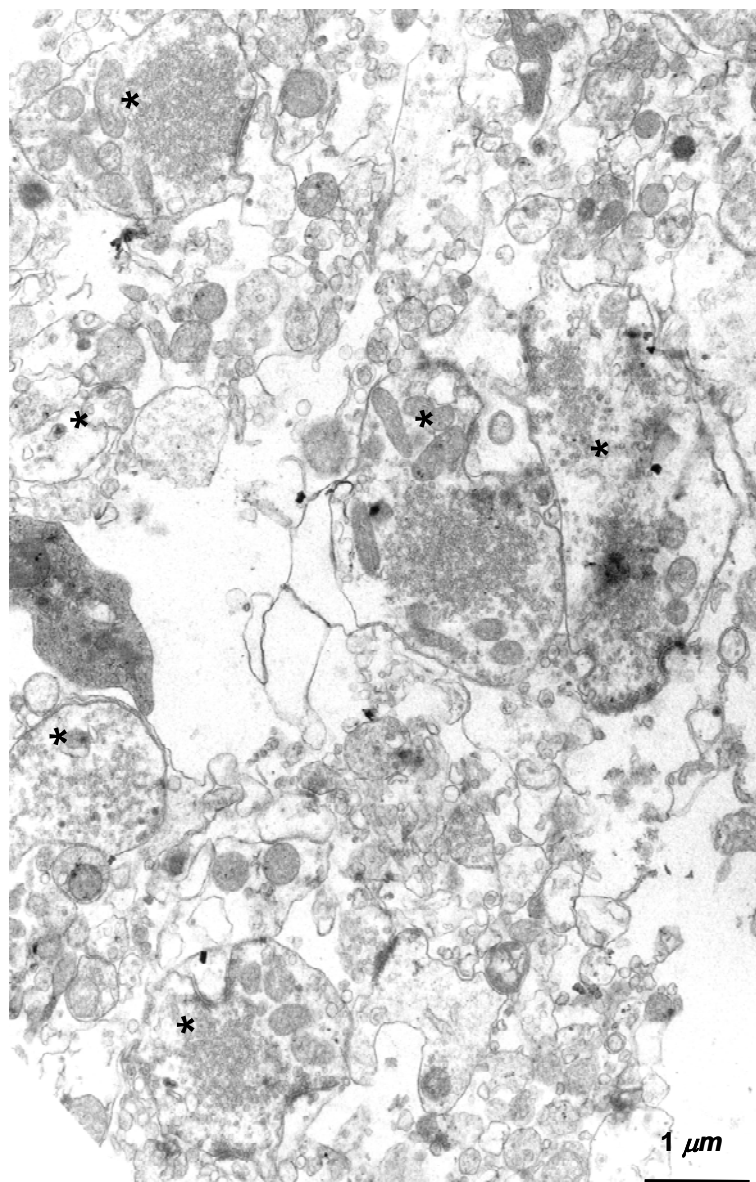


Figure 3.1.1. *Synaptosomes des fibres moussues d'hippocampe de rat.* Image en microscopie électronique conventionnelle à faible grossissement de la préparation. Après sédimentation de la préparation, le culot a été fixé et examiné en microscopie électronique conventionnelle. Les astérisques indiquent des fibres moussues reconnaissables grâce aux éléments montrés sur la Figure 3.1.2.

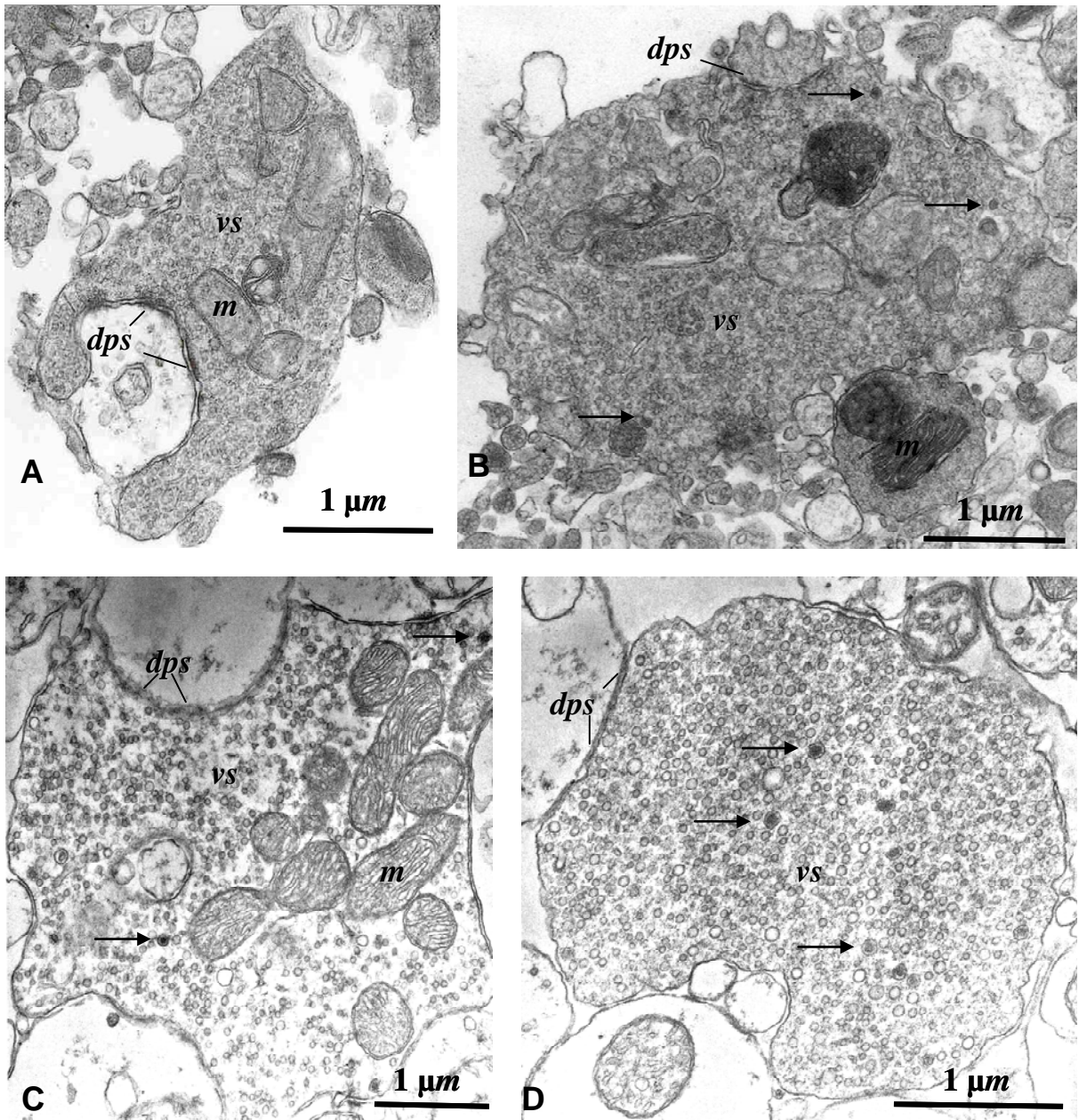


Figure 3.1.2. Images en microscopie électronique conventionnelle de synaptosomes des fibres mossues d'hippocampe (A, B) et du cervelet (C, D) de rat.

A l'intérieur des synaptosomes, on aperçoit des mitochondries (*m*), d'abondantes vésicules synaptiques (*vs*), quelques vésicules à cœur dense (*flèches*). Des fragments d'épines dendritiques postsynaptiques ont été arrachés avec les fibres mossues. Elles conservent leurs connexions synaptiques qu'on peut identifier grâce aux densités pré- et postsynaptiques (*dps*).

Le potentiel de membrane

En utilisant une sonde fluorescente, la carbocyanine di-S-C3(5), on peut suivre, en continu, les changements du potentiel de membrane (PM) des synaptosomes des fibres moussues (Fig.3.1.3.A. et B.). Environ 5 min après l'addition de 5-8 μM de di-S-C3(5) à la suspension de synaptosomes (5 mg/ml protéines), la ligne de base se stabilise à un niveau qui résulte probablement d'une répartition critique de la sonde entre les milieux intra- et extracellulaires. On peut diminuer le PM des synaptosomes des fibres moussues (dépolariation) en augmentant le KCl extracellulaire. On observe alors une corrélation étroite entre les changements du PM et la concentration du potassium extracellulaire. Plus on rajoute du potassium, plus on dépolariise les terminaisons des FM et plus le signal fluorescent augmente. A la fin de chaque enregistrement, on rajoute 2 μM de gramicidine afin d'estimer la valeur zéro du PM. En effet, la gramicidine est un antibiotique qui forme des pores perméables aux ions monovalents, ce qui permet de mesurer la valeur de fluorescence correspondant à un PM de 0 mV, par l'annulation des gradients ioniques qui le maintiennent.

L'administration de valinomycine, un ionophore spécifique pour le potassium, permet de calculer les valeurs du potentiel de membrane en utilisant l'équation de Nernst, car après son administration le potentiel de membrane suit le potentiel d'inversion du potassium. On a pris pour la concentration intracellulaire du potassium 140 mM, et pour concentration extracellulaire, celle du potassium rajouté dans le tube d'expérience plus celle déjà présente dans le milieu. Dans la figure 3.1.5.A. on a représenté sur une échelle logarithmique les valeurs de fluorescence correspondant à différentes concentrations de potassium. Les valeurs du PM sont pratiquement identiques avec et sans valinomycine, pour autant que la concentration extracellulaire de K^+ soit supérieure à 5 mM. Cela s'explique très probablement par l'ouverture de canaux potassiques voltage-dépendants lorsque les synaptosomes sont dépolariés. En utilisant la valinomycine, la variation de fluorescence est linéaire en fonction du logarithme du K^+ extracellulaire. En convertissant les valeurs de ΔF en mV par l'équation de Nernst, on a pu déterminer que le potentiel de repos initial des synaptosomes de FM était de -82.35 ± 3.1 mV (n=8). D'autres variations du PM, notamment celles provoquées par la 4-aminopyridine, ont été quantifiées de la même manière (vide infra).

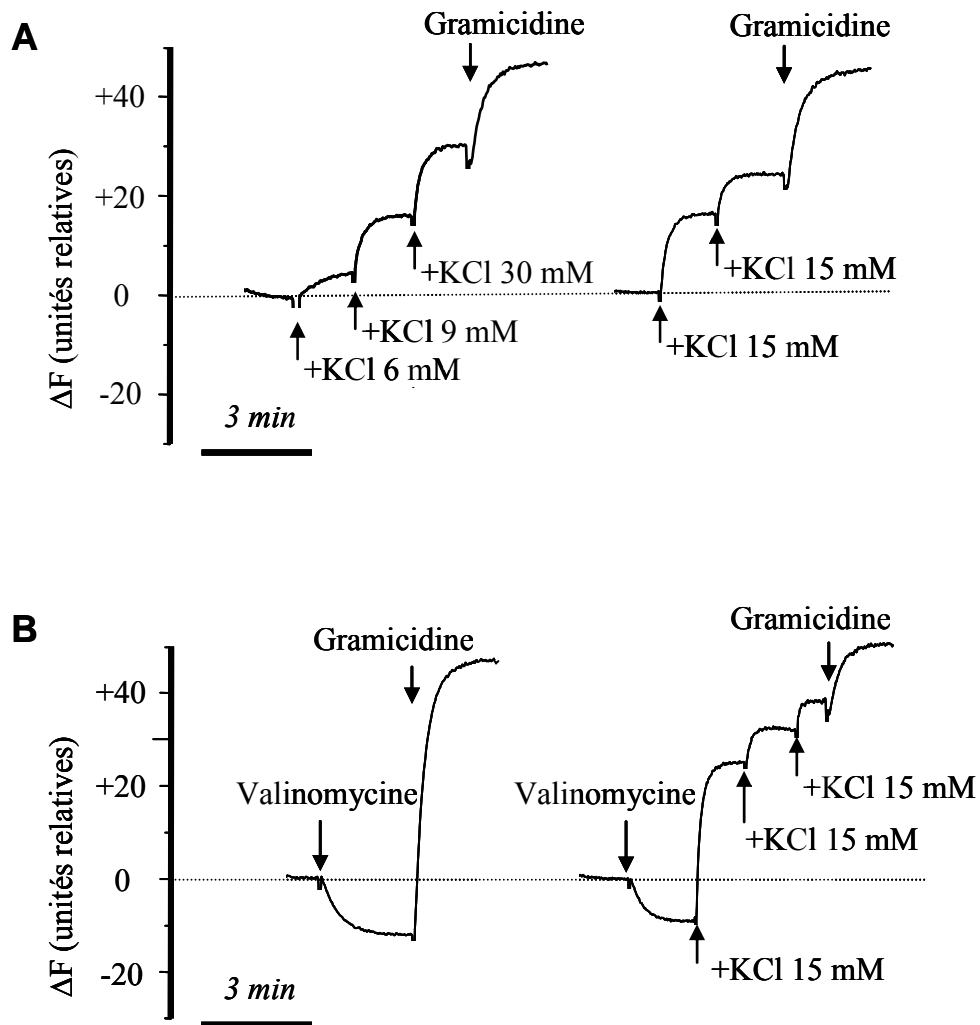


Figure 3.1.3. Mesure en fluorescence du potentiel de membrane des SFM en utilisant la sonde di-S-C3(5), 5 μM .

(A). L'ajout de différentes quantités de KCl augmente le signal fluorescent. L'administration, à la fin des enregistrements, de gramicidine (2 μM), un ionophore pour les cations monovalents, induit une augmentation maximale du signal, ce qui permet d'identifier le signal fluorescent correspondant à la valeur de 0 mV.

(B). Après l'administration de valinomycine (0.5 μM), un ionophore spécifique pour le K^+ , le signal fluorescent diminue. Dans cette condition, le signal fluorescent suit le potentiel d'inversion du potassium. Il en va ainsi lorsqu'on augmente graduellement le K^+ extracellulaire. Les niveaux de fluorescence obtenus permettent de calculer le PM en utilisant l'équation du Nernst.

La libération de glutamate par le KCl

Les terminaisons des fibres moussues sont glutamatergiques. La technique de chimiluminescence permet la mesure, sur le mode continu ou discontinu, de la quantité de glutamate libéré par les terminaisons nerveuses. La figure 3.1.3.A illustre un exemple d'enregistrement en continu. La libération est induite par dépolarisation, en ajoutant 50 mM de KCl à la préparation (concentration finale 55,6 mM), en présence de 5 mM de CaCl₂. La dépolarisation qui s'ensuit provoque l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage et c'est l'entrée du calcium qui déclenche la libération du glutamate par les synaptosomes (Fig.3.1.4.A). La libération du glutamate par les FM est calcium-dépendante. En effet, le remplacement du calcium par le magnésium (Fig.3.1.4.B.) diminue la quantité de glutamate libéré (probablement parce que le magnésium bloque les canaux calciques voltage-dépendants). Dans ces conditions expérimentales, ce n'est pas l'augmentation de la pression osmotique qui détermine la libération. En effet, si on ajoute 50 mM de NaCl au lieu de KCl, les fibres moussues ne libèrent pas de glutamate (Fig.3.1.4.D.). La figure 3.1.4.C. montre une superposition des traces résultant de la libération du glutamate à différents degrés de dépolarisation. Plus la dépolarisation au KCl est importante, plus la quantité de transmetteur libéré est grande.

Corrélation entre la dépolarisation et la quantité de glutamate libéré

Dans les expériences de dépolarisation au KCl, on observe une corrélation entre le changement de potentiel de membrane et la quantité de glutamate libéré (Fig.3.1.5.). Comme le changement de PM mesuré par la carbocyanine, la libération de glutamate par les synaptosomes de fibres moussues est une fonction du logarithme de la concentration en KCl. De plus la gramicidine, qui conduit le PM à 0 mV, libère une quantité maximale de neurotransmetteur. Entre la dépolarisation des synaptosomes (en ΔmV) et la libération de glutamate (en pmol/mg protéines par 5 min) la relation est sigmoïde. Elle atteint 50 % de sa valeur maximale pour une dépolarisation atteignant -30 mV (Fig.3.1.5.C.).

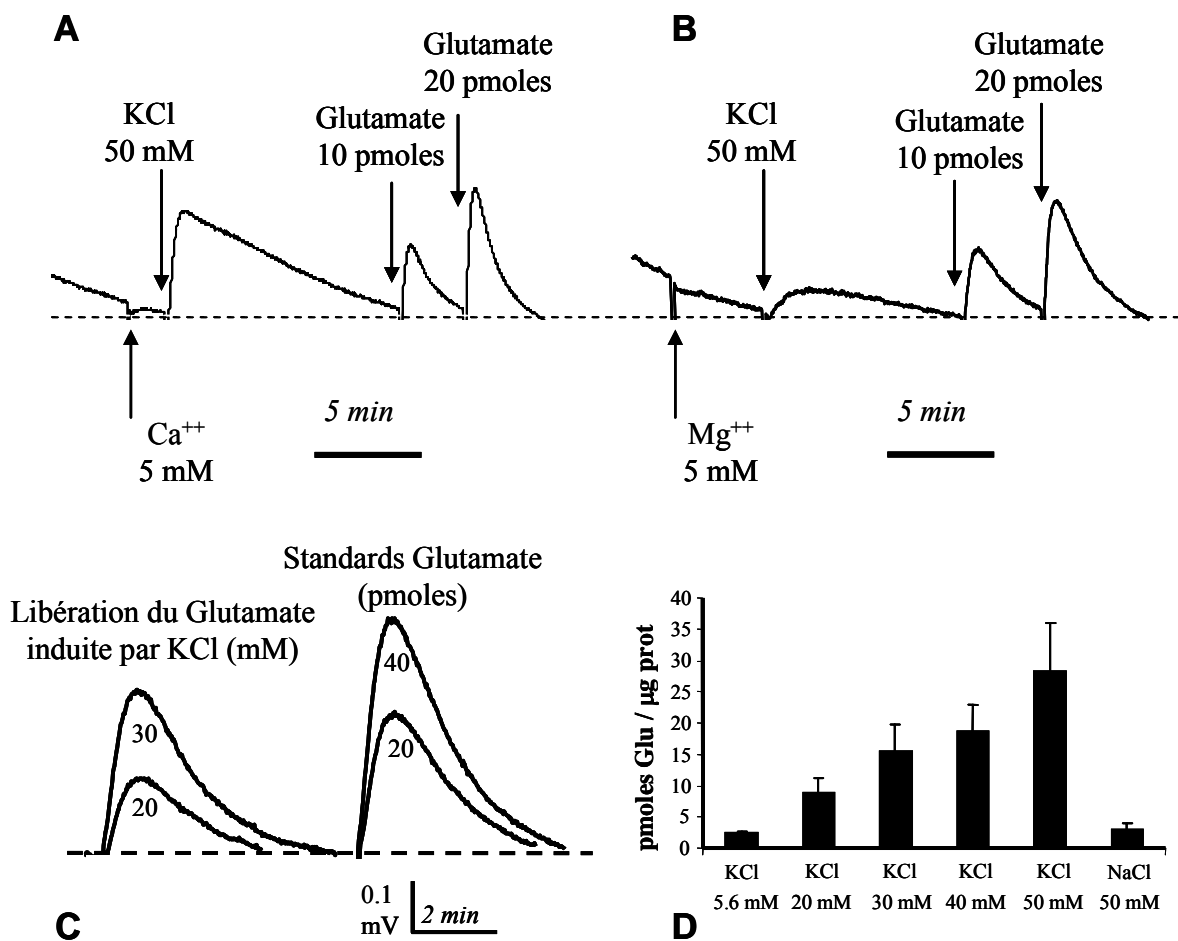


Figure 3.1.4. Libération de glutamate par des SFM in vitro.

(A). La libération est induite par dépolarisation au KCl (50 mM) en présence de calcium (5 mM) et mesurée en continu par la méthode luminométrique. (B). Même expérience, mais le calcium est remplacé par du magnésium (5 mM), ce qui diminue significativement la libération de glutamate. A la fin de chaque expérience, plusieurs doses standard de glutamate sont ajoutées pour quantifier la quantité de glutamate libéré. La figure C, représente la superposition des traces de libération en continu induites par deux quantités différentes de KCl, suivies de la superposition des réponses à des standards de glutamate. La figure D, représente la moyenne +SEM de la libération de glutamate en fonction de la quantité de KCl utilisée pour la déclencher. Durée de l'incubation : 5 min dans cette expérience en discontinu. Le remplacement équimolaire du KCl par le NaCl n'induit pas de libération.

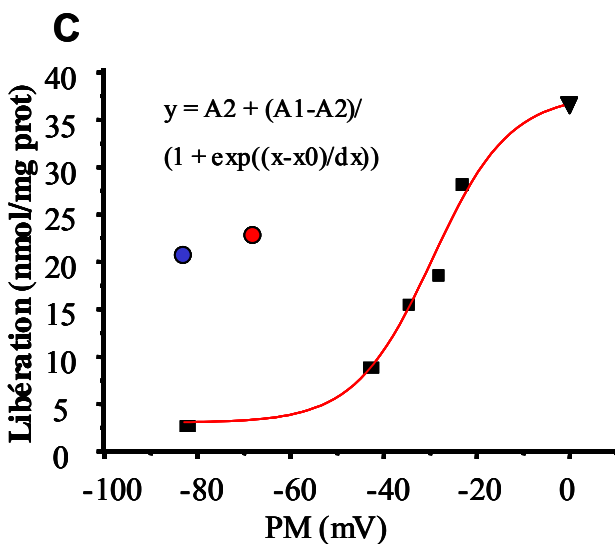
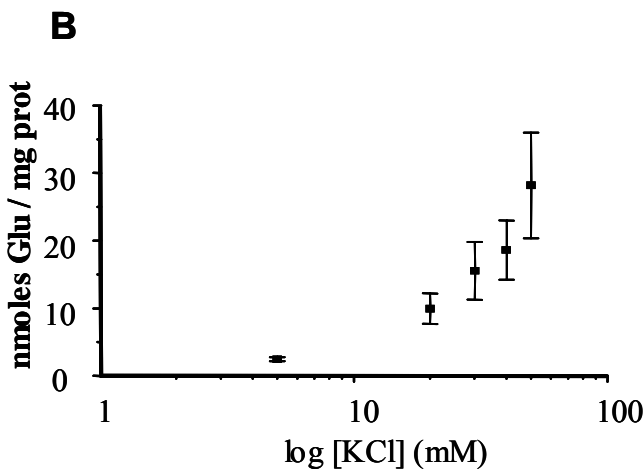
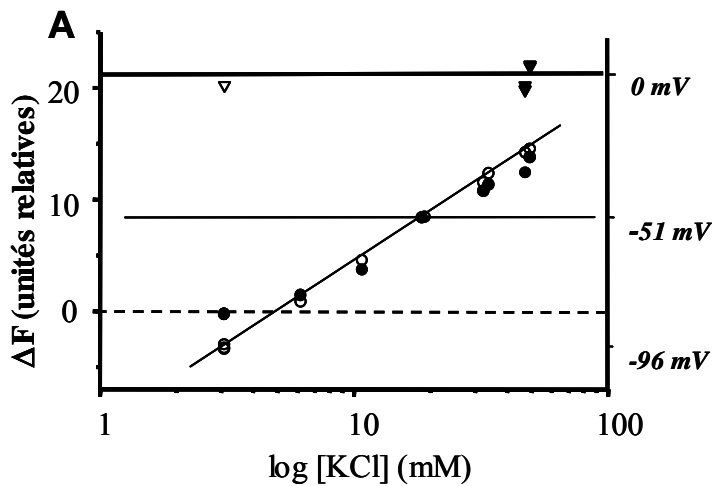


Figure 3.1.5. Relation entre le PM et la libération du glutamate par les SFM d'hippocampe.

La figure A représente la relation entre le PM mesuré en fluorescence (ΔF) et la concentration de KCl (échelle log). Les valeurs de ΔF (et donc de PM) sont mesurées en présence (○) ou en absence (●) de valinomycine. Les niveaux de fluorescence enregistrés après l'administration de gramicidine sont indiqués par des triangles vides avec valinomycine, et pleins sans valinomycine. L'équation de Nernst permet de convertir ΔF en mV pour la condition "valinomycine" (axe y de droite). Il y a une relation linéaire entre le PM et le $\log [KCl]$ pour les concentrations comprises entre 5.6 et 50 mM, que la valinomycine soit présente ou pas.

B. Relation entre la quantité de glutamate libéré (cf Fig. 3.1.3.D) et la concentration de KCl (échelle log; n=5).

C. Relation entre saut de dépolarisation (mV) et quantité de glutamate libéré (nmol/mg protéine). Les carrés correspondent aux valeurs de libération induite par le KCl, le triangle à la libération induite par la gramicidine. Le point bleu indique que la nicotine (25 μM) fait libérer le glutamate sans dépolariser les SFM (voir Section 3.2.). Le point rouge indique la libération induite par la 4-AP (1 mM).

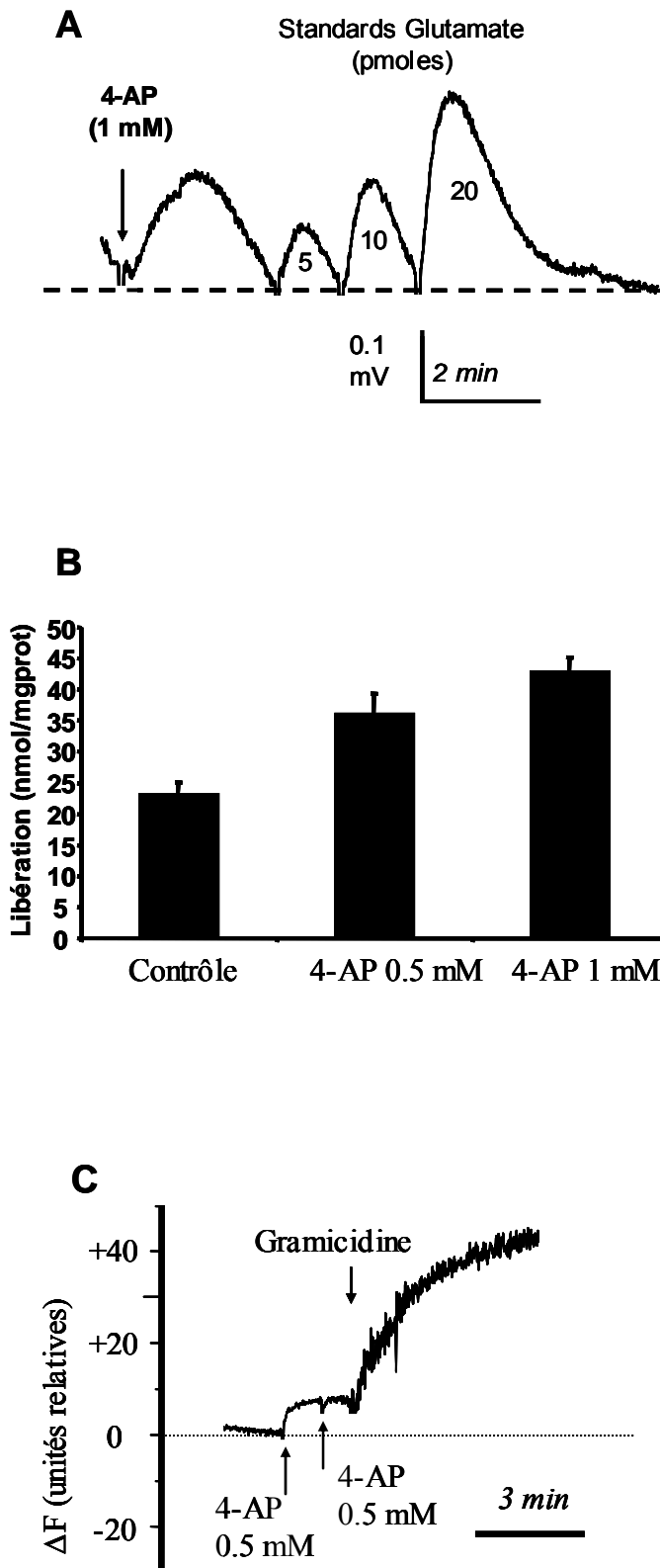


Figure 3.1.6. Effets de la 4-aminopyridine (4-AP) sur la libération de glutamate et le PM des SFM.

A. Trace luminométrique décrivant en continu la libération de glutamate induite par la 4-AP (1 mM), suivie de plusieurs doses standards de glutamate (pmoles).

B. Libération de glutamate induite par 0.5 (n=2) et 1 mM (n=5) de 4-AP, comparée à la valeur contrôle (n=5). Mesure par la méthode de luminescence en discontinu. Temps d'incubation : 5 min. La quantité mesurée sans stimulation représente principalement le glutamate amené dans le tube de mesure avec l'échantillon de SFM.

C. Effet de la 4-AP sur le potentiel de membrane. Mesure par la carbocyanine di-S-C3(5), 5 μ M. L'administration d'une dose de 4-AP (0.5 mM) entraîne une dépolarisation significative, tandis que la gramicidine conduit le PM à 0 mV.

La 4-aminopyridine (4-AP)

La libération de glutamate par les synaptosomes des fibres moussues peut être déclenchée par d'autres moyens pharmacologiques. En particulier la 4-aminopyridine (4-AP), un bloqueur des canaux potassiques dépendants du voltage, induit une dépolarisation modérée qui conduit à une libération importante de transmetteur. Avec 1 mM 4-AP, la dépolarisation atteint 13.8 ± 0.07 mV, (Fig.3.1.6.C.). Au contraire de la dépolarisation induite par le haut KCl, la 4-AP ne change pas la valeur du potentiel d'inversion pour les ions potassiques, qui reste proche d'un niveau physiologique. La Figure 3.1.6.A. donne un exemple de libération en continu déclenchée par la 4-AP (1 mM) en présence de CaCl_2 (2.2 mM), suivie des standards de glutamate. Il faut noter qu'à dépolarisation équivalente, la 4-AP fait libérer plus de glutamate que le KCl (Fig.3.1.6.C.).

Discussion : Les fibres moussues comme outil expérimental

La préparation des synaptosomes des fibres moussues utilisée dans ce travail est loin d'être pure et homogène puisqu'elle consiste simplement en une fraction nucléaire brute, contenant des noyaux, des membranes myélinisées ou non, et d'autres éléments. Elle s'est révélée cependant parfaitement adéquate par rapport aux objectifs de notre recherche pour les raisons suivantes.

La microscopie électronique révèle une proportion importante de grandes terminaisons nerveuses dont l'aspect correspond en tout point à la morphologie des fibres moussues *in situ* et à la description de fractions synaptosomales plus purifiées que celle que nous avons utilisées (Taupin et al. 1994b; Taupin et al. 1994a; Terrian et al. 1988). Sur 40 terminaisons nerveuses analysées sur des images à faible grossissement, nous avons mesuré une longueur moyenne de 2.05 ± 0.2 μm et certaines d'entre elles avaient une taille atteignant les 8 μm . Surtout les SFM utilisés ont montré d'excellentes capacités fonctionnelles. Le potentiel de membrane mesuré au repos (en début d'expérience) atteint une valeur de -82 mV, proche de la valeur attendue dans les conditions *in situ* et beaucoup plus élevée que le PM mesuré sur d'autres fractions synaptosomales (Blaustein and Goldring 1975; Meunier 1984).

D'autre part, la préparation des SFM utilisée dans nos expériences libère une quantité substantielle de glutamate en réponse soit à la dépolarisation au KCl (voir (Helme-Guizon et

al. 1998)), soit à celle provoqué par la 4-AP. Il existe une excellente cohérence entre le potentiel de membrane et la quantité de glutamate libéré (voir Fig 3.1.5.). Nous avons constaté que le fait d'ajouter une centrifugation, dans le but d'améliorer la pureté de la fraction diminuait fortement les capacités fonctionnelles des SFM et tout particulièrement la libération du glutamate.

La libération de glutamate par les fibres moussues est d'ordinaire mesurée suite à une dépolarisation au potassium. Nous avons cependant, dans ce travail, cherché à induire la libération du glutamate sans affecter l'équilibre du potassium. La 4-AP, un inhibiteur des canaux potassiques dépendant du voltage, s'est révélée un outil de choix pour dépolariser assez les synaptosomes et déclencher une libération de glutamate. Des travaux précédents (Tibbs et al. 1989b) effectués sur des synaptosomes, avaient déjà montré que la 4-AP provoquait une dépolarisation et une libération de glutamate. Nous avons confirmé ces observations en enregistrant le PM à l'aide d'une sonde fluorescente et en mesurant la libération du glutamate par la méthode de chimiluminescence. La 4-AP est inefficace en bas sodium ou en présence d'un inhibiteur des canaux sodique comme la vératridine (Tibbs et al. 1989a). La libération de glutamate par la 4-AP serait due à une entrée de calcium par des canaux calciques voltage-dépendants. La quantité de calcium accumulé suite à une dépolarisation induite par 1 mM de 4-AP est équivalente à celle que provoque 30 mM de KCl (Tibbs et al. 1989a). Dans nos conditions expérimentales la libération induite par l'application de la 4-AP est supérieure à celle observée dans les autres travaux (voir Fig.3.1.5.C.), confirmant encore une fois que la préparation de SFM utilisée dans ce travail est dans un excellent état métabolique. En utilisant la 4-AP pour déclencher la libération, on ne change pas la concentration du potassium dans le milieu extracellulaire. En d'autres termes, on ne modifie pas le potentiel d'équilibre du potassium. Cela permet d'étudier les changements de libération du glutamate modulés par des conductances potassiques, comme c'est le cas du canal K_{ATP} . Nous avons vu que l'utilisation du KCl comme sécrétagogue ne permet pas de détecter l'implication de ces conductances potassiques.

Les fibres moussues pourraient très bien se prêter à une étude des mécanismes subcellulaires et moléculaires de la transmission glutamatergique, comme l'organe électrique de la torpille et la jonction neuromusculaire ont apporté des éléments décisifs à la connaissance de la transmission cholinergique. La transmission synaptique dans ces systèmes est très rapide et la libération du neurotransmetteur est quantique c'est-à-dire qu'elle s'effectue

sous la forme de « paquets » multimoléculaires. L'explication classique de ce quanta repose sur l'hypothèse vésiculaire qui stipule que le quantum correspond au contenu d'une vésicule synaptique libéré brusquement dans la fente synaptique par le processus d'exocytose (Katz 1969). Cette hypothèse continue à rencontrer beaucoup de succès bien qu'elle soit contredite par de nombreuses observations (pour revue voir Dunant et Israel (2000)). La taille des vésicules synaptiques est beaucoup plus grande dans l'organe électrique qu'à la jonction neuromusculaire mais celle du quantum est la même (environ 10000 molécules et une subdivision en dix sub-quanta). A la synapse FM/CA3 le quantum est très petit (10 pA) impliquant l'ouverture de quelques dizaines de récepteurs, pour laquelle 50 à 200 molécules de glutamate sont suffisantes. Dans les fibres moussues la taille de la vésicule synaptique est identique à celle de la jonction neuromusculaire (47 nm de diamètre ; voir tableau 3.1). Il nous est impossible dans le cadre de cette thèse d'aborder tous les aspects de cette controverse. Il nous suffira de rappeler que dans l'organe électrique de la torpille et probablement dans les autres synapses rapides un protéolipide de la membrane plasmique « le médiatophore » est indispensable pour assurer la libération calcium dépendante et quantique du transmetteur. Dans cette thèse nous nous sommes intéressé aux régulations de la libération du glutamate davantage qu'à ses mécanismes moléculaires.

Synapses	FM / CA3	Inhibition sur cellules en grains du gyrus denté	Organe électrique de torpille	J. Neuromusculaire de grenouille
Neurotransmetteur	GLU	GABA	ACh	ACh
Nb de zones actives sur une cell. postsyn.	1 – 27	?	3 10 ⁶	300
EPSP unitaire pour une fibre présyn. et une cellule postsyn.	6-42 quanta (m=16)	1-8 (?)	> 10 ⁶ quanta (1.3 q/μm ²)	300
Quantum : Taille Sous-unités	10 pA 133 pS ?	7-20 pA 200-400 pS ?	1-4 nA 75 nS environ 10	2 nA 30-50 nS environ 10 (7-15)
T montée (20-80%)	0.2 – 0.8 ms	<1 ms	0.19 ms	0.05 – 0.30 ms
T _{1/2} décours	4.8 ms	τ = 2 et 55 ms	0.45 ms	0.8 – 2.10 ms
Nb. de récepteurs activés	14 – 65	6 - 30	2000-3000 sous-unité : 200-300	1700 – 2500 sous-unité 170 - 250
Nb de molécules suffisantes pour un quantum	50 - 200	50 - 200	7 – 10'000 sous-unité : 1000	6 – 10'000 sous-unité 1000
Récepteur : Type courant	AMPA 0.6 pA 8.5 pS	GABA-A 14 et 23 pS	nAChR 1-4 pA 20-42 pS	nAChR 1 pA 30 pS
mean open time	3 ms	? (2 cinétiques)	0.6 - 1.3 ms	≈1- 3 ms:
Vésicules synaptiques. Nb de molécules NT	47 nm ?	? ?	80 nm env. 100-200'000	45 nm ?

Tableau 3.1. Comparaisons des propriétés électrophysiologiques et de l'organisation fonctionnelle de quatre synapses à fonctionnement ultra-rapide.

Pour la colonne FM/CA3 (Jonas et al. 1993), pour la colonne GABA : (Edwards et al. 1990), pour les colonnes organe électrique de la torpille et jonction neuromusculaire : (Dunant Y. communication personnelle).

3.2. Régulation de la libération de Glu par des récepteurs nicotiniques pré-synaptiques

Effet de la nicotine sur la libération de glutamate

L'administration de nicotine à la concentration de 25 μM sur des synaptosomes de fibres moussues induit une libération substantielle de glutamate. La figure 3.2.1.A. montre un enregistrement en continu de libération déclenchée par la nicotine.

En mesurant la libération de glutamate par les synaptosomes des fibres moussues en mode discontinu (incubation de 5 min en présence de nicotine et analyse du transmetteur dans le surnageant), on peut mieux quantifier la libération et déterminer comment l'ACh pourrait moduler la transmission en agissant sur les récepteurs nicotiniques présynaptiques. La libération est mesurée après soustraction de la valeur-témoin (blanc), correspondant à la quantité de glutamate analysée dans le surnageant de préparations non traitées par la nicotine. Ce « blanc » provient principalement du glutamate extracellulaire amené dans le tube avec les synaptosomes.

La figure 3.2.1.B. représente la dose-dépendance de l'effet de la nicotine sur la libération du glutamate par des SFM. L'effet maximal est obtenu pour 25 μM et correspond à environ 20 nmol/mg prot. L'augmentation de la dose de nicotine au-delà de 25 μM n'induit pas une augmentation de la quantité de glutamate libéré (résultat non illustré). Les 50 % de l'effet maximal de la nicotine (ED_{50}) correspondent approximativement à 2.7 μM . Il s'agit donc de récepteurs nicotiniques à relativement haute affinité.

Effet de la nicotine sur le PM des fibres moussues

La nicotine déclenche-t-elle la libération de glutamate en dépolarisant les fibres moussues ? Pour tester ce point, nous avons administré de la nicotine à des synaptosomes dont on mesurait le PM par une carbocyanine. A notre grand étonnement, il n'y eut aucune modification de la fluorescence (Fig.3.2.3.A). Or la quantité de glutamate libérée par 25 μM de nicotine équivaut à celle que produisent 30 mM de KCl.

L'administration concomitante de KCl 40 mM et la nicotine 25 μM ne libère pas des quantités significativement plus grandes de glutamate par rapport aux quantités libérées par le KCl 40 mM seul (Fig. 3.2.2.B.).

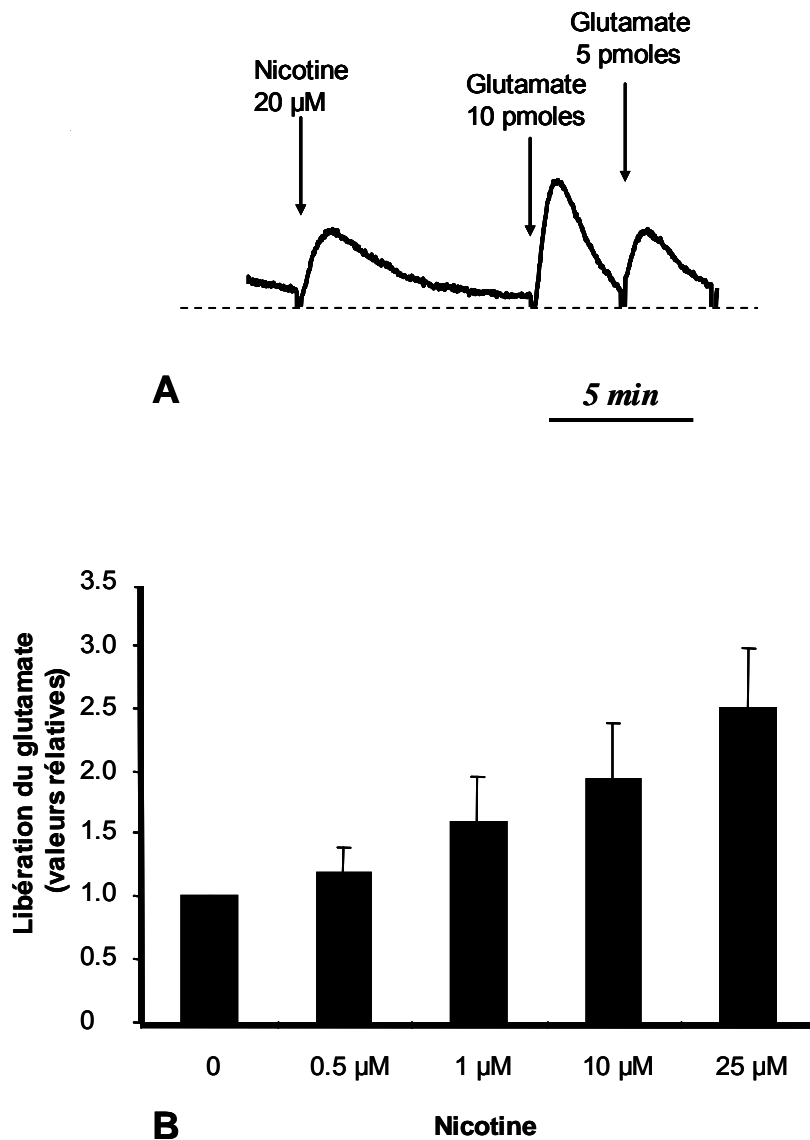


Figure 3.2.1. Effets de la nicotine sur la libération de glutamate par les synaptosomes des fibres moussues.

A. Trace luminométrique enregistrée en continu, résultant de la libération de glutamate par les SFM. L'application de la nicotine ($20 \mu\text{M}$) induit une augmentation du signal lumineux. Pour quantifier la quantité de glutamate libéré, des standards de glutamate ont été ajoutés.

B. Libération induite par différentes concentrations de nicotine ($n = 5-15$). Mesure en discontinu pour des temps d'incubation de 5 min. Des doses plus fortes de nicotine n'ont pas libéré des quantités plus grandes de glutamate. Cette relation effet-dose permet d'estimer la EC_{50} de la nicotine à environ $2.7 \mu\text{M}$.

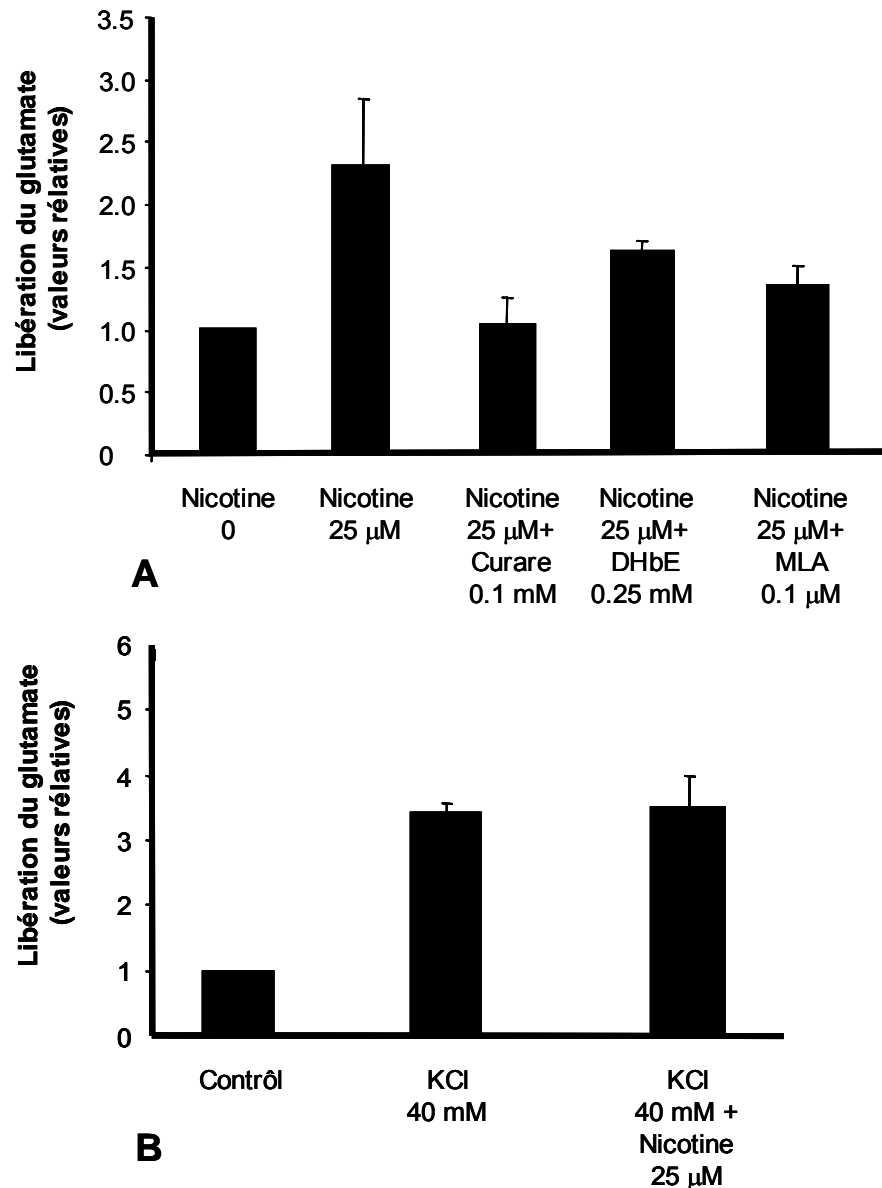


Figure 3.2.2. *Pharmacologie de l'effet de la nicotine sur la libération du glutamate. Méthode de luminescence en discontinu. Périodes d'incubation de 5 min.*

A. L'effet de la nicotine (25 µM) est pratiquement annihilé en présence de la tubocurarine (0.1 mM), un bloqueur non-spécifique des récepteurs nicotiniques (n=10). Il n'est que partiellement inhibé (réduction de 54 %) en présence de la DHbE (0.25 mM), un bloqueur préférentiel des récepteurs de type $\alpha 4\beta 2$ (n=4) et plus sérieusement (73 %) en présence de la MLA (0.1 µM; n=6), un bloqueur préférentiel des récepteurs nicotiniques de type $\alpha 7$.

B. La nicotine, à une concentration de 25 µM, ne modifie pas la libération du glutamate induite par dépolarisation au potassium (40 mM; n=4).

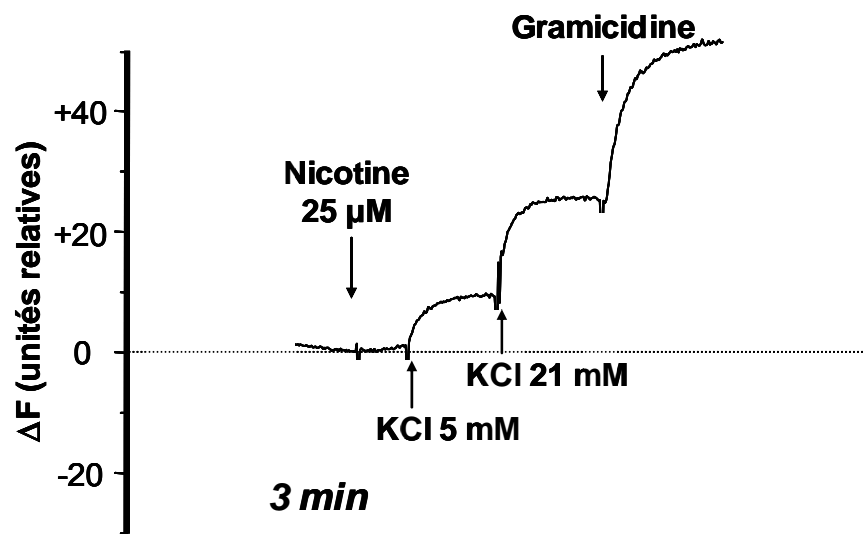


Figure 3.2.3. *Nicotine et potentiel de membrane*

Effet de la nicotine sur le potentiel de membrane des SFM, mesuré en fluorescence. La nicotine induisant une libération comparable à celle déclenchée par la dépolarisation au KCl (25 - 30 mM), nous avons voulu savoir si elle provoquait une dépolarisation du même ordre. La figure montre que ce n'est pas le cas. L'administration de nicotine (25 μ M) n'apporte aucune modification au PM, mesuré ici en fluorescence.

Sous-types de récepteurs nicotiniques

Un autre point important est la nature des récepteurs nicotiniques impliqués dans cet effet inducteur de la libération de glutamate. Nous avons abordé la question par une approche pharmacologique, en utilisant une batterie d'agents agonistes et antagonistes des récepteurs nicotiniques, et aussi en tentant d'identifier par immunocytochimie les récepteurs présents sur la membrane des fibres moussues.

L'effet de la nicotine sur la libération de glutamate est totalement bloqué par l'application concomitante de d-tubocurarine (0.1 mM) (bloqueur peu spécifique des récepteurs nicotiniques). La libération est réduite à 98 % du témoin. Pour identifier le sous-type de récepteur en jeu, nous avons testé la méthyllycaconitine (MLA ; 0.1 μ M) et la dihydro- β -érythroïdine (DH β E ; 0.25 mM). Le blocage s'est révélé partiel, le MLA réduisant la libération à 73 % et la DH β E à 54 (Fig.3.2.2.A.).

Identification morphologique des récepteurs sur les fibres moussues

Les récepteurs nicotiniques de type alpha-7 ont été marqués sur les SFM en utilisant la technique d'immunolocalisation à l'or colloïdal sur des préparations de microscopie électronique conventionnelle. L'anticorps utilisé est le anti-alpha-7 nAChR IgG de souris. La figure 3.2.4.A-C. montre que le marquage des récepteurs de type alpha-7 est très faible sur les synaptosomes des fibres moussues. Quelques récepteurs alpha-7 sont néanmoins clairement présents sur la membrane cytoplasmique, avec un site accessible par la face extracellulaire. Vu la forme et la taille des terminaisons sur lesquelles on a observé des grains d'or, on peut assurer que les marquages se trouvent bien à la membrane des fibres moussues (Fig.3.2.4.A-B.).

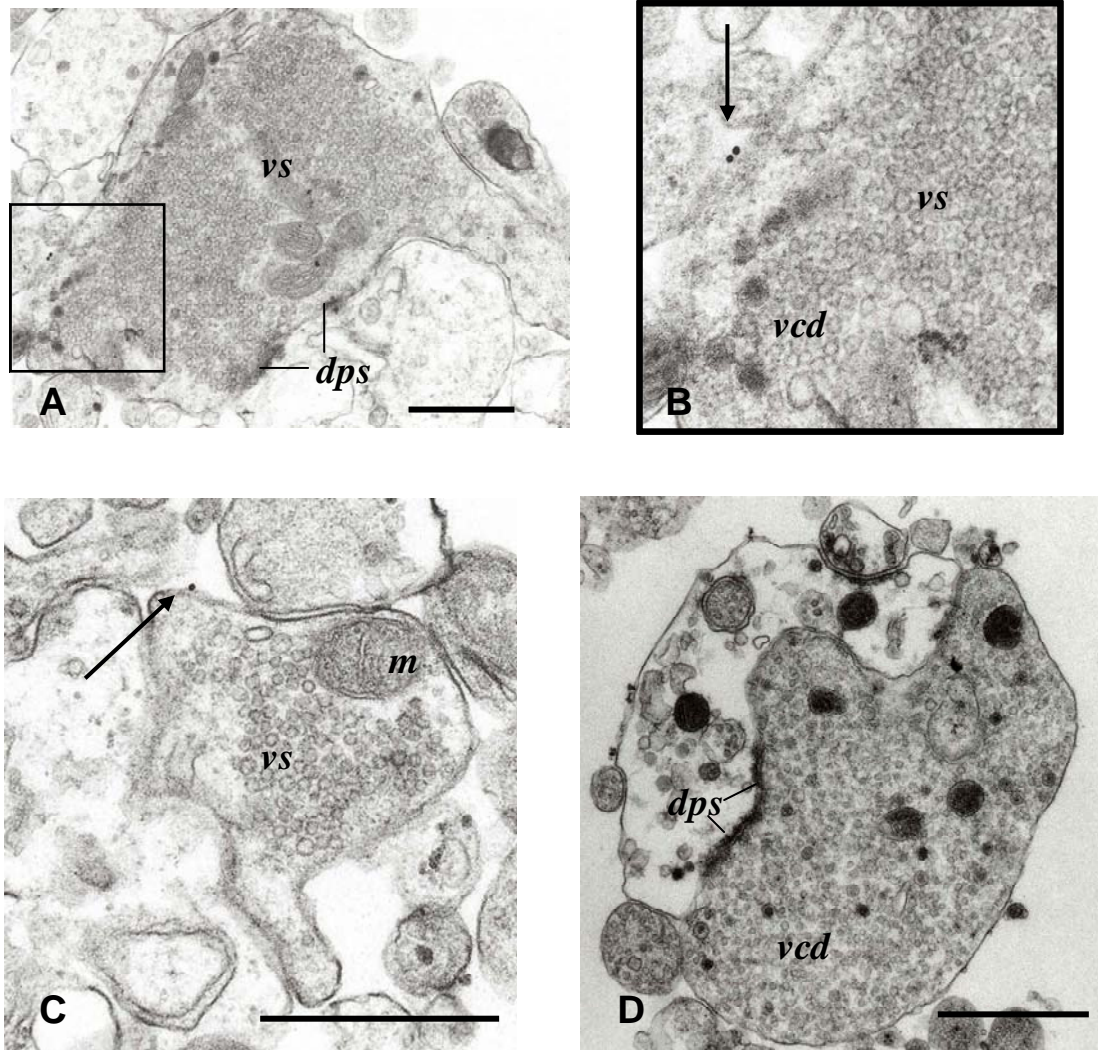


Figure 3.2.4. *Immuno-localisation en microscopie électronique des récepteurs nicotiniques de type $\alpha 7$ sur des synaptosomes des fibres moussues.*

A-C. Images en microscopie électronique conventionnelle de SFM marqués avec un anticorps anti- $\alpha 7$ en utilisant la technique de marquage à l'or colloïdal. **B.** agrandissement de la zone sélectionnée dans le carré de l'image A. On peut apercevoir des grains d'or à la membrane plasmique des SFM (flèches). **D.** Image de SMF du groupe contrôle, sans incubation avec l'anticorps primaire. Calibration 1 μ m.

A l'intérieur des SFM on peut identifier des vésicules synaptiques (*vs*), des mitochondries (*m*), des vésicules à cœur dense (*VCD*) et des densités pré- et postsynaptiques (*dps*).

Discussion : La nicotine et la libération du glutamate

Dix secondes après avoir fumé une cigarette, la concentration de la nicotine dans le sang atteint entre 0.2 et 0.8 μM (Henningfield et al. 1993). La consommation de plusieurs cigarettes pendant la journée chez un fumeur régulier maintient la concentration de la nicotine à des valeurs supérieures à 0.2 μM ce qui est proche des concentrations efficaces pour faire libérer le glutamate des fibres moussues de l'hippocampe ($\text{EC}_{50} = 2.7 \mu\text{M}$). Les effets que nous avons mesurés dans ce travail pourraient donc se rapporter aux effets de la nicotine dans le cerveau d'un fumeur.

Nicotine et fonctions mnésiques

D'autre part l'hippocampe est bien connu pour son implication dans les fonctions mnésiques et le fumeur cherche avec la nicotine à augmenter ses capacités de concentration intellectuelle et d'apprentissage. En effet, avant même son introduction dans la culture européenne, on considérait que le tabac améliorait la mémoire. Une des premières publications mentionnant les effets cognitifs de la nicotine date de 1659: *Panacea; or The Universal Medecine, Being a Discovery of the Wonderfull Vertus of Tobacco Taken in a Pipe, with its Operation and Use both in Physick and Chyrurgery*, par le Dr Giles Everard (Everard 1659).

Nicotine et libération des neurotransmetteurs

La fonction des récepteurs nicotiniques dans le SNC est loin d'être encore complètement élucidée. Il semble que la majorité de ces récepteurs soient présynaptiques c'est à dire situés sur les terminaisons nerveuses, et module la libération de différents neurotransmetteurs. Par exemple la nicotine stimule la libération de la dopamine dans le striatum, celle de la noradrénaline, du GABA et de l'ACh elle-même (autorécepteurs présynaptiques) dans l'hippocampe (Wonnacott 1997).

Nicotine et libération du glutamate

L'effet de la nicotine sur la libération du glutamate a été testé sur des synaptosomes du cortex de rat en utilisant un précurseur (D-Asp) radioactif. Les résultats obtenus dans ce travail démontrent sans équivoque en utilisant une préparation en excellent état physiologique que la nicotine en concentration micromolaire déclenche la libération du glutamate par les terminaisons nerveuses des fibres moussues de l'hippocampe.

Nous avons cherché à démontrer si cette libération était quantique en enregistrant en temps réel la libération de glutamate par les fibres moussues par la méthode de « sniffer cells » en utilisant des cellules pourvues de récepteurs au glutamate (HEK GluR1). Les résultats sont encore très préliminaires mais ils indiquent bien que la libération se fait de manière pulsatile, probablement quantique (Fig. 3.2.5.)

Les enregistrements faits *in situ* à la jonction des fibres moussues cellules pyramidales CA3 par Gray et collaborateurs ont révélé une augmentation de la fréquence des potentiels d'excitation postsynaptique sous l'action de la nicotine (Gray et al. 1996). Ces travaux *in situ* sont importants car ils confortent nos résultats et en démontrent l'intérêt physiologique.

Mécanisme d'action de la nicotine.

Lorsqu'on diminue la concentration du calcium, la libération du glutamate induite par la nicotine diminue. Nous avons donc été très surpris que la nicotine n'altère pas le PM. On ne peut exclure cependant que des dépolarisations transitoires, très rapides et localisées aient pu échapper à l'enregistrement par la sonde utilisée. Il semble ainsi peu probable que la nicotine agisse via des canaux calciques voltage-dépendants. Il reste deux possibilités : ou bien le calcium est entré par les récepteurs nicotinique eux-mêmes pour activer la libération ou bien on est en présence d'un mécanisme complètement inhabituel. Pour la première hypothèse, il est bien connu que plusieurs types des récepteurs nicotiniques sont perméables aux ions calcium (en particulier le type alpha 7).

Types des récepteurs impliqués dans l'effet de la nicotine.

Dans le travail de (Gray et al. 1996) la nicotine favoriserait la libération du glutamate par les fibres moussues *in situ* en agissant sur un récepteur nicotinique présynaptique de type alpha 7. Nos résultats pharmacologiques, encore préliminaires, suggèrent en outre que le sous-type $\alpha 4\beta 2$ de nAChR pourrait être également impliqué. Les résultats du marquage à l'or colloïdal ont relevé des sites antigéniques alpha 7 sur la membrane plasmique des SFM. Des expériences sont en cours pour rechercher d'autres sous-types des récepteurs nicotiniques.

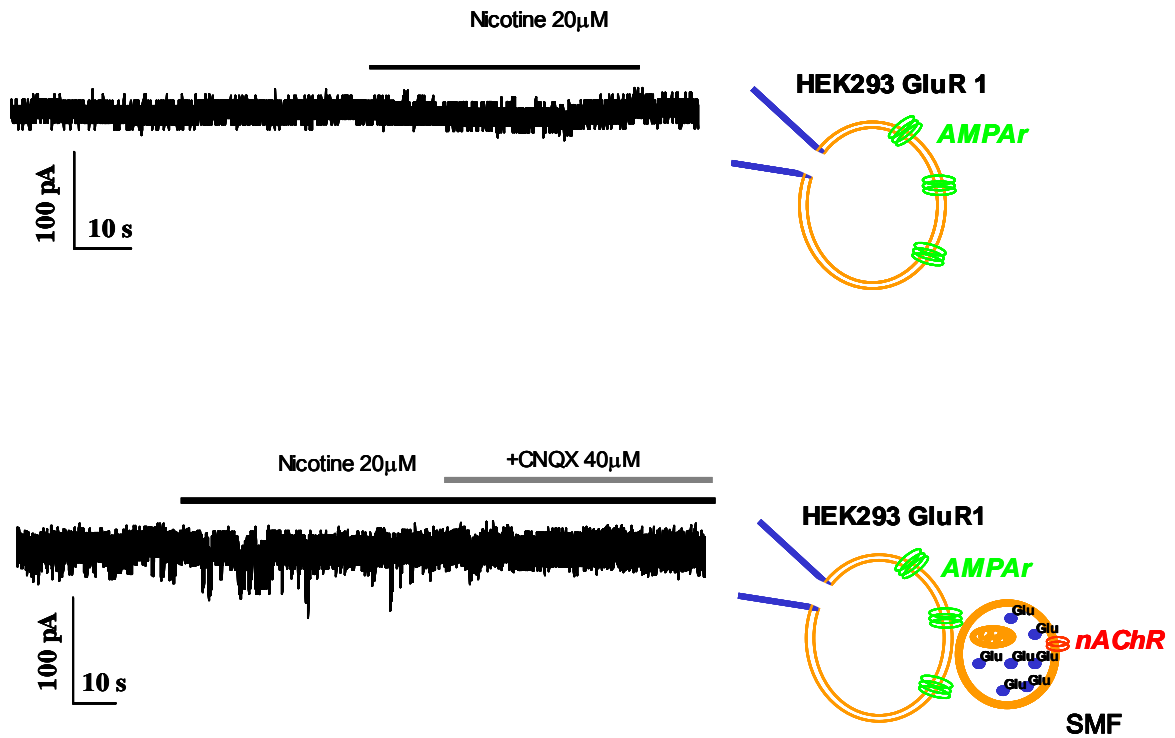


Figure 3.2.5. *Nature quantique de la libération du glutamate par les SFM.*

Une cellule HEK293T transfectée avec le récepteur au glutamate GluR1 est utilisée comme détecteur en temps réel de la libération de glutamate. **A.** L'application de nicotine (20 μM) directement sur la cellule détectrice, ne produit pas des réponses appréciables. **B.** Lorsque des SFM sont mises en contact avec la cellule détectrice le bruit de fond du courant enregistré augmente. L'administration de la nicotine (20 μM) fait apparaître des signaux discontinus d'une amplitude allant jusqu'à 50 pA, qui sont sensibles au CNQX. Expériences préliminaires.

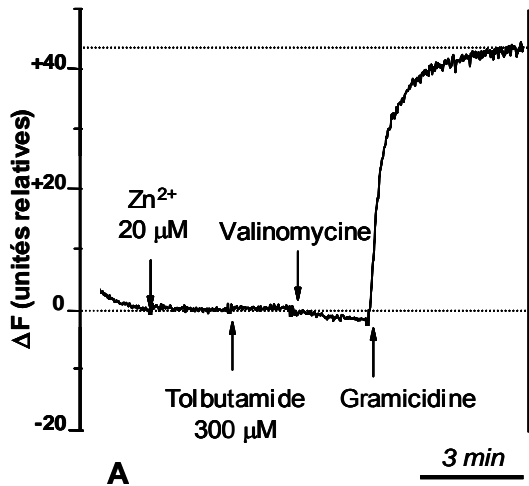
3.3. Régulation de la libération de glutamate par le zinc et les canaux K_{ATP}

En travaillant sur des synaptosomes de fibres moussues de l'hippocampe, nous avons constaté que le zinc modulait la libération de glutamate en modifiant le potentiel de membrane.

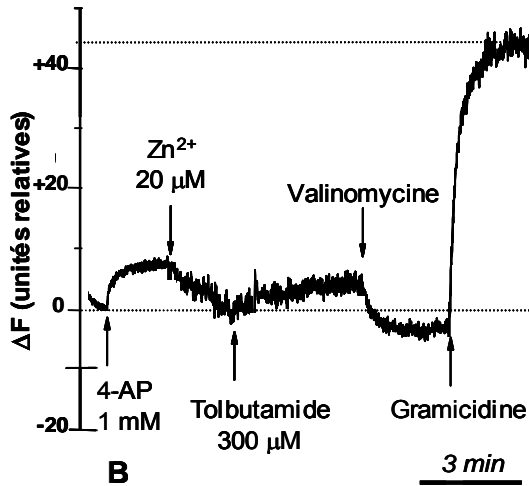
Potentiel de membrane

Le PM des synaptosomes de fibres moussues a été mesuré comme précédemment en enregistrant la fluorescence de la carbocyanine di-S-C3(5). Le potentiel de membrane des SFM fraîchement préparées, maintenues « au repos », est en moyenne -82.3 ± 3.1 mV ($n=8$). C'est une valeur qui, dans la plupart des expériences, est proche du potentiel d'équilibre du potassium (E_{K^+}). En effet, à ce niveau de PM, la valinomycine ne cause qu'une faible et peu reproductible hyperpolarisation. Ni le zinc à la concentration de 20 μ M, ni la tolbutamide (300 μ M) ne changent sensiblement le potentiel de membrane des SFM dans ces conditions (Fig.3.3.1.A.). La gramicidine, par contre, induit un grand saut du signal fluorescent, confirmant que le PM au repos était maintenu à des valeurs éloignées de 0 mV. En supposant que l'effet du zinc sur le PM des SFM passe par une conductance potassique, on comprend qu'il ne peut pas se manifester dans ces conditions, vu que le PM est proche du potentiel d'inversion du potassium. On a donc cherché à provoquer une légère dépolarisation sans passer par un changement de la concentration du potassium extracellulaire. Dans ce but, nous avons utilisé la 4-AP (1 mM), un bloqueur non sélectif des canaux potassiques dépendants du voltage. L'administration de 4-AP entraîne en effet une dépolarisation modérée mais significative (13.8 ± 0.7 mV, 5 expériences). Une fois les SFM dépolarisés par la 4-AP, l'application du zinc à des concentrations micromolaires provoque une repolarisation de -11.12 ± 3.2 mV ($n=5$). La repolarisation induite par le zinc est antagonisée par l'application de tolbutamide (300 μ M) (Fig.3.3.1.B.) Le diazoxide (100 μ M, un ouvreur des canaux K_{ATP}), administré à des synaptosomes dépolarisés par la 4-AP, les repolarise dans la même mesure que le zinc ; l'effet du diazoxide est aussi antagonisé par le tolbutamide (Fig.3.3.1.C.).

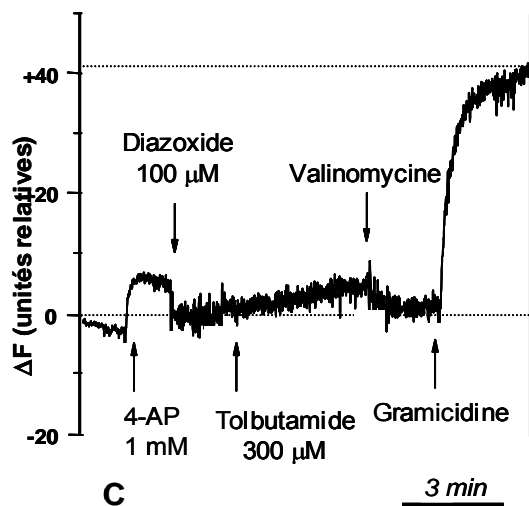
Par contre, si on induit la dépolarisation par du KCl, le zinc n'est plus capable de modifier le PM des SFM. Ce résultat n'est pas une surprise, car lorsque le K^+ extracellulaire est élevé, les conductances voltage-dépendantes sont ouvertes, E_{K^+} est déplacé et la manipulation des K_{ATP} reste pratiquement sans effet sur le PM.



A



B



C

Figure 3.3.1. Effet du zinc et des substances agissant sur les canaux K_{ATP} sur le potentiel de membrane des SFM.

A. En absence de dépolarisation préalable, l'administration de zinc ($20 \mu\text{M}$) ne modifie pas le PM. Le tolbutamide ($300 \mu\text{M}$), un bloqueur des canaux K_{ATP} non plus. La valinomycine induit une légère décroissance du signal, ce qui indique que le PM initial était proche du potentiel d'inversion du potassium. Cela est confirmé par la gramicidine qui provoque un grand saut de potentiel.

B. L'application de 4-AP (1 mM) provoque une augmentation du signal fluorescent (dépolarisation). Le zinc ($20 \mu\text{M}$), appliqué après le 4-AP, modifie alors le PM dans le sens d'une repolarisation. La tolbutamide ($300 \mu\text{M}$) dépolarise à nouveau, antagonisant l'effet du zinc.

C. Comme dans la figure B, la 4-AP dépolarise les SFM. L'ajout de diazoxide ($100 \mu\text{M}$), un ouvreur des canaux K_{ATP} repolarise les synaptosomes, comme l'avait fait le zinc dans le figure B.

Ces données laissent supposer que l'effet du zinc sur le potentiel de membrane passe par l'activation des canaux de type K_{ATP} . Le zinc ne change pas le PM dans la condition de repos (Fig. A.) Au repos, le potentiel de membrane est à environ -82.8 mV et à ce PM l'activation d'un canal potassique n'a aucun effet.

Libération du glutamate

Comme on l'a vu précédemment (Fig. 3.1.5.A-B.), la 4-AP, à la concentration de 1 mM, induit une libération significative de glutamate par les SFM. Nous nous sommes posé la question suivante : si la dépolarisation induite par la 4-AP (12-15 mV) est suffisante pour libérer du glutamate, le zinc qui s'y oppose devrait réduire la quantité de transmetteur libéré. Par contre, il ne devrait pas modifier la libération lorsque c'est le KCl qui est utilisé pour la déclencher.

Les expériences illustrées par la figure 3.3.2.A. montrent que sous l'action de la 4-AP, les SFM libèrent en moyenne 43 nmoles/mg prot. de glutamate en 5 min. Cela correspond à 20.7 nmoles/mg prot. de plus que la quantité trouvée dans les échantillons de SMF non traités par la 4-AP (condition témoin, quantité de transmetteur amenée dans le tube avec les SFM, *cf.* plus haut). L'application concomitante de tolbutamide 250 μ M et de 4-AP augmente la libération de glutamate de 73 %. Par contre, le diazoxide 100 μ M diminue la libération d'environ 66%. Le zinc exerce un effet similaire à celui du diazoxide ; il diminue la libération de glutamate induite par la 4-AP de 67% à la concentration de 5 μ M, et de 66% à 10 μ M (Fig. 3.3.2.A.).

En revanche, mais conformément à nos attentes, nous avons trouvé que le zinc ne modifiait pas la libération de glutamate quand on la déclenche par dépolarisation en haut potassium (50 mM, Fig.3.3.2.B.).

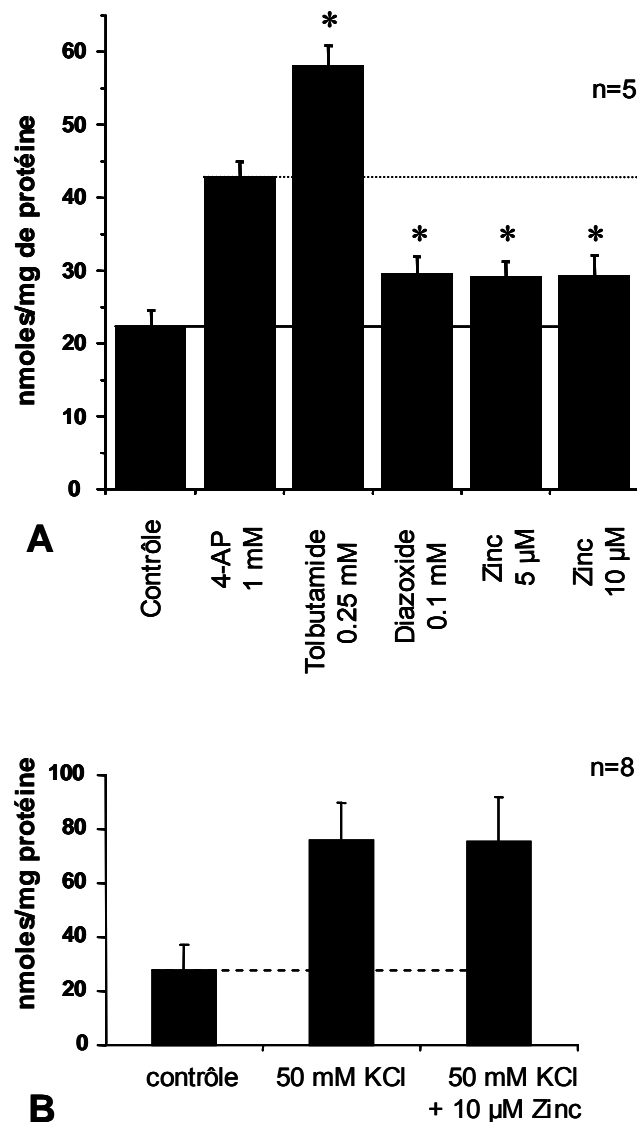


Figure 3.3.2. Effet du zinc sur la libération du glutamate par les synaptosomes des fibres moussues. Mesures luminométriques en mode discontinu, incubations de 5 min.

A. Comme on a vu dans la figure 3.1.5.B., l'administration de 4-AP (1 mM) induit une libération mesurable de glutamate. Le zinc (5 et 10 µM) diminue significativement cette libération, de 67 % et 66 % respectivement. Le diazoxide (100 µM) diminue également de 66 % le libération de glutamate induite par la 4-AP. Au contraire, le tolbutamide (250 µM) augmente considérablement la libération du glutamate (73 %) au dessus de la valeur obtenue avec la 4-AP seule (n=5).

B. En revanche, le zinc (10 µM) ne modifie pas la libération de glutamate induite par dépolarisation au potassium (50 mM; n=8).

Discussion : zinc et transmission FM-CA3

Le zinc est abondant dans le SNC, particulièrement dans la région CA3 de l'hippocampe, où il est localisé dans les terminaisons des fibres moussues (Frederickson and Moncrieff 1994). Il est concentré dans les vésicules synaptiques et co-libéré avec le glutamate durant l'activité nerveuse (Aniksztejn et al. 1987; Charton et al. 1985; Howell et al. 1984; Thompson et al. 2002).

La concentration atteinte par le zinc dans la fente synaptique après stimulation a été l'objet de vives discussions. On l'a évaluée à des dizaines de μM après stimulation à haute fréquence (Vogt et al. 2000; Li et al. 2001b), et certains auteurs ont même proposé des valeurs jusqu'à 300 μM si l'activation est particulièrement intense (Assaf and Chung 1984). En revanche, un travail récent estime que la concentration synaptique du zinc devrait être beaucoup plus basse, même après stimulation, ne dépassant pas 2 nM (Kay 2003).

Une fois libéré, le zinc peut réagir avec de nombreuses protéines impliquées dans la transmission synaptique, en particulier certains récepteurs (pour la plupart glutamatergiques, comme les récepteurs AMPA, Kainate et NMDA) ou des canaux ioniques (comme les canaux calciques voltage-dépendants). Le zinc peut même entrer dans les cellules, surtout postsynaptiques, à travers des récepteurs-canaux ou des canaux ioniques, surtout si la cellule est dépolarisée (Ohana et al. 2004; Kerchner et al. 2000). Lorsque sa concentration s'élève à l'intérieur de terminaisons nerveuses, le zinc déclenche lui-même la libération du transmetteur. Pour cette action, il est même plus puissant que le calcium (Dunant et al. 1996).

A des concentrations supérieures à 50 μM , le zinc est capable par lui-même d'induire une LTP dans les synapses fibres moussues/cellules pyramidales du CA3 (Li et al. 2001a; Lu et al. 2000). D'autres études montrent en outre qu'à ces concentrations et à des concentrations supérieures le zinc peut exercer un effet neurotoxique (Choi and Koh 1998; Frederickson et al. 2000).

Les résultats obtenus dans notre travail avec des concentrations micromolaires de zinc suggèrent que le zinc joue un rôle régulateur dans la libération du glutamate. Le zinc repolarise les synaptosomes des fibres moussues (SFM) préalablement dépolarisés par la 4-AP. En même temps, le zinc diminue la libération du glutamate par les SFM induite par la même 4-AP. Ces effets du zinc sur le PM et sur la libération du glutamate sont reproduits par le diazoxide, et bloqués par le tolbutamide. Ils semblent donc passer par une activation des canaux K_{ATP} .

Nos résultats concordent sur ce point avec les observations que les K_{ATP} peuvent moduler la sécrétion de différentes hormones ainsi que des transmetteurs, y compris ceux de type rapide comme l'ACh, le GABA et le glutamate. Les travaux d'Alain Bloc (Bloc et al. 2000) sur les cellules β -pancréatiques démontrent que le zinc peut jouer un rôle de feed-back négatif dans l'activité de ces cellules, freinant la libération de l'insuline. Dans la cellule β -pancréatique comme dans les fibres moussues le zinc est co-localisé et co-libéré avec le produit de sécrétion, respectivement l'insuline et le glutamate.

Des travaux récents, effectués en collaboration avec l'équipe du Dr. P. Maechler sur des cellules INS-1E (insulinome de rat), ont montré que la libération de l'insuline induite par le glucose est modifiée par l'application du zinc. L'élévation du glucose entraîne une augmentation de l'ATP intracellulaire, ce qui se traduit par la fermeture des canaux K_{ATP} . Cette fermeture dépolarise la cellule, ce qui provoque l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage. A son tour, l'augmentation du calcium intracellulaire induit la libération de l'insuline. Le zinc, à des concentrations de 0.7 et 10 μ M, diminue la quantité d'insuline libérée. Cet effet s'exerce sur les canaux K_{ATP} qui hyperpolarisent la membrane des cellules ce qui diminue le nombre des canaux calciques ouverts. En revanche, le zinc n'a pas modifié la libération de l'insuline induite par dépolarisation à haut potassium (30mM).

Ces résultats montrent un parallélisme entre le mécanisme de la libération de l'insuline par les cellules β -pancréatiques et celle du glutamate par les terminaisons des fibres moussues de l'hippocampe. Le zinc est co-libéré dans les cellules β -pancréatiques avec l'insuline et dans les terminaisons des fibres moussues avec le glutamate. De plus la composition du canal K_{ATP} des cellules bêta et celle des canaux trouvés dans l'hippocampe est identique, comprenant les sous-unités Kir6.2 et SUR1.

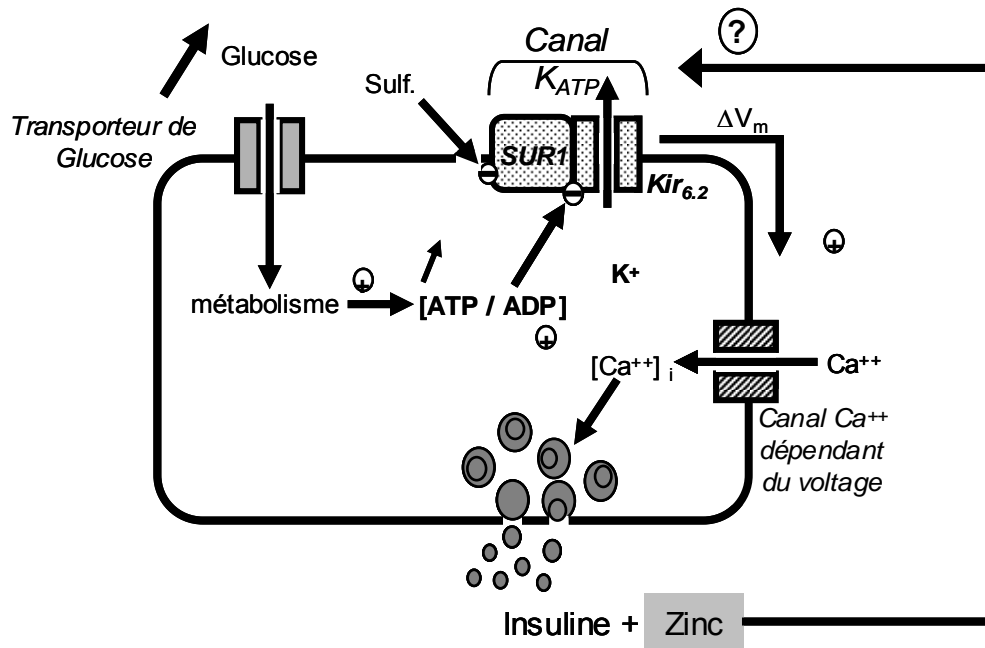


Figure 3.3.3. Représentation schématique de la libération de l'insuline par les cellules β -pancréatiques (d'après A. Bloc). Le zinc pourrait jouer un effet de feed-back négatif sur la libération de l'insuline via l'activation des canaux K_{ATP} .

Certaines formations de l'hippocampe sont particulièrement riches en K_{ATP} . Marqués par un ligand radioactif, les K_{ATP} ont été trouvés en forte densité dans la couche granulaire du gyrus denté, sur les corps cellulaires des cellules en grains, ainsi que dans le *stratum lucidum* de la région CA3, où se situent les terminaisons de ces cellules, les fibres moussues. Si l'on induit une dégénérescence du système cellules en grains-fibres moussues par l'injection locale de kaïnate, cela fait pratiquement disparaître à la fois la forte concentration de zinc et celle des K_{ATP} dans le gyrus denté et le secteur CA3 (Mourre et al. 1991).

Sur la base de nos résultats, nous proposons une nouvelle hypothèse pour le rôle physiologique du zinc dans la région CA3, en plus des effets déjà décrits sur les récepteurs et les autres canaux ioniques : en repolarisant les fibres moussues, le zinc diminue l'excitabilité et la quantité de glutamate libéré.

La question se pose de savoir si la libération synaptique du zinc module la transmission seulement pendant l'activité intense ou/et les conditions pathologiques, ou également lors du trafic normal des influx nerveux ? Dans les synapses fibres moussues /CA3, les processus comme la « paired-pulse facilitation » ; la « frequency facilitation » ou la LTP

ne sont apparemment pas affectés quand le zinc est chélaté ou chez les souris ZnT3 déficientes, bien que le zinc module d'autres processus synaptiques en inhibant des récepteurs NMDA (Vogt et al. 2000). Cependant, d'autres auteurs ont clairement démontré que le zinc est indispensable à l'induction de LTP au niveau de ces synapses (Li et al. 2001a; Lu et al. 2000). Nous suggérons que le zinc exerce des actions opposées suivant sa concentration. Si un ensemble de synapses sont activées à haute fréquence, le zinc augmentera l'excitation et pourra même provoquer une LTP localement, mais il diminuera la transmission, en réduisant la libération de glutamate dans les synapses environnantes qui sont atteintes par des concentrations inférieures. Ce processus pourrait renforcer la sélectivité de la plasticité synaptique dans les connexions fibres moussues /CA3.

Nous verrons que le zinc peut ainsi exercer une action neuro-protectrice dans le cas d'une dépolarisation excessive induite par l'ischémie.

3.4. Effet du zinc sur les canaux K_{ATP} . Analyse moléculaire

Dans les expériences sur les fibres moussues, nous avons vu que le zinc, en concentration micromolaire, agissait sur potentiel de membrane d'une manière qui pouvait s'expliquer par une activation des canaux K_{ATP} . Pour une démonstration directe de ce mécanisme, nous nous sommes adressé à des canaux recombinants, transfectés dans des cellules (HEK293T) qui sont dépourvues de K_{ATP} endogènes.

Sous-unités du canal K_{ATP} impliquées dans l'effet du zinc

Par transfection au phosphate de calcium, nous avons co-exprimé de façon transitoire les sous-unités Kir6.2 et SUR1 du canal K_{ATP} avec la E-GFP (*enhanced green fluorescent protein*) dans les cellules HEK293T. Les cellules effectivement transfectées peuvent ainsi être identifiées par la fluorescence de la GFP. Comme contrôles, nous avons co-transfecté la GFP dans les cellules HEK293T soit avec la sous-unité Kir6.2 seule (n=6), soit avec la sous-unité SUR1 seule (n=8). Aucune des cellules transfectées avec une seule sous-unité n'a présenté de courant sensible aux bloqueurs des K_{ATP} (tolbutamide et glibenclamide). De plus, nous avons confirmé qu'aucune cellule HEK293T non transfectée n'exprimait de conductance endogène sensible au zinc dans nos conditions expérimentales.

Nous avons alors exprimé le canal de type β -pancréatique/neuronal composé des sous-unités Kir 6.2 et SUR 1. La Figure 3.4.1.A. illustre un enregistrement en potentiel imposé à -40 mV d'une cellule HEK293T exprimant le canal K_{ATP} de ce type. Le zinc (10 μ M) accroît de manière significative et réversible l'amplitude d'un courant sortant. Le tolbutamide (250 μ M) fait disparaître le courant préexistant et supprime l'effet activateur du zinc.

Dans la plupart des cas, au moment de son lavage, le zinc provoque une inhibition des courants K_{ATP} , inhibition également transitoire, et dont la cinétique est plus lente que celle de l'effet activateur. C'est pourquoi cet effet inhibiteur ne se voit clairement qu'au lavage du zinc lorsqu'il n'est plus masqué par l'effet activateur de cinétique rapide. Dans ce travail, nous avons porté notre intérêt essentiellement sur l'effet activateur.

Dans la Figure 3.4.1.B., le zinc, administré à la cellule pendant une suite d'enregistrements en rampe de potentiel de -120 à -40 mV, accroît une conductance indépendante du voltage, correspondant à un courant qui s'annule à une valeur proche du

HEK293T: rKir6.2 / rSUR1

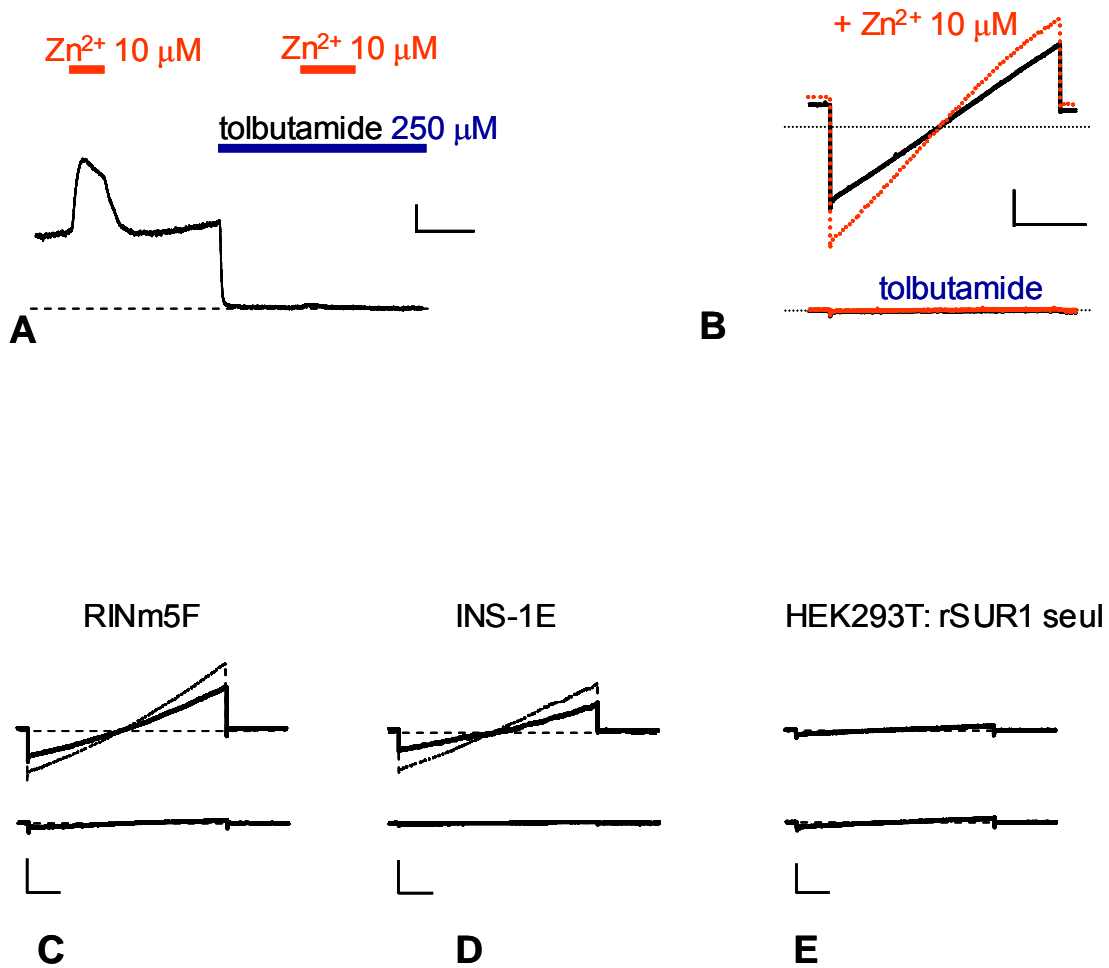


Figure 3.4.1. *Effet du zinc sur des canaux natifs et recombinants.*

A. Le zinc active un courant préexistant, blocable par le tolbutamide, sur une cellule transfectée avec les sous-unités Kir6.2 et SUR1. Enregistrement en configuration cellule entière, voltage imposé à -40 mV. **B.** Même cellule: rampe de -120 à -40 mV. **C.** et **D.** mêmes conditions que **B** sur des cellules d'insulinome de rat. La réponse au zinc est représentée par la trace pointillée **E.** Cellule HEK transfectée avec une seule sous-unité. Calibration 0.5 nA pour tous les tracés; 0.2 sec **A.** et **B.** et 0.5 sec **C.-E.**

potentiel d'inversion du potassium (E_{K^+}). En d'autres termes, le zinc active une conductance linéaire de nature potassique. En présence de tolbutamide (250 μ M) la conductance linéaire préexistante, mesurée en réponse à des rampes de potentiel de -120 à -40 mV, disparaît et le zinc n'exerce plus aucun effet (Fig.3.4.1.B trace du bas). Ces premiers résultats confirment les résultats obtenus sur le canal naturel de type β -pancréatique endogène exprimé par les cellules RIN m5F (Bloc et al. 2000) et montrent qu'il est possible d'étudier l'action du zinc sur des canaux K_{ATP} recombinants exprimés dans les cellules HEK293T.

Dans le but de déterminer si l'effet du zinc dépend de la composition en sous-unités du canal K_{ATP} et aussi de d'identifier la sous-unité cible, nous avons étudié l'action du divalent sur les K_{ATP} constitués de quatre combinaisons de sous-unités, soit :

- Kir6.2 plus SUR1
- Kir6.1 plus SUR1
- Kir6.2 plus SUR2A
- Kir6.1 plus SUR2A

Les résultats sont présentés dans la figure 3.4.2. Comme on l'a vu précédemment, le canal constitué des sous-unités Kir6.2 et SUR1 exprime un courant qui est activé par le zinc (10 μ M) et le diazoxide (100 μ M), et qui est bloqué par le tolbutamide (250 μ M).

Le canal fait des sous-unités Kir6.1 et SUR1 présente également un courant activé par le zinc (10 μ M) et par le diazoxide (100 μ M). Il est bloqué par le tolbutamide (250 μ M). L'amplitude de l'effet du zinc est plus grande avec cette combinaison (notez le changement de l'échelle de calibration).

Le canal composé des sous-unités Kir6.2 et SUR2A exprime un courant sur lequel ni le zinc (10 μ M) ni diazoxide (100 μ M) ne provoquent d'activation. Le zinc pourrait même causer une inhibition. Avec cette combinaison, le tolbutamide (250 μ M) n'est pas un bloqueur efficace, au contraire du glibenclamide (10 μ M).

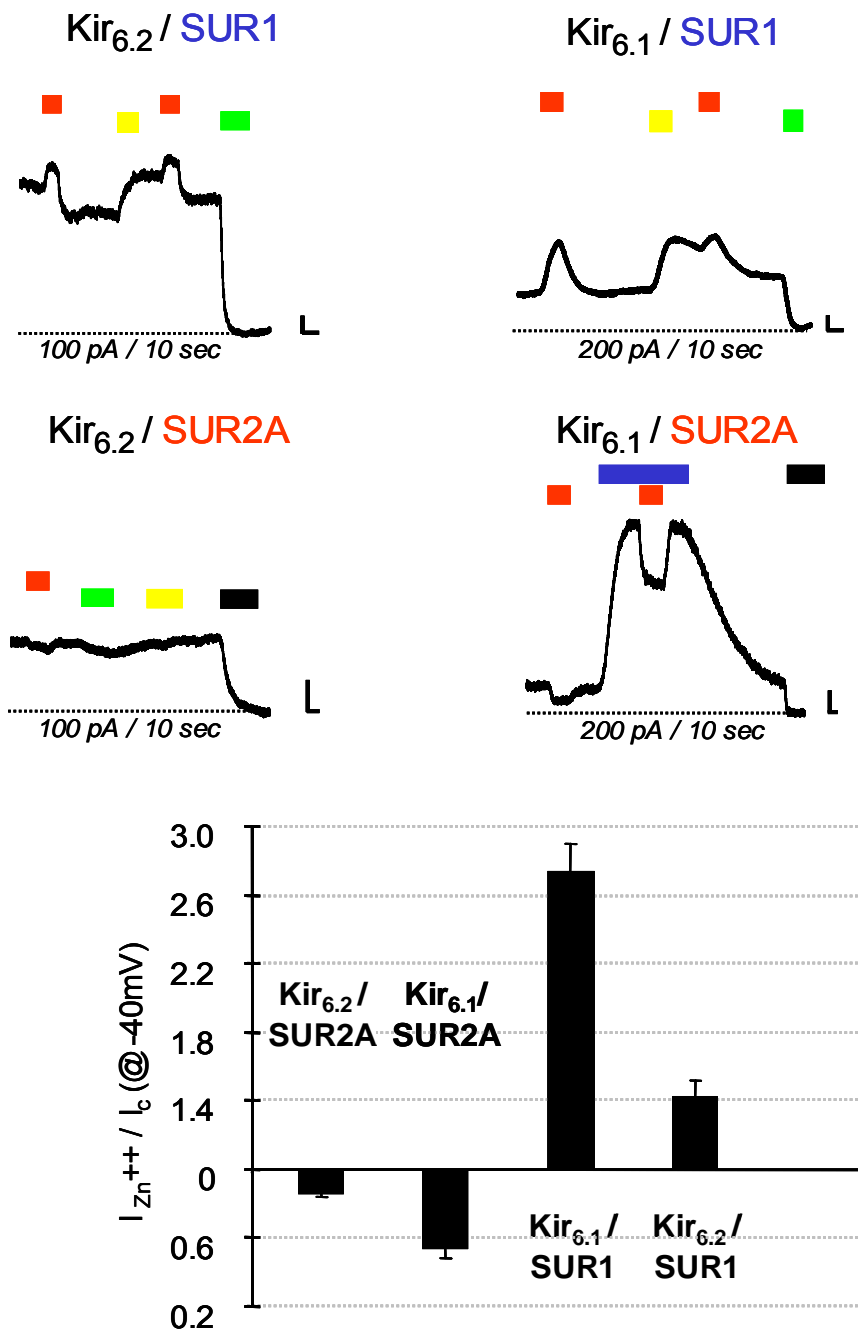


Figure 3.4.2. Effet du zinc sur le canal K_{ATP} recombinant composé des différentes sous-unités. Différents types de canaux K_{ATP} ont été exprimés dans les cellules HEK293T par transfection de quatre combinaisons différentes des sous-unités Kir6.1-6.2 et SUR1-2A. Les traits rouges correspondent à l'administration de zinc 10 μ M, les jaunes au diazoxide 100 μ M, les verts au tolbutamide 250 μ M et les noirs au glibenclamide 10 μ M. Le zinc n'active le K_{ATP} que lorsque la sous-unité SUR1 est présente. Les histogrammes expriment les changements provoqués par l'administration du zinc en fonction du courant préexistant.

Le canal constitué des sous-unités Kir6.1 et SUR2A donne également un courant qui n'est pas activé mais inhibé par le zinc (10 μM). Cette inhibition est particulièrement visible lorsque le courant a été préalablement activé par le pinacidil (100 μM). Les K_{ATP} de cette composition sont aussi bloqués par le glibenclamide (10 μM).

Les histogrammes de la figure 3.4.2. résume l'effet du zinc sur les courants K_{ATP} de canaux composés des différentes combinaisons illustrées ci-dessus. Première conclusion, l'effet du zinc sur le canal K_{ATP} est lié à la sous-unité SUR ; il est indépendant de la sous-unité Kir. L'effet activateur du zinc s'exerce exclusivement sur la sous-unité SUR1. Le zinc semble au contraire inhiber les canaux comprenant la sous-unité SUR2A.

Acide aminé en jeu dans la liaison du zinc

Les sites de liaisons du zinc peuvent être formés par plusieurs chaînes latérales d'acides aminés comme les cystéines, les histidines, ou les acides aminés acides (aspartate ou glutamate) (Tainer et al. 1991). Une technique utilisée pour identifier les sites de liaison du zinc sur d'autres canaux ioniques est la titration d'un effet en fonction du pH. Nous avons donc étudié l'influence du pH de la solution extracellulaire sur l'activation par 20 μM de zinc du canal K_{ATP} des cellules RIN m5F (une lignée β -pancréatique exprimant naturellement des K_{ATP} de composition Kir6.2 et SUR1).

En voltage imposé à -40mV et au pH alcalin de 8.0, le zinc induit un effet activateur légèrement supérieur en amplitude à celui mesuré au pH physiologique (pH 7.2). En revanche lorsqu'on diminue le pH extracellulaire, l'effet activateur du zinc diminue progressivement. Pour les valeurs de pH les plus acides testées (pH 6.0 et 5.6) le zinc induit même une diminution du courant K_{ATP} (Fig. 3.4.3.A.). Le zinc exerce donc, en dessous de pH 6.4, un effet inhibiteur sur le canal K_{ATP} . Sur l'ensemble des valeurs de pH testées de 5.6 à 8.0, le pH_{50} pour l'effet activateur du zinc sur le K_{ATP} est de 6.4 (Fig.3.4.3.B).

Deuxième conclusion, l'action du zinc sur les K_{ATP} dépend du pH de la solution extracellulaire. L'effet activateur du zinc, observable à des valeurs du pH alcalin, disparaît à pH acide, révélant ainsi l'effet inhibiteur du zinc. La valeur du pH_{50} pour l'effet activateur étant proche du pK_a des résidus histidine, on peut penser qu'un ou plusieurs de ces acides aminés sont présents au niveau du site de liaison du zinc. L'implication d'histidines a été confirmée par l'utilisation du diéthylpyrocarbonate (DEPC) qui modifie, par liaison covalente les chaînes latérales des histidines, rendant inaccessible le site de liaison. La Figure 3.4.4.

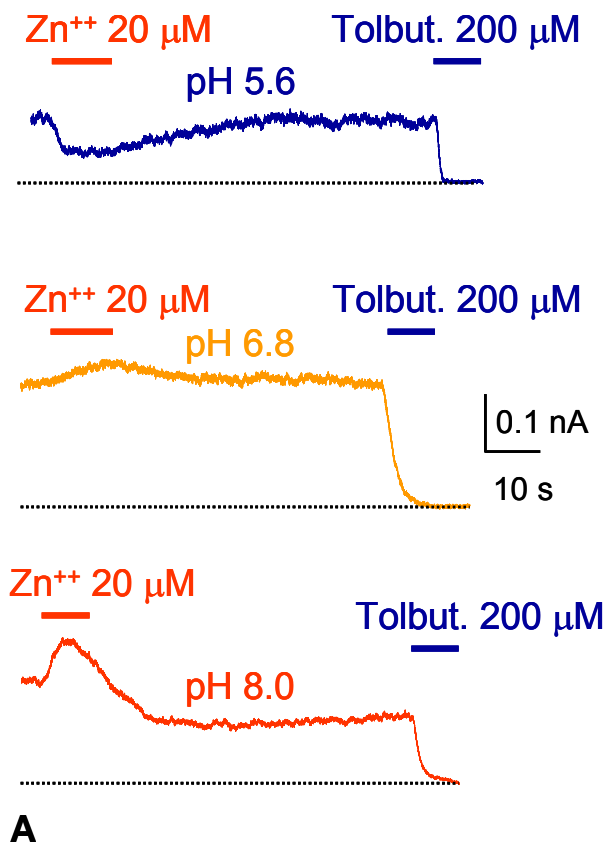
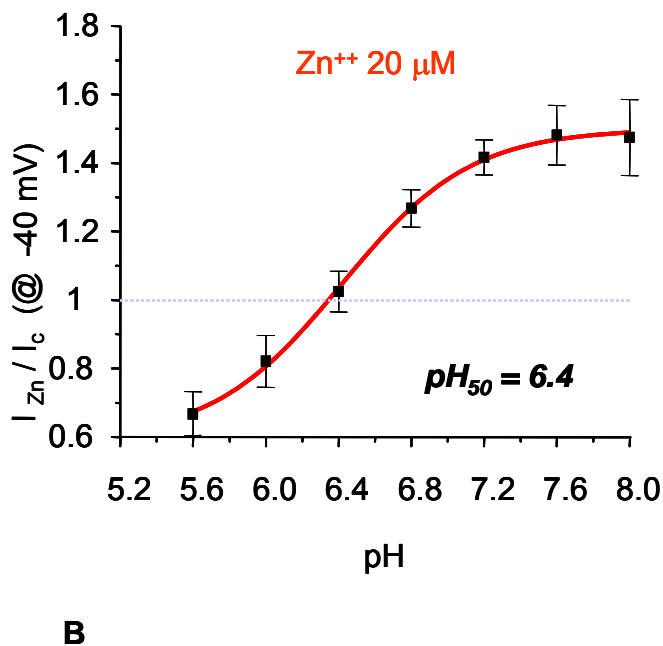


Figure 3.4.3. L'effet du zinc sur le canal K_{ATP} de type Kir6.2/ SUR1 dépend du pH extracellulaire. L'expérience a été faite sur des cellules RIN-5F et l'effet du zinc a été testé en configuration cellule entière, voltage imposé à -40 mV.

A. L'effet du zinc est nettement activateur à pH 8.0, plus faible à pH 6.8. Il devient inhibiteur à pH 5.6

B. Sur le graphique la variation du courant est exprimée en fonction du courant préexistant, blocable par le tolbutamide. L'action du zinc s'inverse à un pH de 6.4



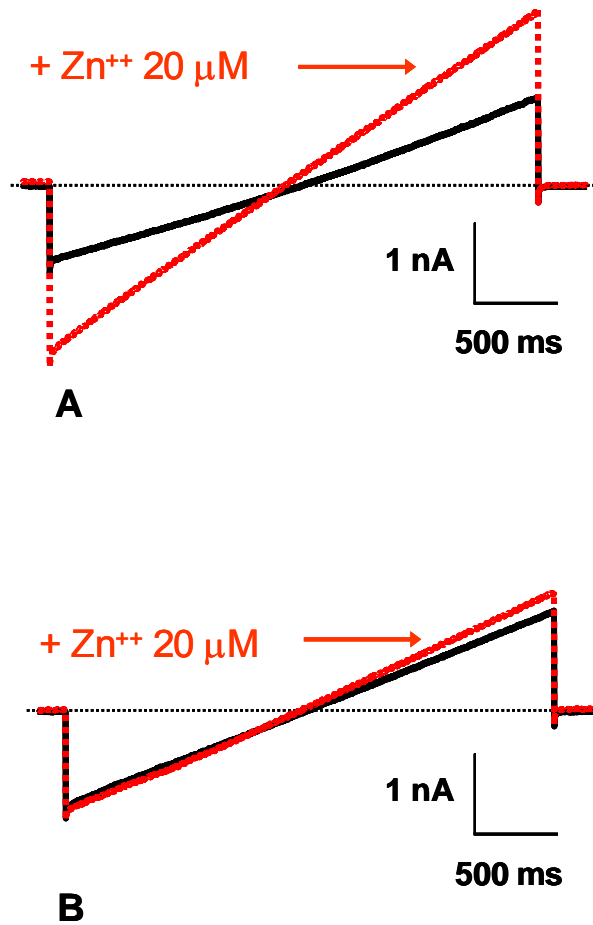


Figure 3.4.4. *Le DEPC supprime l'effet activateur du zinc sur le K_{ATP} .*
A. Activation du canal K_{ATP} par le zinc (20 μM) sur une cellule HEK transfectée avec les sous-unités Kir6.2 et SUR1. **B.** L'application préalable du DEPC (1mM) durant 1 min réduit fortement l'effet du zinc. Rampe de potentiel de -120 à -40 mV.

représente les enregistrements en rampes de potentiel de -120 à -40 mV d'une cellule HEK293T exprimant un canal K_{ATP} composé des sous-unités Kir6.2 et SUR1. Dans les conditions initiales, le zinc exerce un effet activateur du courant K_{ATP} (Figure 3.4.4.A.). Un prétraitement au DEPC (2 min, 1 mM) annule l'effet activateur du zinc (Fig.3.4.4.B.).

Identification du site de liaison par mutagenèse dirigée

Ainsi, l'effet activateur du zinc sur le canal K_{ATP} dépendrait de résidus histidines présents à la surface de la sous-unité SUR1 du canal. En alignant les séquences en acides aminés des sous-unités SUR1 et SUR2A de rat, nous avons mis en évidence 5 histidines extracellulaires, présentes uniquement sur la sous-unité SUR1. Ces résidus histidines se trouvent dans les positions H11; H160; H 326; H332 et H1273 (Fig.3.4.5.). Par mutagenèse dirigée, nous avons généré des SUR1 mutants pour ces histidines, mutants qui ont été exprimés avec la sous-unité Kir6.2 dans des cellules HEK293T. Chaque histidine extracellulaire spécifique de la sous-unité SUR1 a été remplacée par une alanine, acide aminé neutre (A). Nous avons donc testé les effets du zinc ($10 \mu\text{M}$) sur 6 canaux K_{ATP} mutés, soit les canaux formés des combinaisons: Kir6.2 SUR1_{H11A}; Kir6.2 SUR1_{H160A}; Kir6.2 SUR1_{H326A}; Kir6.2 SUR1_{H332A}; Kir6.2 SUR1_{H1273A}, ainsi que le double mutant Kir6.2 SUR1_{H326A} et _{H332A}.

Les canaux formés des combinaisons: Kir6.2 SUR1_{H11A}; Kir6.2 SUR1_{H160A} et Kir6.2 SUR1_{H1273A} expriment des courants activables par le zinc comme dans le cas du canal non muté (WT) (Fig. 3.4.6.). Par contre, les canaux formés des combinaisons: Kir6.2 SUR1_{H326A} et Kir6.2 SUR1_{H332A} expriment des courants qui ne sont pas activés mais inhibés par le zinc. Les histogrammes de la Figure 3.4.8. représentent l'amplitude moyenne des effets du zinc sur le courant K_{ATP} du canal sauvage et des différents canaux mutés en histidine. Il apparaît clairement que si les mutations H11A; H160A; H326A ne modifient pas l'amplitude de l'activation du canal par le zinc, les mutations H326A et H332A abolissent complètement l'activation du canal. Le courant K_{ATP} se trouve inhibé de 20, 40 et 50 % dans le cas des mutations H326A, H332A et de la double mutation, respectivement. Il est à noter que l'effet des 2 mutations semble cumulatif.

	1	11	21	31	41	51	61
SUR1ptotein	MFLAFCGTE	SAAYRVDQ	GVLNNG	CFVDALN	VVPHVLLF	ITFPILF	IGWGSQSSK
SUR2Aprotein	MSLSFCG	SSYNIYH	GVLQ	MPCFVDALN	LVPHVLLF	ITFPILF	IGWGSQSSK
Consensus	m l fcg n	y gvl n	cfvdaln	vphvllf	itfpilfigwgs	qsskv	ihh twlhfp
	71	81	91	101	111	121	131
SUR1ptotein	HNLRWILTF	ILLFV	VCEIAEG	ILSDGV	TESRHLH	LYMPAG	MAFMAA
SUR2Aprotein	HNLRWILTF	FALLFV	BVCEIAEG	IVSDG	QRASRHLH	LFMPAVM	GFVAT
Consensus	hnlrwiltf	llfv vceiaegi	sd	srhlhl	mpa m f a	ts	vyyhnietsnfpkll al
	141	151	161	171	181	191	201
SUR1ptotein	IYWLAFIT	KTIKFK	VFY	AI	GFSQLR	FLCGL	LVILY
SUR2Aprotein	IYWMAFIT	KTIKLV	KY	W	MSDLR	FCIG	VVILN
Consensus	yw afitktik	vk	g s	lrfc	tg vil g l	ve	nvirvrryvf p vkppedl
	211	221	231	241	251	261	271
SUR1ptotein	QDLGVRFL	QFFV	NLLSK	GIY	WMMAF	IKTAK	KKPIDL
SUR2Aprotein	QDLGVRFL	QFFV	NLLSK	GIY	WMM	TLI	ISAH
Consensus	qdlgvrflq	ffvnl	sk	tywmm	i ah	kpidl	aigklpiamra tny l a q k
	281	291	301	311	321	331	341
SUR1ptotein	OOGARA	IWRAL	CHAF	GRRL	VLSST	FRIL	LADLL
SUR2Aprotein	FNRIPS	IWLAMY	RAFGR	FILL	SSFR	YLADLL	GFAGPLC
Consensus	iw a	afgr	lsstfr	ladllg	fagplci	giv	1 ss e
	351	361	371	381	391	401	411
SUR1ptotein	FLGNAY	VVLAVL	FLAL	L	IQRT	FLQAS	YVVA
SUR2Aprotein	FLGNAY	VVLAVL	FLAL	L	IQRT	FLQAS	YVVA
Consensus	fl na	vlavllflal	lqrtflq	asyyv	ietginlrga	iyunki	lstsnlsmgmt qqi nl
	421	431	441	451	461	471	481
SUR1ptotein	VAIDTN	QLMWF	F	FLCP	NLWAMP	VQII	V
SUR2Aprotein	VAIDTN	QLMWF	F	FLCP	NLWAMP	VQII	V
Consensus	vai	tnqlmwf	f	lcpnlwamp	vqii	gvilly	lg sal gaavi llap qyf atkl aq stl
	491	501	511	521	531	541	551
SUR1ptotein	YSNERLK	Q	TNEML	RGIK	LKLYA	NEIFC	SR
SUR2Aprotein	YSNERLK	Q	TNEML	RGIK	LKLYA	NEIFC	SR
Consensus	ys	erlk	tne l	gikllklyaw	efc	ve tr	ke sl fa yts sifm aipiaavl tfv
	561	571	581	591	601	611	621
SUR1ptotein	GHVSFF	KESD	FSP	VAFAS	LSL	FHIL	VTP
SUR2Aprotein	TBA-YAS	GNNL	KFAE	AFAS	LSL	FHIL	VTP
Consensus	h	p	afasls	lshilv	tpfills	vvr	vka svqkl efl s e i e e
	631	641	651	661	671	681	691
SUR1ptotein	AFQGO	AGKY	QAV	FL	VVNR	KRFAR	EEV
SUR2Aprotein	LF	FESCK	KHTG	VQ	SKP	IRNK	Q
Consensus	p	k v k	nrk p r	d	rl p	g f w	g tlni
	701	711	721	731	741	751	761
SUR1ptotein	TIRIP	RG	Q	LT	MIVG	Q	CG
SUR2Aprotein	DIRIP	Q	LT	MIVG	Q	CG	CG
Consensus	irip	gqltmivg	qcgk	sllla	lgemq	g v	wn n rsr
	771	781	791	801	811	821	831
SUR1ptotein	VAYAS	Q	KP	WLL	NAT	VEEN	IT
SUR2Aprotein	VAYA	Q	KP	WLL	NAT	VEEN	IT
Consensus	vaya	qkpwllnat	veenitf	s fn	gryk v	acslq	pdid lp gdqt igerginlsggqrqri
	841	851	861	871	881	891	901
SUR1ptotein	VARALY	Q	TN	VV	FL	DD	FF
SUR2Aprotein	VARALY	Q	TN	VV	FL	DD	FF
Consensus	varalyq	tn	vfldd	ffsald	hlsdhlmq	gil	l ddkrtvvlvthklqyl hadwiiamkdg
	911	921	931	941	951	961	971
SUR1ptotein	REGTL	ND	F	OR	SEC	Q	L
SUR2Aprotein	REGTL	ND	F	OR	SEC	Q	L
Consensus	regtlnd	f	orsec	qlf	ebwktl	mnrq	qelektvmerrapefsoqlframsrddgllldedeefffaae

	981	991	1001	1011	1021	1031	1041
SUR1ptotein	SEEDDN	LSSV	LHORAK	IFWRACT	KYLSSA	GILLLS	LLVFSQ
SUR2Aprotein	EEEDDN	MSTVM	RRLRYK	MPFKTC	WNYLTS	CGFFLL	FLMIFS
Consensus	eddn	s v	r k	pw c	yl s	g ll	l fs llkh v
	1051	1061	1071	1081	1091	1101	1111
SUR1ptotein	NC	LSOECAL	DOSV	IAMVFT	VLC	SLGIAL	CLVTSV
SUR2Aprotein	EYS	INDPGKAD	QTF	YVAGF	SILCG	AGIFL	CLVTSL
Consensus	s	dq y	f lc	gi lclvts	tvev	gl ak	lh ll n iil p rff ttplg
	1121	1131	1141	1151	1161	1171	1181
SUR1ptotein	SILNRF	SSDC	NTIDQ	HIFST	ILECL	SRSTLLC	V
SUR2Aprotein	LILNRF	SADT	NIIDQ	HIFPT	LESL	TRSTLLC	L
Consensus	ilnrf	s d	n idqhip	tle	l rstllc	sa isy	tpvfl al pl v ysiqkyfrvas dl
	1191	1201	1211	1221	1231	1241	1251
SUR1ptotein	QQ	LDDT	TQLF	LLS	BF	AETVE	GLGTT
SUR2Aprotein	QEL	DDST	TQLF	LLC	BF	SETA	EGLT
Consensus	q ldd	tqlpll	hf et	eglttiraf	e rf	q le	td nnia lfl aanrwlvr y gac
	1261	12	1281	1291	1301	1311	1321
SUR1ptotein	VL	TAA	T	S	S	NS	IFEL
SUR2Aprotein	VL	T	A	S	I	S	ISGS
Consensus	vl a	sis s	glv	g	l	yal nyl	nw vrnlad e q gavl l e e yeg
	1331	1341	1351	1361	1371	1381	1391
SUR1ptotein	L	A	P	S	L	I	P
SUR2Aprotein	M	D	P	S	Q	V	P
Consensus	p s	p wp	g i	i l	vry lkp	vlkhv a i	pgqk gicgrtsgskss slaffrmvdf
	1401	1411	1421	1431	1441	1451	1461
SUR1ptotein	EGR	I	I	D	G	I	D
SUR2Aprotein	DGR	I	V	I	D	G	I
Consensus	g i	idgidi	kplhtl	rsrls	ii	lqdp	lfsgrfnldpke kc d lwealeiaqlk vk lpg
	1471	1481	1491	1501	1511	1521	1531
SUR1ptotein	GL	D	A	I	I	T	E
SUR2Aprotein	GL	D	A	T	V	T	E
Consensus	gl da	tegg	enfs	gqrql	fclara	fvrk	si imdeatasidmatenilqkvvmtafadrvtvtiahr
	1541	1551	1561	1571	1581	1591	1601
SUR1ptotein	V	B	I	L	S	A	D
SUR2Aprotein	V	S	I	M	D	A	G
Consensus	v i	a lv	v g	e d	ll	k f	v

Figure 3.4.5. *Alignement des séquences codant pour les sous-unités SUR1 et SUR2 du canal K_{ATP} de rat.* Les nucléotides en noir montrent l'homologie des séquences codant pour les sous-unités SUR1 et SUR2A, en rouge les nucléotides différents entre les deux sous-unités. L'alignement présente 67 % d'homologie. Les rectangles verts indiquent les histidines présentes spécifiquement sur la partie extracellulaire de la sous-unité SUR1 (H11 ; H161 ; H326 ; H332 et H1273). L'alignement a été effectué à l'aide du programme Jellyfish (LabVelocity, USA).

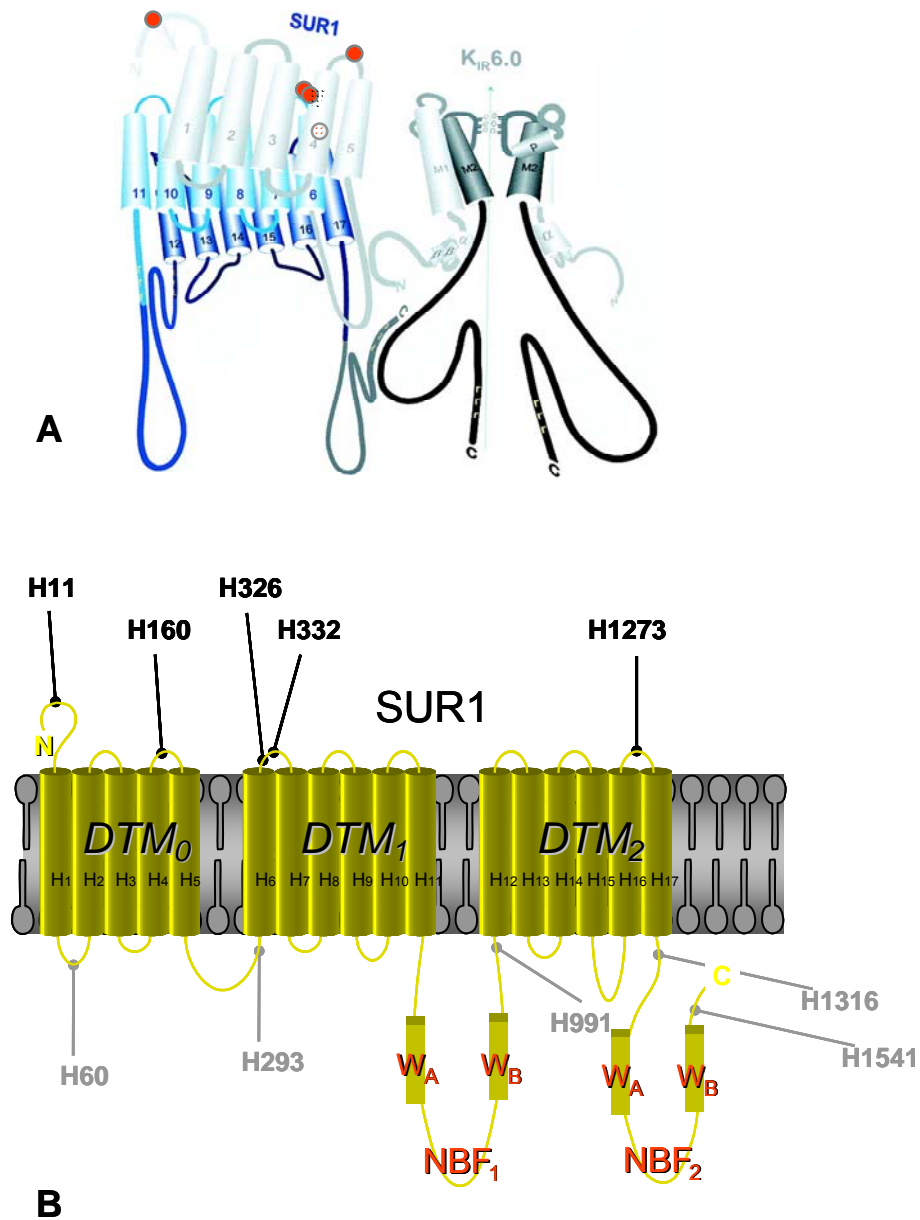


Figure 3.4.6. A-B. Représentation schématique de la localisation des histidines extracellulaires présentes spécifiquement sur la sous-unité SUR1 du canal K_{ATP} .
A. Représentation spatiale du canal K_{ATP} . Les points rouges représentent la localisation des histidines H-11; -160; -326; -332 et -1273 sur la sous-unité SUR 1.
DTM : domaine trans-membranaires; H : histidine; NBF : nucléotide binding fold

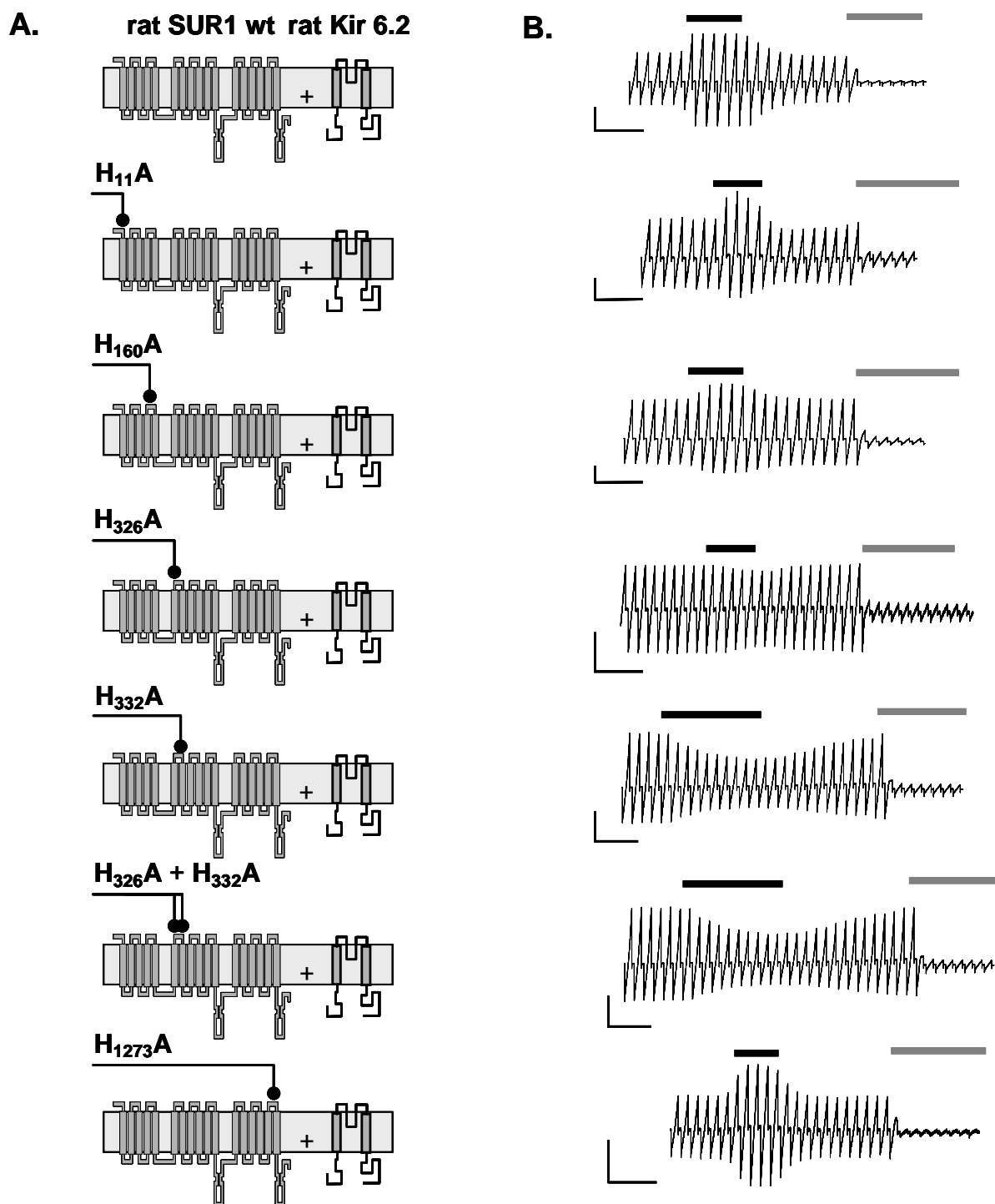


Figure 3.4.7. Effet du zinc sur les courants des canaux K_{ATP} des mutants H-11A; H-160A; H-326A; H-332A; H-1273A; et du double mutant H326A-H332A.

A. Représentation schématique de l'endroit de la mutation **B.** Exemples d'enregistrement en rampe de -120 à +40 mV. L'application de zinc 10 μ M est indiquée par une barre noire, celle de tolbutamide 250 μ M par une barre grise. Calibration 1 nA; 20 sec.

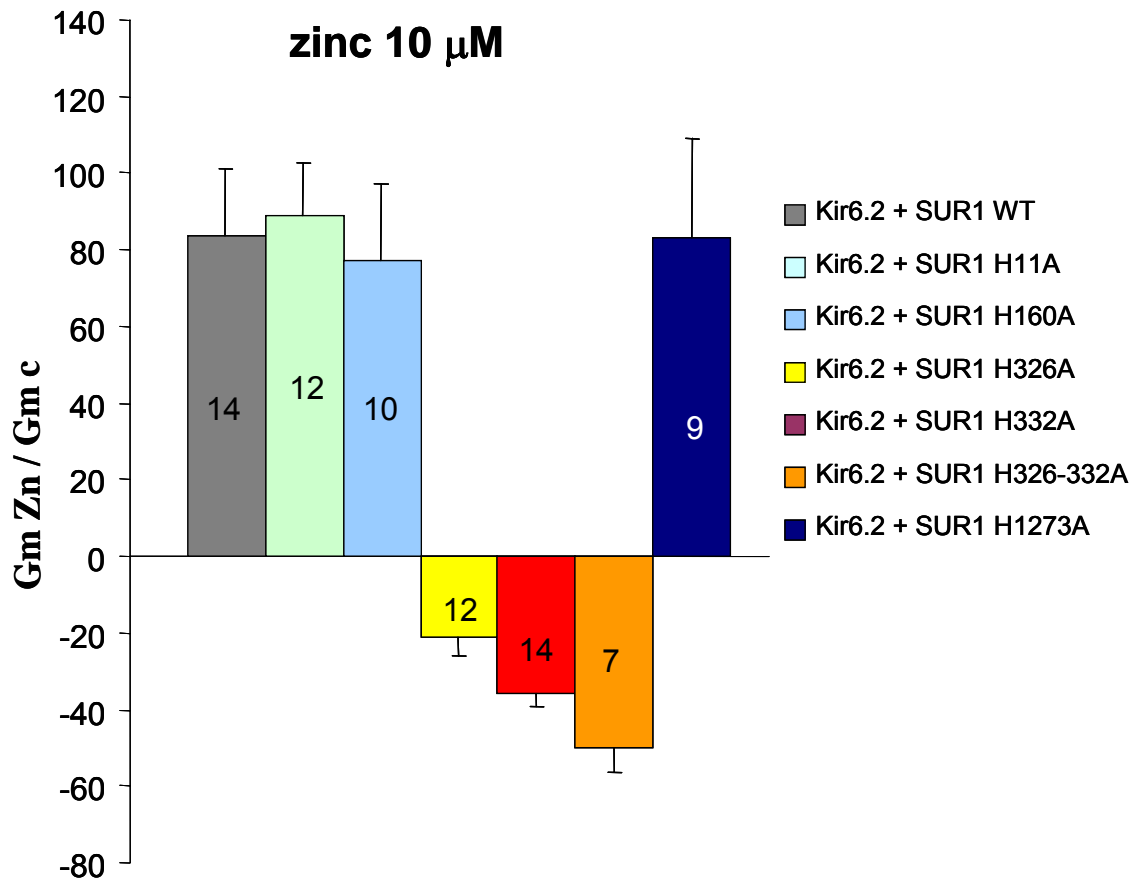


Figure 3.4.8. Histogrammes résumant les effets des mutations de la sous-unité SUR1 du canal K_{ATP} sur le sens et l'amplitude des effets du zinc. Les variations sont exprimées en moyennes \pm SEM des pourcentages du courant préexistant. Le nombre de déterminations est indiqué sur les histogrammes

Discussion : action moléculaire du zinc sur les canaux K_{ATP}

L'effet activateur du zinc sur le canal K_{ATP} a été décrit initialement sur les cellules RIN m5F (insulinome de rat) qui expriment de façon endogène un canal K_{ATP} de type pancréatique (Bloc et al. 2000). Dans cette lignée cellulaire, le zinc active de façon réversible une conductance linéaire qui s'inverse au potentiel d'équilibre du potassium soit à environ -82 mV dans les conditions expérimentales choisies. L'effet activateur du zinc est insensible aux bloqueurs des canaux potassiques dépendants du voltage comme le tétraéthylammonium (TEA, 20 mM) et la 4-AP (1 mM), mais il est complètement supprimé par un bloqueur spécifique des canaux K_{ATP} des cellules β -pancréatique, le tolbutamide (100 μ M). Dans les cellules RIN m5F, l'activation du canal K_{ATP} par le zinc s'exerce avec une haute affinité ($ED_{50} = 1.7$ μ M).

Sur une autre lignée de cellules β -pancréatiques de rat, les cellules INS-1E, le zinc exerce un effet identique : il active de façon réversible un courant potassique sensible au tolbutamide. L'activation par le zinc se fait également avec une relativement haute affinité (valeur ED_{50} de 0.7 μ M. Bancila V. et al., en préparation), proche de celle déterminée sur les cellules RIN m5F.

L'analyse par RT-PCR effectuée sur les cellules INS-1E a montré qu'elles expriment les sous-unités spécifiques du canal K_{ATP} des cellules β -pancréatiques, Kir6.2 et SUR1, et pas les sous-unités Kir6.1 ou SUR2A (Bancila V. et al., en préparation).

L'effet activateur du zinc sur le canal K_{ATP} mis en évidence au laboratoire (Bloc et al. 2000) n'avait jamais été décrit précédemment. Au contraire, un travail antérieur sur l'action des ions divalents (Kwok and Kass 1993) montrait un effet bloqueur du zinc sur le canal K_{ATP} de type cardiaque. Cette divergence de résultats nous a conduit à supposer que l'effet du zinc pouvait être différent en fonction du type de canal considéré, c'est à dire en fonction de sa composition en sous-unités. Afin de tester cette hypothèse, nous avons exprimé dans une lignée cellulaire, les cellules humaines HEK293T, des canaux K_{ATP} constitués par différentes combinaisons des sous-unités Kir et SUR du rat.

Notre choix s'est porté sur cette lignée comme système d'expression hétérologue pour trois raisons principales :

1. Les cellules HEK293T n'expriment pas de K_{ATP} endogène et, de façon plus générale, elles ne présentent qu'une relativement faible perméabilité potassique.
2. Elles montrent un taux d'expression transitoire de canaux recombinants correcte (de l'ordre de 20 à 40 % des cellules transfectées) et largement suffisant pour réaliser confortablement une étude électrophysiologique poussée.
3. Elles se prêtent facilement, de par leur morphologie, les caractéristiques de leurs membranes et leur robustesse in vitro, à l'enregistrement en patch-clamp, sur cellule entière des courants transmembranaires.

Les canaux K_{ATP} sont des doubles tétramères formés de quatre sous-unités SUR, contenant le site de liaison aux ouvreurs et aux sulfonylurées, et de quatre sous-unités Kir6.x, formant le canal potassique lui-même et portant le site d'inhibition par les ions d'ATP intracellulaires. Par l'expression transitoire dans les cellules HEK293T, de K_{ATP} recombinants formés de différentes combinaisons des sous-unités SUR et Kir6.x de rat et l'analyse électrophysiologique de leur sensibilité au zinc, nous avons pu montrer que la présence de l'isoforme SUR1 est nécessaire à l'effet activateur du zinc extracellulaire. Quand l'isoforme SUR2 est exprimée, seule une action inhibitrice du zinc sur le courant K_{ATP} a pu être mesurée. L'influence des 2 isoformes de Kir6.x testées ne concerne que l'amplitude de l'effet : les actions soit inhibitrice, soit activatrice, du zinc extracellulaire sont plus prononcées lorsque l'isoforme Kir6.1 est co-exprimée avec la sous-unité SUR1 ou SUR2A, respectivement, que lorsque Kir6.2 est présent. Ces résultats nous ont donc conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle **la sous-unité SUR1 est indispensable à l'expression de l'effet activateur du zinc extracellulaire sur le K_{ATP} .**

Il est important de noter que, au-delà des informations sur les bases moléculaires responsables de l'action du zinc sur les K_{ATP} , notre étude in vitro basée sur l'analyse de canaux recombinants apporte une explication claire au fait que le zinc active les K_{ATP} des cellules β -pancréatiques ou des cellules granulaires de l'hippocampe (qui contiennent la sous-unité SUR1) mais pas les K_{ATP} cardiaques par exemple, qui sont formés eux de la combinaison des sous-unités SUR2 et Kir6.2 (Chutkow et al. 1996).

Sur la base de différentes données obtenues antérieurement au laboratoire, nous sommes arrivés à la conclusion que l'effet activateur du zinc extracellulaire résultait **d'une action directe, probablement par simple liaison de l'ion divalent sur un domaine extracellulaire du K_{ATP}** . Principalement, ces données sont les suivantes:

1. l'effet activateur du zinc extracellulaire et sa réversibilité suite au lavage sont rapides ($>1\text{sec}$),
2. il est présent sur des canaux K_{ATP} isolés lors d'enregistrements en configuration outside/out (Bloc et al. 2000), dans une situation où la majorité des voies de signalisation intracellulaire est supprimée
3. il est insensible aux chélateurs intracellulaires des divalents. En effet, dans tous nos travaux l'activation du courant K_{ATP} par le zinc extracellulaire a été mise en évidence et a été étudiée en présence de 1mM EGTA dans le milieu intrapipette, que ce soit en configuration cellule entière, ou sur canal unitaire (en configuration out side/out). De plus dans cette dernière configuration, l'activation des canaux K_{ATP} isolés n'est pas altérée lorsqu'un chélateur plus sélectif du zinc (DTPA 1mM) est utilisé dans la pipette de patch-clamp (Fig. 6. dans (Prost et al. 2004)).

Ces deux conclusions, action directe du zinc par liaison au canal et présence indispensable de l'isoforme SUR1, nous ont logiquement conduit à supposer que l'activation du K_{ATP} par le zinc serait due à la liaison du divalent sur un site extracellulaire localisé spécifiquement sur la sous-unité SUR1, site de liaison absent sur l'isoforme SUR2A.

La question suivante résidait donc dans l'identification du site de liaison du zinc, spécifique de la sous-unité SUR1. D'après la littérature, outre des motifs complexes impliquant des séquences d'acides aminés définies («zinc-finger», par exemple) la liaison du zinc sur les protéines s'effectuerait préférentiellement sur les résidus cystéines, histidines ou acides tels que l'aspartate ou le glutamate (Tainer et al. 1991). En particulier, sur d'autres canaux ioniques régulés également par le zinc (NMDA, canal Cl^- , etc...), différents auteurs (Low et al. 2000; Choi and Lipton 1999), ont déjà mis en évidence des sites de liaison au zinc formés par des résidus histidines.

Par la titration de la sensibilité au pH de l'action activatrice de zinc extracellulaire et par la démonstration que cet effet est aboli suite au traitement par le DEPC des canaux K_{ATP} recombinants, nous avons pu déterminer que le site de liaison du zinc impliquerait des résidus

histidines. La comparaison des séquences des isoformes de SUR1 et SUR 2A de rat a mis en évidence cinq histidines (H11; H160; H 326; H332 et H1273) extracellulaires présents uniquement sur la sous-unité SUR1, la seule activable par le zinc.

Par une approche de mutagenèse dirigée, nous avons ensuite cherché à déterminer laquelle ou lesquelles de ces histidines formeraient le site de liaison du zinc. L'étude électrophysiologique de l'action du zinc sur les canaux recombinants où les histidines de la sous-unité SUR1 de rat (H11; H160; H 326; H332 et H1273) ont été mutées, une par une, nous a permis de mettre en évidence le rôle critique des histidines (H326 et H332) dans l'activation du canal K_{ATP} . En effet, le zinc extracellulaire n'active plus des canaux recombinants contenant la sous-unité SUR1 mutée en H326A ou en H332A. Sur ces constructions, nous avons enregistré une inhibition du courant K_{ATP} que nous attribuons à la suppression de l'effet activateur du zinc, démasquant l'action inhibitrice du divalent. Sur ces canaux mutants, le zinc extracellulaire exercerait donc un effet comparable à celui exercé sur les canaux natifs comprenant la sous-unité SUR2 (dépourvue naturellement des H326 et H332) ou sur les canaux formés avec la sous-unité SUR1 mais enregistrés dans un milieu extracellulaire acide ($pH < 6.4$). Dans cette dernière condition expérimentale, notre hypothèse était que la protonisation des résidus histidines empêcherait la liaison du zinc extracellulaire sur son site de liaison activateur de la sous-unité SUR1.

Suite à ces résultats, nous avons examiné les conséquences de la double mutation H326A - H332A et constaté un effet cumulatif de celle-ci, le zinc extracellulaire provoquant une inhibition des courants K_{ATP} encore plus prononcée que lors de la simple mutation (H326A ou H332A). L'effet cumulatif de la double mutation s'expliquerait :

- soit par l'existence de deux sites de liaison activateurs pour le zinc, un sur H326 et l'autre sur H332
- soit par le rôle conjugué des deux histidines dans la formation d'un site activateur unique.

Dans l'état actuel de notre travail, une étude complémentaire est nécessaire afin de trancher entre ces deux hypothèses ou même d'évaluer des interprétations alternatives, comme par exemple celle d'une interaction des mutations H326A et H332A avec le mécanisme d'inhibition du K_{ATP} par le zinc extracellulaire.

Cependant, le rôle clé des deux histidines (H326 et H332) conjuguées dans la formation du site activateur du zinc extracellulaire sur le canal K_{ATP} de rat a été confirmé par l'étude du canal K_{ATP} humain de type β -pancréatique.

L'examen de la séquence de la sous-unité SUR1 du canal humain révèle une différence en ce qui concerne les résidus histidines formant le site de liaison du zinc sur la sous-unité SUR1 de rat. En position 332 la sous-unité SUR1 du canal humain possède un résidu aspartate et non une histidine comme c'est le cas chez le rat.

Dans un premier temps nous avons pu montrer, par l'analyse électrophysiologique de canaux K_{ATP} recombinants formés de la combinaison des sous-unités Kir6.2 et SUR1 humaines, une action inhibitrice du zinc extracellulaire. L'inhibition est d'une amplitude comparable à celle exercée par le zinc, à même concentration extracellulaire (10 μ M), sur le canal de rat formé de la combinaison des sous-unités Kir6.2 et SUR1, et muté en position H332A.

Dans un deuxième temps nous avons réalisé une étude électrophysiologique similaire sur un canal formé cette fois par la combinaison des sous-unités Kir6.2 et SUR1 D₃₃₂H humaines. Les résultats montrent (Fig.3.4.9) que le zinc extracellulaire active le canal K_{ATP} humain muté avec une amplitude comparable à celle observée sur le canal K_{ATP} de type β -pancréatique (Kir6.2 et SUR1) natif de rat. La mutation en histidine de l'aspartate 332 présent sur la sous-unité SUR1 du canal humain change donc complètement l'effet du zinc qui devient alors activateur.

L'ensemble des données obtenues sur les canaux humains confirme que la présence conjuguée des deux histidines H326 et H332 est bien nécessaire à la formation d'un site activateur pour le zinc extracellulaire et généralise cette conclusion aux canaux K_{ATP} des différentes espèces.

Concernant l'inhibition par le zinc, observable : a) sur les K_{ATP} humains natifs, b) sur les K_{ATP} de rat constitués par la sous-unité SUR2, c) lors du lavage du zinc sur les canaux de rat constitués par la sous-unité SUR1, nous n'avons pour l'instant que peu d'information et nos interprétations sont donc embryonnaires. Des résultats préliminaires semblent indiquer que cette fois la sous-unité Kir6.x jouerait un rôle essentiel. En effet, en exprimant dans les cellules HEK293T une forme tronquée de Kir 6.2 (Kir 6.2 Δ C26, où les 26 derniers acides aminés de l'extrémité c-terminale ont été délétés, forme capable de conduire à elle seule, en

l'absence de toute sous-unité SUR un courant potassique sensible à l'ATP (Tucker et al. 1997), nous n'avons pu mesurer qu'une faible inhibition de courant par le zinc extracellulaire (inhibition d'amplitude comparable à celle observée sur les canaux constitués des sous-unités Kir6.2 et SUR2). Ces données, qui restent à confirmer, appuient l'hypothèse selon laquelle Kir6.x serait la cible principale du zinc extracellulaire pour son action inhibitrice.

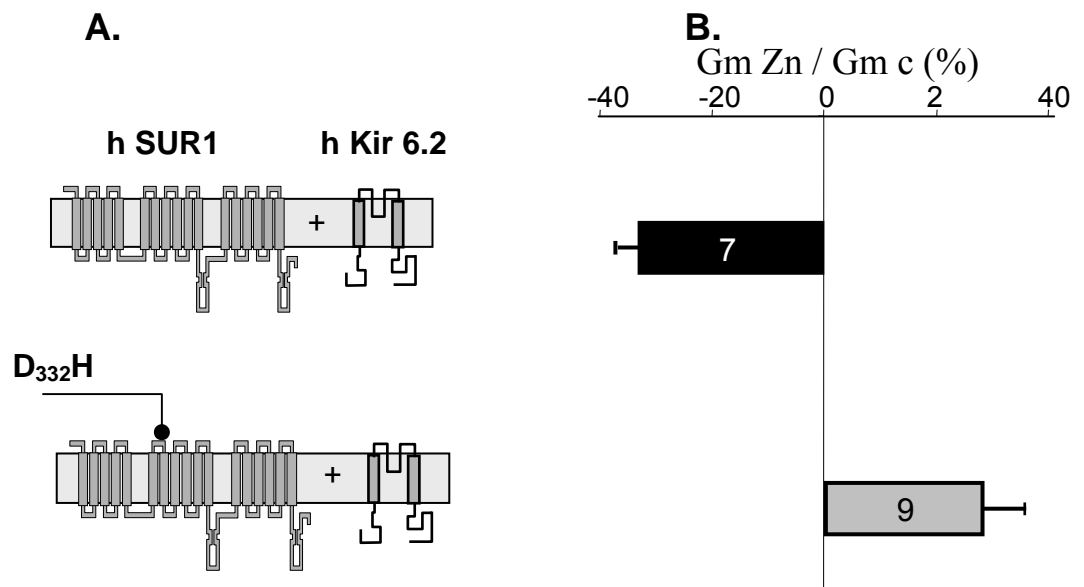


Figure 3.4.9. Effet du zinc extracellulaire sur le canal K_{ATP} humain natif et muté.

A. Représentation schématique du canal humain natif comparé à celui muté en position 332 par un résidu histidine. **B.** Histogrammes représentant l'effet du zinc extracellulaire (10 μM) sur des canaux K_{ATP} humains recombinants natifs, et mutés formés des sous-unités Kir6.2 et SUR1 (canal natif) Kir6.2 et SUR1D₃₃₂H (canal muté). Les données présentées correspondent à la moyenne ± SEM des % de variation de la conductance des K_{ATP} due à l'application du zinc. Les chiffres présentés sur les barres indiquent le nombre de cellules testées dans chaque condition.

Dans le SNC, des canaux K_{ATP} de compositions moléculaires diverses sont exprimés. Dans l'hippocampe, les ARN messagers des sous-unités Kir 6.2 et SUR 1 ont été trouvés

abondants par la technique d'hybridation *in situ*, surtout dans le gyrus denté, mais aussi de façon moindre dans les cellules pyramidales des régions CA1 et CA3. Cette composition moléculaire (Kir 6.2 et SUR 1) est la même que celle des canaux exprimés dans les cellules β -pancréatiques. La concordance entre la localisation du zinc et des K_{ATP} dans les fibres moussues de l'hippocampe, fait donc de cette région du SNC une structure idéale pour étudier les relations entre cet ion et ce type de canal et leurs répercussions dans le fonctionnement de la transmission glutamatergique et ses régulations présynaptiques.

3.5. *Le zinc une substance neuroprotectrice endogène*

Des tranches d'hippocampe, prélevées sur le rat nouveau né et cultivées plus d'une semaine se développent selon un plan organotypique, imitant la structure et le fonctionnement de l'hippocampe *in vivo*. Après 12-14 jours *in vitro*, la coloration des cultures à l'iodure de propidium (PI) n'a révélé qu'un taux négligeable de cellules mortes, attestant de l'excellent état des tranches au moment de procéder à l'expérience elle-même.

La brève exposition à l'ischémie (en fait, 10 min en conditions d'anoxie et d'hypoglycémie) n'entraîne pas ou peu de mort cellulaire immédiate. En effet, 2 h après l'épisode, le marquage au PI reste faible. Très peu de cellules sont mortes. En revanche, 24 heures après l'ischémie, la coloration au PI révèle une mort cellulaire massive dans les cultures-témoin (sans zinc). La coloration est particulièrement accentuée dans les régions CA3, CA2 et dans le gyrus denté ; elle est faible en revanche au niveau CA1. La mort cellulaire des zones CA2-CA3 et gyrus denté s'accroît encore entre 24 et 48 heures après l'épreuve, mais l'augmentation est plus modérée que pendant les premières 24 h (Fig. 3.5.1 A).

Effet aigu (zinc présent pendant l'ischémie)

L'administration de zinc (1 ou 5 μM) dans le milieu de perfusion 5 minutes avant, et pendant l'épreuve, a pour conséquence une diminution notable de la coloration au PI 24 et 48 heures plus tard. Le marquage au niveau du CA3 et du gyrus denté est nettement moins prononcé que dans les témoins (Fig. 3.5.1 A). Nous avons retrouvé l'action protectrice du zinc contre la mort cellulaire différée dans toutes les expériences conduites « en aigu ». L'effet a été quantifié en mesurant l'intensité de la coloration au PI pour le point de 24 heures. Les histogrammes de la figure 3.5.1.B. comparent l'intensité du marquage dans les groupes « témoins », « zinc » « zinc + tolbutamide » ainsi que « Ca-EDTA ». La protection exercée par le zinc contre la mort cellulaire est statistiquement significative ($P < 0.001$, test-t de Student, valeurs indépendantes). Nous avons utilisé le Ca-EDTA (500 μM) comme chélateur afin de voir le rôle du zinc endogène dans la neuroprotection. Son administration augmente significativement la mort cellulaire (Fig. 3.5.1 A. 3^{ème} colonne).

Est-ce en activant les K_{ATP} que le zinc a protégé les cellules de la mort différée causée par l'épisode anoxique ? Nous avons testé cette hypothèse en donnant simultanément du tolbutamide (250 μ M) avec le zinc (1 μ M). L'effet protecteur du zinc est alors pratiquement annihilé (Fig. 3.5.1 B). L'application de diazoxide à la concentration de 10 μ M donne les mêmes résultats que le zinc (non illustré). Ces données confortent l'idée que, si le zinc assure une protection contre la mort cellulaire induite par l'ischémie, il le fait en activant des canaux K_{ATP} présynaptiques.

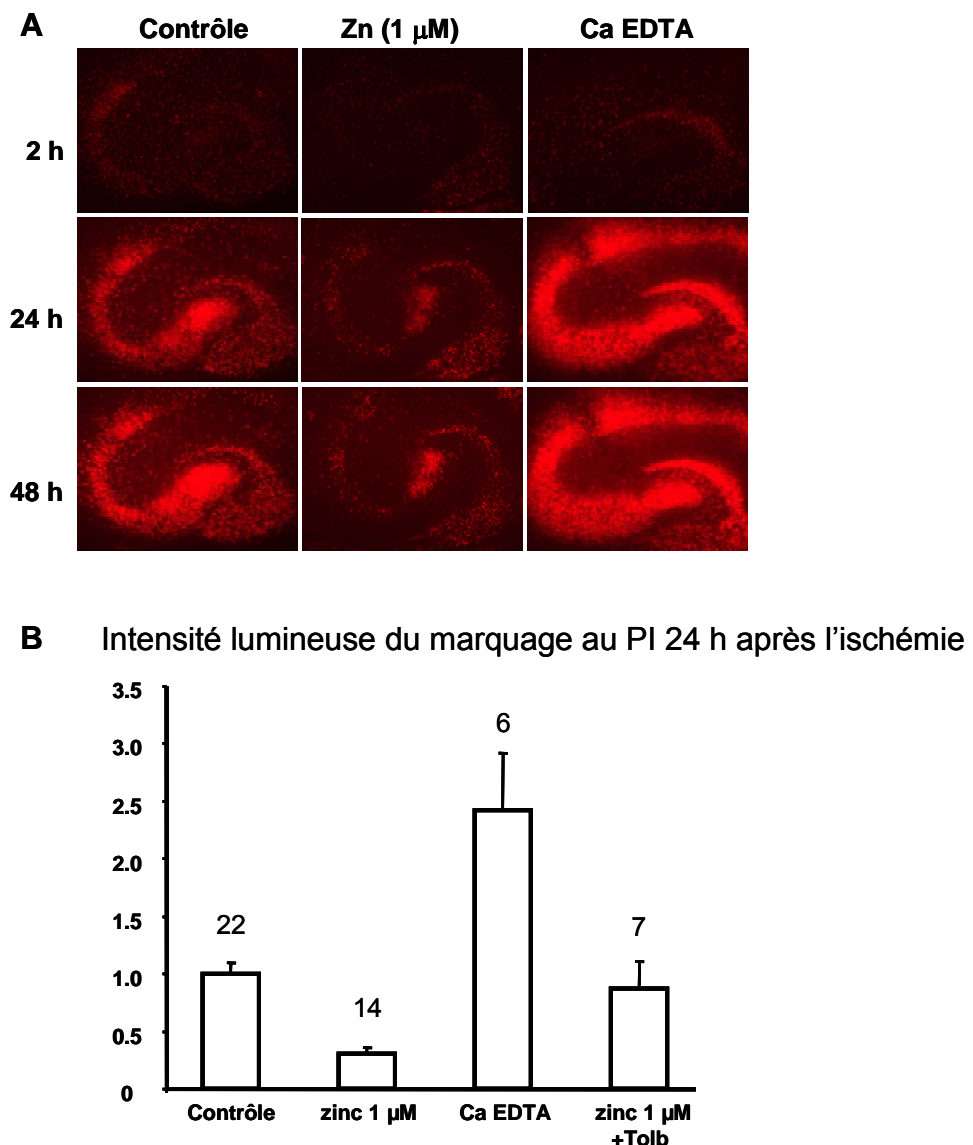


Figure 3.5.1. Effet du zinc en administration aiguë sur la mort cellulaire induite par un brève période d'ischémie (10 min en absence de glucose et d'oxygène).

A. Images de coloration au iodure de propidium (PI) de cultures organotypiques d'hippocampe prises à différents temps après l'ischémie (2, 24 et 48 h). La culture contrôle n'a pas été traitée au zinc. Dans ce groupe, le marquage au PI est très faible deux heures après l'épreuve, ce qui indique que la préparation était en bon état et que l'épisode ischémique n'entraîne que peu de toxicité cellulaire à court terme. Par contre, la mort cellulaire est très importante 24 et 48 heures après l'ischémie, surtout dans le gyrus denté et la région CA2-CA3. Dans le groupe zinc, le zinc (1 μ M) est appliqué 5 min avant et durant les 10 min d'ischémie. On constate alors que le marquage au PI est beaucoup moins intense que dans les cultures contrôles pour les temps de 24 et 48 heures. Au contraire, la chélation du zinc par l'administration du Ca EDTA (500 μ M; 3^{ème} colonne) augmente considérablement la mort cellulaire; le marquage au PI est très prononcé.

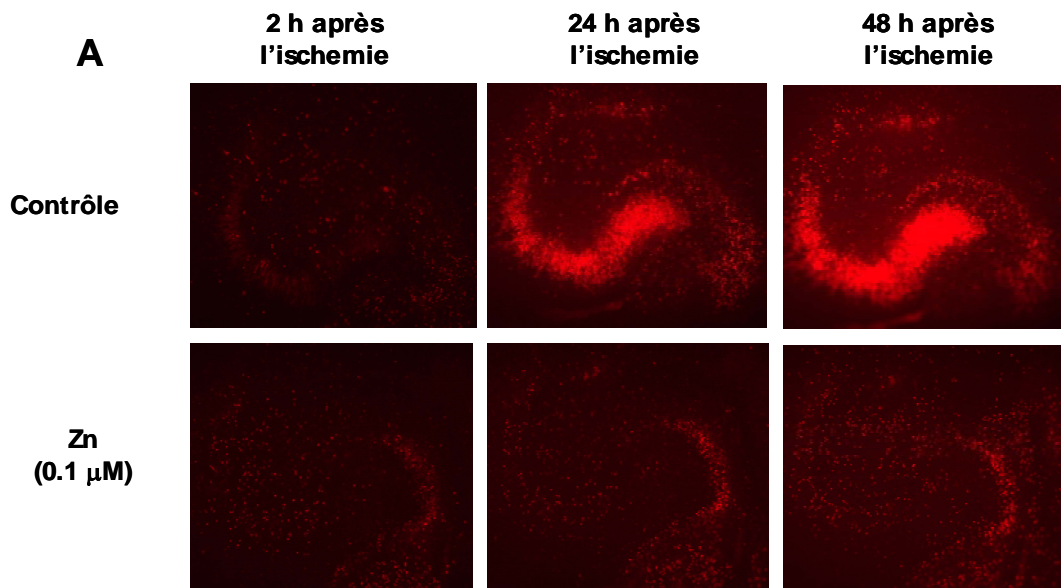
B. Quantification des résultats représentant les moyennes \pm SEM de l'intensité du marquage au PI 24 heures après l'ischémie. Le nombre des expériences dans chaque condition est indiqué au-dessus des histogrammes.

Effet chronique : zinc ajouté au milieu de culture

Les cultures organotypiques d'hippocampe étant en routine maintenues dans un milieu sans zinc ajouté, il est fort probable qu'elles souffrent d'un certain degré de déficience en cet ion divalent. C'est pourquoi, nous avons cultivé des tranches organotypiques d'hippocampe pendant 11-12 jours en présence d'une faible concentration de zinc (0.1 μM). Ensuite, les épreuves d'hypoglycémie - anoxie, et les colorations successives au PI, ont été pratiquées en utilisant le protocole décrit précédemment, mais le zinc n'a pas été ajouté au milieu pendant l'épreuve.

Dans le groupe contrôle (sans zinc), les dégâts cellulaires occasionnés par l'hypoglycémie - anoxie sont semblables aux dégâts observés dans le groupe contrôle lors du protocole précédent (effet aigu). Mais dans les cultures qui se sont développées pendant 12 jours dans un milieu contenant une faible dose de zinc, l'épreuve d'ischémie cause moins de mort cellulaire différée : l'intensité de la coloration au PI à 24 h diminue de manière significative (Fig.3.5.2.A). Sur 8 expériences, la diminution du marquage dans le groupe « zinc chronique » (0.1 μM durant 12 jours) correspond à 60 % de la valeur contrôle (Fig.3.5.2.B).

Afin de déterminer la quantité de zinc dans les cultures organotypiques d'hippocampe nous avons effectué les colorations de Timm et au TSQ en fluorescence. La coloration de Timm s'est révélée inadaptée à ce type de préparation, car l'épaisseur de la tranche ne permet pas une bonne pénétration du colorant. La technique de mesure en fluorescence (TSQ) est mieux adaptée car elle permet l'utilisation des tissus frais. Comme on le voit dans la figure.3.5.3.A. les cultures organotypiques maintenues dans un milieu standard (sans adjonction de zinc) présentent un marquage au TSQ à peine visible. Par contre les tranches cultivées dans milieux enrichi en zinc (100 nM) accumulent ce métal au cours du temps, ce qui se traduit par un marquage net au TSQ (Fig.3.5.3.B.). Pour comparaison, nous avons prélevé des tranches d'hippocampe sur un rat de 20 jours d'âge et les avons traitées au TSQ. La silhouette des structures hippocampique se distingue alors aisément, montrant un marquage prononcé dans la région CA3 (Fig.3.5.3.C).



B Intensité lumineuse du marquage au PI 24 h après l'ischémie

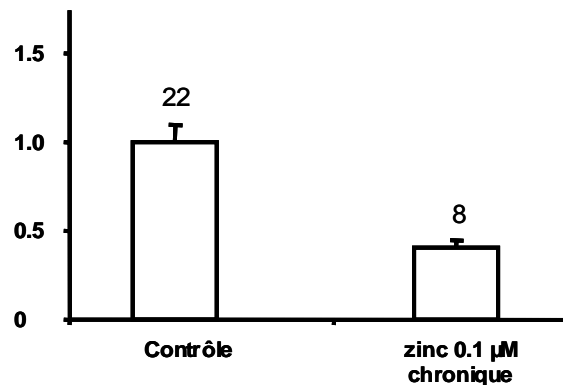


Figure 3.5.2. Effet du zinc (0.1 μM) en administration chronique (12 jours) avant l'épreuve d'ischémie.

A. Comme dans la figure 3.5.1., le contrôle représente les images de coloration au PI faite sur une tranche 2, 24 et 48 heures après un épisode ischémique de 10 min. comme dans l'expérience précédente, la mort cellulaire est visible dans le gyrus denté, et très marquée dans les régions CA2-CA3, 24 et 48 heures après l'ischémie. Le groupe zinc a été traité à faible concentration (0.1 μM) pendant les 12 jours de culture mais n'a pas reçu de zinc pendant l'épisode d'anoxie-hypoglycémie. Ce groupe ne montre qu'un très faible marquage au PI dans toutes les régions et à tous les temps de coloration.

B. Histogrammes représentant les moyennes ± SEM de l'intensité du marquage au PI à 24 heures après l'ischémie. La supplémentation préalable en zinc (0.1 μM) a permis une diminution du marquage de 60 % ($P < 0.005$). Le nombre des expériences dans chaque condition est indiqué au-dessus des histogrammes.

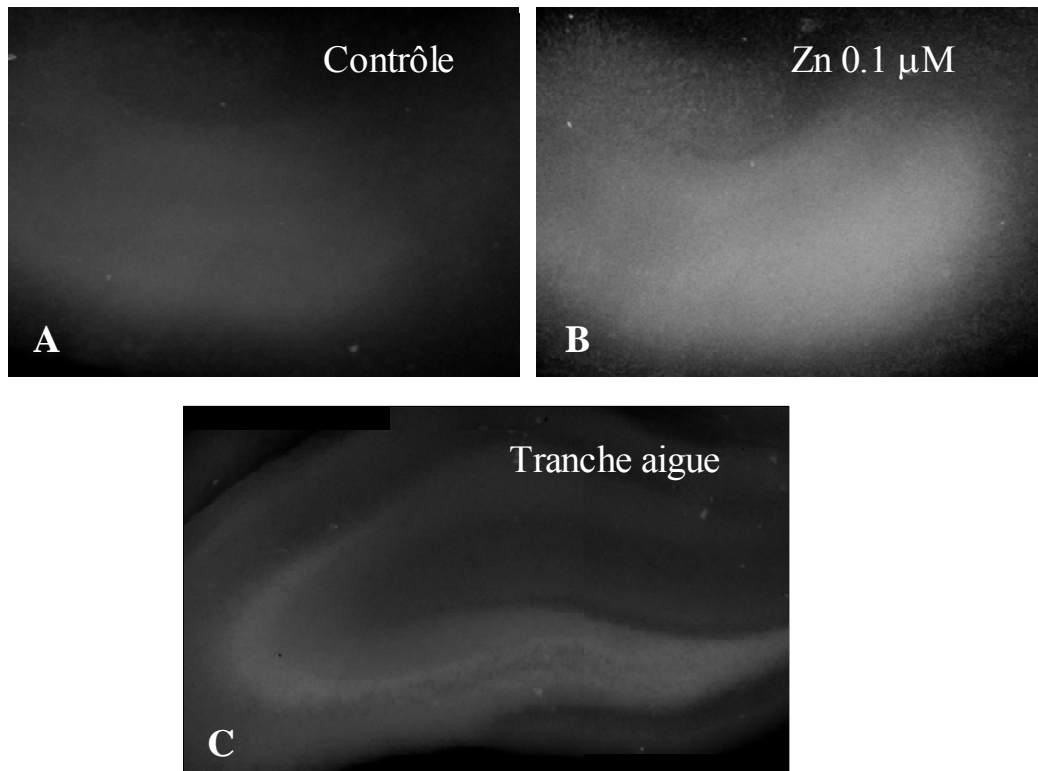


Figure 3.5.3. *Marquage en fluorescence du zinc dans les tranches d'hippocampe*

A. Marquage au TSQ d'une tranche organotypique d'hippocampe cultivée dans des conditions standard. (contrôle). L'intensité lumineuse du marquage est très faible. **B.** Dans une culture élevée dans un milieu contenant du zinc ($0.1\ \mu\text{M}$) durant 12 jours, l'intensité du marquage est nettement visible. **C.** Visualisation du zinc dans une tranche de $50\ \mu\text{m}$ d'hippocampe de rat, prélevée à 20 jours d'âge.

Discussion : Zinc et neuroprotection

Le cerveau est particulièrement vulnérable à l'ischémie. Cette vulnérabilité élevée reflète le taux métabolique élevé du tissu cérébral. Bien que le cerveau humain représente seulement environ 2.5% du poids corporel, il utilise environ 25% du métabolisme basal.

Il est bien établi qu'un épisode d'anoxie ou d'ischémie cérébrale conduit à la réduction du métabolisme énergétique des neurones (LOWRY et al. 1964; Siesjo 1978). Cela réduit l'efficacité des pompes ioniques, perturbant l'équilibre ionique de part et d'autre de la membrane cellulaire et dépolarisant la cellule (Hansen 1985). L'ischémie induit rapidement une faible élévation du $[K^+]_e$ suivie, 2 à 4 min plus tard, d'une augmentation massive du $[K^+]_e$ et d'une diminution concomitante du $[Na^+]_e$ et $[Ca^{2+}]_e$ (Astrup et al. 1977; Hansen and Zeuthen 1981; Harris et al. 1981; Siemkowicz and Hansen 1981).

La dépolarisation causée par l'ischémie peut déclencher une libération massive des acides aminés excitateurs (Glu et Asp) et favorise une entrée de calcium, soit à travers des canaux calciques dépendant du potentiel, soit via des récepteurs-canaux perméables au calcium (Miller 1987; Tsien et al. 1988). Des études utilisant des microélectrodes ion-sélectives montrent que, durant l'anoxie/ischémie, l'augmentation du calcium intracellulaire est très rapide et dépend des récepteurs NMDA car elle est bloquée par les antagonistes kétamine ou MK-801 (Silver and Erecinska 1990). D'autres études effectuées sur des neurones pyramidaux dissociés du cortex suggèrent l'implication des canaux calciques de type L (Pisani et al. 1998).

La figure 3.5.4. récapitule les changements induits par une ischémie aigue. Des enregistrements concomitants du PM d'une cellule de la région CA1, du pH et du Ca^{2+} intracellulaires, du $[K^+]_e$ extracellulaire et de l'électrocorticogramme (ECoG) de la région frontale, montrent que la privation d'oxygène induit une légère alcalinisation de courte durée suivie d'une acidification progressive. La concentration du Ca^{2+} intracellulaire augmente rapidement après la privation d'oxygène. Une légère hyperpolarisation initiale est suivie d'une dépolarisation progressive. L'activité électrique globale enregistrée par ECoG diminue rapidement (Silver and Erecinska 1990).

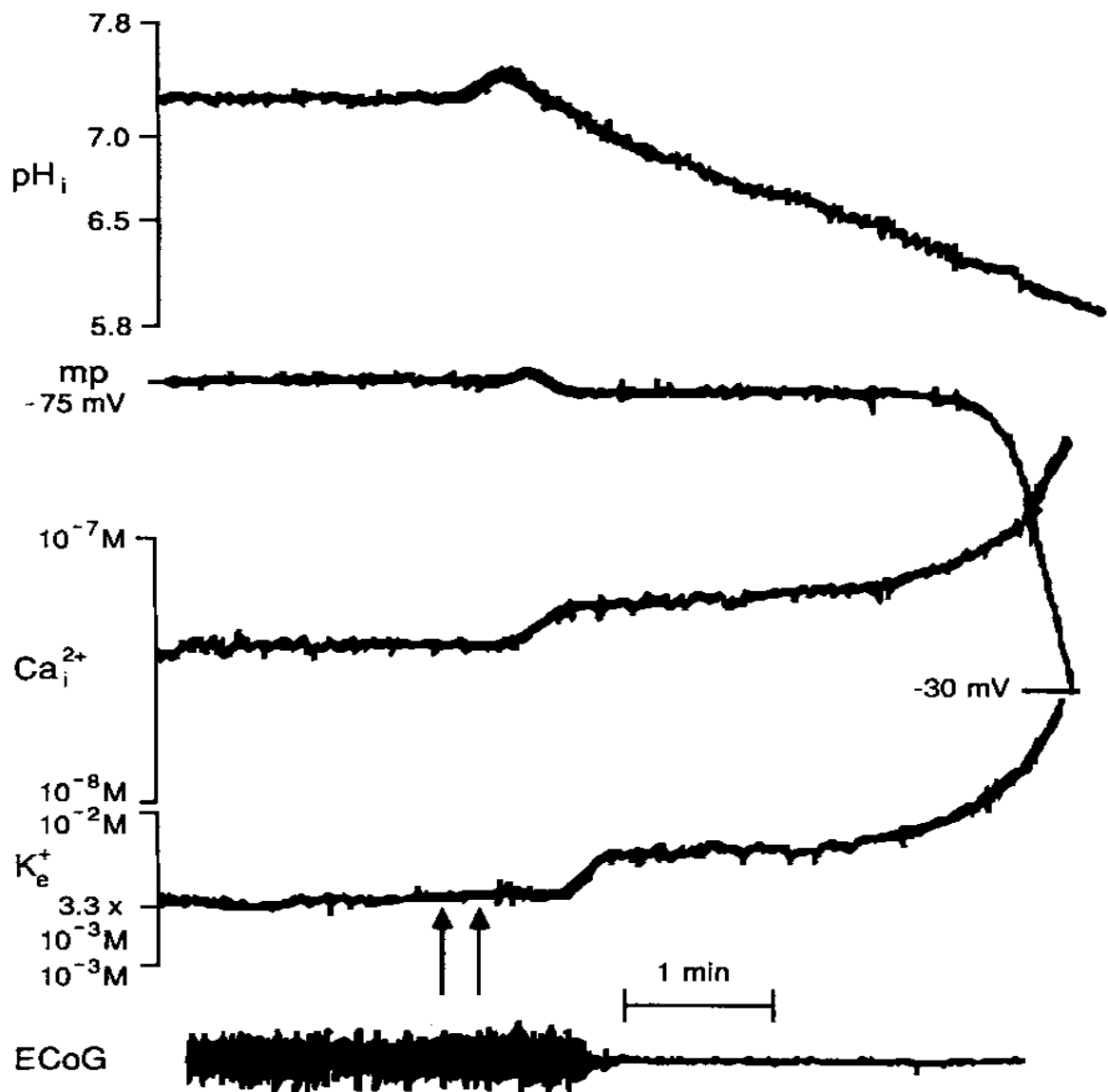


Figure 3.5.4. Enregistrements simultanés du pH et du Ca²⁺ intracellulaires, du PM et du [K⁺] extracellulaire dans l'hippocampe, ainsi que de l'ECoG frontale durant une ischémie induite par occlusion artérielle. La première flèche correspond à l'occlusion artérielle, la deuxième à l'instant où la PO₂ atteint la valeur 0 dans le tissu, d'après (Silver and Erecinska 1990).

On peut comprendre que dans les structures où le canal K_{ATP} est fortement exprimé la baisse du taux d'ATP intracellulaire et/ou l'action du zinc s'opposent à la dépolarisation, ce qui peut protéger les cellules des dommages liés à l'ischémie.

Neurotoxicité du zinc

Nous montrons ici que, dans des conditions expérimentales bien définies, le zinc peut exercer un effet neuroprotecteur contre la mort cellulaire retardée, consécutive à un bref épisode « ischémique ». Or, les données de la littérature sont contradictoires sur ce point. Certains trouvent que le zinc est une substance neurotoxique, d'autres concluent à un effet protecteur. Nous verrons que la contradiction n'est peut-être qu'apparente et que le zinc pourrait bien avoir des effets opposés, suivant les conditions et surtout suivant les concentrations.

Exposer pendant 15 min des neurones en culture au zinc, à des concentrations atteignant 300 ou 600 μM , induit une mort cellulaire qui se manifeste après 24 h (Yokoyama et al. 1986). Cette action neurotoxique peut s'exercer à des concentrations plus basses (100-300 μM) si l'exposition au zinc se fait sur des cellules dépolarisées préalablement par du potassium ou du kaïnate. Les substances exerçant une action chélatrice sur le zinc atténuent dans ces conditions la mort cellulaire différée. Le mécanisme de cet effet neurotoxique pourrait passer par une entrée importante de zinc dans les cellules postsynaptiques. Effectivement, le zinc peut pénétrer dans les neurones, surtout si la cellule est préalablement dépolarisée, à travers divers canaux, particulièrement les canaux calciques. Par exemple, Freund et Reddig (1994), utilisant des cultures primaires de cortex exposées à l'AMPA et au zinc pour induire la mort cellulaire, et jouant avec des chélateurs du zinc et/ou des antagonistes des récepteurs au glutamate, ont montré que :

- bloquer le récepteur NMDA associé avec un canal calcique par le MK-801 ne modifie pas la toxicité du zinc ;
- bloquer le récepteur AMPA par le CNQX diminue la toxicité, indiquant que ce récepteur pourrait être impliqué;
- chélater le zinc et le calcium par l'EDTA ou l'EGTA supprime l'effet toxique, suggérant que l'entrée des deux divalents initie la neuro dégénérescence.
- bloquer les canaux calciques de type L par le diltiazem et la nimidopine, exerce un effet protecteur, suggérant que l'effet passe par une activation de ces canaux et un influx de zinc et de calcium.

L'entrée de zinc via les canaux calciques voltage-dépendants et les récepteurs au glutamate fourniraient donc au zinc des voies préférentielles d'entrée dans les cellules, mais

d'autres acteurs, comme l'échangeur $\text{Na}^+ - \text{Zn}^{2+}$ pourraient également jouer un rôle (Ohana et al. 2004). De plus, lorsque sa concentration augmente dans les terminaisons nerveuses, le zinc est capable de se substituer au calcium pour déclencher la libération des transmetteurs (Dunant et al. 1996). Cela peut contribuer significativement à la mort cellulaire lorsque le zinc est présent en forte concentration. Pour une revue sur la toxicité cérébrale du zinc, voir (Choi and Koh 1998).

Effet neuroprotecteur du zinc

Les cultures organotypiques de l'hippocampe se sont révélées très favorables pour déterminer si l'activation des K_{ATP} par le zinc - et la réduction de la libération de glutamate consécutive - pouvaient assurer une protection en cas de stress « ischémique ». Prélevées sur le rat nouveau-né et cultivées, en conditions habituelles, dans un milieu de culture sans adjonction de zinc, les tranches devaient probablement souffrir d'un certain degré de carence. Leur seul apport de zinc pouvait provenir du sérum ajouté au milieu de culture. La concentration du zinc libre dans le sérum des mammifères étant estimée à 10^{-10} M (Magneson et al. 1987) et la proportion de sérum dans le milieu de culture étant de 25%, le zinc dans le milieu final devait atteindre tout au plus quelques centaines de pM. Que le zinc, administré pendant l'épisode ischémique, protège les cultures conduites dans les conditions standard contre la mort cellulaire différée, suggérait déjà que la préparation pouvait ne pas avoir accumulé les fortes quantités qui caractérisent l'hippocampe *in vivo*. Cette hypothèse est renforcée par les résultats, encore préliminaire, de nos expériences de coloration au TSQ (Fig.3.5.3.).

Ce point de vue est renforcé par les expériences où le zinc est donné en faible concentration tout au long du développement des cultures – mais pas pendant l'ischémie. La protection, dans ce cas, est très certainement assurée par le zinc endogène, libéré par les fibres moussues dépolarisées pendant l'épisode ischémique.

En se fondant sur les résultats des expériences sur les fibres moussues décrites plus haut, on peut attribuer, avec une bonne probabilité, l'effet protecteur du zinc administré pendant l'ischémie, à une activation des canaux K_{ATP} , principalement présynaptiques. Cette hypothèse est renforcée par les résultats pharmacologiques : en effet, l'application concomitante du tolbutamide (bloqueur de canaux K_{ATP}) supprime l'effet protecteur du zinc, tandis que le diazoxide (ouvreur des K_{ATP}) mime au contraire cet effet.

Nous proposons les mécanismes suivants pour expliquer la mort différée observée dans les tranches organotypiques d'hippocampe soumises à une brève période d'anoxie -

hypoglycémie. Les lésions prédominent dans la région CA2-CA3 de la Corne d'Ammon ainsi que dans la couche granulaire du gyrus denté. Pendant et juste après l'épisode ischémique, l'ensemble des cellules et spécialement les terminaisons nerveuses, doivent subir une dépolarisation importante (Ben Ari 1990). Les fibres moussues libèrent des quantités massives de glutamate sur les neurones pyramidaux CA3 et sont elles-mêmes envahies par du calcium dont on connaît l'action délétère sur les processus de mort cellulaire, dont l'apoptose. Dans les conditions physiologiques (stocks suffisants de zinc dans les vésicules synaptiques) ou si l'on administre du zinc (μM) à la préparation, l'ion divalent active les K_{ATP} des fibres moussues ce qui a un double effet : 1) les éléments présynaptiques très riches en K_{ATP} sont moins dépolarisés, moins de calcium envahit les cellules, d'où moins de mort neuronale dans les cellules granulaires (protection présynaptique) ; 2) l'hyperpolarisation causée par le zinc au niveau des fibres moussues empêche la libération massive de glutamate et l'excitotoxicité produite sur les neurones CA3, qui, par ailleurs, sont moins bien équipés en K_{ATP} (effet postsynaptique). Cette explication ferait du zinc un important neuroprotecteur endogène et donnerait un sens à la forte concentration de zinc et de K_{ATP} présents sur les mêmes éléments neuronaux. Le mécanisme décrit ci-dessus doit se combiner, bien sûr, à d'autres effets potentiellement neuroprotecteurs du zinc, notamment le blocage de certains récepteurs au glutamate et de certains canaux calciques (A. Bloc ; P. Bijlenga, communication personnelle).

Quelle que soit l'explication définitive, l'intérêt principal de cette méthode est que, bien que la durée de l'épisode ischémique soit brève (10 min), la mort cellulaire ne se manifeste qu'après un laps de temps relativement long après l'épreuve. Ce phénomène ressemble beaucoup à la situation d'ischémie *in vivo*, où une part importante des dégâts neurologiques survient avec un retard important par rapport à l'épisode aigu. Le modèle utilisé est donc bien approprié pour tester des substances neuroprotectrices.

Implications neurologiques du zinc

Le zinc, selon le cas, peut avoir un effet anti-convulsivant (Williamson and Spencer 1995) ou convulsivant (Pei et al. 1983). Le maintien de l'homéostasie du zinc dans le cerveau est très important pour la prévention du développement de l'épilepsie. L'altération de cette homéostasie pourrait être à l'origine de manifestations épileptiques (Takeda 2000).

Des souris EL, utilisées comme un modèle de l'épilepsie, ont dans les zones du gyrus denté de l'hippocampe, une teneur en zinc beaucoup plus faible que les souris normales (Fukahori et al. 1988). L'adjonction de zinc à l'apport alimentaire des souris EL diminue

l'incidence des crises épileptiques. Inversement, la diminution de l'apport en zinc augmente l'incidence de crises (Fukahori and Itoh 1990). Une altération de la concentration en zinc dans l'hippocampe pourrait donc jouer un rôle dans la pathophysiologie de certains types d'épilepsies. Cette hypothèse est appuyée par les expériences effectuées sur des souris Mocha, qui n'expriment pas le transporteur vésiculaire du zinc ZnT3. Dans cette lignée, il n'y a pas d'accumulation de zinc dans les terminaisons des fibres mossues. Elles sont donc « naturellement carencées » en zinc. Or, ces souris sont plus sensibles aux convulsions induites par le kaïnate que des souris contrôle (Cole et al. 2000).

4. CONCLUSION et PERSPECTIVES

Les fibres moussues, objet central de notre travail, se sont avérées très favorables pour une approche pluridisciplinaire des mécanismes présynaptiques. Les synapses fibres moussues/CA3 ont été très bien décrites au niveau ultrastructurel, en particulier par Amaral et col., (1978; 1981; 1989; 1990; 1994). Les investigations électrophysiologiques (Geiger and Jonas 2000; Jonas et al. 1993) ont permis de déterminer les caractéristiques fonctionnelles de ces synapses. Nous avons utilisé des synaptosomes de fibres moussues, une préparation déjà décrite depuis longtemps (Israel and Whittaker 1965) mais qui reste un outil de choix pour l'étude de la libération de glutamate et de ses régulations. Même si la préparation est relativement hétérogène, elle nous a permis d'établir des relations quantitatives entre le potentiel de membrane et la libération du transmetteur.

La nicotine, stimule à faible concentration certaines de nos fonctions cognitives par des mécanismes qui sont encore mal connus. On sait qu'elle agirait de façon prépondérante sur des récepteurs présynaptiques, déclenchant ou favorisant la libération des transmetteurs tels que les catécholamines, le GABA, le glutamate et l'ACh. En utilisant des synaptosomes des fibres moussues, nous avons démontré, de façon directe, que la nicotine induit la libération du glutamate. Elle le fait par un mécanisme inhabituel, car il n'est pas accompagné d'une modification significative du potentiel de membrane. La modulation de la libération par la nicotine s'exerce à travers des récepteurs à l'ACh présynaptiques de type nicotiques, dont certains (α -7) ont pu être identifiés à la membrane des synaptosomes des fibres moussues. Des travaux ultérieurs seront nécessaires pour poursuivre l'identification des récepteurs nicotiques présynaptiques et déterminer comment ils sont couplés au mécanisme de libération. Cependant, il est possible que l'activation par la nicotine des récepteurs présynaptiques perméables au Ca^{2+} (comme par exemple le type α -7) provoque une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire capable de déclencher la libération de glutamate, sans altération significative du potentiel de membrane et donc sans passer par l'activation de canaux calciques dépendant du potentiel.

Une particularité intrigante des fibres moussues de l'hippocampe est le fait qu'elles contiennent une quantité importante de zinc. Malgré de nombreux travaux, son rôle physiologique n'a pas pu être élucidé de manière totalement satisfaisante. Nos résultats montrent que le zinc, à faible concentration, inhibe la libération du glutamate en agissant sur le potentiel de membrane par une activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP. Par ce mécanisme le zinc, généralement considéré comme une substance neurotoxique (du moins à

forte concentration) s'est avéré neuroprotecteur à des concentrations faibles. Nous avons pu en faire la démonstration en utilisant des cultures organotypiques d'hippocampe soumises à une épreuve d'ischémie et traitées de façon aiguë par du zinc exogène ou à l'inverse par un chélateur du zinc. Nous avons pu confirmer que l'activation des K_{ATP} est aussi impliquée dans cet effet neuroprotecteur, qui est aboli par le tolbutamide. L'augmentation de la mort cellulaire induite par l'ischémie en présence d'un chélateur du zinc indique de plus que l'effet neuroprotecteur peut également être assuré physiologiquement par le zinc endogène, probablement libéré à la synapse. Cette dernière hypothèse est confortée par les résultats obtenus en traitant des cultures avec du zinc pendant les 12 jours précédant l'épreuve ischémique. Ce traitement chronique compense le déficit en zinc, probablement lié aux conditions habituelles de culture, constaté dans les cultures organotypiques. Il protège d'une façon spectaculaire les tranches contre la mort cellulaire induite par l'ischémie.

Nous avons également analysé l'action du zinc sur le canal K_{ATP} au niveau moléculaire, déterminé la sous-unité du canal impliquée et identifié deux acides aminés responsables du site de liaison du zinc. Ces deux acides aminés sont les histidines 326 et 332, toutes deux localisées sur la boucle extracellulaire reliant entre les segments transmembranaires H6 et H7 de la sous-unité SUR1. La mutation de l'une ou l'autre de ces histidines suffit à inverser l'action du zinc sur les courants K_{ATP} ; la double mutation produisant un effet encore plus prononcé. Ce résultat peut ouvrir la voie à des recherches originales sur des pathologies où le fonctionnement des canaux K_{ATP} est perturbé, comme certaines maladies touchant le SNC (épilepsie, neuro-dégénérescences), liées indirectement à un dysfonctionnement nerveux (obésité) ou affectant le pancréas (diabète, hyper-insulinisme). En effet, des canaux K_{ATP} de même composition régulent la libération de l'insuline par les cellules β et celle du glutamate par des terminaisons nerveuses excitatrices, comme les fibres moussues de l'hippocampe.

En conclusion, le zinc accumulé dans les vésicules synaptiques de certaines terminaisons nerveuses semble bien jouer le rôle d'un neuroprotecteur endogène. Ce rôle s'exerce principalement par une action sur des canaux K_{ATP} neuronaux, rôle que nous avons identifié et caractérisé, tant au niveau physiologique et pathologique (répercussion sur la sécrétion de glutamate et la neuroprotection) que moléculaire (identification du site de liaison au canal). Cette action, qui s'ajoute à la myriade d'effets déjà identifiés du zinc, vient compléter notre compréhension encore rudimentaire des rôles joués par le divalent dans le fonctionnement et les pathologies du système nerveux.

5. PUBLICATIONS

Bancila, V., Nikonenko, I., Dunant, Y. and Bloc, A. Zinc inhibits glutamate release via activation of presynaptic K_{ATP} channels and reduces ischemic damage in rat hippocampus. *J.Neurochem.*, **90**, 1243-1250 (2004)

Bancila, V., Cens, T., Monnier, D., Chanson, F., Faure, C., Dunant, Y. and Bloc, A. Involvement of two SUR1-specific histidine residues in zinc-induced activation of the rat K_{ATP} channel. (*soumis*)

Bancila, V., Chanson, F., Maechler P., Van Bever, L., Faure, C., Dunant, Y. and Bloc, A. SUR1-dependent activation of K_{ATP} channels by zinc and control of insulin release. (*en preparation*)

Bancila, V., Bloc, A. and Dunant, Y. Nicotine induces glutamate release from hippocampal mossy fiber synaptosomes. (*sous-presse dans Cholinergic Mechanism*, I. Silman et al. Eds, Martin Dunitz, London)

Cordeiro, M., **Bancila, V.**, Bloc, A., Gonçalves P. and Dunant Y. A calcium-proton antiport in presynaptic nerve terminals. (*sous-presse dans Cholinergic Mechanism*, I. Silman et al. Eds, Martin Dunitz, London)

Bloc, A., **Bancila, V.**, Israel, M. and Y. Dunant. Reconstitution of mediatophore-supported quantal ACh release. *Metab. Brain Disease*, **15**, 1-16 (2000)

Fischer, J., **Bancila, V.**, Mailly, P., Masson, J., Hamon, M., El Mestikawy, S. and Conrath, M. Immunocytochemical evidence of vesicular localization of the orphan transporter Rxt1 in the rat spinal cord. *Neuroscience*, **92**, 729-743 (1999)

Communications:

Bancila, V., Nikonenko, I., Dunant, Y. and Bloc, A. Activation of K-ATP channels by zinc in rat hippocampus results in decreased glutamate release and neuroprotection against ischemia. FENS Forum 2004 (Lisbon, July 10 - 14, 2004)

Bancila, V., Bloc, A. and Dunant, Y. Nicotine induces glutamate release from hippocampal mossy fiber synaptosomes. XIth International Symposium on Cholinergic Mechanisms - Function and Dysfunction (St.Moritz, Switzerland, 2002)

Bloc, A., Cens, T., Bancila, V., Bazzucchi, V., Faure, C. and Dunant, Y. Le zinc active les canaux K_{ATP} de type pancréatique et neuronal. 5^{ème} colloque Société des Neurosciences (Toulouse 29-31 mai 2001)

Dunant, Y., Bancila, V., Gulik, T., Israel, M. et Morel, N. Les zones actives des jonctions neuromusculaires ont-elle un équivalent dans les changements dynamiques affectant les particules intra-membranaires d'autres synapses? Journée thématique en l'honneur du Professeur René Couteaux (Gif sur Yvette, 6 octobre 1999)

Fischer, J., Bancila, V., Masson, J., Hamon, M., El. Mestikawy, S. and Conrath, M. Immunocytochemical localization of orphan transporter RXT 1 in rat spinal cord: possible role in vesicular glutamate uptake. 1st Mediterranean Neuroscience Conference, 5th Mediterranean Epilepsy Conference (Monpellier, France, September 3-6, 1997)

6. LISTE DES REFERENCES

- Acsady L., Kamondi A., Sik A., Freund T., and Buzsaki G. (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* **18**, 3386-3403.
- Aguilar-Bryan L. and Bryan J. (1999) Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* **20**, 101-135.
- Aguilar-Bryan L., Nichols C. G., Wechsler S. W., Clement J. P., Boyd A. E., III, Gonzalez G., Herrera-Sosa H., Nguy K., Bryan J., and Nelson D. A. (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423-426.
- Amaral D. G. (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* **182**, 851-914.
- Amaral D. G. and Dent J. A. (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* **195**, 51-86.
- Amaral D. G., Dolorfo C., and Alvarez-Royo P. (1991) Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus* **1**, 415-435.
- Amaral D. G., Ishizuka N., and Claiborne B. (1990) Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res* **83**, 1-11.
- Amaral D. G. and Witter M. P. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591.
- Amaral D. G. and Witter M. P. (1994) Hippocampal Formation, in *The Rat Nervous System, second edition* (Paxinos G., ed.), pp. 443-494. San Diego Academic., San Diego.
- Amoroso S., Schmid-Antomarchi H., Fosset M., and Lazdunski M. (1990) Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K⁺ channels. *Science* **247**, 852-854.
- Andersen P., Eccles J. C., and Loynning Y. (1964) Pathway of postsynaptic inhibition in the hippocampus. *J Neurophysiol* **27**, 608-619.

- Aniksztejn L., Charton G., and Ben Ari Y. (1987) Selective release of endogenous zinc from the hippocampal mossy fibers in situ. *Brain Res* **404**, 58-64.
- Arriza J. L., Eliasof S., Kavanaugh M. P., and Amara S. G. (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4155-4160.
- Ascher P. and Nowak L. (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol* **399**, 247-266.
- Ashcroft F. M., Harrison D. E., and Ashcroft S. J. (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* **312**, 446-448.
- Ashcroft F. M. and Rorsman P. (1989) Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* **54**, 87-143.
- Ashcroft S. J. (2000) The beta-cell K(ATP) channel. *J Membr Biol* **176**, 187-206.
- Ashfield R., Gribble F. M., Ashcroft S. J., and Ashcroft F. M. (1999) Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K(ATP) channel. *Diabetes* **48**, 1341-1347.
- Ashford M. L., Boden P. R., and Treherne J. M. (1990) Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflugers Arch* **415**, 479-483.
- Ashford M. L., Sturgess N. C., Trout N. J., Gardner N. J., and Hales C. N. (1988) Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflugers Arch* **412**, 297-304.
- Assaf S. Y. and Chung S. H. (1984) Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature* **308**, 734-736.
- Astrup J., Symon L., Branston N. M., and Lassen N. A. (1977) Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* **8**, 51-57.

- Babenko A. P., Aguilar-Bryan L., and Bryan J. (1998) A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annu Rev Physiol* **60**, 667-687.
- Baskys A. (1992) Metabotropic receptors and 'slow' excitatory actions of glutamate agonists in the hippocampus. *Trends Neurosci* **15**, 92-96.
- Ben Ari Y. (1990) Galanin and Glibenclamide Modulate the Anoxic Release of Glutamate in Rat CA3 Hippocampal Neurons. *Eur J Neurosci* **2**, 62-68.
- Bernardi H., Fosset M., and Lazdunski M. (1992) ATP/ADP binding sites are present in the sulfonylurea binding protein associated with brain ATP-sensitive K⁺ channels. *Biochemistry* **31**, 6328-6332.
- Bettler B., Boulter J., Hermans-Borgmeyer I., O'Shea-Greenfield A., Deneris E. S., Moll C., Borgmeyer U., Hollmann M., and Heinemann S. (1990) Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron* **5**, 583-595.
- Bezzi P., Gundersen V., Galbete J. L., Seifert G., Steinhauser C., Pilati E., and Volterra A. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* **7**, 613-620.
- Blackstad T. W. and Kjaerheim A. (1961) Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J Comp Neurol* **117**, 133-146.
- Blaustein M. P. and Goldring J. M. (1975) Membrane potentials in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. *J Physiol* **247**, 589-615.
- Bliss T. V. and Collingridge G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39.
- Bloc A., Cens T., Cruz H., and Dunant Y. (2000) Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic β -cells: activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *J Physiol* **529 Pt 3**, 723-734.

Blumcke I., Behle K., Malitschek B., Kuhn R., Knopfel T., Wolf H. K., and Wiestler O. D. (1996) Immunohistochemical distribution of metabotropic glutamate receptor subtypes mGluR1b, mGluR2/3, mGluR4a and mGluR5 in human hippocampus. *Brain Res* **736**, 217-226.

Bortolotto Z. A., Lauri S., Isaac J. T., and Collingridge G. L. (2003) Kainate receptors and the induction of mossy fibre long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 657-666.

Burnashev N., Zhou Z., Neher E., and Sakmann B. (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* **485 (Pt 2)**, 403-418.

Busselberg D., Platt B., Michael D., Carpenter D. O., and Haas H. L. (1994) Mammalian voltage-activated calcium channel currents are blocked by Pb^{2+} , Zn^{2+} , and Al^{3+} . *J Neurophysiol* **71**, 1491-1497.

Cajal S. R. (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'homme et des vertébrés*, pp. 1-993. Maloine, Paris.

Canzoniero L. M., Sensi S. L., and Choi D. W. (1997) Measurement of intracellular free zinc in living neurons. *Neurobiol Dis* **4**, 275-279.

Castillo P. E., Malenka R. C., and Nicoll R. A. (1997) Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* **388**, 182-186.

Charpak S., Gahwiler B. H., Do K. Q., and Knopfel T. (1990) Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters. *Nature* **347**, 765-767.

Charton G., Rovira C., Ben Ari Y., and Leviel V. (1985) Spontaneous and evoked release of endogenous Zn^{2+} in the hippocampal mossy fiber zone of the rat in situ. *Exp Brain Res* **58**, 202-205.

Chicurel M. E. and Harris K. M. (1992) Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* **325**, 169-182.

- Chittajallu R., Vignes M., Dev K. K., Barnes J. M., Collingridge G. L., and Henley J. M. (1996) Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* **379**, 78-81.
- Choi D. W. and Koh J. Y. (1998) Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci* **21**, 347-375.
- Choi Y. B. and Lipton S. A. (1999) Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn^{2+} inhibition of the NMDA receptor. *Neuron* **23**, 171-180.
- Christine C. W. and Choi D. W. (1990) Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci* **10**, 108-116.
- Chutkow W. A., Simon M. C., Le Beau M. M., and Burant C. F. (1996) Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular KATP channels. *Diabetes* **45**, 1439-1445.
- Clarke V. R., Ballyk B. A., Hoo K. H., Mandelzys A., Pellizzari A., Bath C. P., Thomas J., Sharpe E. F., Davies C. H., Ornstein P. L., Schoepp D. D., Kamboj R. K., Collingridge G. L., Lodge D., and Bleakman D. (1997) A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature* **389**, 599-603.
- Cole T. B., Robbins C. A., Wenzel H. J., Schwartzkroin P. A., and Palmiter R. D. (2000) Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. *Epilepsy Res* **39**, 153-169.
- Cole T. B., Wenzel H. J., Kafer K. E., Schwartzkroin P. A., and Palmiter R. D. (1999) Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1716-1721.
- Colvin R. A., Fontaine C. P., Laskowski M., and Thomas D. (2003) Zn^{2+} transporters and Zn^{2+} homeostasis in neurons. *Eur J Pharmacol* **479**, 171-185.
- Cook D. L. and Hales C. N. (1984) Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**, 271-273.
- Cook D. L., Satin L. S., Ashford M. L., and Hales C. N. (1988) ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic beta-cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes* **37**, 495-498.

- Cull-Candy S., Brickley S., and Farrant M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 327-335.
- Curtis D. R., Phillis J. W., and Watkins J. C. (1959) Chemical excitation in spinal neurones. *Nature* **183**, 611-612.
- Curtis D. R. and Watkins J. C. (1960) The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem* **6**, 117-141.
- Danbolt N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**, 1-105.
- Danscher G. (1981) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry* **71**, 1-16.
- Deutsch J. A. and Rocklin K. W. (1967) Amnesia induced by scopolamine and its temporal variations. *Nature* **216**, 89-90.
- Dingledine R., Borges K., Bowie D., and Traynelis S. F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**, 7-61.
- Draguhn A., Verdorn T. A., Ewert M., Seeburg P. H., and Sakmann B. (1990) Functional and molecular distinction between recombinant rat GABAA receptor subtypes by Zn²⁺. *Neuron* **5**, 781-788.
- Dreixler J. C. and Leonard J. P. (1997) Effects of external calcium on zinc modulation of AMPA receptors. *Brain Res* **752**, 170-174.
- Dunant Y. and Israel M. (2000) Neurotransmitter release at rapid synapses. *Biochimie* **82**, 289-302.
- Dunant Y., Loctin F., Vallee J. P., Parducz A., Lesbats B., and Israel M. (1996) Activation and desensitisation of acetylcholine release by zinc at Torpedo nerve terminals. *Pflugers Arch* **432**, 853-858.

- Dunne M. J., Illot M. C., and Peterson O. H. (1987) Interaction of diazoxide, tolbutamide and ATP4- on nucleotide-dependent K⁺ channels in an insulin-secreting cell line. *J Membr Biol* **99**, 215-224.
- Ebadi M., Iversen P. L., Hao R., Cerutis D. R., Rojas P., Happe H. K., Murrin L. C., and Pfeiffer R. F. (1995) Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem Int* **27**, 1-22.
- Edwards F. A., Konnerth A., and Sakmann B. (1990) Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J Physiol* **430**, 213-249.
- Egebjerg J., Bettler B., Hermans-Borgmeyer I., and Heinemann S. (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* **351**, 745-748.
- Everard G. (1659) *Panacea; or the universal medicine, being a discovery of the wonderfull vertues of tobacco*, Simon Miller, London.
- Fagni L., Chavis P., Ango F., and Bockaert J. (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* **23**, 80-88.
- Fairman W. A., Vandenberg R. J., Arriza J. L., Kavanaugh M. P., and Amara S. G. (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **375**, 599-603.
- Faivre J. F. and Findlay I. (1990) Action potential duration and activation of ATP-sensitive potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Biochim Biophys Acta* **1029**, 167-172.
- Faulk W. P. and Taylor G. M. (1971) An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* **8**, 1081-1083.
- Fitch J. M., Juraska J. M., and Washington L. W. (1989) The dendritic morphology of pyramidal neurons in the rat hippocampal CA3 area. I. Cell types. *Brain Res* **479**, 105-114.
- Fonnum F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* **42**, 1-11.

- Fosse V. M., Kolstad J., and Fonnum F. (1986) A bioluminescence method for the measurement of L-glutamate: applications to the study of changes in the release of L-glutamate from lateral geniculate nucleus and superior colliculus after visual cortex ablation in rats. *J Neurochem* **47**, 340-349.
- Foster M. C., Leapman R. D., Li M. X., and Atwater I. (1993) Elemental composition of secretory granules in pancreatic islets of Langerhans. *Biophys J* **64**, 525-532.
- Frederickson C. J. (1989) Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol* **31**, 145-238.
- Frederickson C. J. and Moncrieff D. W. (1994) Zinc-containing neurons. *Biol Signals* **3**, 127-139.
- Frederickson C. J., Perez-Clausell J., and Danscher G. (1987) Zinc-containing 7S-NGF complex. Evidence from zinc histochemistry for localization in salivary secretory granules. *J Histochem Cytochem* **35**, 579-583.
- Frederickson C. J., Suh S. W., Silva D., Frederickson C. J., and Thompson R. B. (2000) Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr* **130**, 1471S-1483S.
- Freund T. F. and Buzsaki G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347-470.
- Freund W. D. and Reddig S. (1994) AMPA/Zn²⁺-induced neurotoxicity in rat primary cortical cultures: involvement of L-type calcium channels. *Brain Res* **654**, 257-264.
- Frotscher M., Schlander M., and Leranth C. (1986) Cholinergic neurons in the hippocampus. A combined light- and electron-microscopic immunocytochemical study in the rat. *Cell Tissue Res* **246**, 293-301.
- Frotscher M., Vida I., and Bender R. (2000) Evidence for the existence of non-GABAergic, cholinergic interneurons in the rodent hippocampus. *Neuroscience* **96**, 27-31.

- Fujita A. and Kurachi Y. (2000) Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. *Pharmacol Ther* **85**, 39-53.
- Fukahori M. and Itoh M. (1990) Effects of dietary zinc status on seizure susceptibility and hippocampal zinc content in the El (epilepsy) mouse. *Brain Res* **529**, 16-22.
- Fukahori M., Itoh M., Oomagari K., and Kawasaki H. (1988) Zinc content in discrete hippocampal and amygdaloid areas of the epilepsy (El) mouse and normal mice. *Brain Res* **455**, 381-384.
- Gasser R. N. and Vaughan-Jones R. D. (1990) Mechanism of potassium efflux and action potential shortening during ischaemia in isolated mammalian cardiac muscle. *J Physiol* **431**, 713-741.
- Geiger J. R. and Jonas P. (2000) Dynamic control of presynaptic Ca(2+) inflow by fast-inactivating K(+) channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* **28**, 927-939.
- Glickstein M. (1997) Mossy-fibre sensory input to the cerebellum. *Prog Brain Res* **114**, 251-259.
- Golgi C. (1886) *Studii sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso*, Milano.
- Graham F. L. and van der Eb A. J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**, 536-539.
- Gray R., Rajan A. S., Radcliffe K. A., Yakehiro M., and Dani J. A. (1996) Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* **383**, 713-716.
- HAMLIN L. H. (1962) The fine structure of the mossy fibre endings in the hippocampus of the rabbit. *J Anat* **96**, 112-120.
- Hansen A. J. (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* **65**, 101-148.
- Hansen A. J. and Zeuthen T. (1981) Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand* **113**, 437-445.

Harris R. J., Symon L., Branston N. M., and Bayhan M. (1981) Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **1**, 203-209.

Harrison N. L. and Gibbons S. J. (1994) Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology* **33**, 935-952.

Hasselmo M. E., Schnell E., and Barkai E. (1995) Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J Neurosci* **15**, 5249-5262.

Haug F. M. (1967) Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie* **8**, 355-368.

Helme-Guizon A., Davis S., Israel M., Lesbats B., Mallet J., Laroche S., and Hicks A. (1998) Increase in syntaxin 1B and glutamate release in mossy fibre terminals following induction of LTP in the dentate gyrus: a candidate molecular mechanism underlying transsynaptic plasticity. *Eur J Neurosci* **10**, 2231-2237.

Henningfield J. E., Stapleton J. M., Benowitz N. L., Grayson R. F., and London E. D. (1993) Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug Alcohol Depend* **33**, 23-29.

Hernandez-Sanchez C., Basile A. S., Fedorova I., Arima H., Stannard B., Fernandez A. M., Ito Y., and LeRoith D. (2001) Mice transgenically overexpressing sulfonyleurea receptor 1 in forebrain resist seizure induction and excitotoxic neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3549-3554.

Hidalgo J. and Carrasco J. (1998) Regulation of the synthesis of brain metallothioneins. *Neurotoxicology* **19**, 661-666.

Hinoi E., Takarada T., Ueshima T., Tsuchihashi Y., and Yoneda Y. (2004) Glutamate signaling in peripheral tissues. *Eur J Biochem* **271**, 1-13.

Hoffman D. W. and Zamir N. (1984) Localization and quantitation of dynorphin B in the rat hippocampus. *Brain Res* **324**, 354-357.

- Hollmann M. and Heinemann S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* **17**, 31-108.
- Houser C. R., Crawford G. D., Barber R. P., Salvaterra P. M., and Vaughn J. E. (1983) Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res* **266**, 97-119.
- Howell G. A., Welch M. G., and Frederickson C. J. (1984) Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* **308**, 736-738.
- Huang L., Kirschke C. P., and Gitschier J. (2002) Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J Biol Chem* **277**, 26389-26395.
- Huerta P. T. and Lisman J. E. (1993) Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature* **364**, 723-725.
- Hutton J. C., Penn E. J., and Peshavaria M. (1983) Low-molecular-weight constituents of isolated insulin-secretory granules. Bivalent cations, adenine nucleotides and inorganic phosphate. *Biochem J* **210**, 297-305.
- Ibata Y. and Otsuka N. (1969) Electron microscopic demonstration of zinc in the hippocampal formation using Timm's sulfide silver technique. *J Histochem Cytochem* **17**, 171-175.
- Inagaki N., Gono T., Clement J. P., Namba N., Inazawa J., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L., Seino S., and Bryan J. (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**, 1166-1170.
- Inagaki N., Gono T., Clement J. P., Wang C. Z., Aguilar-Bryan L., Bryan J., and Seino S. (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* **16**, 1011-1017.
- Isomoto S., Kondo C., Yamada M., Matsumoto S., Higashiguchi O., Horio Y., Matsuzawa Y., and Kurachi Y. (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J Biol Chem* **271**, 24321-24324.

Israel M. and Lesbats B. (1982) Application to mammalian tissues of the chemiluminescent method for detecting acetylcholine. *J Neurochem* **39**, 248-250.

Israel M., Lesbats B., Bruner J., Israel M., Lesbats B., and Bruner J. (1993) Glutamate and acetylcholine release from cholinergic nerve terminals, a calcium control of the specificity of the release mechanism. *Neurochem Int* **22**, 53-58.

Israel M. and Whittaker V. P. (1965) The isolation of mossy fibre endings from the granular layer of the cerebellar cortex. *Experientia* **21**, 325-326.

Jonas P., Major G., and Sakmann B. (1993) Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J Physiol* **472**, 615-663.

Kambe T., Narita H., Yamaguchi-Iwai Y., Hirose J., Amano T., Sugiura N., Sasaki R., Mori K., Iwanaga T., and Nagao M. (2002) Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **277**, 19049-19055.

Kamiya H. and Ozawa S. (1998) Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca²⁺ influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *J Physiol* **509** (Pt 3), 833-845.

Kanai Y. and Hediger M. A. (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **360**, 467-471.

Katz B. (1969) *The Release of Neural Transmitter Substances*, Liverpool University Press., Liverpool UK.

Kay A. R. (2003) Evidence for chelatable zinc in the extracellular space of the hippocampus, but little evidence for synaptic release of Zn. *J Neurosci* **23**, 6847-6855.

Keinanen K., Wisden W., Sommer B., Werner P., Herb A., Verdoorn T. A., Sakmann B., and Seeburg P. H. (1990) A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* **249**, 556-560.

Kerchner G. A., Canzoniero L. M., Yu S. P., Ling C., and Choi D. W. (2000) Zn²⁺ current is mediated by voltage-gated Ca²⁺ channels and enhanced by extracellular acidity in mouse cortical neurones. *J Physiol* **528 Pt 1**, 39-52.

Kristiansen L. H., Rungby J., Sondergaard L. G., Stoltenberg M., and Danscher G. (2001) Autometallography allows ultrastructural monitoring of zinc in the endocrine pancreas. *Histochem Cell Biol* **115**, 125-129.

Krnjevic K. (1970) Glutamate and gamma-aminobutyric acid in brain. *Nature* **228**, 119-124.

Kwok W. M. and Kass R. S. (1993) Block of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels by external divalent cations is modulated by intracellular ATP. Evidence for allosteric regulation of the channel protein. *J Gen Physiol* **102**, 693-712.

Laslop A. and Mahata S. K. (2002) Neuropeptides and chromogranins: session overview. *Ann N Y Acad Sci* **971**, 294-299.

Lee K., Brownhill V., and Richardson P. J. (1997) Antidiabetic sulphonylureas stimulate acetylcholine release from striatal cholinergic interneurons through inhibition of K(ATP) channel activity. *J Neurochem* **69**, 1774-1776.

Lee K., Dixon A. K., Richardson P. J., and Pinnock R. D. (1999) Glucose-receptive neurones in the rat ventromedial hypothalamus express KATP channels composed of Kir6.1 and SUR1 subunits. *J Physiol* **515 (Pt 2)**, 439-452.

Legendre P. and Westbrook G. L. (1990) The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. *J Physiol* **429**, 429-449.

Legendre P. and Westbrook G. L. (1991) Noncompetitive inhibition of gamma-aminobutyric acidA channels by Zn. *Mol Pharmacol* **39**, 267-274.

Li Y., Hough C. J., Frederickson C. J., and Sarvey J. M. (2001a) Induction of mossy fiber --> Ca³ long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn²⁺. *J Neurosci* **21**, 8015-8025.

- Li Y., Hough C. J., Suh S. W., Sarvey J. M., and Frederickson C. J. (2001b) Rapid translocation of Zn^{2+} from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation. *J Neurophysiol* **86**, 2597-2604.
- Liss B., Bruns R., and Roeper J. (1999) Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J* **18**, 833-846.
- Lopes da Silva F. H. (1990) A critical review of clinical applications of topographic mapping of brain potentials. *J Clin Neurophysiol* **7**, 535-551.
- Lorente de No R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of ammonic system. *J Psychol Neurol* **43**, 113-177.
- Low C. M., Zheng F., Lyuboslavsky P., and Traynelis S. F. (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11062-11067.
- LOWRY O. H., PASSONNEAU J. V., HASSELBERGER F. X., and SCHULZ D. W. (1964) Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J Biol Chem* **239**, 18-30.
- Lu Y. M., Taverna F. A., Tu R., Ackerley C. A., Wang Y. T., and Roder J. (2000) Endogenous Zn^{2+} is required for the induction of long-term potentiation at rat hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Synapse* **38**, 187-197.
- Magneson G. R., Puvathingal J. M., and Ray W. J., Jr. (1987) The concentrations of free Mg^{2+} and free Zn^{2+} in equine blood plasma. *J Biol Chem* **262**, 11140-11148.
- Malenka R. C. and Nicoll R. A. (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* **16**, 521-527.
- Margail I., Miquet J. M., Doble A., Blanchard J. C., and Boireau A. (1992) KATP channels modulate GABA release in hippocampal slices in the absence of glucose. *Fundam Clin Pharmacol* **6**, 295-300.

Masters B. A., Quaife C. J., Erickson J. C., Kelly E. J., Froelick G. J., Zambrowicz B. P., Brinster R. L., and Palmiter R. D. (1994) Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci* **14**, 5844-5857.

Masu M., Tanabe Y., Tsuchida K., Shigemoto R., and Nakanishi S. (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **349**, 760-765.

Mayer M. L., Vyklicky L., Jr., and Westbrook G. L. (1989) Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurones. *J Physiol* **415**, 329-350.

McBain C. J. and Mayer M. L. (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* **74**, 723-760.

McGinty J. F., Henriksen S. J., Goldstein A., Terenius L., and Bloom F. E. (1983) Dynorphin is contained within hippocampal mossy fibers: immunochemical alterations after kainic acid administration and colchicine-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 589-593.

McMahon R. J. and Cousins R. J. (1998) Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4841-4846.

Meunier F. M. (1984) Relationship between presynaptic membrane potential and acetylcholine release in synaptosomes from Torpedo electric organ. *J Physiol* **354**, 121-137.

Michalczyk A. A., Allen J., Blomeley R. C., and Ackland M. L. (2002) Constitutive expression of hZnT4 zinc transporter in human breast epithelial cells. *Biochem J* **364**, 105-113.

Miller R. J. (1987) Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* **235**, 46-52.

Moore K. A., Nicoll R. A., and Schmitz D. (2003) Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14397-14402.

Mourre C., Ben Ari Y., Bernardi H., Fosset M., and Lazdunski M. (1989) Antidiabetic sulfonylureas: localization of binding sites in the brain and effects on the hyperpolarization induced by anoxia in hippocampal slices. *Brain Res* **486**, 159-164.

Mourre C., Widmann C., and Lazdunski M. (1991) Specific hippocampal lesions indicate the presence of sulfonyleurea binding sites associated to ATP-sensitive K⁺ channels both post-synaptically and on mossy fibers. *Brain Res* **540**, 340-344.

Nakanishi S. (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* **13**, 1031-1037.

Nakaya H., Takeda Y., Tohse N., and Kanno M. (1991) Effects of ATP-sensitive K⁺ channel blockers on the action potential shortening in hypoxic and ischaemic myocardium. *Br J Pharmacol* **103**, 1019-1026.

Nichols C. G., Shyng S. L., Nestorowicz A., Glaser B., Clement J. P., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L., Permutt M. A., and Bryan J. (1996) Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* **272**, 1785-1787.

Nicoletti F., Bruno V., Copani A., Casabona G., and Knopfel T. (1996) Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* **19**, 267-271.

Noma A. (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**, 147-148.

O'Dell B. L. (1993) Roles of zinc and copper in the nervous system. *Prog Clin Biol Res* **380**, 147-162.

O'Halloran T. V. (1993) Transition metals in control of gene expression. *Science* **261**, 715-725.

O'Keefe J. and Nadel L. (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford University Press, Oxford.

Ohana E., Segal D., Palty R., Ton-That D., Moran A., Sensi S. L., Weiss J. H., Hershfinkel M., and Sekler I. (2004) A sodium zinc exchange mechanism is mediating extrusion of zinc in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**, 4278-4284.

- Ohno-Shosaku T., Sawada S., and Yamamoto C. (1993) ATP-sensitive K⁺ channel activators suppress the GABAergic inhibitory transmission by acting on both presynaptic and postsynaptic sites in rat cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* **159**, 139-142.
- Ohno-Shosaku T. and Yamamoto C. (1992) Identification of an ATP-sensitive K⁺ channel in rat cultured cortical neurons. *Pflugers Arch* **422**, 260-266.
- Outten C. E. and O'Halloran T. V. (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**, 2488-2492.
- Palmiter R. D., Cole T. B., and Findley S. D. (1996a) ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J* **15**, 1784-1791.
- Palmiter R. D., Cole T. B., Quaipe C. J., and Findley S. D. (1996b) ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14934-14939.
- Palmiter R. D., Findley S. D., Whitmore T. E., and Durnam D. M. (1992) MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6333-6337.
- Pei Y., Zhao D., Huang J., and Cao L. (1983) Zinc-induced seizures: a new experimental model of epilepsy. *Epilepsia* **24**, 169-176.
- Pellerin L. and Magistretti P. J. (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10625-10629.
- Perez-Clausell J. and Danscher G. (1985) Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Res* **337**, 91-98.
- Peters S., Koh J., and Choi D. W. (1987) Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science* **236**, 589-593.
- Pines G., Danbolt N. C., Bjoras M., Zhang Y., Bendahan A., Eide L., Koepsell H., Storm-Mathisen J., Seeberg E., and Kanner B. I. (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* **360**, 464-467.

- Pisani A., Calabresi P., Tozzi A., D'Angelo V., and Bernardi G. (1998) L-type Ca²⁺ channel blockers attenuate electrical changes and Ca²⁺ rise induced by oxygen/glucose deprivation in cortical neurons. *Stroke* **29**, 196-201.
- Prasad A. S. (1995) Zinc: an overview. *Nutrition* **11**, 93-99.
- Prost A. L., Bloc A., Hussy N., Derand R., and Vivaudou M. (2004) Zinc is both an intracellular and extracellular regulator of KATP channel function. *J Physiol* **559**, 157-167.
- Qian H., Malchow R. P., Chappell R. L., and Ripps H. (1996) Zinc enhances ionic currents induced in skate Muller (glial) cells by the inhibitory neurotransmitter GABA. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **263**, 791-796.
- Quast U. (2000) La structure des canaux potassiques ATP-dépendants: complexe moléculaire SUR/Kir6. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 1-12.
- Quayle J. M., Bonev A. D., Brayden J. E., and Nelson M. T. (1995) Pharmacology of ATP-sensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *Am J Physiol* **269**, C1112-C1118.
- Raggenbass M., Pierson P., Metzger D., and Alberi S. (1997) Action of a metabotropic glutamate receptor agonist in rat lateral septum: induction of a sodium-dependent inward aftercurrent. *Brain Res* **776**, 75-87.
- Rassendren F. A., Lory P., Pin J. P., and Nargeot J. (1990) Zinc has opposite effects on NMDA and non-NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* **4**, 733-740.
- Represa A., Tremblay E., and Ben Ari Y. (1987) Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: localization and plasticity. *Neuroscience* **20**, 739-748.
- Rodriguez-Moreno A., Herreras O., and Lerma J. (1997) Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* **19**, 893-901.
- Roper J. and Ashcroft F. M. (1995) Metabolic inhibition and low internal ATP activate K-ATP channels in rat dopaminergic substantia nigra neurones. *Pflugers Arch* **430**, 44-54.

- Rorsman P. and Trube G. (1985) Glucose dependent K⁺-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP. *Pflugers Arch* **405**, 305-309.
- Rozas J. L., Paternain A. V., and Lerma J. (2003) Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors. *Neuron* **39**, 543-553.
- Safer D. J. and Allen R. P. (1971) The central effects of scopolamine in man. *Biol Psychiatry* **3**, 347-355.
- Saier M. H., Jr. (1999) A functional-phylogenetic system for the classification of transport proteins. *J Cell Biochem Suppl* **32-33**, 84-94.
- Sala L. (1891) Zur anatomie des groben seepferdefubes. *Z Wiss Zool* **52**, 18-45.
- Sandler R. and Smith A. D. (1991) Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. *J Comp Neurol* **303**, 177-192.
- Sandstead H. H. (1994) Understanding zinc: recent observations and interpretations. *J Lab Clin Med* **124**, 322-327.
- Schmitz D., Mellor J., Frerking M., and Nicoll R. A. (2001) Presynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11003-11008.
- Seino S. (1999) ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* **61**, 337-362.
- Seino S. and Miki T. (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol* **81**, 133-176.
- Sheline C. T., Ying H. S., Ling C. S., Canzoniero L. M., and Choi D. W. (2002) Depolarization-induced 65zinc influx into cultured cortical neurons. *Neurobiol Dis* **10**, 41-53.
- Siemkowicz E. and Hansen A. J. (1981) Brain extracellular ion composition and EEG activity following 10 minutes ischemia in normo- and hyperglycemic rats. *Stroke* **12**, 236-240.
- Siesjo B. K. (1978) Brain energy metabolism and catecholaminergic activity in hypoxia, hypercapnia and ischemia. *J Neural Transm Suppl* 17-22.

- Silver I. A. and Erecinska M. (1990) Intracellular and extracellular changes of [Ca²⁺] in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J Gen Physiol* **95**, 837-866.
- Slotboom D. J., Konings W. N., and Lolkema J. S. (1999) Structural features of the glutamate transporter family. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 293-307.
- Smart T. G. (1992) A novel modulatory binding site for zinc on the GABAA receptor complex in cultured rat neurones. *J Physiol* **447**, 587-625.
- Smart T. G. and Constanti A. (1990) Differential effect of zinc on the vertebrate GABAA-receptor complex. *Br J Pharmacol* **99**, 643-654.
- Smart T. G., Xie X., and Krishek B. J. (1994) Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog Neurobiol* **42**, 393-41.
- Sommer B., Burnashev N., Verdoorn T. A., Keinänen K., Sakmann B., and Seeburg P. H. (1992) A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J* **11**, 1651-1656.
- Spiridon M., Kamm D., Billups B., Mobbs P., and Attwell D. (1998) Modulation by zinc of the glutamate transporters in glial cells and cones isolated from the tiger salamander retina. *J Physiol* **506** (Pt 2), 363-376.
- Spruce A. E., Standen N. B., and Stanfield P. R. (1985) Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* **316**, 736-738.
- Standen N. B., Quayle J. M., Davies N. W., Brayden J. E., Huang Y., and Nelson M. T. (1989) Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* **245**, 177-180.
- Stanford I. M. and Lacey M. G. (1996) Electrophysiological investigation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* **74**, 499-509.
- Stirling R. V. and Bliss T. V. (1978) Hippocampal mossy fiber development at the ultrastructural level. *Prog Brain Res* **48**, 191-198.

- Stoppini L., Buchs P. A., and Muller D. (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* **37**, 173-182.
- Storck T., Schulte S., Hofmann K., and Stoffel W. (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10955-10959.
- Sturgess N. C., Ashford M. L., Cook D. L., and Hales C. N. (1985) The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet* **2**, 474-475.
- Sturgess N. C., Kozlowski R. Z., Carrington C. A., Hales C. N., and Ashford M. L. (1988) Effects of sulphonylureas and diazoxide on insulin secretion and nucleotide-sensitive channels in an insulin-secreting cell line. *Br J Pharmacol* **95**, 83-94.
- Swanson L. W. and Cowan W. M. (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* **172**, 49-84.
- Tainer J. A., Roberts V. A., and Getzoff E. D. (1991) Metal-binding sites in proteins. *Curr Opin Biotechnol* **2**, 582-591.
- Takeda A. (2000) Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Brain Res Rev* **34**, 137-148.
- Tanaka K. (1993) Cloning and expression of a glutamate transporter from mouse brain. *Neurosci Lett* **159**, 183-186.
- Tang C. M., Dichter M., and Morad M. (1989) Quisqualate activates a rapidly inactivating high conductance ionic channel in hippocampal neurons. *Science* **243**, 1474-1477.
- Taupin P., Ben Ari Y., and Roisin M. P. (1994a) Subcellular fractionation on Percoll gradient of mossy fiber synaptosomes: evoked release of glutamate, GABA, aspartate and glutamate decarboxylase activity in control and degranulated rat hippocampus. *Brain Res* **644**, 313-321.
- Taupin P., Roisin M. P., Ben Ari Y., and Barbin G. (1994b) A fraction enriched in rat hippocampal mossy fibre synaptosomes contains trophic activities. *Neuroreport* **5**, 1353-1355.

Terrian D. M., Gannon R. L., and Rea M. A. (1990) Glutamate is the endogenous amino acid selectively released by rat hippocampal mossy fiber synaptosomes concomitantly with prodynorphin-derived peptides. *Neurochem Res* **15**, 1-5.

Terrian D. M., Hernandez P. G., Rea M. A., and Peters R. I. (1989) ATP release, adenosine formation, and modulation of dynorphin and glutamic acid release by adenosine analogues in rat hippocampal mossy fiber synaptosomes. *J Neurochem* **53**, 1390-1399.

Terrian D. M., Johnston D., Claiborne B. J., Ansah-Yiadom R., Strittmatter W. J., and Rea M. A. (1988) Glutamate and dynorphin release from a subcellular fraction enriched in hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Brain Res Bull* **21**, 343-351.

Thompson R. B., Peterson D., Mahoney W., Cramer M., Maliwal B. P., Suh S. W., Frederickson C., Fierke C., and Herman P. (2002) Fluorescent zinc indicators for neurobiology. *J Neurosci Methods* **118**, 63-75.

Tibbs G. R., Barrie A. P., Van Mieghem F. J., McMahon H. T., and Nicholls D. G. (1989a) Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release. *J Neurochem* **53**, 1693-1699.

Tibbs G. R., Dolly J. O., and Nicholls D. G. (1989b) Dendrotoxin, 4-aminopyridine, and beta-bungarotoxin act at common loci but by two distinct mechanisms to induce Ca²⁺-dependent release of glutamate from guinea-pig cerebrocortical synaptosomes. *J Neurochem* **52**, 201-206.

Timm F. (1958) Zur histochemie des Zincs. *Deut Z Gerichtl Med* **47**, 428-431.

Tremblay E., Zini S., and Ben Ari Y. (1991) Autoradiographic study of the cellular localization of [3H]glibenclamide binding sites in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* **127**, 21-24.

Trombley P. Q. and Shepherd G. M. (1996) Differential modulation by zinc and copper of amino acid receptors from rat olfactory bulb neurons. *J Neurophysiol* **76**, 2536-2546.

- Trube G., Rorsman P., and Ohno-Shosaku T. (1986) Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch* **407**, 493-499.
- Trussell L. O. and Fischbach G. D. (1989) Glutamate receptor desensitization and its role in synaptic transmission. *Neuron* **3**, 209-218.
- Tsien R. W., Lipscombe D., Madison D. V., Bley K. R., and Fox A. P. (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* **11**, 431-438.
- Tsuji S., Kobayashi H., Uchida Y., Ihara Y., and Miyatake T. (1992) Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease. *EMBO J* **11**, 4843-4850.
- Tucker S. J., Gribble F. M., Zhao C., Trapp S., and Ashcroft F. M. (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**, 179-183.
- Uchida Y. (1994) Growth-inhibitory factor, metallothionein-like protein, and neurodegenerative diseases. *Biol Signals* **3**, 211-215.
- Ueno S., Tsukamoto M., Hirano T., Kikuchi K., Yamada M. K., Nishiyama N., Nagano T., Matsuki N., and Ikegaya Y. (2002) Mossy fiber Zn²⁺ spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. *J Cell Biol* **158**, 215-220.
- Uhde I., Toman A., Gross I., Schwanstecher C., and Schwanstecher M. (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* **274**, 28079-28082.
- Usherwood P. N., Machili P., and Leaf G. (1968) L-Glutamate at insect excitatory nerve-muscle synapses. *Nature* **219**, 1169-1172.
- Vallee B. L. and Auld D. S. (1992) Active zinc binding sites of zinc metalloenzymes. *Matrix Suppl* **1**, 5-19.

- Vallee B. L. and Falchuk K. H. (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* **73**, 79-118.
- Vandenberg R. J., Mitrovic A. D., and Johnston G. A. (1998) Molecular basis for differential inhibition of glutamate transporter subtypes by zinc ions. *Mol Pharmacol* **54**, 189-196.
- Vizi E. S. and Kiss J. P. (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus* **8**, 566-607.
- Vogt K., Mellor J., Tong G., and Nicoll R. (2000) The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **26**, 187-196.
- Wallwork J. C. (1987) Zinc and the central nervous system. *Prog Food Nutr Sci* **11**, 203-247.
- Weiss J. H., Hartley D. M., Koh J. Y., and Choi D. W. (1993) AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity. *Neuron* **10**, 43-49.
- Weiss J. H., Koh J. Y., Christine C. W., and Choi D. W. (1989) Zinc and LTP. *Nature* **338**, 212.
- Wenzel H. J., Cole T. B., Born D. E., Schwartzkroin P. A., and Palmiter R. D. (1997) Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12676-12681.
- Westbrook G. L. and Mayer M. L. (1987) Micromolar concentrations of Zn²⁺ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* **328**, 640-643.
- Williamson A. and Spencer D. (1995) Zinc reduces dentate granule cell hyperexcitability in epileptic humans. *Neuroreport* **6**, 1562-1564.
- Wonnacott S. (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* **20**, 92-98.
- Wonnacott S., Kaiser S., Mogg A., Soliakov L., and Jones I. W. (2000) Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur J Pharmacol* **393**, 51-58.

- Xie X., Gerber U., Gahwiler B. H., and Smart T. G. (1993) Interaction of zinc with ionotropic and metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* **159**, 46-50.
- Xie X. M. and Smart T. G. (1991) A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission. *Nature* **349**, 521-524.
- Yamamura H. I., Vickroy T. W., Gehlert D. R., Wamsley J. K., and Roeske W. R. (1985) Autoradiographic localization of muscarinic agonist binding sites in the rat central nervous system with (+)-cis-[3H]methyldioxolane. *Brain Res* **325**, 340-344.
- Yokoyama M., Koh J., and Choi D. W. (1986) Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons. *Neurosci Lett* **71**, 351-355.
- Yu S. P. and Kerchner G. A. (1998) Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* **52**, 612-617.
- Zalutsky R. A. and Nicoll R. A. (1990) Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* **248**, 1619-1624.
- Zawar C., Plant T. D., Schirra C., Konnerth A., and Neumcke B. (1999) Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J Physiol* **514** (Pt 2), 327-341.
- Zhang H. and Bolton T. B. (1995) Activation by intracellular GDP, metabolic inhibition and pinacidil of a glibenclamide-sensitive K-channel in smooth muscle cells of rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* **114**, 662-672.
- Zigmond M. J., Bloom F. E., Landis S. C., Roberts J. L., and Squire L. R. (1999) *Fundamental Neuroscience*, Academic Press, San Diego.