



## Chapitre 3 - La libération du neurotransmetteur

Les 3 vidéos au programme :

- Observations
- Canal calcique, courants  $\text{Ca}^{2+}$  unitaire et total
- $\text{Ca}^{2+}$  et libération du neurotransmetteur

### INTRO CHAPITRE 3 (1:30)

Ce troisième chapitre concerne le courant calcium déclenché par l'arrivée du potentiel d'action dans les terminaisons axonales. Ce courant calcium permet l'entrée des ions calcium dans les terminaisons axonales et la libération du neurotransmetteur par les vésicules synaptiques. Quels sont les objectifs de ce chapitre? À la fin de ce chapitre, vous saurez ce qu'est un courant calcium à travers un canal calcium sensible au voltage. Vous comprendrez les différents états d'un canal calcium sensible au voltage: état fermé, ouvert, inactivé. Vous comprendrez comment les ions calcium intracellulaires déclenchent l'exocytose des vésicules synaptiques et la libération du neurotransmetteur et vous comprendrez la clairance des ions calcium. Est-ce que tu peux nous expliquer simplement cette première phase de la transmission synaptique? La transmission de l'information entre les neurones se fait sous une forme chimique. Ce que nous allons comprendre dans ce chapitre, c'est comment les terminaisons axonales traduisent l'arrivée du potentiel d'action, qui est un signal électrique, en un signal chimique qui est la libération du neurotransmetteur. Le potentiel d'action, c'est un peu comme la commande électrique d'une porte d'usine qui, une fois ouverte, laisse sortir le personnel. Sauf que, quelquefois, cette commande électrique ne marche pas bien et la libération du neurotransmetteur ne se fait pas. Quels outils d'apprentissage sont prévus pour ce chapitre? À part les vidéos de cours, annexes, quiz, exercices d'application, il y a une vidéo d'expérience réalisée à l'INMED.

### CH. 3-1 : OBSERVATIONS (6:18)

Dans ce chapitre 3, nous allons étudier comment le potentiel d'action arrivé aux terminaisons axonales déclenche la libération du neurotransmetteur. Commençons par observer la transmission synaptique. Supposons que nous avons deux neurones connectés: un neurone présynaptique en orange et un neurone postsynaptique en bleu. Puisqu'il est situé après la synapse, on l'appelle postsynaptique; avant la synapse: présynaptique. Les deux neurones sont enregistrés en configuration cellule entière et en mode courant imposé pour enregistrer des changements de potentiel. Si on stimule le neurone présynaptique, on va enregistrer un potentiel d'action dans ce neurone présynaptique qui déclenche dans le neurone postsynaptique un changement de potentiel de très faible amplitude, qu'on appelle potentiel postsynaptique excitateur parce qu'il est dépolarisant. Si on ajoute de la TTX dans le milieu extracellulaire dans lequel baignent les neurones, on constate qu'il n'y a pas de potentiel d'action présynaptique en réponse à la stimulation, puisque, c'est normal, les canaux sodium sensibles au voltage sont bloqués par la TTX. Et on constate qu'il n'y a pas non plus de réponse postsynaptique, c'est logique puisqu'il n'y a pas eu de potentiel d'action présynaptique. Si



maintenant on ajoute un milieu qui baigne l'enregistrement totalement dépourvu en ions calcium, 0 calcium, ça n'affecte pas du tout le potentiel d'action présynaptique en réponse à la stimulation, mais par contre, il n'y a pas du tout de réponse postsynaptique. Est-ce que les ions calcium jouent un rôle particulier dans la transmission synaptique? Et si oui, où est-ce qu'ils agissent? Afin de comprendre où agissent les ions calcium, on travaille sur la synapse géante de calmar. Dans cette synapse géante, on voit ici l'arrivée de la terminaison axonale, c'est l'élément présynaptique. Il fait synapse avec un élément postsynaptique, que l'on voit ici en jaune et noir, et la synapse se trouve sous l'élément présynaptique. On peut remplir cet élément présynaptique d'un marqueur des ions calcium qui s'appelle l'aequorine. Quel est l'intérêt? C'est que l'aequorine fixe les ions calcium et devient sous sa forme liée l'aequorine-calcium. Or, cette molécule fluoresce différemment suivant qu'elle est liée ou libre. Donc en fonction de la fluorescence de l'aequorine, on peut savoir si des ions calcium sont entrés dans la terminaison présynaptique. On enregistre ici en imagerie ce qui se passe au point de vue fluorescence et on voit ici l'élément présynaptique qui est fluorescent sans rien faire. On stimule maintenant l'élément présynaptique, ici, on le stimule pour faire qu'il y ait des potentiels d'action. Et on a cet enregistrement, petit b. Pour comprendre ce qui s'est passé entre les deux, on soustrait ces deux images et on voit ici le calcium qui est entré pendant la stimulation. On distingue des petits domaines de calcium, on appelle ça des microdomaines. On voit bien que le calcium est entré dans la terminaison présynaptique, il est entré de façon non uniforme et ceci suggère qu'il y a donc des canaux calcium dans cet élément présynaptique qui permettent l'entrée des ions calcium. D'après l'expérience précédente, on peut faire l'hypothèse que les potentiels d'action qui arrivent dans les terminaisons présynaptiques ouvrent des canaux calcium et le calcium entre à travers ces canaux dans la terminaison présynaptique. Si tel est le cas, de quel type de canaux s'agit-il? Comment sont les courants calcium? Quelles sont leurs caractéristiques? Est-ce qu'on peut expliquer ces microdomaines que nous avons vus dans la terminaison présynaptique? Pour comprendre les types de canaux et pour les étudier, il faudrait pouvoir enregistrer en patch-clamp les terminaisons axonales. Or, c'est très compliqué parce qu'elles sont de très faible diamètre, environ 1 micromètre, et c'est exactement le diamètre, souvent, de la pipette d'enregistrement. Mais on peut travailler dans des synapses géantes. Nous venons de voir la synapse géante de calmar. Il y a aussi le calice de Held, qui se trouve dans le système nerveux central de mammifères dans les voies de l'audition, qui est une synapse géante, ou bien travailler sur la synapse neuromusculaire, qui est la synapse entre les motoneurones et les cellules musculaires et qui est aussi une synapse géante. On peut aussi enregistrer les canaux calcium dans le soma car on retrouve certains des canaux calcium de la terminaison axonale dans le soma. On avait décrit dans de nombreuses préparations 1, 2, 3, 4 types de canaux calcium qu'on a appelés L, N, P/Q, T et qui ont aussi une nomenclature Cav, pour "voltage-dépendants". Quels types de canaux calcium sont présents dans les terminaisons axonales? Si on étudie la jonction neuromusculaire qui est facile à étudier puisque c'est une synapse géante, on voit que ce sont en fait des canaux de type N essentiellement, et puis, dans d'autres synapses, des canaux du type P/Q. Nous nous bornerons à étudier les canaux de type N, qui sont les plus souvent présents dans la terminaison axonale et qui permettent l'entrée des ions calcium dans cette terminaison. Nous en venons donc à cette hypothèse qu'un courant entrant calcium sensible au voltage (parce qu'il est ouvert par le potentiel d'action sodique via des canaux calcium à haut seuil de type N) est responsable de l'augmentation transitoire de



calcium que nous avons vue dans la synapse géante de calmar. On en arrive à cette hypothèse: un courant entrant calcium sensible au voltage vient des canaux à haut seuil de type N. Plus exactement, qu'est-ce que cela veut dire? Que des ions calcium entrent à travers des canaux calcium sensibles au voltage, puisqu'ils sont ouverts par le potentiel d'action, à haut seuil, c'est-à-dire qu'il faut que le potentiel soit vraiment dépolarisé pour qu'ils s'ouvrent, et c'est ce qui se passe pendant un potentiel d'action, seraient responsables de l'augmentation transitoire de la concentration intracellulaire en ions calcium que nous avons vue dans la synapse géante de calmar.

### **CH. 3-2 : CANAL CALCIQUE ET COURANTS CALCIQUES (6:08)**

Les canaux calcium de type N, qu'on appelle aussi Cav2.2, se présentent sous la forme suivante. Ils rappellent les canaux sodium, c'est-à-dire que c'est une seule même protéine avec 1, 2, 3, 4 domaines transmembranaires similaires. Dans chaque domaine transmembranaire, on voit les segments transmembranaires 1, 2, 3, 4, 5, 6, puis, ici, la boucle P, qui se trouve, quand la protéine est repliée sur elle-même (ici on la voit repliée sur elle-même sous la forme d'un pseudo-tétramère), cette boucle P se trouve dans le pore aqueux et le segment transmembranaire 4, qui est chargé et qui donne à cette protéine une sensibilité au voltage. Et les ions calcium passent dans le pore aqueux, à l'intérieur de cette protéine lorsqu'elle est repliée en trois dimensions. Pour étudier le courant calcium unitaire de type N, on choisit ici la configuration cellule attachée pour avoir très peu de canaux sous la pipette, et en mode voltage imposé pour étudier le courant. Comme on est en mode cellule attachée, dans la pipette, il y a du liquide extracellulaire. Dans ce liquide extracellulaire, au lieu de mettre du calcium, on met 110 mM de baryum. Pourquoi met-on du baryum dans les enregistrements en courant unitaire? Parce que les canaux calcium sont très perméables aux ions baryum et ceci donne un courant unitaire de plus grande amplitude que si on mettait des ions calcium. On met des bloquants des autres canaux que des canaux de type N. Et maintenant, on enregistre le courant unitaire. Comme on est en voltage imposé, on impose le potentiel de la membrane à -80 mV. A ce potentiel, il n'y a pas d'ouverture des canaux calcium puisque ce sont des canaux calcium sensibles au voltage. On dépolarise pendant 200 ms à +20 mV et on voit que, pendant cette dépolarisation, des canaux s'ouvrent avec un courant entrant, négatif. Et puis, ils se referment, ils s'ouvrent, ils se referment, ils s'ouvrent. C'est un petit courant, il fait 0,5 pA. Dans une autre expérience, on voit que, bien qu'il y ait ce test, ici, jusqu'à +20 mV, il n'y a pas de réponse. Là aussi, il n'y a pas de réponse, là aussi il n'y a pas de réponse. Et dans toutes les autres, il y a des réponses qui sont variables. Étudions maintenant la courbe i-V, courant unitaire en fonction du voltage. Là, nous étions à +20 mV, donc par exemple ici à peu près 0,5 pA. Si on avait fait maintenant des potentiels tests à des potentiels plus hyperpolarisés que +20, donc par ici, le courant augmente en amplitude. Ce courant augmente en amplitude, c'est logique, parce que je vous rappelle que le potentiel d'équilibre des ions calcium est vers +50, +60 mV. Donc, plus on est loin du potentiel d'inversion, qui est à peu près ici, plus on est loin de ce potentiel d'inversion, plus le courant a une intensité forte. Et puis vers -50, on n'a plus rien parce que, en dessous de -50, les canaux sont fermés. Quelles sont les caractéristiques du courant calcium total de type N? Pour les comprendre, on enregistre en configuration cellule entière afin d'enregistrer plusieurs canaux calcium de type N. En mode voltage imposé pour enregistrer un courant, on met du calcium à l'extérieur en concentration de 2 mM et surtout on ajoute des bloquants des canaux sodium et potassium



sensibles au voltage pour ne pas les enregistrer et des bloquants des autres canaux calcium que ceux de type N. On maintient le potentiel de membrane à  $-80$  mV et on applique un saut de potentiel dépolarisant jusqu'à  $+20$  mV. En réponse à ce saut de potentiel, on voit un courant entrant qui diminue progressivement pendant le saut de potentiel. Il y a donc une phase descendante, un pic, et une diminution progressive de ce courant bien que le potentiel soit toujours à  $+20$  mV. Cela donne l'idée qu'en fait, les canaux s'inactivent. La phase descendante correspond à l'ouverture progressive des différents canaux calciques de type N, cette ouverture se fait rapidement. Et ici, il faudrait voir qu'en fait on a une multitude d'échelons de courant qui se sont sommés pour donner cette courbe lisse. Si on répète l'expérience en faisant plusieurs steps dépolarisants. On enregistre à  $-30$  mV un petit courant. Et puis à  $0$  mV un courant qui est plus grand. Et à  $+20$  mV, on est ici au pic du courant. La courbe courant-potentiel nous montre qu'à  $-30$  mV, on a un petit courant et que ce courant augmente progressivement jusqu'au pic, qui est vers  $+20$ ,  $+30$  mV, puis diminue. Alors pourquoi avons-nous une courbe I-V en cloche alors que, pour le courant unitaire, on avait une droite? Parce que, dans le courant unitaire, soit le canal s'ouvre, soit il ne s'ouvre pas. Là, c'est un comportement de plusieurs canaux, de très nombreux canaux présents dans la membrane. Le fait que quelques canaux s'ouvrent au début dépolarise la membrane et fait que les canaux qui ne sont pas encore ouverts vont s'ouvrir sous l'effet de cette dépolarisation. Donc, c'est comme pour les canaux sodium, ils vont s'ouvrir les uns derrière les autres jusqu'à ce que tous ceux qui peuvent s'ouvrir s'ouvrent. Et ensuite, le courant diminue parce qu'on se rapproche du potentiel d'inversion. Normalement, le courant devrait être beaucoup plus grand puisqu'on est très loin du potentiel d'inversion ici. Mais le fait que les canaux ne s'ouvrent pas tous en même temps en réponse au voltage fait que le courant augmente progressivement de pas grand-chose, jusqu'au pic, puis, ensuite, il va diminuer.

### CH. 3-3 : CALCIUM ET LIBERATION DU NEUROTRANSMETTEUR (10:12)

Nous savons maintenant que les ions calcium entrent dans les terminaisons axonales, en réponse à l'arrivée du potentiel d'action, grâce à l'ouverture de canaux calcium de type N, qui sont des canaux à haut seuil d'activation. Ils sont donc ouverts par de fortes dépolarisations comme lors d'un potentiel d'action. Les ions calcium entrent dans la terminaison présynaptique et provoquent la libération du neurotransmetteur. Quels sont les intermédiaires entre les ions calcium et la libération du neurotransmetteur ? Le fait que le délai entre l'entrée des ions calcium et la libération du neurotransmetteur soit extrêmement court, quelques centaines de microsecondes, fait faire l'hypothèse qu'il y avait un lien physique entre les canaux calcium et les vésicules qui contiennent le neurotransmetteur, que tout était prêt en quelque sorte pour la libération du neurotransmetteur. Ce schéma représente une terminaison axonale, qu'on appelle un élément présynaptique, avec la membrane présynaptique. Cette terminaison contient des vésicules synaptiques qui contiennent le neurotransmetteur. Il y a ici la fente synaptique et, en face, la membrane postsynaptique du neurone postsynaptique. On sait maintenant que des canaux calcium sont localisés extrêmement proche des vésicules qui sont amarrées à la membrane. On dit aussi quelquefois dockées. Voyons sur ce schéma comment les vésicules synaptiques sont amarrées à la membrane présynaptique et où sont les canaux calcium. Ce que l'on voit sur ce schéma, c'est la membrane présynaptique, qui est ici et ici. Et on voit ici une vésicule avec sa membrane tout autour. Donc, une vésicule et le canal calcium ici. Il y a un lien physique entre membrane



présynaptique, syntaxine, une protéine intégrale de la membrane présynaptique, et aussi il y a des liens entre la syntaxine et des protéines intégrales de la membrane des vésicules ou de la membrane présynaptique. Donc, on les appelle "v-snare" pour vésicule et "t-snare" pour target, cible en anglais. Tout ce complexe ici fait que les vésicules sont amarrées à la membrane présynaptique et que l'entrée de calcium n'est pas loin du tout de la vésicule. Quand les ions calcium entrent dans le milieu intracellulaire de la terminaison axonale, ils se fixent sur une protéine sensible au calcium qui s'appelle la synaptotagmine. Et ceci provoque un changement total de configuration du système avec une fusion entre les membranes de la vésicule et la membrane présynaptique. Lorsque les ions calcium entrent dans la terminaison présynaptique parce que les canaux calcium se sont ouverts, il y a une augmentation locale de la concentration intracellulaire en ions calcium. Ceci provoque la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique. C'est un phénomène qu'on appelle exocytose. Les deux membranes fusionnent à un moment donné et il se fait un trou, qu'on appelle pore de fusion, par lequel sortent les molécules du neurotransmetteur. Toutes ces étapes, entre l'amarrage des vésicules et l'exocytose, impliquent de très nombreuses protéines. Ce sont des étapes complexes dont on n'a pas encore tout compris parce qu'ils impliquent des changements de conformation de protéines. Ensuite, ces vésicules sont recyclées par endocytose, puis re-remplies de neurotransmetteur et peuvent participer à une autre libération de neurotransmetteur. En résumé, le potentiel d'action arrive dans des terminaisons axonales. Ce potentiel d'action, qui va dépolariser la membrane jusqu'à +20 mV à peu près, provoque l'ouverture des canaux calcium sensibles au voltage et qui sont à haut seuil. L'entrée des ions calcium provoque l'exocytose et la libération du neurotransmetteur, qui va se fixer sur les différents sites récepteurs de la membrane postsynaptique. Il faut noter que même lorsque toutes les conditions sont réunies, c'est-à-dire qu'il y a un ou plusieurs potentiels d'action présynaptiques, il n'y a pas toujours libération du neurotransmetteur. C'est un processus relativement inefficace, tel qu'environ un seul potentiel d'action parmi deux à vingt va provoquer l'ouverture des canaux calcium, la libération des neurotransmetteurs et une réponse postsynaptique. Maintenant, dans le cas où il y a une réponse postsynaptique, comment est-ce que cette réponse s'arrête, c'est-à-dire comment est-ce que la libération du neurotransmetteur s'arrête? Une fois que les ions calcium sont entrés, qu'est-ce qui se passe pour que la fusion des vésicules et l'exocytose s'arrêtent? Le retour à l'état de repos des terminaisons axonales implique plusieurs processus. En ce qui concerne la membrane, la membrane va se repolariser, d'abord parce qu'il y a une inactivation des canaux sodium du spike, comme nous l'avons vu au chapitre 2. Il y a aussi une inactivation des canaux calcium de type N, comme nous avons vu quand on a étudié le courant total de type N: on a vu que c'était un courant qui s'inactivait relativement rapidement. Et puis, il y a aussi une activation de canaux potassium sensibles aux ions calcium. Ces canaux, nous n'allons pas les étudier maintenant, ils sont étudiés dans une annexe. Et quel est leur rôle? C'est de faire sortir du potassium pour aider à repolariser la membrane, et comme ils sont sensibles aux ions calcium, dès que les ions calcium entrent dans la terminaison présynaptique, ceci active la partie intracellulaire de ces canaux, qui s'ouvrent et laissent sortir des ions potassium. Il en résulte une repolarisation rapide de la terminaison présynaptique, et donc les ions calcium cessent d'entrer puisque les canaux calcium se ferment. Ils se ferment parce que la membrane s'est repolarisée. Mais les ions calcium qui sont déjà entrés, que font-ils? Ils sont expulsés de la région présynaptique par plusieurs processus: des pompes, qui utilisent de l'énergie sous



forme d'ATP et qui mettent le calcium soit en réserve, par exemple dans le réticulum endoplasmique, soit vers l'extérieur; des transporteurs qui transportent, qui échangent des ions calcium contre des ions sodium et qui expulsent là encore le calcium à l'extérieur; la liaison avec des protéines qui sont dans le milieu intracellulaire, comme la parvalbumine, la calbindine, qui sont capables de lier les ions calcium et qui font donc disparaître le calcium sous sa forme ionique, qui est la forme sous laquelle il agit. Tout ceci fait que l'augmentation de calcium intracellulaire est transitoire, extrêmement brève, et que donc la libération du neurotransmetteur est brève. Lorsque le potentiel d'action arrive dans la terminaison axonale, la phase de dépolarisation de ce potentiel d'action permet l'ouverture des canaux calcium, qui sont essentiellement de type N ou P/Q, et qui sont à haut seuil, qui s'ouvrent donc en réponse à des fortes dépolarisations, comme le potentiel d'action. Il en résulte une entrée des ions calcium dans la terminaison axonale et une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium, mais cette augmentation est très locale et transitoire. Elle est transitoire parce que les canaux calcium s'inactivent et aussi il y a des mécanismes qui vont expulser les ions calcium vers le milieu extracellulaire ou vers des réserves intracellulaires et permettre ainsi de diminuer la concentration locale en ions calcium. Lorsque le calcium qui est entré permet d'atteindre une concentration intracellulaire d'environ 0,5-40 micromolaires, il y a exocytose d'une vésicule synaptique, c'est-à-dire libération du neurotransmetteur. Ces ions calcium effectivement se fixent à des protéines sensibles aux ions calcium, par exemple la synaptotagmine, et ceci permet de changer la configuration entre membrane vésiculaire et membrane présynaptique et la fusion de ces deux membranes. Cet exocytose se fait avec un délai court, d'environ deux cents microsecondes, parce que l'ensemble canaux calcium, protéines sensibles aux ions calcium et vésicules amarrées est très proche, très liés les uns aux autres. La repolarisation de la terminaison axonale, qui est importante pour qu'une deuxième transmission synaptique puisse avoir lieu, se fait grâce au courant potassique. Ce sont des courants, soit du potentiel d'action donc activés par la dépolarisation, que nous avons vus au chapitre 2, ou bien des courants que nous verrons en annexe, qui sont sensibles à la concentration intracellulaire en ions calcium, c'est-à-dire que ces canaux s'ouvrent quand il y a entrée des ions calcium à l'intérieur des terminaisons axonales. Et lorsque ces canaux s'ouvrent, il y a sortie d'ions potassium et donc repolarisation de la membrane. Nous savons maintenant qu'un signal électrique, comme le potentiel d'action, est créé par des courants d'ions, donc le passage des ions à travers la membrane, notamment des ions sodium et potassium. Ce signal électrique créé au segment initial de l'axone et propagé le long de l'axone, arrive aux terminaisons axonales. Aux terminaisons axonales, il dépolarise la membrane des terminaisons axonales, fait ouvrir des canaux calcium et provoque l'entrée d'ions calcium. Cette entrée d'ions calcium est perçue par des protéines sensibles aux ions calcium et entraîne l'exocytose des vésicules synaptiques qui contiennent le neurotransmetteur. Le neurotransmetteur est ainsi libéré dans la fente synaptique. Nous allons voir dans les cours prochains, comment ce neurotransmetteur va recréer un signal électrique qu'on appelle potentiel postsynaptique. Nous avons donc dans le neurone présynaptique, un signal électrique, le potentiel d'action. Le potentiel d'action entraîne un courant d'ions calcium qui lui aussi dépolarise la membrane - on parle quelquefois de potentiel d'action sodico-calcique parce que les ions calcium participent - et qui provoque la libération d'une molécule chimique. Maintenant, nous allons voir comment une molécule chimique peut recréer un signal électrique.