

R. Sautiere: Decembre 1990.
CR. 2768

H

Neurobiologie cellulaire

9

**Canaux ioniques et
transmission synaptique**

C. Hammond

Maître de conférence, Paris V

D. Tritsch

Professeur, Paris VI

Préface : P. Ascher

Professeur, Paris VI

Chapitre 18

Libération des neurotransmetteurs

Le ou les neurotransmetteurs synthétisés par un neurone sont stockés dans l'élément présynaptique, à l'intérieur des vésicules synaptiques. En l'absence d'activité présynaptique, la probabilité de libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique est faible. Cette probabilité augmente fortement lorsque l'élément présynaptique est activé. La libération des neurotransmetteurs est un phénomène discontinu, « quantique », et comme le montrent les *figures 2-4 et 12-1*, elle correspondrait à l'exocytose des vésicules synaptiques et le contenu total d'une vésicule synaptique représenterait un quantum (Del Castillo et Katz, 1954).

Parmi les différents événements qui conduisent à la libération des neurotransmetteurs, l'élévation de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} et la nécessité de cette augmentation pour le déclenchement du processus d'exocytose ont été clairement mis en évidence (§ 18-1). En revanche, les mécanismes moléculaires responsables du couplage entre l'entrée des ions Ca^{2+} et l'exocytose représentent encore un domaine mal connu. Ce domaine comprend la nature des processus moléculaires qui régulent l'exocytose, leur ordre d'intervention et les protéines qui en sont responsables (§ 18-2).

L'exocytose d'une vésicule synaptique est un phénomène aléatoire qui n'est pas forcément déclenché par l'activité présynaptique. Ainsi, même lorsque toutes les conditions sont réunies (dépolariation de l'élément présynaptique, ouverture des canaux Ca^{2+} , entrée des ions Ca^{2+}), la probabilité moyenne de l'exocytose d'une vésicule synaptique reste inférieure à 1 (§ 18-3).

Cette théorie vésiculaire de la libération des neurotransmetteurs est une des théories permettant d'expliquer la libération des neurotransmetteurs. Elle s'oppose à une autre théorie dite non vésiculaire. Dans cette théorie, les molécules de neurotransmetteurs libérées dans la fente synaptique ne seraient pas celles stockées dans les vésicules mais celles présentes dans le cytoplasme présynaptique (annexe 18-1). Nous exposerons dans ce chapitre les données concernant la théorie vésiculaire. Toutefois, le lecteur doit garder présent à l'esprit que ce débat n'est pas clos car, bien que de nombreux arguments plaident en faveur de la théorie vésiculaire, les preuves irréfutables de l'une ou de l'autre de ces théories n'ont pas été obtenues jusqu'à présent.

Dans le système nerveux central de mammifères, les synapses interneuronales, et notamment les éléments présynaptiques de ces synapses, sont de dimensions trop faibles pour être couramment étudiés à l'aide des techniques électrophysiologiques et a fortiori pour permettre l'injection intracellulaire de molécules influant sur la libération des neurotransmetteurs. De ce fait, les études au niveau des synapses interneuronales concernant le couplage excitation-libération ont été faites pour la plupart sur la synapse géante de calmar (située dans le ganglion étoilé) (fig. 18-1) et sur les synapses inhibitrices afférentes à la cellule de Mauthner (situées dans le bulbe des poissons téléostéens) (voir fig. 18-13A).

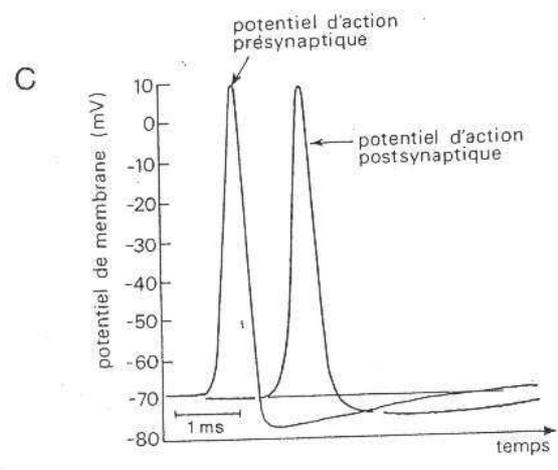
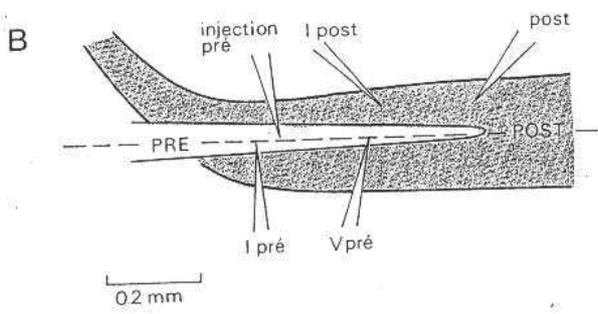
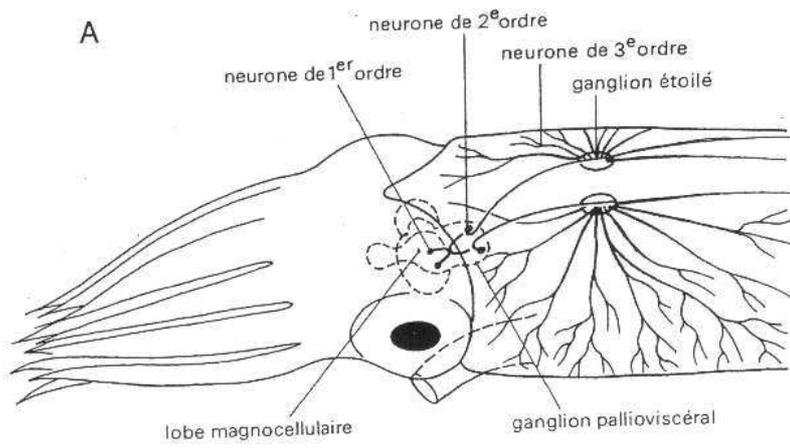
Figure 18-1 La synapse géante de calmar.

A : Cette synapse est localisée dans le ganglion étoilé. Ces neurones font partie d'un réseau de neurones géants. Les neurones de 1^{er} ordre, dont les corps cellulaires sont situés dans le lobe magnocellulaire, reçoivent les informations sensorielles (captés par les yeux et tentacules). Ils les transmettent aux neurones de 2^e ordre dont les corps cellulaires sont situés dans le ganglion pallioviscéral. Dans ce ganglion, les axones des neurones de 1^{er} ordre contactent les axones des neurones de 2^e ordre. Puis les axones des neurones de 2^e ordre projettent au ganglion étoilé où ils établissent des contacts synaptiques géants avec les axones des neurones de 3^e ordre. Les neurones de 3^e ordre sont responsables des contractions des muscles du manteau qui permettent l'expulsion d'eau et la propulsion de l'animal hors de la zone de danger.

B : La synapse géante est une synapse entre axone amyélinique de gros diamètre des neurones de 2^e ordre et axone géant des neurones de 3^e ordre. Le contact entre les 2 axones s'étend sur environ 700 μm et le diamètre de l'axone postsynaptique est d'environ 50 μm . Ceci permet d'introduire plusieurs électrodes et d'enregistrer simultanément, en courant ou voltage imposés, les éléments pré- et post-synaptiques. Le pointillé représente le plan de coupe de la figure 18-2.

C : Potentiels d'action pré- et post-synaptiques enregistrés simultanément en courant imposé. Le potentiel d'action post-synaptique se développe à partir d'une dépolarisation post-synaptique. Le délai synaptique est de l'ordre de 1 ms. $[\text{Ca}^{2+}]_e = 10 \text{ mmol/l}$.

D'après Llinas R, Steinberg I Z, Walton K. Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* 1981 ; 33 : 323-52.



18-1 LA DÉPOLARISATION DE L'ÉLÉMENT PRÉSYPNAPTIQUE ENTRAÎNE UNE ÉLEVATION TRANSITOIRE DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN IONS Ca^{2+} ET LE DÉCLENCHEMENT DE L'EXOCYTOSE

Dans un élément présynaptique « au repos », les ions Ca^{2+} libres sont présents à une concentration très faible, de l'ordre de 10^{-7} mol/l à 10^{-8} mol/l, c'est-à-dire à une concentration au moins 10^4 fois plus faible que celle du milieu extracellulaire (voir *fig. 5-2*). La concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est maintenue à cette valeur par un certain nombre de mécanismes (voir § 7-2) qui seront aussi examinés au § 18-1-3.

Dans un élément présynaptique « en activité », c'est-à-dire dépolarisé par l'arrivée des potentiels d'action, les canaux Ca^{2+} sensibles au voltage présents dans la membrane présynaptique sont ouverts par la dépolarisation (voir *fig. 2-4A et 12-1B*). Cette entrée d'ions Ca^{2+} entraîne une élévation transitoire de la concentration en ions Ca^{2+} dans l'élément présynaptique et augmente la probabilité d'exocytose des vésicules synaptiques. Nous analyserons dans ce paragraphe le déroulement temporel de l'élévation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et présenterons les divers processus qui permettent le retour à une faible concentration en ions Ca^{2+} .

18-1-1 L'entrée des ions Ca^{2+} dans l'élément présynaptique résulte de l'ouverture des canaux Ca^{2+} sensibles au voltage

L'entrée des ions Ca^{2+} à travers les canaux Ca^{2+} sensibles au voltage représente une étape indispensable au déclenchement de l'exocytose et ceci pour toutes les synapses chimiques étudiées jusqu'à présent. En effet, lorsque des synapses sont étudiées dans un milieu extracellulaire dépourvu d'ions Ca^{2+} ou renfermant des bloquants des canaux Ca^{2+} (comme les ions Co^{2+} ou Cd^{2+}), on observe une disparition des potentiels post-synaptiques bien que les potentiels d'action présynaptiques soient inchangés. De même, dans un milieu extracellulaire pauvre en ions Ca^{2+} et riche en ions Mg^{2+} , les ions Mg^{2+} entrant en compétition avec les ions Ca^{2+} , la quantité de neurotransmetteur libérée diminue. In vivo, dans des conditions normales, c'est la brève dépolarisation de la membrane lors de la phase ascendante de chaque potentiel d'action, qui déclenche l'ouverture des canaux Ca^{2+} sensibles au voltage (voir chap. 11) et l'entrée des ions Ca^{2+} dans l'élément présynaptique.

Lorsqu'on étudie à l'aide des techniques d'imagerie, dans la terminaison présynaptique de la synapse géante de calmar, l'amplitude et la localisation de l'élévation de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} en réponse à l'application de sauts de potentiel dépolarisants au niveau présynaptique, on observe que l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est beaucoup plus forte (environ dix fois plus importante) au niveau des zones actives qu'au niveau des autres régions de la membrane présynaptique (*fig. 18-2*). Ceci est un des arguments quant à la localisation en forte densité des canaux Ca^{2+} sensibles au voltage au niveau des zones actives.

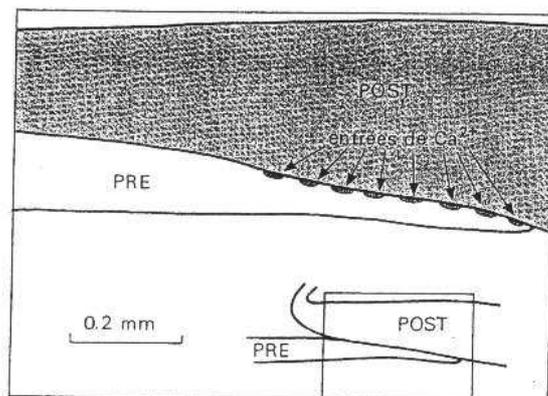


Figure 18-2 La localisation des élévations locales de $[Ca^{2+}]_i$ suggère que les canaux Ca^{2+} sont localisés en forte densité au niveau des zones actives (synapse géante de calmar). Le long de la région de contact entre les fibres pré- et post-synaptiques (encart en bas à droite), on distingue des milliers de zones actives. Les changements de concentration $[Ca^{2+}]_i$ sont enregistrés à l'aide de la technique de fura-2 (voir annexe 15-1), en réponse à de brèves périodes de décharge présynaptique (durée du train de potentiels d'action : 0,5 s, fréquence des potentiels d'action dans le train : 80 Hz). Les résultats montrent que les élévations de $[Ca^{2+}]_i$, les plus importantes sont localisées au niveau des zones actives (schéma du haut).

D'après Smith SJ, Augustine GJ. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. TINS 1988 ; 11 : 458-64.

18-1-2 L'entrée des ions Ca^{2+} entraîne une élévation transitoire de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} libres

Afin d'étudier simultanément le courant entrant (I_{Ca}) et l'élévation de $[Ca^{2+}]_i$ qui en résulte, ces deux variables sont enregistrées simultanément lors de brèves dépolarisations de la terminaison présynaptique (synapse géante de calmar). Le courant I_{Ca} est enregistré en voltage imposé en présence de bloquants des canaux Na^+ sensibles au voltage (TTX) et des canaux K^+ sensibles au voltage (TEA, Cs^+ et /ou 4-AP). Les changements de $[Ca^{2+}]_i$ sont mesurés à l'aide de l'arsenazo III, sonde qui change de propriétés d'absorbance (mesurée à 660 nm) en fonction de la concentration en ions Ca^{2+} libres (voir annexe 15-1).

Lorsqu'on évoque par l'application d'un saut de potentiel dépolarisant, un courant entrant I_{Ca} dans la terminaison présynaptique dans laquelle l'arsenazo III a été précédemment injecté, on observe que (fig. 18-3) :

- la durée du signal calcique, c'est-à-dire la durée de l'élévation de $[Ca^{2+}]_i$, dépasse largement la durée du courant entrant I_{Ca} (fig. 18-3A).
- l'amplitude du signal calcique présente la même sensibilité au potentiel que le courant I_{Ca} (fig. 18-3B).

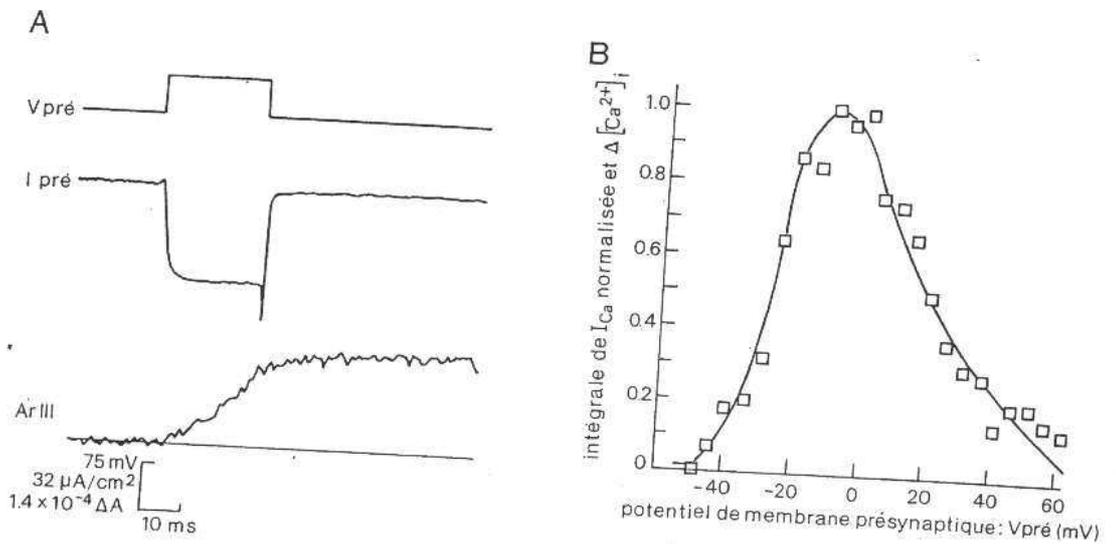


Figure 18-3 Enregistrements simultanés du courant I_{Ca} présynaptique et de l'élévation de la concentration intracellulaire en ions Ca²⁺.

A : Courant I_{Ca} présynaptique évoqué par l'application d'un saut de potentiel dépolarisant (V_{pré}, 25 ms de durée). I_{Ca} (I_{pré}) est enregistré en voltage imposé et en présence de bloquants des courants Na⁺ et K⁺. L'élévation moyenne de la concentration des ions Ca²⁺ dans la terminaison présynaptique en réponse à V_{pré} est mesurée par les changements d'absorbance de l'arsenazo III. On constate que le signal calcique (élévation de [Ca²⁺]_i) dure beaucoup plus longtemps que I_{Ca}. Dans les conditions de l'expérience, un changement d'absorbance de 10⁻⁴ (Δ A) correspond à un changement de [Ca²⁺]_i de l'ordre de 3. 10⁻⁷ mol/l.

B : Sensibilité au voltage du courant I_{Ca} (intégrale du courant, trait continu) et de l'élévation de [Ca²⁺]_i (mesurée au pic \square) en fonction de l'amplitude du saut de potentiel dépolarisant présynaptique (durée : 6 ms). On observe que les variations de [Ca] et de I_{Ca} sont parallèles lorsque ces deux valeurs sont normalisées au pic de leurs valeurs.

D'après Augustine G J, Charlton MP, Smith SJ. Calcium entry into voltage clamped presynaptic terminal of squid. J Physiol 1985 ; 367 : 143-62.

Afin d'obtenir des données quantitatives sur les changements d'amplitude et de durée de I_{Ca} et [Ca²⁺]_i, ces variables sont étudiées non plus en réponse à des sauts de potentiel dépolarisants mais en réponse à des potentiels d'action présynaptiques. On observe que (fig. 18-4) :

- en réponse à l'émission d'un potentiel d'action, [Ca²⁺]_i augmente d'environ 75 nmol/l. Cette valeur maximale est atteinte en un temps de l'ordre de 1 ms et ceci pendant la phase de repolarisation du potentiel d'action (fig. 18-4A) ;
- en réponse à l'émission de deux potentiels d'action séparés de 12 ms, [Ca²⁺]_i augmente de la même valeur (75 nmol/l) pour chaque potentiel d'action (fig. 18-4B) ;
- en réponse à l'émission d'un train de potentiels d'action (n = 7 à 74, fréquence = 30 à 40 Hz), [Ca²⁺]_i augmente de façon linéaire pendant la durée du train, puis décroît lentement avec une constante de temps variant entre 4,5 s et 15 s selon le nombre de potentiels d'action présents dans le train. La valeur maximale de l'élévation de [Ca²⁺]_i correspond à la valeur théorique obtenue en multipliant la valeur de l'élévation de [Ca²⁺]_i en réponse à un potentiel d'action par le nombre de potentiels d'action présents dans le train (fig. 18-4C).

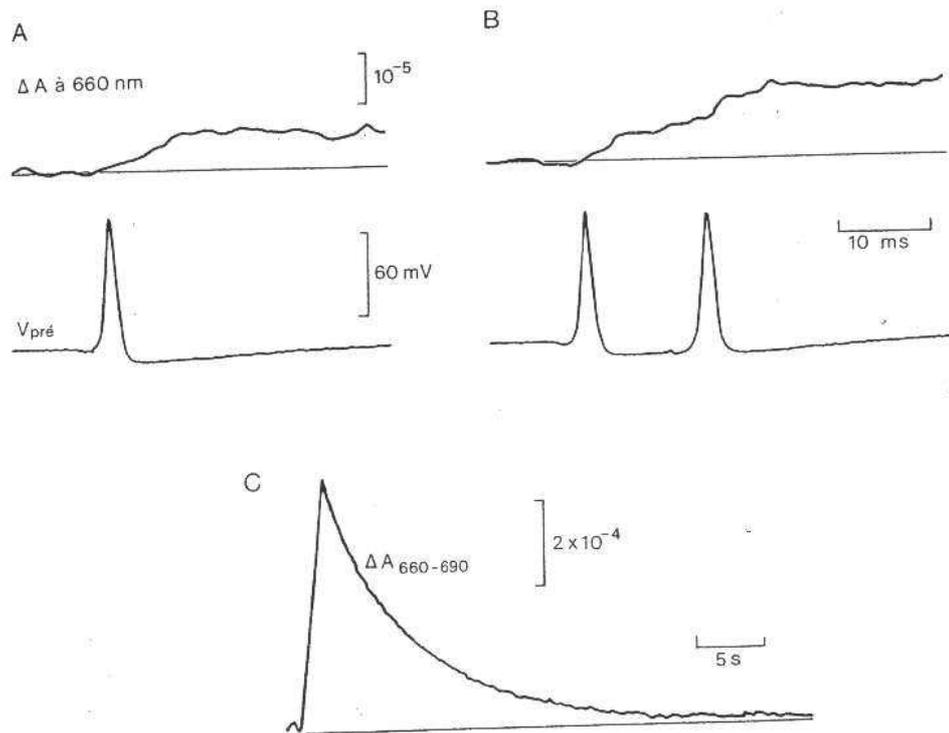


Figure 18-4 Elévation de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} en fonction de l'activité présynaptique (synapse géante de calmar).

A et B : L'arsenazo III est injecté dans la terminaison présynaptique et on mesure son changement d'absorbance (voir annexe 15-1) à 660 nm (ΔA , moyenne sur 160 mesures) en réponse à l'arrivée d'un (A) ou deux (B) potentiels d'action présynaptiques (en B, les potentiels d'action sont espacés de 12 ms). Les changements d'absorbance correspondent à la moyenne de 16 mesures. On constate que l'élévation de $[Ca^{2+}]_i$ en réponse au 2^e potentiel d'action est identique à celle enregistrée en réponse au 1^{er} potentiel d'action.

C : Changement d'absorbance de l'arsenazo III (ΔA , moyenne de 16 mesures) lors d'une activité répétée (stimulation 33 Hz pendant 2 s, barre blanche) de la terminaison présynaptique. $[Ca^{2+}]_e = 11$ mmol/l.

D'après Charlton MP, Smith SJ, Zucker RS. Role of presynaptic calcium ions and channels in synaptic facilitation and depression at the squid giant axon synapse. *J. Physiol.* 1982 ; 323 : 173-93.

Ces résultats montrent une bonne corrélation entre l'intégrale du courant entrant I_{Ca} et l'amplitude de l'élévation de $[Ca^{2+}]_i$. De plus, lors d'une activité répétée de la terminaison présynaptique, la quantité d'ions Ca^{2+} qui entre lors de chaque potentiel d'action est la même. Cependant, comme $[Ca^{2+}]_i$ n'est pas revenue à son niveau de base entre les potentiels d'action successifs, on observe une cumulation des élévations successives de $[Ca^{2+}]_i$. Ceci peut rendre compte de l'hypothèse du « calcium résiduel » dans la facilitation synaptique (voir § 18-4-2).

18-1-3 L'amplitude et le décours temporel de l'élévation de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} sont déterminés par la quantité d'ions Ca^{2+} entrés et par l'efficacité des mécanismes de clearance des ions Ca^{2+} intracellulaires

La concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} libres est maintenue à une valeur très faible (10^{-7} mol/l à 10^{-8} mol/l), la plupart des ions Ca^{2+} intracellulaires se trouvant sous forme liée dans le cytosol ou bien séquestrée dans des organelles. Le maintien de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à une valeur très faible est assuré par un ensemble de mécanismes que nous appellerons mécanismes de clearance des ions Ca^{2+} .

Les mécanismes de clearance des ions Ca^{2+} ont une telle efficacité qu'ils jouent sur la durée de l'élévation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mais aussi sur son amplitude. On estime en effet qu'il n'y a que 0,1 % à 1 % de la quantité d'ions Ca^{2+} entrés qui est effectivement « vue » par le milieu intracellulaire en tant que ions Ca^{2+} libres et ceci même au pic de l'augmentation de la concentration, du fait de l'action des systèmes de clearance des ions Ca^{2+} .

Ainsi l'amplitude et la durée du signal calcique sont déterminées par la quantité d'ions Ca^{2+} qui entrent au niveau des zones actives par unité de temps et par l'efficacité des systèmes de clearance des ions Ca^{2+} .

La quantité d'ions Ca^{2+} qui entrent par unité de temps à travers les canaux Ca^{2+} sensibles au voltage dépend in vivo du nombre de canaux Ca^{2+} ouverts, qui dépend lui-même :

- de l'activité présynaptique (durée, fréquence et nombre de potentiels d'action),
- du nombre de canaux Ca^{2+} activables (voir chap. 11).

Les divers composants du systèmes de clearance des ions Ca^{2+} dans les neurones sont la liaison des ions Ca^{2+} avec des protéines cytosolubles, l'expulsion des ions Ca^{2+} à travers la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire et la capture des ions Ca^{2+} par la membrane des organelles (fig. 18-5).

- La liaison des ions Ca^{2+} avec des protéines cytosolubles : différentes protéines cytoplasmiques ont la propriété de lier les ions Ca^{2+} avec une forte affinité. Ces protéines, en général de faible poids moléculaire, jouent essentiellement un rôle de tampons des ions Ca^{2+} (parvalbumine, calbindin) ou un rôle de messenger intracellulaire (calmoduline).

La parvalbumine est présente en forte concentration dans de nombreux neurones GABAergiques du système nerveux central de mammifères (la coexistence de la parvalbumine et du GABA a été mise en évidence à l'aide d'anticorps sélectifs de chacune de ces deux molécules) alors que, dans les autres neurones, sa concentration est beaucoup plus faible. Ces différences de concentration pourraient avoir une conséquence sur la vitesse et la capacité de tamponner les ions Ca^{2+} . Ceci est important notamment pour des neurones présentant une activité à haute fréquence comme les neurones GABAergiques par exemple.

La calbindin a été mise en évidence au niveau du tractus intestinal en tant que protéine liant les ions Ca^{2+} et dépendante de la vitamine D. Depuis, sa présence a été observée dans de nombreux neurones du système nerveux central de mammifères et notamment au niveau des cellules de Purkinje du cortex cérébelleux et des neurones dopaminergiques de la substance noire.

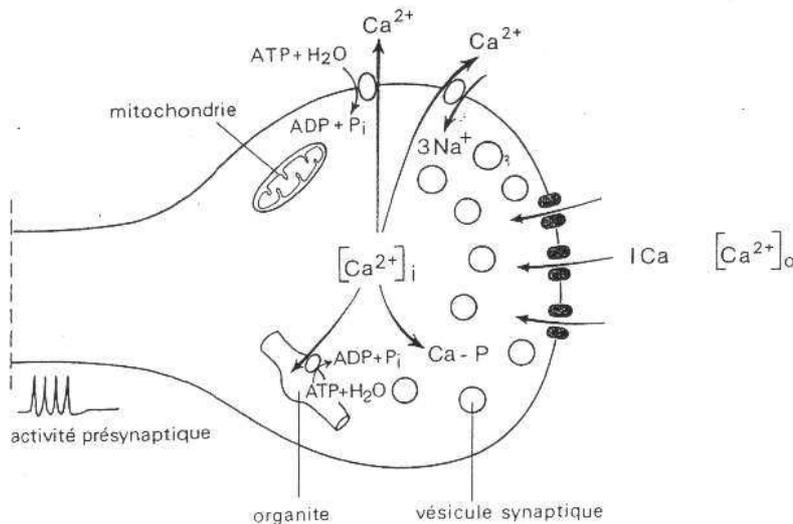


Figure 18-5 Schéma représentant les composantes du système de clearance des ions Ca^{2+} dans une terminaison présynaptique. Lors d'une dépolarisation membranaire, les ions Ca^{2+} entrent au niveau de la zone active présynaptique (I_{Ca}) et sont rapidement tamponnés par les protéines du cytosol capables de lier les ions Ca^{2+} (Ca-P). Les ions Ca^{2+} sont ensuite éliminés du milieu intracellulaire : ils sont expulsés vers le milieu extracellulaire et vers le milieu intra-organelles par l'action des pompes Ca/ATPase et transporteurs Na/Ca. Cette élimination a une constante de temps de l'ordre de plusieurs dizaines de millisecondes à plusieurs secondes.

D'autres types de protéines cytoplasmiques ont aussi une forte affinité pour les ions Ca^{2+} et notamment des protéines comme la calmoduline qui ont un rôle de messenger intracellulaire. Ainsi non seulement ces protéines permettent de tamponner les ions Ca^{2+} mais leur liaison avec les ions Ca^{2+} entraîne le déclenchement de divers processus intracellulaires étudiés aux chapitres 16 et 17.

L'élimination des ions Ca^{2+} libres du milieu intracellulaire par liaison avec des protéines cytosoliques est un système très efficace qui rend compte de la rapide disparition des ions Ca^{2+} entrés ou libérés dans le milieu intracellulaire et qui déterminent en grande partie l'amplitude du signal calcique.

- L'expulsion des ions Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire est due à deux types de protéines, la pompe Ca/ATPase et le transporteur Na/Ca (voir § 5-5, § 7-2 et 7-3-2). La première est indépendante de la concentration intracellulaire en ions Na^+ et utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. La deuxième utilise l'énergie fournie par le gradient électrochimique des ions Na^+ et, de ce fait, est sensible à la concentration intracellulaire en ions Na^+ . La pompe Ca/ATPase représenterait un système à haute affinité mais basse capacité alors que le transporteur Na/Ca serait un système à basse affinité mais haute capacité. Ainsi, la pompe Ca/ATPase serait le système le plus efficace lors d'une faible activité présynaptique alors que les deux systèmes agiraient en synergie pour réguler la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} après un train de potentiels d'action.