

ANNÉE 2017

N° 037

**THÈSE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ÉTAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

par

**Benjamin SERRAZ**

-----

*Présentée et soutenue publiquement le 7 juillet 2017*

**HOMEOSTASIE DU ZINC LIBRE, UN NOUVEAU  
REGARD SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DU  
CERVEAU**

**Président :** Mme. Sylvie PLESSARD, Professeur des universités –  
Praticien hospitalier, Université de Nantes

**Membres du jury :** M. Samuel BULTEAU, Chef de clinique au CHU de Nantes  
M. François LANG, Professeur de pharmacologie, Université  
de Nantes  
M. Clément PREVOST-SOLIÉ, Diplômé de l'École Normale  
Supérieure, doctorant en neurosciences

## REMERCIEMENTS

Je tiens, en premier lieu à remercier M. François LANG pour avoir accepté de prendre la direction de ma thèse de pharmacie. Mon souhait de vous avoir à mes côtés tout au long de cet exercice était tout à fait naturel et il n'y avait, selon moi, aucun autre enseignant au sein de la faculté de pharmacie de Nantes mieux placé que vous pour en prendre la direction. C'est tout d'abord grâce à vos enseignements de pharmacologie qu'est née ma passion pour cette discipline. Par la façon dont vous décriviez les différents systèmes de neuromodulation, les grandes cascades de signalisations qui en découlent, ainsi que les mécanismes d'action des médicaments chers à notre profession, vous avez su me transmettre votre intérêt pour ce champ de la biologie. C'est également grâce à vous que j'ai pu m'orienter vers les neurosciences, une discipline qui me fascine et dans laquelle je m'épanouis. En effet, en 3<sup>ème</sup> année, lors des « POP » (projet d'orientation professionnelle), vous étiez mon enseignant référent. C'est non sans un certain étonnement que vous aviez face à vous un étudiant un peu perdu qui souhaitait s'orienter vers la recherche en éthologie. Après une longue discussion, vous m'aviez convaincu de l'intérêt des neurosciences et c'est grâce à cette conversation que j'ai ensuite décidé de faire un master 2 puis une thèse dans ce domaine. Ainsi, pour l'ensemble de vos contributions dans mon parcours professionnel et pour avoir accepté de diriger ma thèse d'exercice, je tiens à vous remercier chaleureusement.

Je remercie Mme. Sylvie PLESSARD d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je garderai longtemps les souvenirs de vos enseignements dirigés au cours desquels vous avez toujours su manier avec brio l'alternance entre des moments studieux et d'humours. J'ai toujours eu un profond respect pour vous et je suis heureux que vous ayez accepté cette présidence.

Je tiens à remercier M. Samuel BULTEAU d'avoir accepté de rejoindre mon jury de thèse. Votre expertise médicale apportera beaucoup aux discussions que nous aurons lors de la soutenance.

Je tiens tout particulièrement à remercier Christina. Cela fait maintenant plus de deux ans que tu es à mes côtés et que tu me comble de bonheur. Je pense sincèrement que c'est grâce à ton soutien indéfectible que j'ai pu mener à bien ce projet et je suis sûr que grâce à la force que tu me donnes chaque jour, je serais capable d'en accomplir bien

d'autres. Même si je pense que je ne pourrais jamais te remercier assez, le sourire que tu me donne chaque jour est la preuve de mon amour le plus sincère. Pour tous ces moments passés à tes côtés, et le nombreux à venir, je te remercie.

Je me dois également de remercier Mocca, sans quoi Christina me renierait. Merci de faire tes besoins en dehors de l'appartement et de nous rendre si heureux. Et non, 7 heures du matin n'est évidemment pas une heure pour aller jouer. Je précise que Mocca est notre chien.

Je remercie également ma famille et en particulier ma mère, ma sœur ainsi que mon père. Je dois dire que cela fait maintenant 3 ans que vous me poussez à rédiger ce manuscrit. Face à votre acharnement je n'ai eu d'autre solution que d'abdiquer. J'espère donc que vous n'allez pas vous arrêter à la lecture des remerciements mais que vous allez poursuivre jusqu'au point final de ce manuscrit (et cela comprend la bibliographie). Je vous interroge après la soutenance. Je peux dire, sans exagérer, que je ne serais pas là où j'en suis sans vous, autant biologiquement que personnellement. Vous êtes un soutien sans faille et avez toujours su m'écouter et me rendre heureux. Je suis fier d'être votre fils/frère.

Je remercie chaleureusement Marc. Tu es sans nul doute un de mes amis les plus fidèles. Malgré ton incroyable talent pour rallonger tes études et te séparer un peu plus chaque année de ma promotion de pharmacie, nous avons gardé ce lien assez magnifique et rare qui nous unit. Tu as toujours été présent à mes côtés et tu sais pertinemment que la réciproque sera toujours vraie. J'ai un profond respect pour toi et pour notre amitié.

Je remercie également Clément, un membre du jury un peu particulier. Cela fait maintenant quelques années que nous nous connaissons et tu as su devenir un de mes plus fidèles amis. Ton humour et ta sincérité ont toujours su me redonner le sourire et ce en toute situation. Pour tous ces moments passés à tes côtés je ne peux que te remercier. Mon choix de t'inclure dans ce jury était une évidence. En plus de ton amitié, j'ai un immense respect pour tes qualités scientifiques et je suis certain que ton expertise en neurosciences sera un vrai plus dans cette étape importante de ma vie.

Je remercie François pour nos parties endiablées, la création d'une chaîne Youtube absolument exceptionnelle (abonnez-vous), des fous rires mémorables et une colocation inoubliable. Tu es une personne formidable, toujours à l'écoute et d'excellent conseil. Ton amitié m'est extrêmement précieuse. Twin Emile.

Je tiens à remercier Julien pour son incroyable amitié. Tu fais partie de ces rares personnes qui ont réussi à me marquer. Ta joie de vivre constante et ta gentillesse sans limite sont précieuses et je suis fier de te connaître.

Je remercie également Alban, mon plus ancien et fidèle ami. Tant de souvenirs à tes côtés. Merci pour toutes ces années et les nombreuses à venir.

Merci à Mear ainsi qu'à Ludwig et Bergere pour toutes ces belles années à Nantes.

Merci à Maïlis pour son aide précieuse pendant la rédaction de cette thèse, ainsi qu'à Barbara et Éva.

Je tiens tout particulièrement à remercier Pierre PAOLETTI, mon directeur de thèse de science à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure. Vous m'avez donné une chance incroyable en intégrant votre équipe et j'en suis profondément reconnaissant. La confiance que vous me témoignez et votre passion pour la discipline que vous me transmettez chaque jour sont un incroyable moteur au quotidien. C'est grâce à vous que j'ai choisi ce sujet de thèse d'exercice. Les discussions que nous avons régulièrement sur le sujet m'ont réellement aidé à rédiger ce manuscrit et j'espère sincèrement qu'il répondra à vos attentes.

Je remercie également Mariano CASADO, mon autre directeur de thèse, pour l'ensemble de ses conseils et enseignements. C'est un véritable plaisir que de travailler sous ta direction.

Je remercie également l'ensemble des membres de l'équipe Paoletti.

Je tiens à remercier singulièrement Laurine. Tout d'abord pour ton amitié, mais également pour ton soutien constant durant la rédaction de ce document. Tes conseils et les corrections que tu as effectuées m'ont été d'une aide formidable et je pense sincèrement que sans ta contribution, la rédaction de ce manuscrit aurait été bien plus douloureuse.

Je remercie Caroline, Teddy, Dimitri et Jean-Baptiste pour leur soutien tout au long de ces années. Plus que des collègues vous avez su devenir de vrais amis.

# TABLE DES MATIERES

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>II. PHYSIOLOGIE</b> .....	<b>3</b>
<b>II.A. PROPRIETES CHIMIQUES DU ZINC ET SA DISTRIBUTION DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b> .....	<b>3</b>
II.A.1. Propriétés chimiques du zinc .....	3
II.A.2. Distribution macroscopique du zinc libre.....	4
II.A.3. Distribution subcellulaire du zinc libre.....	6
<b>II.B. HOMEOSTASIE DU ZINC LIBRE</b> .....	<b>7</b>
II.B.1. Valeurs normales du zinc libre dans les différents liquides biologiques chez l'homme .....	7
II.B.2. Zinc Importing Proteins (Zips) .....	8
II.B.3. Zinc Transporteurs (ZnTs) .....	9
II.B.4. Echangeur Na <sup>+</sup> /Zn <sup>2+</sup> .....	11
II.B.5. Métallothionéines .....	11
II.B.6. Mitochondrie.....	12
<b>II.C. CIBLES POSTSYNAPTiques DU ZINC LIBRE</b> .....	<b>14</b>
II.C.1. Récepteurs ionotropiques du glutamate .....	15
II.C.1.a. Les récepteurs NMDA .....	15
II.C.1.b. Les récepteurs AMPA.....	16
II.C.1.c. Passage du zinc au travers des récepteurs ionotropiques du glutamate .....	18
II.C.2. Action du zinc sur les récepteurs ionotropiques inhibiteurs.....	19
<b>III. PATHOLOGIES</b> .....	<b>22</b>
<b>III.A. CHOCs ISCHEMIQUES EXCITOTOXIQUES</b> .....	<b>23</b>
III.A.1. Le zinc, un nouvel acteur au cœur de l'excitotoxicité .....	23
III.A.1.a. Théorie calcique de l'excitotoxicité.....	23
III.A.1.b. Implications du zinc dans l'excitotoxicité, remise en cause de la place unique du calcium.....	25
III.A.2. Mécanismes dépendant de la mitochondrie .....	29
III.A.2.a. La mitochondrie, un puits de zinc en conditions excitotoxiques.....	29
III.A.2.b. L'excès de zinc perméabilise la membrane mitochondriale.....	32
III.A.2.c. Zinc, un puissant inhibiteur de la chaîne respiratoire.....	34
III.A.2.d. Inhibition de la chaîne respiratoire et production de radicaux libres.....	35
III.A.2.e. Activation du MPTP mitochondrial et fuite de facteurs pro-apoptotiques.....	36
III.A.2.f. Le zinc inhibe le mouvement des mitochondries.....	40
III.A.3. Mécanismes indépendants de la mitochondrie .....	40
III.A.3.a. La voie PKC/NAPDH.....	41
III.A.3.b. La voie p38 MAPK/canal Ik.....	43
III.A.3.c. Mécanismes d'auto-augmentation des concentrations intracellulaires en zinc .....	45
III.A.3.c.i. La voie des MTs.....	45
III.A.3.c.ii. HNE, autophagie et libération de zinc depuis les lysosomes.....	47
III.A.4. Mécanismes indépendants de la mitochondrie conduisant à une réduction de la production d'ATP .....	51
III.A.4.a. Inhibition de la GAPDH par le zinc .....	52
III.A.4.b. Induction du catabolisme du NAD <sup>+</sup> par le zinc.....	52
III.A.4.b.i. Activation de la boucle PARP/PARG par le zinc.....	55
III.A.4.b.ii. Activation de la voie des sirtuines par le zinc .....	57
III.A.5. Sources du zinc excitotoxique, une question débattue .....	58
III.A.6. La contribution relative du zinc et du calcium dans l'excitotoxicité.....	62
III.A.6.a. Cinétiques relative d'élévation des concentrations en zinc et en calcium excitotoxique .....	63
III.A.6.b. La source de zinc excitotoxique est région-dépendante.....	64
III.A.6.c. Contribution relative du zinc et du calcium aux dommages cellulaires.....	66
III.A.7. Perspectives de traitements.....	68
III.A.7.a. Stratégie visant à restreindre l'entrée neuronale du zinc excitotoxique.....	68
III.A.7.b. Stratégies visant à éliminer l'excès de zinc cytoplasmique.....	70
III.A.7.c. Stratégies visant à bloquer les cascades neurotoxiques zincergiques.....	72

III.A.8.	Conclusion.....	74
<b>III.B.</b>	<b>LA MALADIE D'ALZHEIMER.....</b>	<b>76</b>
III.B.1.	Le zinc favorise l'agrégation des peptides d'A $\beta$ .....	78
III.B.1.a.	Le site zinc des monomères d'A $\beta$ .....	79
III.B.1.b.	Le zinc induit la formation d'oligomères d'A $\beta$ et prolonge leur demi-vie.....	80
III.B.2.	Le zinc vésiculaire favorise la formation d'oligomères toxiques au voisinage des synapses	82
III.B.2.a.	Inhibition de la LTP par les oligomères d'A $\beta$ .....	82
III.B.2.b.	Le zinc attire les oligomères au voisinage de la synapse.....	83
III.B.2.c.	L'homéostasie du zinc est perturbée dans la maladie d'Alzheimer.....	86
III.B.2.d.	Les oligomères d'A $\beta$ se lient à la sous-unité GluN2B des rNMDAs.....	87
III.B.3.	Effets neurotoxiques des peptides d'A $\beta$ et production de ROS.....	89
III.B.4.	Perspectives de traitements.....	91
<b>III.C.</b>	<b>L'EPILEPSIE.....</b>	<b>95</b>
III.C.1.	Manipuler les concentrations en zinc affecte la susceptibilité au déclenchement des crises d'épilepsie.....	96
III.C.1.a.	Effets d'injections intracérébrales de zinc sur la susceptibilité au déclenchement de crises d'épilepsie.....	96
III.C.1.b.	Effets d'un régime appauvri en zinc sur la susceptibilité au déclenchement de crises d'épilepsie.....	99
III.C.1.c.	Effets de l'utilisation de chélateurs du zinc sur la susceptibilité au déclenchement de crises d'épilepsie.....	100
III.C.1.d.	Modification de l'homéostasie du zinc avec des modèles de souris génétiquement modifiées.....	103
III.C.2.	L'effet antiépileptique du zinc passe par son action sur les mZnRs.....	104
III.C.3.	Epilepsie et mutations génétiques affectant des protéines associées au zinc libre.....	108
III.C.3.a.	Altération génétique de ZnT3 dans l'épilepsie fébrile.....	108
III.C.3.b.	Altérations génétique de la sous-unité GluN2A des rNMDAs chez des patients épileptiques.....	111
III.C.4.	Perspectives de traitements.....	113
<b>III.D.</b>	<b>AUTRES PATHOLOGIES IMPLIQUANT LE ZINC LIBRE.....</b>	<b>115</b>
III.D.1.	Lésions du nerf optique.....	115
III.D.2.	Hyperekplexie.....	120
III.D.3.	Vers une implication du zinc dans d'autres pathologies ?.....	122
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>125</b>
<b>V.</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>I</b>
<b>VI.</b>	<b>ANNEXE.....</b>	<b>I</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## CHOCIS ISCHEMIQUES EXCITOTOXIQUES

FIGURE 1 : MARQUAGE DU ZINC LIBRE PAR AUTOMETALLOGRAPHIE (MARQUAGE DE TIMM) SUR UNE TRANCHE SAGITTALE DE CERVEAU DE RAT .....	5
FIGURE 2 : DISTRIBUTION SUBCELLULAIRE DU ZINC LIBRE ACCUMULE DANS LES VESICULES SYNAPTIQUES DE NEURONES GLUTAMATERGIQUES.....	6
FIGURE 3 : ÉLIMINATION DU ZINC VESICULAIRE DANS LE CERVEAU DE SOURIS ZNT3 KO.....	9
FIGURE 4 : SYSTEME DE REGULATION HOMEOSTATIQUE DU ZINC LIBRE DANS LES NEURONES. ENCART, SITE DE FIXATION DU ZINC SUR LES ZNTS.....	13
FIGURE 5 : SCHEMA D'UNE SYNAPSE ZINCERGIQUE.....	14
FIGURE 6 : STRUCTURE ET MECANISME DE REGULATION ALLOSTERIQUE DES RNMDAS.....	16
FIGURE 7 : STRUCTURE D'UN RANPA HOMOTETRAMERIQUE GLUA2.....	17
FIGURE 8 : TRANCHE CORONALE D'UN CERVEAU DE SOURIS REVELEE PAR LE MARQUAGE DE NISSL.....	25
FIGURE 9 : AFFINITE ZINC D'UNE SONDE CALCIQUE FLUORESCENTE REVELEE PAR L'UTILISATION DE TPEN.....	27
FIGURE 10 : AUGMENTATION NEUROTOXIQUE DU ZINC DANS LES NEURONES A LA SUITE DE PROTOCOLES D'ISCHEMIE ET EFFET PROTECTEUR DE SA CHELATION .....	28
FIGURE 11 : LE ZINC EXCITOTOXIQUE ENTRE DANS LES MITOCHONDRIES VIA L'UNI PORTEUR CALCIQUE ET INDUIT UNE DEPOLARISATION DE LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE.....	30
FIGURE 12 : LIBERATION PHYSIOLOGIQUE DE ZINC PAR LA MITOCHONDRIE .....	32
FIGURE 13 : LE ZINC INHIBE LA CONSOMMATION EN O <sub>2</sub> DES MITOCHONDRIES.....	35
FIGURE 14 : LE ZINC AUGMENTE LA PRODUCTION D'ESPECES RADICALAIRES PAR LES MITOCHONDRIES.....	36
FIGURE 15 : LE ZINC INDUIT L'OUVERTURE DU MPTP MITOCHONDRIAL PROVOQUANT LE GONFLEMENT DE L'ORGANITE ET LA PRODUCTION DE FACTEURS PRO-APOPTOTIQUES.....	38
FIGURE 16 : LE ZINC INDUIT LA PRODUCTION INTRACELLULAIRE DE RADICAUX LIBRES PAR ACTIVATION DE LA CASCADE PKC/NADPH OXYDASE .....	42
FIGURE 17 : L'INDUCTION DE LA PRODUCTION DE NO PAR LE ZINC FAVORISE LA FORMATION DE ROS, L'ACTIVATION DE LA P38 MAPK ET L'OUVERTURE SUBSEQUENTE DE CANAUX I <sub>K</sub> A L'ORIGINE DE TROUBLES OSMOTIQUE CELLULAIRES CONDUISANT A L'APOPTOSE NEURONALE.....	44
FIGURE 18 : LA PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES PAR LE ZINC FAVORISE SA LIBERATION DEPUIS LES MTS .....	46
FIGURE 19 : LE ZINC EXCITOTOXIQUE S'ACCUMULE DANS LES LYSOSOMES ET ENCLENCHE LE PROCESSUS DE LMP VIA LA PRODUCTION D'HNE CONDUISANT A LA LIBERATION D'ENZYMES ACIDOPHILES TELLES QUE LA CATHEPSINE D.....	48
FIGURE 20 : SCHEMA D'UNE SYNAPSE TRIPARTITE.....	50
FIGURE 21 : SCHEMA DE LA GLYCOLYSE .....	53
FIGURE 22 : LE ZINC ACCELERE LE CATABOLISME DU NADH.....	54
FIGURE 23 : DOMMAGES DE L'ADN, ACTIVATION DE LA BOUCLE PARP/PARG ET DEPLETION EN NADH INDUITE PAR LE ZINC EXCITOTOXIQUE .....	56
FIGURE 24 : EFFET DU ZINC SUR LA VOIE DES SIRTUINES.....	57
FIGURE 25 : REMISE EN CAUSE DE L'ORIGINE SYNAPTIQUE DU ZINC EXCITOTOXIQUE .....	59
FIGURE 26 : L'INJECTION DE CAEDTA REDUIT LA MORT NEURONALE INDUITE PAR LE ZINC EXCITOTOXIQUE .....	61
FIGURE 27 : CINETIQUE RELATIVE D'AUGMENTATION DES CONCENTRATIONS EN ZINC ET EN CALCIUM EXCITOTOXIQUE .....	63
FIGURE 28 : LA SOURCE DE ZINC EXCITOTOXIQUE EST REGION-DEPENDANTE.....	65
FIGURE 29 : CONTRIBUTION RELATIVE DU ZINC ET DU CALCIUM AUX DOMMAGES CELLULAIRES .....	67
FIGURE 30 : NEUROPROTECTION ASSOCIEE A LA PREVENTION DE L'ENTREE DU ZINC DANS LES NEURONES .....	69
FIGURE 31 : NEUROPROTECTION ASSOCIEE A LA PREVENTION DE L'ACTION DU ZINC SUR SES EFFECTEURS CELLULAIRES .....	73

## LA MALADIE D'ALZHEIMER

FIGURE 32 : FORMATION DE LA PLAQUE AMYLOÏDE .....	77
FIGURE 33 : SITE DE FIXATION DU ZINC AU SEIN D'UN MONOMERE D'AB .....	79
FIGURE 34 : LE ZINC INDUIT LA FORMATION D'OLIGOMERES D'AB.....	80
FIGURE 35 : EFFETS NEGATIFS DES OLIGOMERES D'AB SUR LES PROCESSUS A LA BASE DE LA MEMORISATION.....	82
FIGURE 36 : LE ZINC SYNAPTIQUE FAVORISE L'ACCUMULATION D'OLIGOMERES D'AB A LA SYNAPSE.....	84
FIGURE 37 : EXPRESSION MODIFIEE DES TRANSPORTEURS DU ZINC ZNTS DANS UN MODELE MURIN DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	86
FIGURE 38 : LA SOUS-UNITE GLUN2B DES RNMDA EST UNE CIBLE SYNAPTIQUE DES OLIGOMERES D'AB .....	87
FIGURE 39 : LES PEPTIDES D'AB INDUISENT LA PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES DANS LE CYTOPLASME DES NEURONES..	90
FIGURE 40 : STRUCTURE CHIMIQUE DU CLIOQUINOL (PBT1) ET DU PBT2 .....	92

## **L'EPILEPSIE**

FIGURE 41 : NIVEAUX DE ZINC ALTERES DANS LE SNC DE RATS EPILEPTIQUES ? .....	98
FIGURE 42 : EFFETS PROTECTEUR DU ZINC VIS-A-VIS DU DECLenchEMENT DES CRISES D'EPILEPSIE .....	101
FIGURE 43 : PAR SON ACTION SUR LES MZNR, LE ZINC ACCELERE LA CINETIQUE DE FONCTIONNEMENT DES TRANSPORTEURS NEURONAUX DU CHLORE KCC2 .....	106
FIGURE 44 : PERTE DE FONCTION DU TRANSPORTEUR VESICULAIRE DU ZINC ZNT3 MUTE CHEZ DES PATIENTS EPILEPTIQUE .....	109
FIGURE 45 : ALTERATION DE LA SENSIBILITE AU ZINC DE RNMDA CONTENANT UNE SOUS-UNITE GLUN2A MUTEE IDENTIFIEE CHEZ DES PATIENTS EPILEPTIQUES.....	112

## **LESION DU NERF OPTIQUE**

FIGURE 46 : SCHEMA DE L'ORGANISATION CELLULAIRE DE LA RETINE .....	116
FIGURE 47 : ZINC, UNE NOUVELLE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DES LESIONS DU NERF OPTIQUE.....	119

## **HYPEREKPLEXIE**

FIGURE 48 : IMPACT DE LA MUTATION W170S IDENTIFIE CHEZ DES PATIENTS SUR LA SENSIBILITE ZINC DES RECEPTEURS GLYCINERGIQUES.....	121
--	-----

## I. Introduction

Le corps humain renferme une grande variété de métaux. Fer, zinc, cuivre ou encore magnésium, ils sont présents en faible quantité mais sont indispensables au fonctionnement de notre organisme. La vaste majorité de ces oligoéléments est séquestrée au cœur des protéines et participe à leur structure et à leur fonction. C'est le cas du plus célèbre des métaux de notre organisme, le fer, nécessaire à la distribution du dioxygène ( $O_2$ ) dans le corps humain et dont la physiopathologie est étudiée de façon exhaustive depuis de nombreuses années. Le zinc quant à lui est un métal de transition ayant la particularité d'exister sous forme libre. Cette caractéristique unique au sein des éléments de transition de l'organisme a poussé de nombreux groupes de recherche à s'intéresser à ses implications dans de nombreux processus physiopathologiques. Le zinc a depuis été identifié dans la régulation d'un nombre important de fonctions cellulaires et métaboliques car il est un élément structural indispensable des facteurs de transcription à doigt zinc. Concentré dans de nombreux organes, le zinc libre est particulièrement abondant dans le cerveau au sein duquel il participe à la transmission synaptique. Alors que son rôle et sa fonction dans ce processus sont encore aujourd'hui controversés, depuis le début des années 1990, le zinc a été identifié comme un acteur majeur du développement de nombreuses pathologies affectant le système nerveux central (SNC). Impliqué dans la maladie d'Alzheimer ou encore dans le développement des processus neurotoxiques observés lors d'accidents vasculaires cérébraux (AVCs), le zinc active un certain nombre de cascades intracellulaires délétères et l'identification de ce métal et de ses effecteurs comme des nouvelles cibles médicamenteuses apporte un nouvel espoir dans le traitement de ces maladies pour lesquelles le catalogue thérapeutique est aujourd'hui restreint ou peu efficace.

Cette thèse vise à détailler les mécanismes cellulaires associés aux troubles de l'homéostasie du *zinc libre* impliqués dans le développement de pathologies du SNC affectant plus particulièrement l'organe principal de ce système, *le cerveau*. L'identification et la description des effecteurs moléculaires à la base de ces effets permettront alors de discuter des potentielles implications thérapeutiques qu'elles représentent et des perspectives de traitement qui en découlent. La recherche sur le zinc

libre étant encore *jeune*, de nombreuses maladies sont régulièrement associées à des troubles de son homéostasie. C'est la raison pour laquelle cette thèse se limitera à ne détailler que les pathologies pour lesquelles les preuves scientifiques sont suffisamment nombreuses et convaincantes au regard de l'implication du zinc libre dans leur développement.

## II. Physiologie

### II.A. Propriétés chimiques du zinc et sa distribution dans le système nerveux central

#### II.A.1. Propriétés chimiques du zinc

Le zinc trône à la deuxième position des éléments traces les plus abondants du corps humain. Comparativement aux autres métaux de transition tels que le fer ou le cuivre, le zinc est l'ion le plus utilisé par les protéines de l'organisme puisqu'il est lié à 8 à 10% d'entre elles. Ce réservoir de zinc (75-80% du zinc total, [Frederickson, 1989](#); [Palmiter et al., 1996](#); [Cole et al., 1999](#)) est chimiquement lié à diverses protéines et enzymes telles que des oxydoréductases, des transférases, des hydrolases, des lyases, des isomérases ou encore des ligases. En conséquence, le zinc lié joue un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme à la fois des protéines mais également des acides nucléiques et des lipides. Il est au cœur du fonctionnement de notre organisme.

Une des raisons probables pour laquelle l'évolution a mis en avant le zinc parmi l'ensemble des métaux de transition pour participer à la structure et à la fonction des protéines, tient au fait qu'il est particulièrement stable et stéréochimiquement flexible. Physiologiquement, le zinc en solution est non toxique, en particulier grâce à un faible potentiel oxydoréducteur. En parallèle, il est doté d'une certaine flexibilité stéréochimique due à une sphère de coordination variable autorisant des liaisons avec 2 à 8 partenaires. Au cœur des protéines, le rôle du zinc lié peut se résumer à trois fonctions. La première est structurale, puisqu'en se liant aux macromolécules, le zinc participe à leur stabilité. Dans les enzymes, il peut également participer directement aux réactions de catalyse, il est alors essentiel à leur fonctionnement et son absence (*p. ex.* par chélation) conduit à l'inactivation de ces enzymes. Finalement, le zinc peut se comporter comme un cofacteur enzymatique, augmentant ou diminuant les capacités catalytiques des enzymes auxquels il est lié.

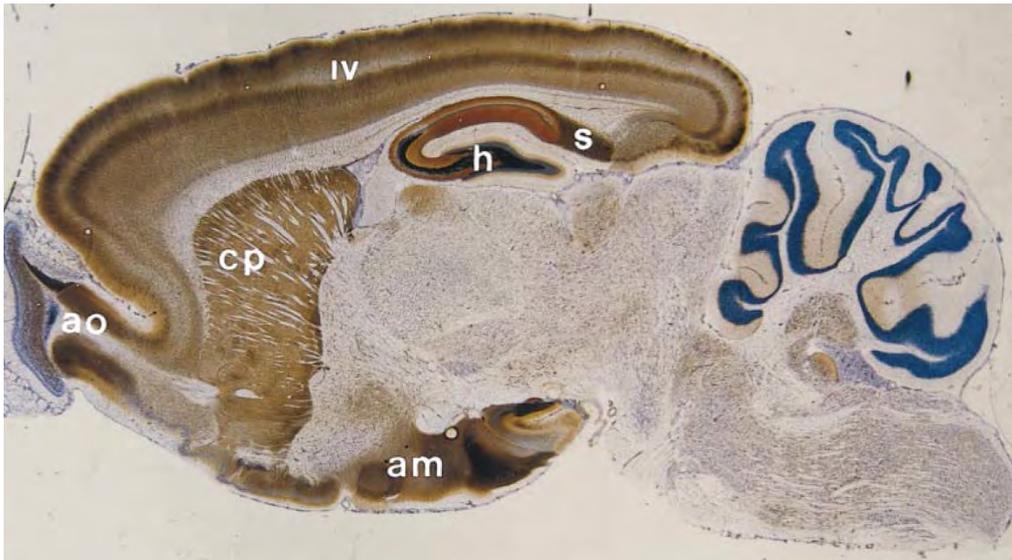
Le zinc lié est donc un élément clé du fonctionnement de nombreuses protéines. Au cœur des macromolécules, leur structure influence les propriétés chimiques du zinc

qui en retour, conditionne directement leur fonction biologique (pour revue, voir [Vallee and Falchuk, 1993](#)).

Le zinc est un métal biologiquement particulier car à la différence des autres éléments de transition, il existe également sous *forme libre* dans l'organisme (**Figure 1**, [Danscher, 1981](#); [Frederickson, 1989](#); [Frederickson et al., 2000](#); [Sindreu et al., 2003](#); [Nakashima and Dyck, 2009](#); [Paoletti et al., 2009](#); [Sensi et al., 2009](#)). Représentant 20 à 25 % du zinc total ([Frederickson, 1989](#); [Palmiter et al., 1996](#); [Cole et al., 1999](#)), sa faible réactivité chimique est une raison possible de sa présence sous forme non liée (*Cf.* ci-dessus). Le zinc libre est présent à des concentrations élevées dans divers organes tels que dans le SNC où il semble être impliqué dans la modulation de la transmission synaptique aux synapses glutamatergiques ([Nozaki et al., 2011](#); [Vergnano et al., 2014](#); [Kalappa et al., 2015](#); [Kalappa and Tzounopoulos, 2017](#)). Ce réservoir de zinc s'accumule également dans les glandes salivaires, à divers endroits du système gastro-intestinal, ainsi que dans la prostate où il participe à la maturation du sperme. ([Vallee and Falchuk, 1993](#)).

### II.A.2. Distribution macroscopique du zinc libre

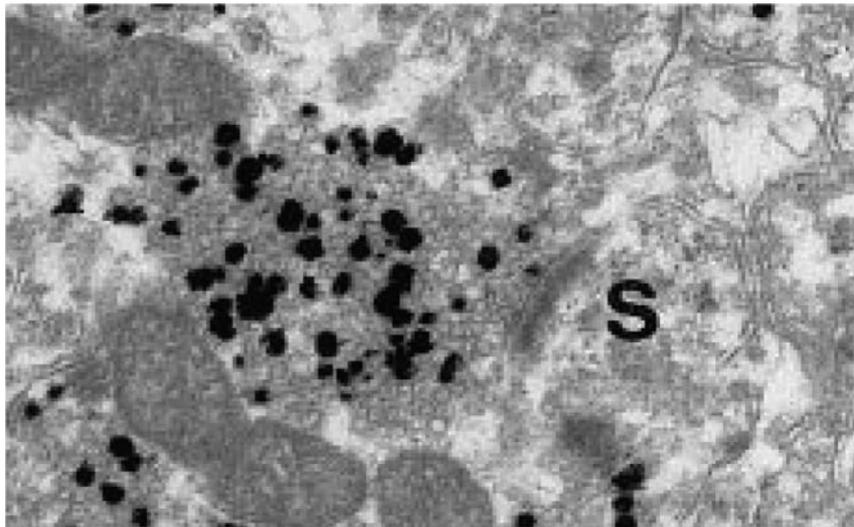
Non lié aux protéines, ce réservoir de zinc est disponible chimiquement et peut donc réagir avec différents composés. Cette propriété permet d'étudier son rôle dans le fonctionnement du cerveau sain et pathologique. En particulier, l'utilisation de chélateurs permet de séquestrer le zinc et de l'empêcher de participer aux réactions dans lesquels il est impliqué et notamment, sa liaison à différentes cibles localisées sur la membrane des neurones postsynaptiques (*Cf.* partie II.C). Parmi ces chélateurs, certains sont capables de franchir les membranes, tels que le **TPEN** (N,N,N',N'-tétrakis-(2-Pyridylmethyl)ethylenediamine) ou le **ZX1** (sel d'hydrate de sodium de l'acide 2-[[Bis(2-pyridinylmethyl)amino]ethylamino]benzenesulfonique) alors que d'autres ne les franchissent pas et restent cantonnés à l'environnement extracellulaire et en particulier à la synapse tel que le CaEDTA (sels de calcium de l'acide ethylenediaminetetraacétique) ou la tricine (*Cf.* partie II.C.1.b).



**Figure 1: Marquage du zinc libre par autométallographie (marquage de Timm) sur une tranche sagittale de cerveau de rat.** La coloration marron représente le zinc libre issu du marquage de Timm (autométallographie). La coloration bleue est issue d'un marquage de Nissl. S, subiculum; h, hilus ; ao, bulbes olfactifs ; cp, caudate putamen (striatum) ; am, amygdale ; IV, couche 4 du cortex. Adapté de [Frederickson et al., 2000](#).

Cette disponibilité chimique du zinc libre permet également de révéler sa présence à l'aide de différentes techniques d'imagerie. Parmi ces celles-ci, le marquage de Timm a permis de révéler sa distribution dans le SNC (**Figure 1**). Cette technique de marquage *autométallographique* (détaillée dans la partie III.C.1) montre que dans le télencéphale, le zinc a une distribution stéréotypée puisque les fibres zincergiques (fibres contenant du zinc) forment un réseau associationnel dense, interconnectant la plupart des régions corticales et limbiques ([Danscher, 1981](#); [Frederickson, 1989](#)). Certaines de ces régions présentent un marquage particulièrement dense, notamment l'amygdale et le stratum lucidum de l'hippocampe, traduisant d'une concentration importante en zinc libre dans ces régions. Depuis, d'autres méthodes de révélation du zinc libre ont été développées, utilisant notamment des sondes fluorescentes spécifique pour le zinc (*Cf.* partie III.A.1.b) tels que le **TSQ** (N-(6-Methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide), le **TFLZn** (acide 4-[[[6-Methoxy-2-méthyl-8-quinolinyl]amino)sulfonyl]benzoïque, **Figure 25**) ou encore le **ZP-1** (zinpyr-1).

### II.A.3. Distribution subcellulaire du zinc libre



**Figure 2 :** Distribution subcellulaire du zinc libre accumulé dans les vésicules synaptiques de neurones glutamatergiques. Marquage de Timm vu en microscopie électronique. S, synapse. Adapté de [Frederickson et al., 2000](#).

Dans le cerveau, le zinc libre présente une distribution subcellulaire remarquable puisque la vaste majorité s'accumule dans une sous-population de fibres glutamatergiques au sein desquels il est concentré avec le glutamate dans les vésicules synaptiques (**Figure 2**, [Palmiter et al., 1996](#); [Cole et al., 1999](#); [Frederickson et al., 2000](#); [Sindreu et al., 2003](#); [Smart et al., 2004](#); [Paoletti et al., 2009](#); [Sensi et al., 2009](#)). Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la terminaison axonale d'un neurone zincergique, le métal est alors libéré dans la fente synaptique en même temps que le glutamate ([Vergnano et al., 2014](#)). L'estimation actuelle rapporte que 50% de ces fibres contiendraient du zinc ([Danscher, 1981](#); [Frederickson, 1989](#); [Frederickson et al., 2000](#)) mais il est important de noter que ces estimations ont été réalisées à partir de marquages de Timm révélés par microscopie électronique (**Figure 2**). Compte tenu de la difficulté d'effectuer des quantifications à l'aide de techniques autométallographiques (plus de détails dans la partie III.A.1.b), cette estimation est incertaine. En effet, en fonction de la sensibilité de la technique de révélation du zinc (autométallographie ou à l'aide de sondes fluorescentes), certaines fibres contenant le métal en faible proportion dans leurs vésicules synaptiques pourraient ne pas être marquées et seraient donc identifiées comme « zinc négatives » biaisant l'estimation annoncée précédemment. En parallèle, dans d'autres régions du SNC, le zinc est concentré dans des cellules inhibitrices  $\gamma$ -aminobutyrique(GABA)-ergiques et glycinergiques tels que les cellules

amacrynes de la rétine (*Cf.* partie III.D.1, [Li et al., 2017](#)) ou encore dans certains interneurons de la moelle épinière ([Danscher et al., 2001](#)).

## **II.B. Homéostasie du zinc libre**

Le zinc libre, tout comme sa fraction liée, est impliqué dans un nombre important de processus biologiques indispensables au bon fonctionnement de notre organisme. De la régulation de facteurs de transcription, au maintien de l'activité de protéines et de divers enzymes en passant par la modulation de la transmission synaptique, le zinc dans son ensemble requiert un système de régulation homéostatique efficace permettant le maintien de ses concentrations dans des valeurs physiologiques dans les différents compartiments biologiques. Bien que ces systèmes soient majoritairement ubiquitaires, il existe cependant des spécificités à certaines populations cellulaires, notamment aux cellules du SNC. En effet, les neurones doivent permettre le stockage du zinc libre dans les vésicules synaptiques tout en prévenant l'élévation excessive de ses concentrations dans le cytoplasme. A la suite de sa libération dans la fente synaptique, les neurones doivent également disposer de moyens permettant la récupération et le recyclage du zinc libéré. Tous ces systèmes assurent le maintien des concentrations en zinc libre dans des valeurs physiologiques (pour revue voir, [Frederickson et al., 2005](#); [Nakashima and Dyck, 2009](#); [Sensi et al., 2009](#); [Sensi et al., 2011](#)).

### **II.B.1. Valeurs normales du zinc libre dans les différents liquides biologiques chez l'homme**

L'estimation des valeurs normales du zinc libre dans les différents liquides biologiques est complexe car les valeurs rapportées par les différents groupes de recherches dépendent à la fois de la cohorte de patients sélectionnée, du mode de prélèvement des liquides biologiques, des traitements subis post-récolte ainsi que des systèmes utilisés pour mesurer les concentrations en zinc dans ces liquides (en particulier spectroscopie de masse et microdialyse).

Alors que la valeur normale moyenne du zinc dans le sérum semble faire consensus (estimée à 1.10 mg/L, [Kapaki et al., 1989](#)), dès 1989, [Kapaki et al.](#), révèlent

une grande disparité des concentrations mesurées dans le liquide céphalorachidien (LCR) de patients sains. Alors qu'ils évaluent cette dernière à 34.70 µg/L, d'autres groupes l'estiment comprise entre 9 µg/L (Palm et al., 1986) et 496 µg/L (Pandey et al., 1982). Plus récemment (2006), Frederickson et al., ont rapporté une concentration en zinc dans le LCR de 19 nM. Ces importantes disparités dans l'estimation des valeurs normales du zinc libre dans le LCR soulignent la difficulté de l'étude de ce cation dans le SNC. De manière générale, le zinc est un polluant des produits chimiques et est présent en faible concentration même dans l'eau bi-distillée (nanomolaire), rendant difficile l'estimation de ses concentrations sans contamination. Or, la détermination des valeurs normales de zinc dans le LCR est d'une importance majeure. Certains récepteurs ionotropiques neuronaux postsynaptiques disposent d'un site zinc de très haute affinité et la fixation du cation divalent module leur activité (Cf. partie 0). La présence tonique de concentrations mêmes nanomolaires en zinc dans l'environnement synaptique pourrait donc interférer avec ces récepteurs et influencer les propriétés de transmission synaptique telle que nous les connaissons actuellement. Ce caractère contaminant du zinc de l'eau et des produits chimiques entraîne de nombreux problèmes pour l'étude du zinc libre à la synapse et impose l'utilisation de systèmes tampons permettant de limiter l'influence du zinc contaminant sur les résultats expérimentaux.

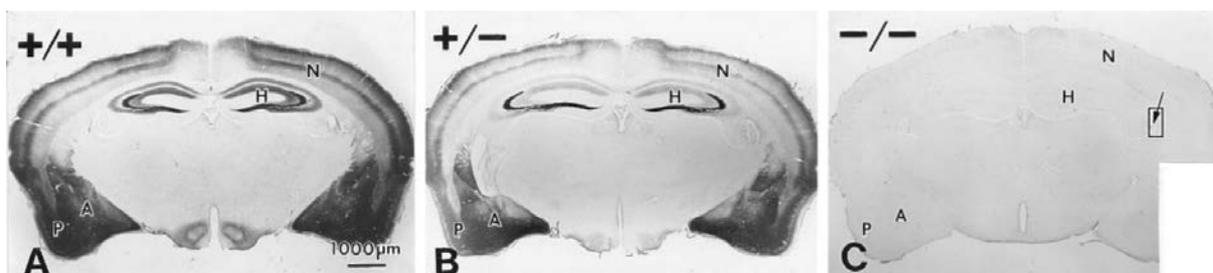
### II.B.2. Zinc Importing Proteins (Zips)

Les Zips (pour zinc importating proteins ou zrt-irt like proteins) sont une famille de transporteurs exprimés à la fois dans le SNC ainsi que dans les tissus périphériques. Ces protéines sont responsables de l'influx du zinc dans le compartiment cytoplasmique des neurones et transportent le cation divalent depuis le milieu extracellulaire et les organites vers le cytoplasme des neurones (Figure 4, Gaither and Eide, 2001; Nakashima and Dyck, 2009; Sensi et al., 2009). Bien que le mécanisme de transport du zinc par ces protéines reste énigmatique, il est facilité ou couplé aux bicarbonates ou aux protons puisque l'influx de zinc par hZip2 (forme humaine de l'isoforme Zip2) est stimulé par un traitement aux bicarbonates (Gaither and Eide, 2000; Sensi et al., 2009). La mise en œuvre de ce système de transport conduit donc à une augmentation des concentrations intracellulaires en zinc.

### II.B.3. Zinc Transporteurs (ZnTs)

A l'inverse des Zips, les ZnTs sont à l'origine de l'extrusion du zinc depuis le cytosol des neurones vers le milieu extracellulaire (*p. ex.* ZnT1) ou vers ses organites (*p. ex.* ZnT3 vers les vésicules synaptiques ou ZnT5, 6 et 7 vers l'appareil de Golgi, **Figure 4**). Le mécanisme de transport du zinc par les ZnTs est couplé aux protons ([Sensi et al., 2009](#)). Ainsi, lors de la survenue de chocs ischémiques, le tissu privé en oxygène peut souffrir d'acidose (*p. ex.* lors d'AVCs). Dans ce contexte, l'acidification du tissu modifie le gradient électrochimique des protons au travers des membranes des neurones et pourrait donc favoriser l'entrée de zinc dans le cytoplasme par transport inverse du métal pas les ZnTs. Il est intéressant de noter que le phénomène inverse se produirait avec Zip, puisque l'acidification du milieu favoriserait l'extrusion du zinc hors du cytoplasme.

Bien que leur distribution soit ubiquitaire, certains transporteurs sont spécifiques de certains types cellulaires. C'est le cas de ZnT3, un isoforme exprimé exclusivement à la surface des vésicules synaptiques des *neurones* et *seul* acteur responsable du stockage vésiculaire du zinc ([Palmiter et al., 1996](#); [Cole et al., 1999](#); [Sindreu et al., 2003](#)). Ainsi, l'ablation sélective du gène codant pour ce transporteur (*SLC30A3*) chez la souris (ZnT3 KO (knock-out)) entraîne une diminution drastique des niveaux de zinc libre dans le cerveau avec une disparition complète du métal avec le marquage de Timm (**Figure 3**, [Palmiter et al., 1996](#); [Cole et al., 1999](#)). Après quantification du zinc libre dans le cerveau de ces souris, il s'avère que les niveaux sont diminués de l'ordre de 20%, en accord avec l'estimation de la fraction libre du zinc dans le corps humain ([Palmiter et al., 1996](#); [Cole et al., 1999](#); [Frederickson et al., 2005](#)). ZnT3



**Figure 3 : Élimination du zinc vésiculaire dans le cerveau de souris ZnT3 KO.** Zinc libre révélé par le marquage de Timm (autometallographie) en comparaison avec un animal sauvage (A, ZnT3 +/+), hétérozygote (B, ZnT3 +/-) et ZnT3 KO (C, ZnT3 -/-). H, hippocampe ; P, cortex piriforme ; N, néocortex ; A, amygdale. Adapté de [Cole et al., 1999](#).

étant l'unique effecteur moléculaire à l'origine du remplissage des vésicules glutamatergiques en zinc (Sindreu et al., 2003), il est classiquement utilisé comme marqueur sélectif des fibres zincergiques dans le SNC.

De façon intéressante, ces animaux ne présentent, *au premier regard*, aucune différence avec des souris contrôles (souris sauvages pour ZnT3 issues des mêmes portées que les animaux ZnT3 KO). En effet, ces animaux n'ont aucune anomalie morphologique, leur poids est dans la normale tout comme leur espérance de vie. De même, leur reproduction est non affectée, avec une fertilité et des tailles de portées identiques aux souris contrôles. La maturation du sperme dans la prostate des souris étant dépendante de zinc libre vésiculaire, l'ablation sélective de ZnT3 aurait pu impacter la reproduction. Cependant, le fait que ZnT3 soit une isoforme exclusivement neuronale explique ce résultat.

Le fait qu'en apparence ces souris ne présentent aucune différence comportementale par rapport à des souris sauvages est surprenant. En effet, le zinc libre est stocké dans une sous-population de fibres glutamatergiques et module la transmission synaptique (Sindreu et al., 2003; Vergnano et al., 2014), il est donc probable que sa présence confère des propriétés particulières d'intégration et de plasticité aux synapses où il est présent. En supprimant complètement le zinc vésiculaire dans le réseau neuronal, sont attendues des modifications comportementales fines. Bien que l'absence d'effets sur le comportement des souris ZnT3 KO puisse s'expliquer par la mise en place de mécanismes de compensation au cours du développement de l'animal, ce constat a conduit certains groupes de recherche à renouveler les expériences sur ce modèle. Après des études plus poussées, il apparaît que les souris ZnT3 KO diffèrent des souris sauvages sur plusieurs points. Ces souris souffrent de troubles cognitifs associés à la mémoire. Elles ont en effet plus de difficultés à réapprendre certaines tâches par rapports aux souris contrôles (*water maze*, Martel et al., 2011), mais elles présentent également des déficits de la mémoire associée à la peur (*fear conditioning*, Martel et al., 2010). Ce type de mémoire est notamment rattaché à l'amygdale, une région du cerveau particulièrement riche en zinc (**Figure 1**). Il a également été montré que les souris ZnT3 KO mâles, âgées de 4 à 5 semaines, présentent un phénotype associé aux troubles du spectre autistique (Yoo et al., 2016). D'autres travaux (non publiés) ont évalué que l'absence du zinc augmente l'état de stress de ces animaux.

#### II.B.4. Echangeur $\text{Na}^+/\text{Zn}^{2+}$

Lors de l'activité synaptique le zinc peut physiologiquement entrer dans les neurones (détaillé dans les parties II.C.1.c et III.A.5, [Sensi et al., 1999](#); [Noh et al., 2005](#); [Medvedeva et al., 2017](#)) mais également être libéré dans le cytoplasme depuis les stocks mitochondriaux ([Dittmer et al., 2009](#)). Afin de maintenir des concentrations intracellulaires physiologiques en zinc lors d'une activité neuronale soutenue (*Cf.* partie III.A.2.a, [Dittmer et al., 2009](#)), il est indispensable que les neurones disposent d'un système d'élimination rapide du métal vers la matrice extracellulaire. Ce système est apporté par un échangeur sodium/zinc récemment découvert (**Figure 4**), bien que non identifié moléculairement ([Sensi et al., 1997](#); [Ohana et al., 2004](#); [Qin et al., 2008](#)). Lors de l'activité synaptique il permet d'éliminer rapidement le zinc à l'extérieur des neurones en évitant son accumulation dans le cytoplasme. A l'inverse, dans certaines conditions pathologiques tel que l'ischémie ou lors de crises d'épilepsie, les neurones accumulent du sodium. Cet effet pourrait inverser le sens de fonctionnement de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Zn}^{2+}$ , concentrant ainsi l'ion divalent à l'intérieur du neurone ([Sensi et al., 2009](#)).

#### II.B.5. Métallothionéines

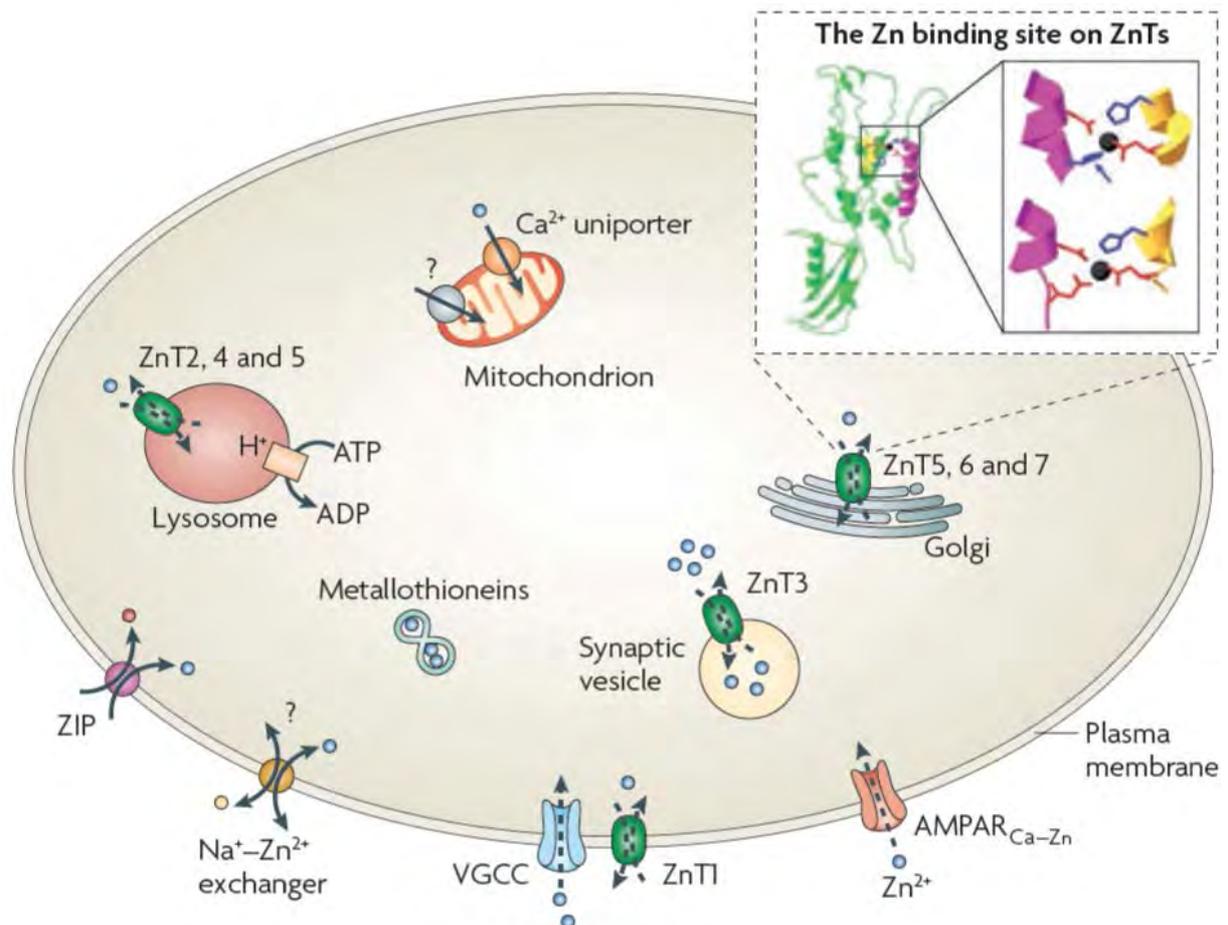
Les métallothionéines (MTs) sont de petites protéines (~3KDa) agissant comme accepteurs de métaux. Riches en résidus thiols apportés par une vingtaine de cystéines, ces protéines peuvent lier jusqu'à 7 ions zinc et sont considérées comme un système tampon intracellulaire de ce métal ( $K_{d \text{ zinc}} = 1.4 \cdot 10^{-13}$  M à pH physiologique pour les MT-III humaines, **Figure 4**, [Jiang et al., 1998](#)). Avec différents isoformes, seule la MT-III est exprimée dans les neurones mais peut également être retrouvée dans la matrice extracellulaire ([Uchida et al., 2002](#)). Les MT-III ont donc un rôle essentiel de contrôle et de maintien des concentrations intracellulaires en zinc. Bien que ne présentant pas de troubles comportementaux notables, les souris MT-III KO présentent une susceptibilité accrue au développement de crises d'épilepsie (*Cf.* partie III.C.1, [Erickson et al., 1997](#); [Cole et al., 2000](#)).

### II.B.6. Mitochondrie

Les mitochondries constituent un autre système de tampon rapide du zinc cytoplasmique intervenant *majoritairement* en contexte excitotoxiques (**Figure 4**, *Cf.* partie III.A.2.a, [Bossy-Wetzel et al., 2004](#); [Dineley et al., 2005](#); [Malaiyandi et al., 2005b](#); [Gazaryan et al., 2007](#); [Dittmer et al., 2009](#); [Medvedeva et al., 2009](#); [Medvedeva et al., 2017](#)). En stockant l'excès de zinc intracellulaire, les mitochondries limitent son impact sur la physiologie neuronale, au même titre qu'elles stockent du calcium lors d'une activité neuronale trop prononcée ([Frederickson et al., 2000](#); [Frederickson et al., 2005](#); [Nakashima and Dyck, 2009](#); [Sensi et al., 2009](#); [Sensi et al., 2011](#)). Cependant, le stockage excessif de zinc dans la mitochondrie conduit à son éclatement et à un emballement du processus de mort neuronale (*Cf.* partie III.A.2.b). A l'inverse, ces organites sont également à l'origine d'une signalisation zinc intracellulaire physiologique puisqu'elles sont capables de libérer ce métal après activation synaptique de certains récepteurs postsynaptiques par le glutamate (*Cf.* partie III.A.2.a, [Sensi et al., 2003](#); [Dittmer et al., 2009](#)). Dans les neurones, les mitochondries jouent donc essentiellement un rôle physiologique à la fois de tampon zinc rapide mais également de libération de zinc en tant que messenger intracellulaire. D'une importance capitale pour la compréhension des effets délétères du zinc dans certaines pathologies, ces notions seront abordées plus en détail dans la suite du manuscrit (*Cf.* partie III.A.2).

La nature a développé un *système complexe* de régulation de l'homéostasie du zinc libre au sein des neurones (**Figure 4**). Ce système assure une distribution du métal dans les différents compartiments cellulaires qui requièrent sa présence. En effet, les Zips ainsi que certains récepteurs canaux postsynaptiques assurent l'entrée du zinc dans les neurones. Cet influx permet à la fois une signalisation intracellulaire zincergique, mais également le fonctionnement de nombreuses protéines et enzymes après fixation du métal dans ces macromolécules. MT et mitochondries assurent d'un autre côté la fonction de systèmes de tampons, maintenant les concentrations en zinc dans des valeurs physiologiques, même après son entrée dans le cytoplasme. Grâce à ce système, le zinc, essentiel au fonctionnement physiologique des neurones, est maintenu à des valeurs constantes. Les ZnTs assurent finalement l'efflux du zinc depuis le cytoplasme en

le distributeur soit dans les différents organites (dont les vésicules synaptiques) soit vers l'extérieur des neurones. Cette voie de sortie du zinc est complétée par l'existence d'échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Zn}^{2+}$  qui, grâce à leur cinétique d'extrusion du zinc vers la matrice extracellulaire, assurent un maintien des concentrations intracellulaire en zinc même lors d'une activité synaptique prolongée. Ce système complexe de régulation homéostatique du zinc libre permet de maintenir les concentrations cytoplasmiques en zinc dans des valeurs physiologiques et prévient l'accumulation pathologique de ce métal dans les neurones.



**Figure 4 : Système de régulation homéostatique du zinc libre dans les neurones. Encart, site de fixation du zinc sur les ZnTs. Adapté de Sensi et al., 2009.**

## II.C. Cibles postsynaptiques du zinc libre

Dans le cerveau, le zinc libre est accumulé dans les vésicules synaptiques exclusivement de neurones glutamatergiques (Palmiter et al., 1996; Cole et al., 1999; Frederickson et al., 2000; Sindreu et al., 2003; Smart et al., 2004; Paoletti et al., 2009; Sensi et al., 2009). Il se trouve donc dans une position idéale pour interférer avec les systèmes de transmission synaptique en agissant notamment sur un certain nombre de récepteurs canaux postsynaptiques. Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, le zinc est libéré à la synapse avec le glutamate qui est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux des vertébrés (Vergnano et al., 2014). Ce dernier agit en particulier sur les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR), une sous-population de récepteurs canaux, au sein des quels on trouve les récepteurs de l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique (rAMPA), les récepteurs du N-méthyl-D-aspartate (rNMDA) ainsi que les récepteurs du kaïnate (rKaïnate). L'action du glutamate sur ces récepteurs tétramériques a pour conséquence l'ouverture de leur canal et le passage de cations (sodium, potassium et calcium - pour les rNMDA) au travers de leur pore de perméabilité (Figure 5, pour revue, voir Traynelis et al., 2010).

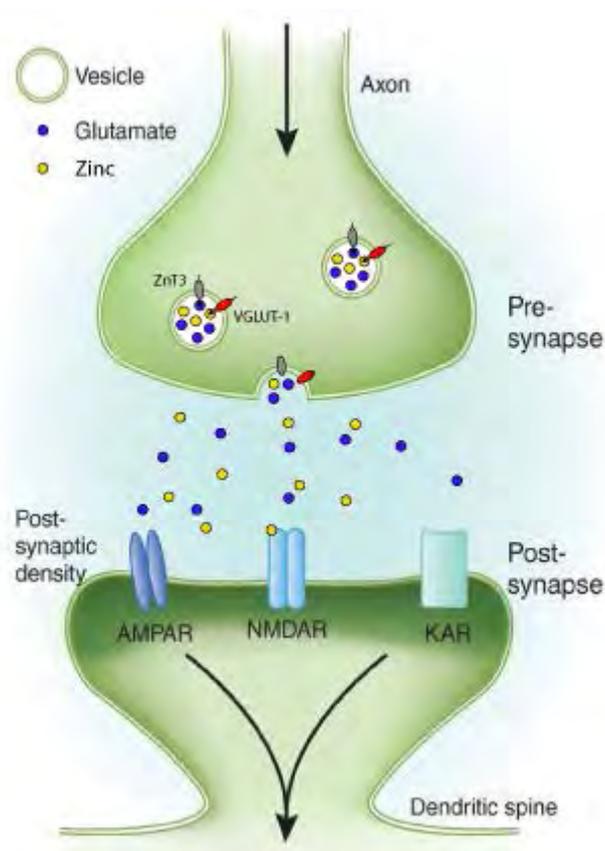


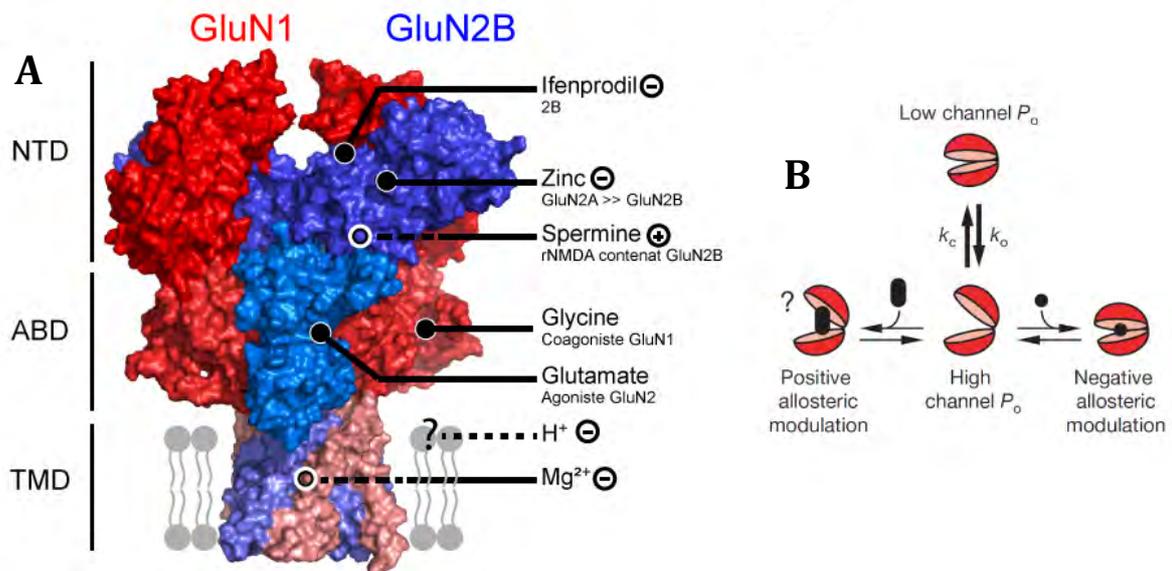
Figure 5 : Schéma d'une synapse zincergique.

## II.C.1. Récepteurs ionotropiques du glutamate

### II.C.1.a. Les récepteurs NMDA

Compte tenu de leur haute affinité pour le métal, les rNMDAs sont une cible privilégiée du zinc à la synapse (Paoletti et al., 1997; Paoletti et al., 2000; Gielen et al., 2009; Nozaki et al., 2011; Zhu and Paoletti, 2015; Serraz et al., 2016). Ces derniers présentent un mécanisme d'activation complexe par rapport aux autres iGluRs car ils nécessitent la présence à la fois de glutamate et de glycine (co-agoniste) pour promouvoir les modifications conformationnelles nécessaires à leur ouverture (Johnson and Ascher, 1987; Paoletti, 2011; Paoletti et al., 2013). De plus, le pore des rNMDA est physiologiquement bloqué par un ion magnésium. En conditions basales (potentiel de membrane au repos), ce dernier empêche le passage des ions au travers du canal mais lorsque la membrane du neurone se dépolarise, notamment grâce à l'activation des rAMPA par le glutamate, le blocage de l'ion magnésium saute laissant passer sodium, potassium et calcium au travers du récepteur (Traynelis et al., 2010; Paoletti, 2011; Paoletti et al., 2013). A la différence des autres iGluRs qui peuvent exister sous forme homomérique, les rNMDA sont exclusivement hétérotétramériques. Les deux sous-unités GluN1 obligatoires s'assemblent généralement avec deux sous-unités GluN2 (GluN2A et GluN2B majoritairement, **Figure 6**). Cet assemblage et la capacité qu'ont les rNMDAs à former des récepteurs di et trihétéromériques, permettent une incroyable diversité structurale avec 12 sous-types de rNMDA fonctionnels actuellement identifiés (Paoletti, 2011; Paoletti et al., 2013; Karakas and Furukawa, 2014; Lee et al., 2014; Stroebel et al., 2014; Romero-Hernandez et al., 2016; Tajima et al., 2016). Compte tenu du fait que les propriétés biophysiques du récepteur sont influencées par la nature de la sous-unité GluN2 qu'il incorpore (et GluN3 lorsqu'elle est présente), cette grande variété de sous-types de rNMDAs entraîne également une diversité fonctionnelle considérable (Paoletti et al., 2013).

Les rNMDAs ont la particularité de lier de petites molécules endogènes capables de moduler leur activité. Cette propriété unique au sein des iGluR est conférée par leur domaine N-terminal (NTD, **Figure 6**, Gielen et al., 2009; Paoletti, 2011; Paoletti et al., 2013; Zhu and Paoletti, 2015). Impliqué dans l'assemblage des sous-unités, le NTD est un site majeur de modulation allostérique et le zinc libéré à la synapse est capable de s'y fixer (**Figure 6**). Agissant comme puissant inhibiteur des rNMDAs contenant la sous-

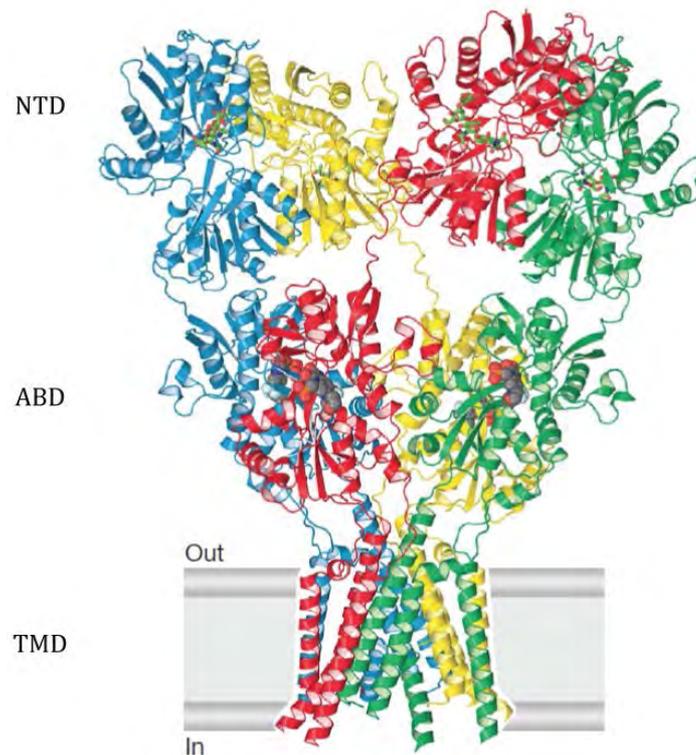


**Figure 6 : Structure et mécanisme de régulation allostérique des rNMDAs.** **A.** Structure d'un rNMDA contenant la sous-unité GluN2B et position des différents sites de fixations des agonistes (glutamate et glycine) ainsi que de divers modulateurs allostériques (zinc, ifenprodil, spermine, protons et magnésium). NTD, domaine N-terminal ; ABD, domaine de liaison des agonistes ; TMD, domaine transmembranaire. N'est pas représenté le domaine C-terminale. Structure cristallographique adapté de [Lee et al., 2014](#) et [Karakas and Furukawa, 2014](#) par J.B. Esmenjaud (Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure). **B.** Mécanisme de régulation allostérique du rNMDA par les NTD. Avec sa structure bilobée (comme l'ABD), le NTD contrôle la probabilité d'ouverture du canal du rNMDA. Ce domaine oscille entre une conformation ouverte (associée à une probabilité d'ouverture élevée) et fermée (associée à une probabilité d'ouverture faible). La fixation de modulateurs allostériques sur ce domaine déplace l'équilibre entre ces deux conformations. Ces molécules peuvent alors favoriser l'ouverture (p. ex. spermine) ou la fermeture (p. ex. zinc) du NTD et influencer la probabilité d'ouverture du canal. En résulte un effet potentialisateur (p. ex. spermine) ou inhibiteur (p. ex. zinc) sur le rNMDA. Adapté de [Gielen et al., 2009](#).

unité GluN2A (concentration inhibitrice 50 ( $IC_{50}$ ) = 20 nM, [Paoletti et al., 1997](#); [Paoletti et al., 2000](#); [Gielen et al., 2009](#); [Nozaki et al., 2011](#); [Zhu and Paoletti, 2015](#); [Serraz et al., 2016](#)) le zinc est un régulateur négatif de la plasticité synaptique impliquant les rNMDAs ([Vergnano et al., 2014](#)). Avec leur affinité nanomolaire, ces récepteurs sont donc une cible privilégiée du zinc libre synaptique.

### II.C.1.b. Les récepteurs AMPA

Récemment, une étude a mis en évidence un potentiel, bien que très controversé, effet inhibiteur du zinc sur les rAMPA ([Kalappa et al., 2015](#); [Kalappa and Tzounopoulos, 2017](#)). Comme tous les iGluRs, ces récepteurs sont tétramériques et organisés en domaines (**Figure 7**, [Sobolevsky et al., 2009](#)). Cependant, alors qu'au sein des rNMDAs la



**Figure 7:** Structure d'un rAMPA homotétramérique *GluA2*. NTD, domaine de N-terminal; ABD, domaine de fixation des agonistes (glutamate); TMD, domaine transmembranaire. Adapté de [Sobolevsky et al., 2009](#).

transduction des effets allostériques du zinc est favorisée par la proximité des NTD par rapport au reste du récepteur, ce n'est pas le cas avec les rAMPAs. En effet, les NTD des rNMDAs sont en contact direct avec les domaines de fixation des agonistes (ABD) que se situent juste en dessous (**Figure 6**). Cette proximité est pensée comme étant la base structurale de la transduction des modifications conformationnelles du NTD - provoquées par le zinc - vers le reste de la protéine, en particulier vers le pore du canal. A l'inverse, au sein des rAMPAs, les NTDs sont séparés des ABDs. Ces faibles interactions entre les deux domaines rendent théoriquement la transduction d'un effet allostérique depuis les NTDs vers le reste de la protéine beaucoup plus difficile (**Figure 7**).

Afin de révéler cet effet allostérique négatif du zinc sur les rAMPAs, l'équipe de Tzounopoulos utilise le ZX1, un chélateur sélectif à très haute affinité ( $K_d \text{ zinc} = 1 \text{ nM}$ ) *supposé* comme incapable de franchir les membranes. Cette propriété des chélateurs assure une sélectivité spatiale de leurs effets en séquestrant le zinc uniquement dans le milieu extracellulaire et donc dans la fente synaptique. Cependant, la capacité du ZX1 à rester confiné dans le milieu extracellulaire est actuellement remise en question ([Li et al., 2017](#)). Or cette caractéristique est fondamentale pour conclure des effets du zinc sur les rAMPAs. En ne contrôlant pas la distribution spatiale du chélateur et compte tenu de

son affinité nanomolaire pour le métal, il est possible que ce dernier séquestre du zinc non synaptique en l'arrachant à des protéines telles que les métallothionéines neuronales (*Cf.* partie II.B.5). Il est également possible qu'il chélate directement le zinc depuis les vésicules synaptiques et rend donc impossible la corrélation des effets du ZX1 avec l'action du zinc sur les rAMPAs. En choisissant un chélateur du zinc non approprié, l'équipe de Tzounopoulos rend difficile, si ce n'est impossible de conclure sur la pertinence physiologique d'un effet allostérique négatif du zinc sur les rAMPAs à la synapse. De plus, ces observations sont en opposition avec les précédentes descriptions des effets du zinc sur les rAMPAs, puisque l'application du cation divalent sur des récepteurs exprimés dans des systèmes hétérologues (cellules HEK et ovocytes de *Xenopus laevis*) montre des effets potentialisateurs du zinc pour des concentrations de l'ordre du micromolaire, et des effets inhibiteur par blocage du canal des rAMPAs pour des concentrations de l'ordre millimolaire (Rassendren et al., 1990; Bresink et al., 1996).

L'effet allostérique du zinc à la synapse sur les rAMPA reste donc méconnu. Cependant, cette controverse montre l'importance du choix du chélateur dans l'étude physiopathologique du zinc à la synapse.

#### **II.C.1.c. Passage du zinc au travers des récepteurs ionotropiques du glutamate**

En parallèle de son effet allostérique sur les iGluRs, le zinc est également capable d'entrer dans les neurones par l'intermédiaire de certains récepteurs perméables au calcium (mécanisme détaillé plus en avant dans la partie III.A.5). En dehors des rNMDAs qui ont une haute perméabilité calcique, certains sous-types de rAMPAs laissent également passer cet ion et par extension le zinc. Ces rAMPAs sont appelés rAMPA-CPs (pour récepteurs AMPA perméables au calcium), à la différence des rAMPA-CIs (pour récepteurs AMPA imperméables au calcium). Comme évoqué précédemment, les rAMPAs sont des récepteurs tétramériques pour lesquels il existe 4 sous-unités différentes (GluA1-GluA4) encodées par différents gènes. La présence de la sous-unité GluA2 apporte une arginine chargée positivement dans le pore des rAMPAs, réduisant drastiquement la perméabilité calcique du récepteur par répulsion électrostatique (rAMPA-CI). En revanche, son absence au sein de la structure des rAMPAs permet un

passage de calcium et de zinc au travers du récepteurs, autorisant leur entrée dans les neurones postsynaptiques (rAMPA-CP). A certaines synapses (en particulier d'interneurones), les rAMPA-CPs sont impliqués dans l'évocation de la plasticité synaptique de façon similaire à celle évoquée par les rNMDAs à d'autres synapses (pour revue voir [Dingledine et al., 1999](#); [Traynelis et al., 2010](#)).

rNMDAs et rAMPA-CPs sont donc tous deux perméables au zinc, au même titre que certains canaux calciques dépendants du voltages (détaillé dans la partie III.A.5, [Sensi et al., 1999](#); [Noh et al., 2005](#); [Medvedeva et al., 2017](#)). Ce passage physiologique de zinc dans les neurones est potentiellement impliqué dans un mécanisme de signalisation cellulaire ([Dittmer et al., 2009](#)) alors que son excès est associé à la dégénérescence des neurones (détaillé dans la partie III.A).

### II.C.2. Action du zinc sur les récepteurs ionotropiques inhibiteurs

En parallèle de son action sur certains iGluRs, le zinc exerce également un effet allostérique sur des récepteurs ionotropiques impliqués dans l'inhibition des neurones. Les récepteurs GABA<sub>A</sub> et glycinergiques, deux récepteurs pentamériques, sont activés respectivement par le GABA et la glycine. L'ouverture de leur canal à forte perméabilité aux ions chlorure entraîne une hyperpolarisation de la membrane plasmique et réduit l'excitabilité des neurones. Bien que partageant la même fonction d'inhibition de la transmission synaptique, les effets du zinc sur ces récepteurs sont opposés.

Tout comme les iGluR, les récepteurs GABA<sub>A</sub> et glycinergiques sont tous deux inhibés par des concentrations élevées en zinc (micromolaire) via un probable blocage de leur canal ionique par le cation divalent. Cependant, les concentrations en zinc libérées à la synapse étant de l'ordre du nanomolaire ([Vergnano et al., 2014](#)), il est peu probable que l'action du métal sur ces récepteurs passe par ce mécanisme. Ainsi, avec des concentrations sub-micromolaires comme observées dans la fente synaptique lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, il a été montré que le zinc potentialise les récepteurs glycinergiques et, à l'inverse, inhibe les récepteurs GABAergiques (pour revue, voir [Smart et al., 2004](#)).

Dans le *cerveau*, le zinc est concentré uniquement dans les vésicules synaptiques de neurones glutamatergiques (Palmiter et al., 1996; Cole et al., 2000; Frederickson et al., 2000; Sindreu et al., 2003) dont les terminaisons ne font pas directement synapse avec des dendrites contenant des récepteurs ionotropiques GABA<sub>A</sub> ou glycinergiques. L'action *directe* du zinc sur ces récepteurs étant donc improbable, il est pensé que son effet de régulation du tonus inhibiteur passe par un mécanisme de *spill-over*. Ce mécanisme repose sur le fait que le zinc libéré aux synapses excitatrices puisse, dans certaines conditions, « déborder » de la connexion neuronale et atteindre les synapses inhibitrices voisines. A l'inverse, dans la moelle épinière et possiblement dans le cervelet, le zinc est accumulé dans des vésicules synaptiques de neurones inhibiteurs (Danscher et al., 2001) impliquant un contrôle important du zinc sur la transmission synaptique inhibitrice dans cette région du SNC.

De par son action sur un grand nombre de cibles postsynaptiques, le zinc apparaît comme un élément clé de contrôle de l'activité synaptique. La régulation fine de son homéostasie permet sa concentration dans les neurones, la mise en place de systèmes facilitant sa libération dans la fente synaptique (ZnT3 et vésicules synaptiques) ainsi que de moyens de recaptures du zinc assurant la terminaison du signal zincergique à la synapse. L'ensemble de ces caractéristiques font du zinc libre un neuromodulateur à part entière. Étonnement, seule une sous-population de fibres glutamatergiques contient du zinc et comprendre les différences de propriétés que confère ce métal en termes d'intégration et de plasticité synaptique par rapport à des fibres qui en sont dépourvus est une question passionnante encore aujourd'hui sans réponse. De par son action modulatrice à la fois de la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice, le zinc est un élément ayant un impact fort sur la balance excitation/inhibition dont l'équilibre est nécessaire à la bonne régulation l'activité neuronale. Tout déséquilibre de cette dernière entraîne des conséquences pathologiques sévères et conduit notamment au développement de crises d'épilepsie ou de phénomènes excitotoxiques (Frederickson et al., 2005; Dong et al., 2009; Paoletti et al., 2009; Sensi et al., 2009; Wang and Qin, 2010; Serraz et al., 2016; Reid et al., 2017). Élucider les mécanismes à la base de son action à la synapse et appréhender l'impact des dérégulations de son homéostasie sur le développement de pathologies affectant le

cerveau sont des étapes indispensables pour le développement de nouvelles molécules permettant leur prise en charge et leur traitement.

### III. Pathologies

A la différence des autres métaux de transition tels que le fer ou le cuivre, le zinc existe dans notre organisme sous forme libre, non lié aux protéines. Concentré dans les vésicules synaptiques avec le glutamate (Sindreu et al., 2003), le zinc libre est apparu comme un modulateur essentiel de la transmission synaptique excitatrice (Paoletti et al., 2009; Vergnano et al., 2014; Kalappa et al., 2015; Serraz et al., 2016). Depuis le début des années 1990, l'intérêt quant à ses effets délétères associés à des pathologies cérébrales est grandissant. Récemment, des troubles homéostatiques du zinc libre ont été impliqués dans de nombreuses conditions pathologiques (Sensi et al., 2009; Sensi et al., 2011). Libéré massivement dans les neurones, le zinc a été identifié comme un acteur majeur de la neurodégénérescence associée à l'épilepsie et aux troubles ischémiques (Frederickson et al., 1989; Koh et al., 1996; Bossy-Wetzels et al., 2004). L'intérêt croissant pour ce cation divalent ne s'arrête pas là. Impliqué dans l'hyperekplexie (Al-Futaisi et al., 2012; Zhou et al., 2013) ainsi que dans des formes graves d'épilepsie familiale (Serraz et al., 2016), le zinc a récemment été relié aux dommages du nerf optique faisant suite à des traumatismes crâniens (Li et al., 2017). La chélation de ce cation a révélé un effet neuroprotecteur vis à vis des neurones ganglionnaires de la rétine et favorise la repousse des axones du nerf optique au-delà du site de lésion. Le zinc est également au cœur des problèmes actuels de santé publique. Avec le vieillissement de la population, l'incidence de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer n'a jamais été aussi importante (Watt et al., 2010; INSERM, 2014). Face au manque d'efficacité des thérapies actuelles, l'identification de nouvelles cibles médicamenteuses est indispensable. Le zinc a récemment été mis en évidence comme participant à l'établissement de la plaque amyloïde et sa chélation favorise la survie neuronale (Lee et al., 2002; Szutowicz et al., 2017). Comprendre le rôle du zinc dans la transmission pathologique et les dommages cellulaires associés constitue un enjeu majeur qui permettra peut-être, le traitement ou la prévention des dommages causés par le zinc, un cation divalent encore aujourd'hui méconnu.

### III.A. Chocs ischémiques excitotoxiques

Les pathologies associées aux troubles ischémiques sont nombreuses. Du simple arrêt cardiaque, au traumatisme crânien en passant par des accidents ischémiques transitoires ou des AVCs, ces pathologies peuvent avoir des conséquences graves sur notre cerveau, principal consommateur en O<sub>2</sub> du corps (20%). Parmi ces pathologies, 89% des AVCs sont d'origine ischémique (HAS, 2015). Leur prise en charge représente un enjeu majeur de santé publique. Chaque année, ce sont plus de 130 000 AVCs qui sont dénombrés, soit un toutes les quatre minutes (INSERM, 2013). Bien que le taux d'incidence soit en stable depuis 1985 (HAS, 2015), notamment grâce à la sensibilisation de la population et à l'amélioration des techniques de diagnostic, les AVCs représentent toujours la première cause de handicap acquis de l'adulte et la deuxième cause de démence (HAS, 2015). L'échec de nombreux traitements développés dans le cadre de la prise en charge des chocs ischémiques s'explique par le fait que les pathologies associées à ces événements (AVCs, accidents ischémiques transitoires, etc.) sont malheureusement imprévisibles et imposent donc l'utilisation de stratégies médicales à large fenêtre thérapeutique permettant la prise en charge du patient à distance de l'épisode délétère. La faible efficacité de moyens actuellement à notre disposition nécessite l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

#### III.A.1. Le zinc, un nouvel acteur au cœur de l'excitotoxicité.

##### III.A.1.a. Théorie calcique de l'excitotoxicité

L'excitotoxicité est définie par l'action toxique d'acides aminés excitateurs (glutamate et ses métabolites) conduisant à la mort cellulaire. De nombreuses situations pathologiques conduisent à ce phénomène. Parmi ces dernières on note des cas d'AVCs, de traumatismes crâniens, d'acidoses post-traumatiques ou encore des crises d'épilepsie prolongées conduisant à un état de mal convulsif (*status epilepticus*). En dehors de l'épilepsie, l'ensemble de ces pathologies a pour dénominateur commun une ischémie du parenchyme cérébral.

Au centre de l'homéostasie des neurones, les pompes électrogéniques sodium-potassium ATPase ( $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase) génèrent un gradient d'ions potassium ( $\text{K}^+$ ) indispensable à l'établissement du potentiel de repos de la membrane plasmique. Après le passage d'un potentiel d'action, ces pompes restaurent et maintiennent ce potentiel de repos (pour revue, voir [Purves, 2012](#)). Dans un contexte ischémique (*p. ex.* AVC), privé d'un apport suffisant en  $\text{O}_2$ , la production cellulaire d'adénosine 5'-triphosphate (ATP) chute, entravant le fonctionnement des nombreuses pompes dépendantes de l'ATP dont les pompes  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase. Le blocage de ces dernières favorise alors l'accumulation intracellulaire d'ions chargés positivement, dépolarisant la membrane des neurones et conduisant à une hyperexcitabilité du réseau neuronal. Cet effet favorise la libération excessive de glutamate, principal neurotransmetteur excitateur dans le système nerveux des vertébrés. L'excès d'excitation constitue alors la première étape du mécanisme excitotoxique. Associé à cette hyperactivité neuronale, les transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAATs pour *excitatory amino-acid transporters*), en partie responsables de la clairance synaptique du glutamate, cessent de fonctionner par défaut d'apport en ATP, favorisant l'accumulation de l'acide aminé excitateur dans la synapse.

L'accumulation de glutamate dans la fente synaptique génère une profonde dépolarisation de la membrane des neurones postsynaptiques via la sur-activation des iGluRs et notamment des récepteurs AMPA et NMDA. Cette profonde dépolarisation membranaire favorise également l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage (VGCC ou *voltage gated calcium channels*). Or, les rNMDAs, certains rAMPA, (les rAMPA-CPs, *Cf.* partie II.C.1.c) et les VGCC présentent une forte perméabilité pour le calcium. Leur ouverture favorise alors l'entrée massive de calcium extracellulaire dans le cytoplasme des neurones postsynaptique. A ce processus, s'ajoute une mobilisation des stocks calciques intracellulaires (depuis les réticulums endoplasmiques notamment) entraînée par activation des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR). En retour, l'excès de calcium intracellulaire active diverses enzymes cataboliques et déclenche les processus conduisant à l'apoptose neuronale (pour revue, voir [Dong et al., 2009](#); [Wang and Qin, 2010](#)).

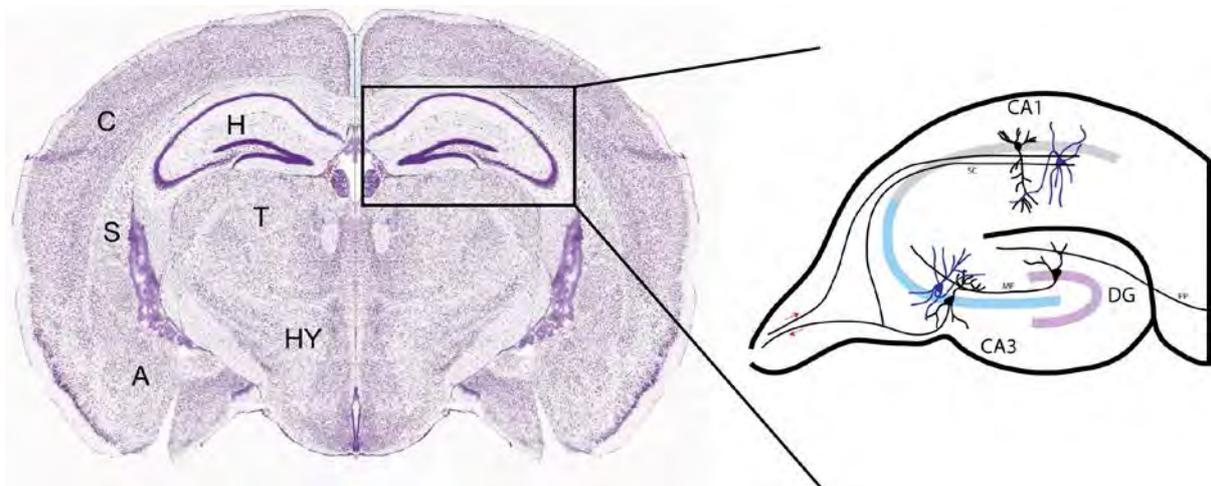
Cependant, les diverses études ayant permis de disséquer cette séquence pathologique, et notamment la place centrale du calcium dans le déclenchement de

l'excitotoxicité, reposaient essentiellement sur l'utilisation de sondes et de chélateurs du calcium dont la sélectivité pour cet ion conditionne la robustesse de ces études (Dong et al., 2009; Sensi et al., 2009; Wang and Qin, 2010).

### III.A.1.b. Implications du zinc dans l'excitotoxicité, remise en cause de la place unique du calcium

Une sonde est un outil moléculaire permettant de suivre dynamiquement les variations de concentration d'un ion (par exemple zinc ou calcium) ou d'une molécule. Elles sont constituées de deux parties. La première contient un site de haute affinité capable de fixer sélectivement la particule en question. Cette fixation induit un réarrangement conformationnel de la sonde conduisant à l'émission d'un signal (*p. ex.* de fluorescence) par une deuxième partie directement liée ou non à la première. Pour qu'une sonde calcique soit sélective pour cet ion, elle doit avoir une affinité *nettement* supérieure pour le calcium par rapport à d'autres ions tels que le zinc ou le magnésium, afin que les variations du signal qu'elle renvoie ne soient dues qu'à des variations de la concentration en calcium sans contamination par celles d'autres ions.

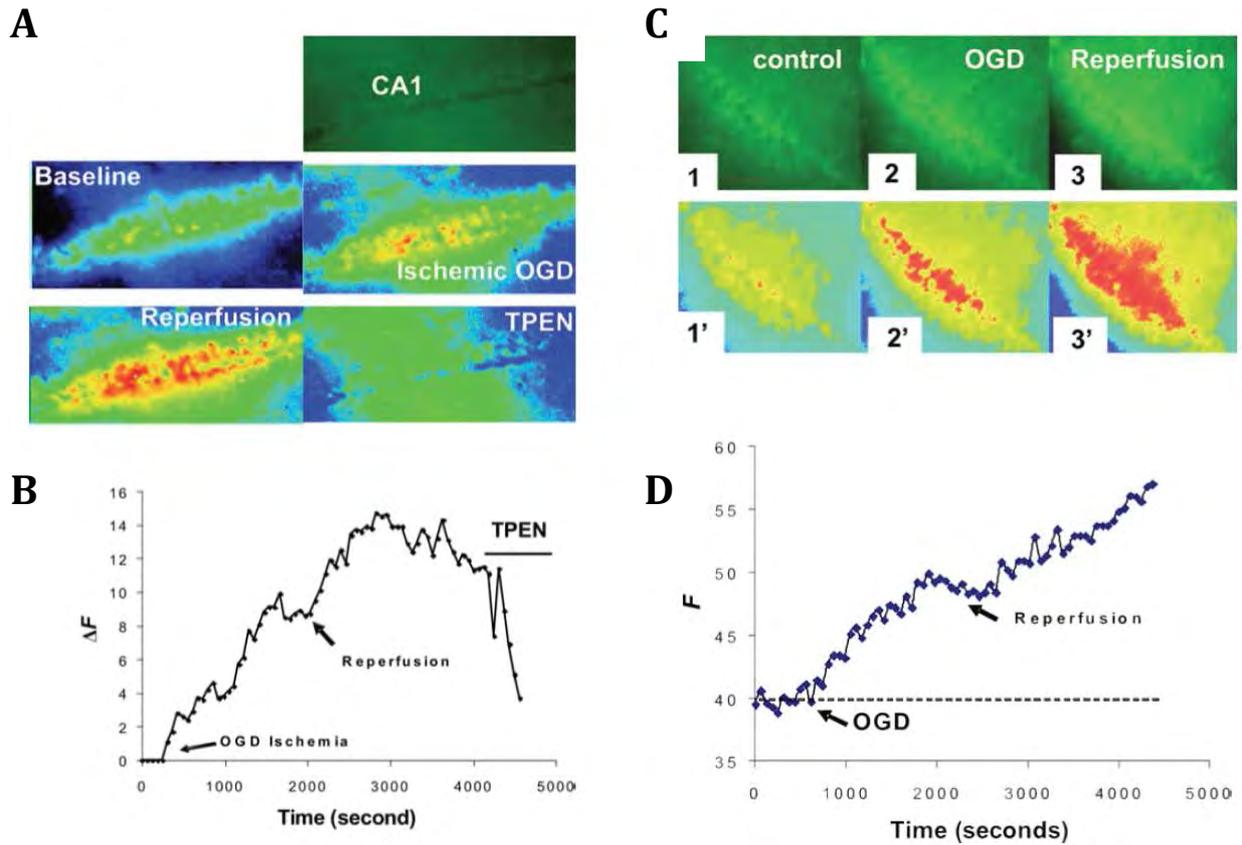
Au cours des années 2000, il est apparu de plus en plus clairement que certains chélateurs et sondes sélectifs pour le calcium avaient une affinité supérieure pour le



**Figure 8 : Tranche coronale d'un cerveau de souris révélée par le marquage de Nissl.** A, amygdale ; C, cortex ; H, hippocampe ; HY, hypothalamus ; S, striatum ; T, thalamus. Encart, schéma de l'hippocampe. Cellules en noir, cellules principales de l'hippocampe (cellules excitatrices glutamatergiques) ; En bleu, interneurons de l'hippocampe ; CA1, région CA1 de l'hippocampe (grisé) ; CA3, région CA3 de l'hippocampe (bleuté) ; DG, gyrus denté (violet) ; MF, fibres moussues ; PP, voie perforante ; SC, collatérale de Schaffer ; Adapté de *Atlas, 2004*.

zinc (Smith, 2009). Conscients de ce fait, en 2000, Sensi et al., montrent que les variations de signal renvoyées par la sonde mitochondriale Rhod-2, supposée sélective pour le calcium, permettent de suivre précisément les variations du niveau de zinc dans les mitochondries des neurones. En 2006, Stork and Li, révèlent que la sonde calcique perméable aux membranes Calcium green 1 ( $K_d$  calcium estimé à 190 nM), présente une affinité pour le zinc supérieure à celle du calcium. Dans cette publication, les auteurs étudient la sélectivité de la sonde au travers d'un modèle d'ischémie mimant certains aspects d'une attaque cérébrale, comme ceux observés au cours d'un AVC. Basé sur la privation en  $O_2$  et en glucose du cerveau, ce modèle utilisé par de nombreux laboratoires est appelé OGD pour *oxygen and glucose deprivation*. Ce protocole est appliqué sur des tranches d'hippocampe de cerveau de rat (**Figure 8**) perfusées avec un LCR artificiel saturé non pas avec de l'oxygène (95/5 :  $O_2/CO_2$ ) mais avec de l'azote (95/5 :  $N_2/CO_2$ ). Leurs expériences montrent que lors de la privation en oxygène ainsi que pendant la phase de reperfusion (phase pendant laquelle le cerveau est de nouveau alimenté en oxygène et en glucose), l'intensité de fluorescence de la sonde Calcium green 1 augmente dans la région CA1 de l'hippocampe, traduisant, théoriquement, une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire dans le soma des neurones de cette région. Après addition d'un *chélateur sélectif pour le zinc perméable aux membranes* (TPEN,  $K_d$  zinc =  $2,6 \cdot 10^{-16}$  M vs  $K_d$  calcium =  $4,0 \cdot 10^{-2}$  M) la fluorescence de l'indicateur décroît fortement reflétant une composante zinc majoritaire dans le signal de fluorescence de la sonde Calcium green 1 (**Figure 9A et 9B**, Stork and Li, 2006). Confirmant ce résultat, la même expérience utilisant une sonde sélective pour le zinc (Newport green diacetate ester,  $K_d$  zinc estimé à  $1,0 \cdot 10^{-6}$  M) affiche le même profil de fluorescence que celui de la sonde Calcium Green 1 (**Figure 9C et 9D**, Stork and Li, 2006). Même si les auteurs n'évoquent à aucun moment la possibilité que le zinc puisse directement influencer les concentrations cytoplasmiques en calcium, il apparaît non seulement qu'un protocole d'ischémie provoque des montées de zinc dans les neurones de l'hippocampe, mais également qu'une sonde supposée sélective pour le calcium rapporte également des variations des concentrations en zinc.

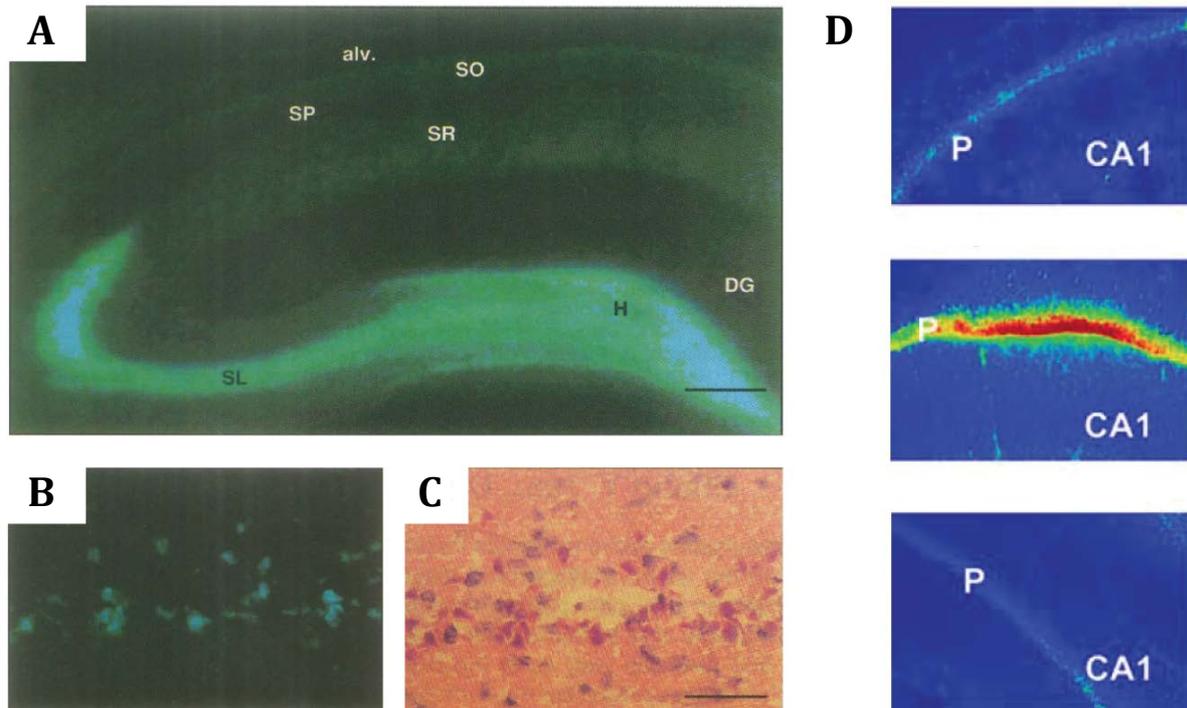
Le fait que de nombreuses sondes calciques (et chélateurs du calcium) aient une affinité supérieure pour le zinc (Smith, 2009) remet en cause la place unique du calcium dans la médiation des effets délétères de l'excitotoxicité. En montrant qu'il existe des



**Figure 9 : Affinité zinc d'une sonde calcique fluorescente révélée par l'utilisation de TPEN.** **A.** Signal de fluorescence de la sonde Calcium green-1 dans la région CA1 de l'hippocampe à la suite des différentes étapes du protocole d'OGD. L'addition de TPEN (100  $\mu$ M) diminue le signal de fluorescence (en bas à droite). **B.** Graphique représentant les variations du signal de fluorescence de la sonde Calcium green-1 lors du protocole d'OGD sur tranches d'hippocampe de cerveau de rat suivi par l'addition de TPEN (100  $\mu$ M). Le TPEN réduit l'intensité de fluorescence signe d'une composante zinc dans le signal de la sonde. **C.** et **D.** Dans un même contexte expérimental qu'en A., la sonde sélective pour le zinc newport green détecte des montées de zinc dans la région CA1 de l'hippocampe. Adapté de [Stork and Li, 2006](#).

concentrations accrues de zinc dans les neurones à la suite d'ischémie, il apparaît évident que le zinc pourrait lui aussi participer au déclenchement du mécanisme d'excitotoxicité. Ces résultats ne sont pas étonnants puisque le zinc et le calcium partagent de nombreuses voies de signalisation, de transport et, au cœur des protéines, de nombreux sites de fixation constituent d'excellents poches de liaisons à la fois pour le zinc et le calcium, ce qui rend parfois difficile la différenciation entre ces deux cations ([Sensi et al., 2009](#)).

Dès le début des années 1990, l'idée que le zinc puisse être impliqué dans les phénomènes excitotoxiques devenait déjà de plus en plus forte. En 1989, [Frederickson et al.](#), montrent qu'au cours de crises d'épilepsie induites par injection de kaïnate (agoniste des récepteurs au kaïnate et agoniste partiel des récepteurs AMPA, le kaïnate



**Figure 10 : Augmentation neurotoxique du zinc dans les neurones à la suite de protocoles d'ischémie et effet protecteur de sa chélation.** **A.** Marquage zinc grâce à la sonde fluorescente TSQ dans un hippocampe non pathologique. Alv, alveus ; DG, gyrus denté ; H, hilus ; SL, stratum lucidum ; SO, stratum oriens ; SP, stratum pyramidale SR, stratum radiatum. Barre d'échelle, 200  $\mu\text{m}$ . **B.** 24 heures après une ischémie de 10 minutes. Le marquage zinc augmente dans des neurones de l'hilus de l'hippocampe. Barre d'échelle, 100  $\mu\text{m}$ . **C.** 24h après une ischémie de 10 minutes, les mêmes neurones qu'en B. révèlent des signes de neurodégénérescence grâce au marquage par l'acide fuchsine. **D.** Marquage à l'iodure de propidium (marqueur de mort cellulaire, intercalant de l'ADN, marquant les noyaux des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire) de neurones de la région CA1 de l'hippocampe à la suite d'un protocole d'OGD. L'addition de TPEN (100  $\mu\text{M}$ ) prévient la neurodégénérescence des neurones. Barre d'échelle, 100  $\mu\text{m}$ . Adapté de Koh et al., 1996 (A-C), Stork and Li, 2006 (D).

est une drogue utilisée dans les modèles d'épilepsie car il provoque une hyperexcitabilité du réseau neuronal par une activation excessive des rAMPAs), les neurones se remplissent de zinc. Dans un contexte d'ischémie cérébrale, ce même phénomène avait été observé dès 1996 et l'accumulation intracellulaire du cation divalent était directement associée à la dégénérescence des neurones (**Figure 10A, 10B et 10C, Koh et al., 1996**). Dès lors, l'élimination de l'excès de zinc dans les neurones via l'utilisation d'un chélateur sélectif du zinc, perméable aux membranes ou non, permettait de prévenir l'apparition de ses effets neurotoxiques (**Figure 10D, Koh et al., 1996; Stork and Li, 2006**).

Grâce à ces études pionnières et à la remise en question de la théorie calcique de l'excitotoxicité, de nombreux groupes vont s'atteler à investiguer la place du zinc dans la

survenue de ces processus toxiques ischémiques. Le fait que sa chélation favorise la survie neuronale en cas d'excitotoxicité (Koh et al., 1996; Stork and Li, 2006) apporte un nouvel espoir dans le traitement des troubles ischémiques survenant à la suite d'AVCs, de traumatismes crâniens ou de problèmes plus généraux tels que les arrêts cardiaques. Face à l'échec des stratégies thérapeutiques visant à réduire l'entrée de calcium dans les neurones aux cours d'événements excitotoxiques, le zinc apparaît donc comme une nouvelle cible d'intérêt. Comprendre à la fois les mécanismes cellulaires enclenchés lors de son augmentation dans le compartiment intracellulaire et sa contribution relative par rapport au calcium sont autant de pistes de recherche nécessaires à l'établissement d'un potentiel traitement permettant de soigner les pathologies associées à l'excitotoxicité.

### III.A.2. Mécanismes dépendant de la mitochondrie

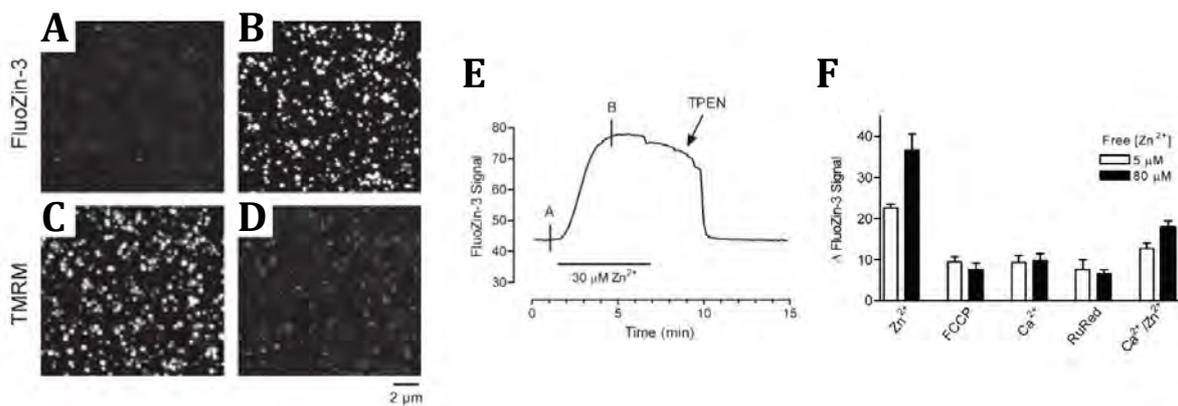
#### III.A.2.a. La mitochondrie, un puits de zinc en conditions excitotoxiques

D'une façon similaire au calcium, les mitochondries sont capables de stocker du zinc en conditions excitotoxiques (Bossy-Wetzell et al., 2004; Dineley et al., 2005; Malaiyandi et al., 2005b; Dittmer et al., 2009). Ces effets ont notamment été révélés à partir de modèles de mitochondries en suspension, extraites de cerveaux de souris ou de rats, puis isolées sur des lamelles de verre. Ce modèle simple permet, entre autre, le marquage individuel et sélectif des mitochondries à l'aide de sondes (*p. ex.* sondes zinc, sondes calciques ou potentiométriques) sans risque d'être gêné par le marquage d'un autre compartiment cellulaire. Il permet également d'exposer facilement les mitochondries à différentes conditions expérimentales (*p. ex.* différentes conditions oxydoréductives, concentrations de glutamate, de zinc, dépolarisation de la membrane mitochondriale).

Ainsi, après exposition de mitochondries isolées de cerveaux de rats, pré-remplies avec une sonde zinc *perméable aux membranes* (FluoZinc-3,  $K_d \text{ zinc} = 15,0 \cdot 10^{-9}$  M), à 10  $\mu\text{M}$  de zinc tamponné, on observe une élévation du signal de fluorescence, traduisant une augmentation de la concentration intra-mitochondriale en zinc (**Figure 11A, 11B**). Exposer ces mitochondries directement à du zinc mime des conditions excitotoxiques puisque le cytoplasme des neurones se gorge de zinc lors d'une ischémie cérébrale (*Cf.* partie III.A.1.b, Frederickson et al., 1989; Koh et al., 1996; Stork and Li,

2006). Le fait que ce signal de fluorescence puisse être éteint à l'aide d'un chélateur de zinc perméable aux membranes (TPEN), montre que ce cation divalent entre dans la matrice mitochondriale et ne reste pas cantonné à l'espace inter-membranaire (**Figure 11E**, Malaiyandi et al., 2005b).

L'entrée du zinc dans la mitochondrie se fait en partie via l'uniporteur calcique et est dépendante du potentiel de la membrane mitochondriale (Jiang et al., 2001; Malaiyandi et al., 2005b; Gazaryan et al., 2007; Medvedeva et al., 2009; Medvedeva et al., 2017). Cette voie d'entrée a été mise en évidence par le fait que l'influx de zinc (révélé par la sonde FluoZin-3) est réduit de près de 80% lors de l'ajout au perfusât d'un bloqueur de l'uniporteur calcique (ruthenium red, Malaiyandi et al., 2005b; Medvedeva et al., 2017) ainsi que par la réduction du gradient électrochimique du zinc en dépolarisant le potentiel membranaire mitochondrial par ajout de calcium ou de carbonylcyanide-p-(trifluorométhoxy)phényl-hydrazone (ou FCCP, agent pharmacologique agissant comme un protonophore et permettant de dissiper le gradient de protons au travers de la membrane mitochondriale, **Figure 11F**, Malaiyandi et al., 2005a; Malaiyandi et al., 2005b). Cependant, l'entrée du zinc n'est pas totalement inhibée dans ces conditions (20% du marquage subsiste), suggérant qu'il existe une deuxième voie d'entrée indépendante de l'uniporteur calcique (*Cf.* partie III.A.2.e).



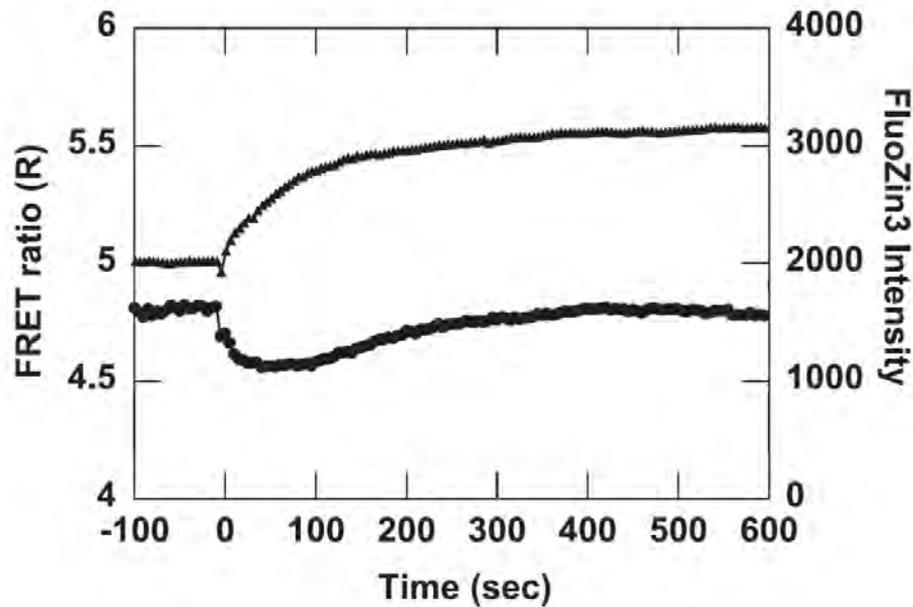
**Figure 11 : Le zinc excitotoxique entre dans les mitochondries via l'uniporteur calcique et induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale. A. et B.** Révélé par la sonde FluoZin-3, le zinc s'accumule dans les mitochondries. A. Contrôle ; B. Exposition à 30 μM de ZnCl<sub>2</sub>, l'élévation du signal de fluorescence témoigné de l'entrée du zinc dans l'organite. C. et D. Mise en évidence de la dépolarisation de la membrane mitochondriale grâce à la sonde potentiométrique TMRM avant (C.) et après (D.) l'exposition au ZnCl<sub>2</sub> (30 μM). E. L'accumulation rapide de zinc dans les mitochondries est inversée par l'utilisation de TPEN (25 μM). F. L'influx de zinc dans la mitochondrie se fait en partie au travers de l'uniporteur calcique et dépend du potentiel de la membrane mitochondriale comme le montre la variation de l'entrée de zinc dans la mitochondrie, révélée par la sonde FluoZin-3, en fonction de différentes conditions dépolarisantes. FCCP, 250 nM ; Calcium 200 μM ; RuRed, ruthenium red, 2 μM. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Adapté de Malaiyandi et al., 2005b.

En conditions excitotoxiques, les mitochondries jouent donc un rôle de tampon rapide du zinc en le stockant dans leur matrice par l'intermédiaire de l'uniporteur calcique. Cette fonction de « puits » de zinc permettrait de limiter l'augmentation rapide de sa concentration dans le cytoplasme (Frederickson et al., 1989; Koh et al., 1996; Stork and Li, 2006).

Même s'il semble clair que les mitochondries soient capables de stocker du zinc en conditions excitotoxiques, la majorité des études sur la relation entre le cation divalent et ces organites a été réalisée sur mitochondries isolées avec des concentrations en zinc dépassant probablement celles observées *in vivo*. Dans des systèmes plus complexes, tels que des cellules en culture, la mitochondrie se révèle également comme un réservoir de zinc, mais un réservoir dépendant du contexte. En dehors de son rôle de tampon rapide survenant lors d'une activité neuronale intense, la mitochondrie stock physiologiquement (Sensi et al., 2003; Dittmer et al., 2009; Lu et al., 2016) en moyenne 680nM de zinc contre 180nM pour le cytoplasme (valeurs obtenues à partir de cellules HeLa, Dittmer et al., 2009). Ces valeurs diffèrent probablement pour les neurones qui disposent de systèmes tampon du zinc différents des cellules HeLa (*p. ex.* MTs).

Etonnement, lorsque l'on expose des neurones en culture d'hippocampe de rat à 100  $\mu$ M de glutamate, les mitochondries *libèrent* le cation divalent, augmentant transitoirement la concentration cytoplasmique en zinc (Figure 12, Dittmer et al., 2009). A l'inverse, lorsque ces cellules sont exposées à 100  $\mu$ M de glutamate et 250  $\mu$ M de zinc (mimant un contexte d'excitotoxicité) le zinc s'accumule dans les mitochondries (Dittmer et al., 2009).

La mitochondrie est donc capable de jouer un double rôle. Le premier, déjà évoqué, est une fonction de « puits » de zinc. A la suite d'une activité neuronale intense et pathologique, le zinc se concentre dans le neurone postsynaptique. Le stockage du zinc représente une mesure de protection contre une augmentation excessive du cation divalent dans le cytoplasme du neurone. A l'inverse, en absence de zinc dans les terminaisons synaptiques (soit ~50% des fibres glutamatergiques, Sindreu et al., 2003)



**Figure 12 : Libération physiologique de zinc par la mitochondrie.** La concentration cytoplasmique en zinc augmente (courbe du haut, triangles noirs, Fluozinc-3) en parallèle de la diminution de la concentration en zinc mitochondrial (courbe du bas, cercles noirs, ratio FRET) lors de l'application de glutamate ( $t = 0, 100 \mu\text{M}$ ) sur des neurones en culture. La variation de la concentration en zinc cytoplasmique est étudiée à l'aide de la sonde FluZinc-3 ; La variation de la concentration en zinc mitochondriales est révélée grâce à une sonde utilisant un système de FRET. Adapté de [Dittmer et al., 2009](#).

ou lors d'une activité neuronale *physiologique*, les concentrations en zinc n'augmentent que peu dans le neurone postsynaptique. Dans ce contexte, en dévoilant une libération mitochondriale de zinc dans le compartiment cytoplasmique à la suite de l'activation des récepteurs glutamatergiques (ionotropiques ou métabotropiques), [Dittmer et al.](#), révèlent potentiellement un nouveau mode de signalisation intracellulaire médié par le zinc.

### III.A.2.b. L'excès de zinc perméabilise la membrane mitochondriale

Un bon indicateur de l'état de santé d'une cellule ou d'un organe, telle que la mitochondrie, est la polarité de leur membrane. Toute modification durable de ce potentiel reflète une altération de la perméabilité membranaire témoin qu'un mécanisme de dégénérescence est installé. En effet, dans ce contexte, la membrane devient perméable aux ions et à l'eau, les laissant diffuser selon leur gradient électrochimique, altérant durablement le potentiel transmembranaire. Or, l'exposition de mitochondries à de fortes concentrations en zinc, comme observé lors d'ischémies

cérébrales (*p. ex.* AVC), dépoliarise le potentiel membranaire mitochondriale (Sensi et al., 1999; Sensi et al., 2000; Bossy-Wetzel et al., 2004; Dineley et al., 2005; Malaiyandi et al., 2005b; Medvedeva et al., 2009; Medvedeva et al., 2017). Cet effet a notamment été révélé sur des isolats mitochondriaux. Après exposition de la culture à 30  $\mu$ M de zinc on observe une diminution du signal de fluorescence de l'ester méthylique de la tétraméthylrhodamine (TMRM), une sonde potentiométrique perméable aux membranes, témoignant d'une altération du potentiel membranaire par perméabilisation de cette dernière (**Figure 11C et 11D**, Malaiyandi et al., 2005b).

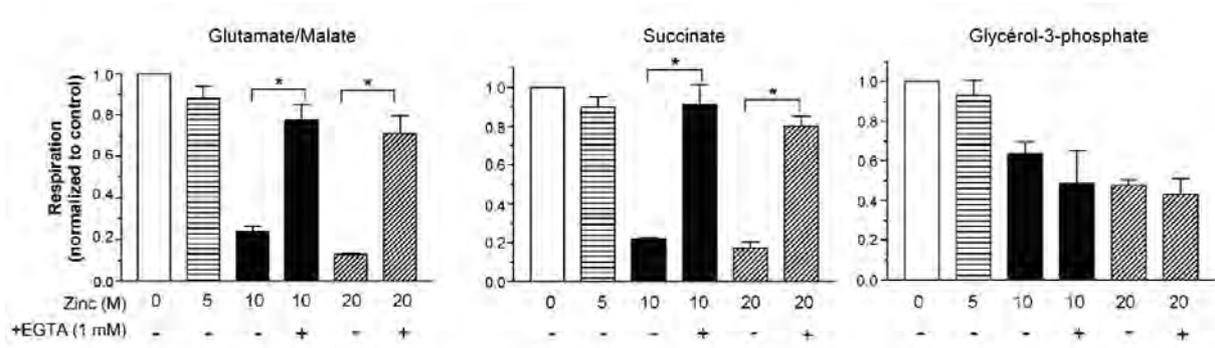
Cependant, de manière générale, la perte de l'intégrité membranaire d'un organite ou d'une cellule pose un problème expérimental majeur : celui de la fuite de la sonde en dehors du compartiment d'intérêt (ici la mitochondrie). Par sa libération et sa diffusion dans le milieu, l'intensité de fluorescence de la sonde décroît. La diminution du signal de fluorescence peut alors être faussement interprétée. L'utilisation de sondes encodées génétiquement permet de palier à ce problème. En effet, adressées sélectivement dans certains compartiments cellulaires, ces sondes restent encrées dans ces derniers. Cette spécificité améliore grandement la définition spatiale du marquage, même en cas de perte d'intégrité de l'organite (Dittmer et al., 2009).

Ainsi, les mitochondries sont des organites clés du métabolisme cellulaire et jouent un rôle fondamental dans la signalisation zinc et la prévention des dérégulations de son homéostasie. Dans un contexte ischémique, l'exposition prolongée des mitochondries au zinc est délétère. La perméabilisation de leurs membranes favorise leur éclatement et compte tenu de leur place centrale dans le métabolisme cellulaire, cette perte d'intégrité amorce un processus de dégénérescence neuronale (*Cf.* ci-après). L'identification de la mitochondrie comme une cible du zinc est une première étape, cependant, la caractérisation des mécanismes enclenchés par le cation divalent dans le phénomène de perméabilisation de leur membrane est indispensable pour identifier de potentielles cibles médicamenteuses nécessaires à la prise en charge des troubles ischémiques.

### III.A.2.c. Zinc, un puissant inhibiteur de la chaîne respiratoire

Comme évoqué précédemment, le rôle de « puits » de zinc de la mitochondrie entraîne de lourdes conséquences. La dépolarisation et la perméabilisation de sa membrane interne sont létales pour l'organite entier. Dès le début des années 1950, il est connu que le zinc perturbe la chaîne respiratoire, un processus à la base des fonctions mitochondriales et cellulaires. En 1955, Hunter and Ford, montrent que des concentrations sub-micromolaires en zinc sont suffisantes pour inhiber le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons. En 1967, Skulachev et al., révèlent des effets inhibiteurs dépendant de la concentration en zinc sur des enzymes purifiées de la chaîne respiratoire, obtenues après sonication de mitochondries ou bien directement sur des mitochondries isolées. Plus tard, en 1995, Link and von Jagow, affinent ce résultat en mettant en évidence l'inhibition par le zinc du complexe bc1 (également appelé complexe III) isolé à partir des chaînes respiratoires de mitochondries de cellules cardiaques bovines. Le zinc libre semble ainsi capable d'entraver le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons, système à la base de la production d'ATP et de la physiologie cellulaire.

Les composés provoquant une dépolarisation de la membrane interne de la mitochondrie (tel que le zinc) ont, de par leurs mécanismes d'action, deux effets opposés possibles sur la consommation en  $O_2$ . Les molécules telles que le FCCP, qui fonctionnent comme des protonophores, dépolarisent la membrane en équilibrant le gradient de proton de part et d'autre de cette dernière. Ce mécanisme accélère le fonctionnement des pompes à protons (qui s'activent pour restaurer un gradient pH à la membrane) et indirectement, accélèrent la consommation en  $O_2$ . A l'inverse, les composés inhibant des complexes enzymatiques faisant partie de la chaîne de transport des électrons provoquent une diminution de la consommation en  $O_2$ . La dépolarisation membranaire résulte alors d'un défaut de fonctionnement de la chaîne respiratoire. Or, l'application de différentes concentrations de zinc tamponné sur des mitochondries isolées révèle une diminution de la consommation en  $O_2$  (Figure 13, Dineley et al., 2005). Cet effet, partiellement reversé par un chélateur du zinc imperméable aux membranes (acide ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,N-tetra acétique ou EGTA,  $K_{d \text{ zinc}} = 7,8 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ ), révèle que le site d'action du métal se trouve sur la face externe de la membrane interne mitochondriale.

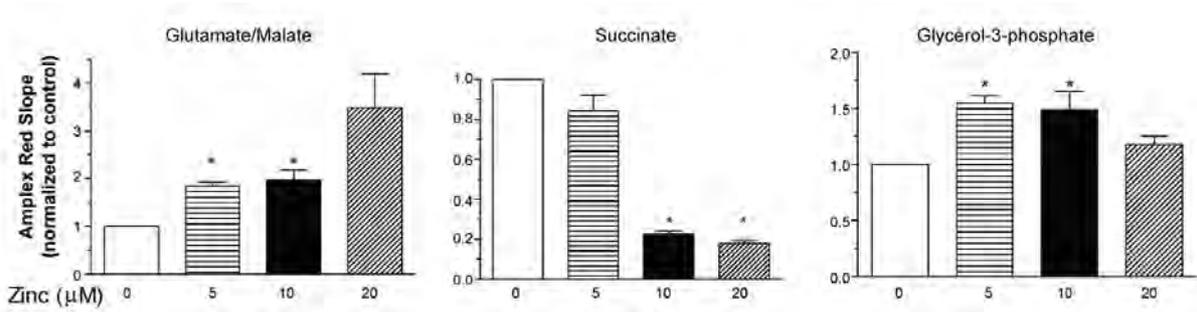


**Figure 13 : Le zinc inhibe la consommation en O<sub>2</sub> des mitochondries.** Valeurs normalisées à des mitochondries non traitées provenant de la même préparation (isolat mitochondrial). \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) selon un test de Student non apparié. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Adapté de [Dineley et al., 2005](#).

Ces résultats, en accord avec les premières études conduites entre les années 1950 et 1990 sur des enzymes isolées ([Hunter and Ford, 1955](#); [Skulachev et al., 1967](#); [Link and von Jagow, 1995](#)), impliquent que la dépolarisation de la membrane interne de la mitochondrie résulte d'une inhibition de la chaîne de transport des électrons ([Bossy-Wetzel et al., 2004](#); [Dineley et al., 2005](#)). En agissant sur la face externe de la membrane interne, le zinc n'a pas besoin de rentrer dans la matrice mitochondriale pour perturber ses fonctions. En inhibant la chaîne de transport des électrons, le cation divalent bloque également la production d'ATP, essentielle au bon fonctionnement de la cellule.

#### III.A.2.d. Inhibition de la chaîne respiratoire et production de radicaux libres

En dehors d'un affaissement de la production en ATP, le blocage de la chaîne de transport des électrons engendre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour *reactive oxygen species*, [Sensi et al., 1999](#); [Sensi et al., 2000](#); [Bossy-Wetzel et al., 2004](#); [Dineley et al., 2005](#)). Cet effet a notamment été mis en évidence par le prisme de la production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de zinc. L'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), principale ROS produite par la chaîne respiratoire, est dégradé en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la superoxyde dismutase. L'exposition de mitochondries isolées à différentes concentrations de zinc augmente de façon significative cette production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figure 14**, [Dineley et al., 2005](#)). En accord avec les travaux de [Link and von Jagow, \(1995\)](#), la production de radicaux libres observée pour les trois milieux de cultures



**Figure 14 : Le zinc augmente la production d'espèces radicalaires par les mitochondries.** La production de ROS est révélée par l'utilisation de la sonde Amplex Red (4 μM). \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) selon un test de Student non apparié. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Adapté de [Dineley et al., 2005](#).

mitochondriales (glutamate/malate, succinate et glycerol 3-phosphate, milieux permettant le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons et du cycle de Krebs) laisse supposer que le zinc exerce son action sur la chaîne respiratoire par l'inhibition du complexe III, voie commune à l'ensemble des voies métaboliques activées par les différents milieux de culture. Cependant, le ralentissement de la production de ROS dans le métabolisme utilisant le succinate, voie générant physiologiquement des ROS en utilisant le fort potentiel membranaire pour le transport inverse des électrons du complexe II vers le complexe I ([Cino and Del Maestro, 1989](#)), s'explique par le fait que le zinc, en dépolarisant la membrane mitochondriale, inhibe ce transport inverse et donc la production de ROS par la voie succinate.

En inhibant le complexe III de la chaîne de transport des électrons, le zinc induit une production massive d'espèces réactives de l'oxygène. Les ROS réagissent avec de nombreux composants protéiques, lipidiques et nucléotidiques, aggravant les effets néfastes du zinc sur l'organite, s'additionnant à la déplétion en ATP ainsi qu'à la perméabilisation de la membrane mitochondriale.

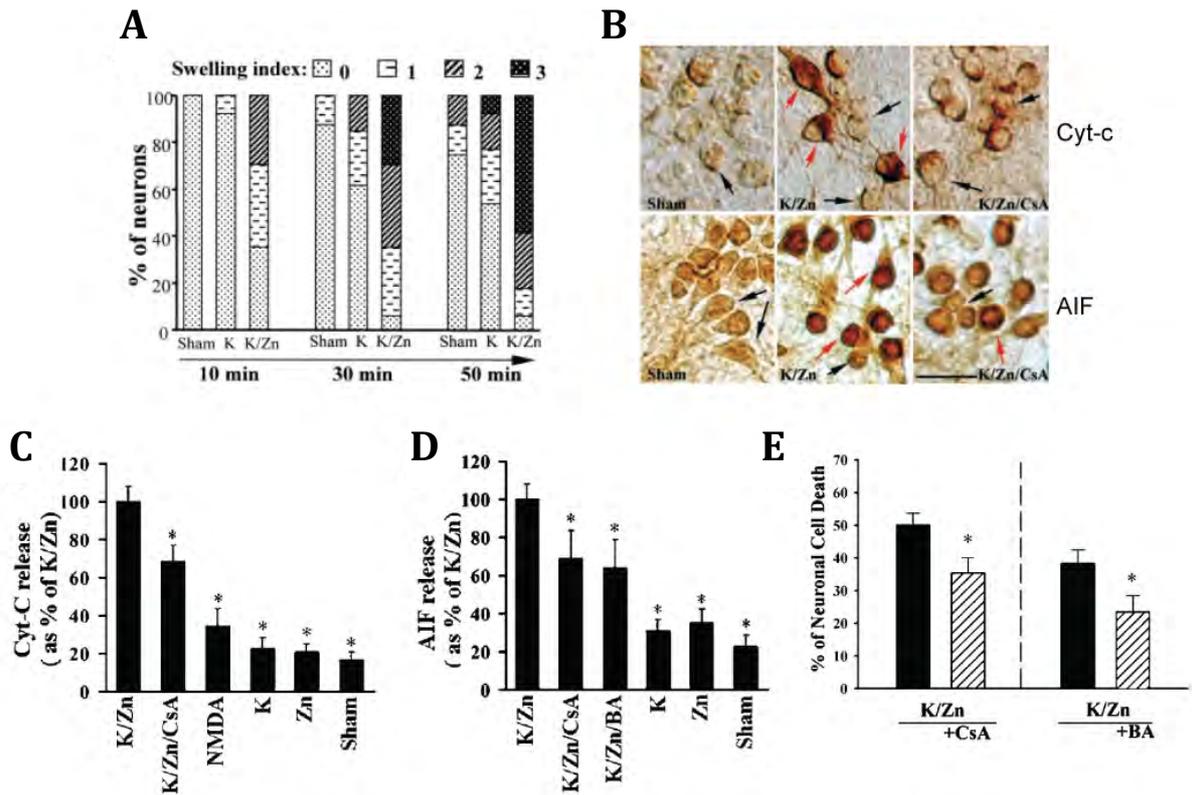
### III.A.2.e. Activation du MPTP mitochondrial et fuite de facteurs pro-apoptotiques

Accumulé dans les mitochondries via l'uniporteur calcique ([Jiang et al., 2001](#); [Malaiyandi et al., 2005b](#); [Gazaryan et al., 2007](#)), le zinc active également le pore de

transition de perméabilité (MPTP), un canal localisé entre la membrane interne et externe de l'organite. Le MPTP est impliquée dans le gonflement des mitochondries par effet osmotique associé à l'entrée de molécules de taille inférieure à 1500 daltons dans la matrice mitochondriale. Cet effet du zinc a notamment été mis en évidence par le fait que des mitochondries de neurones en culture de rats gonflent après exposition à un tampon enrichi en potassium et en zinc à la différences de neurones exposés uniquement à du potassium (**Figure 15A**, Wudarczyk et al., 1999; Jiang et al., 2001; Bossy-Wetzl et al., 2004). Dans ce contexte expérimental, le potassium, en présence de bloqueurs des récepteurs AMPA (NBQX) et NMDA (MK-801), permet de dépolariser la membrane des neurones et d'activer l'ouverture des VGCC. Le potassium permet le passage de calcium dans les neurones via ces canaux. Cependant, l'addition de zinc au potassium permet le passage à la fois de calcium et de zinc (*Cf.* partie III.A.5, Sensi et al., 1999; Sensi et al., 2000). En révélant un effet uniquement lors de l'ajout de zinc, Jiang et al., mettent directement en cause le rôle de ce cation (ou de l'action synergique du zinc et du calcium) dans le gonflement des mitochondries. Le fait que l'effet soit annulé en présence d'un inhibiteur du MPTP (l'acide bongkrekiqique) sur des mitochondries isolées, confirme ces résultats (Jiang et al., 2001). Il est important de noter, que ce protocole expérimental ne permet pas de savoir si c'est la fraction mitochondriale du zinc qui active le MPTP ou celle cytoplasmique.

L'induction du MPTP par le zinc est également reliée au déclenchement de la mort cellulaire programmée. En effet, une des conséquences directes de l'activation de ce canal est la fuite vers le cytoplasme de protéines d'une taille inférieure à 1500 daltons, en particulier de certains facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome-c (Cyt-C) et l'*apoptosis inducing factor* (AIF) (Jiang et al., 2001; Bossy-Wetzl et al., 2004). Après exposition de neurones en cultures à un tampon potassium/zinc (*Cf.* ci-dessus) et marquage immunocytochimique des neurones pour ces deux facteurs, il apparait que l'entrée de zinc dans les neurones déclenche une élévation des niveaux cellulaires de Cyt-c et d'AIF. Ces niveaux sont comparables à ceux induits par la staurosporine, un puissant inducteur d'apoptose connu pour promouvoir la libération de ces deux facteurs (**Figure 15B, 15C et 15D**, Jiang et al., 2001). De plus, en présence de cyclosporine A et d'acide bongkrekiqique, deux antagonistes du MPTP, le gonflement mitochondrial et la production de facteurs pro-apoptotiques est partiellement inhibée (**Figure 15C et 15D**),

Jiang et al., 2001). Le caractère partiel de cet effet peut s'expliquer par le fait que de fortes concentrations en zinc perturbent le potentiel membranaire mitochondrial et augmentent la perméabilité, effet qui à lui seul pourrait induire la fuite de ces deux facteurs. Le blocage du MPTP s'avère bénéfique et favorise la survie neuronale (**Figure 15E, Jiang et al., 2001**).



**Figure 15 : Le zinc induit l'ouverture du MPTP mitochondrial provoquant le gonflement de l'organite et la production de facteurs pro-apoptiques. A.** Le zinc induit le gonflement de mitochondries dans des neurones en cultures après exposition à une solution enrichie en potassium (60 mM) et/ou en zinc (300  $\mu$ M) pendant 10, 30 ou 50 minutes. Les rAMPA et rNMDA ont été respectivement inhibés par 10  $\mu$ M de NBQX et 10  $\mu$ M de MK-801. Les indexes de gonflement sont issus de mitochondries imagées dans des neurones en cultures en microscopie confocale à l'aide du marqueur mitochondriale MitoTracker Green insensible aux variations de potentiel oxydoréducteur associé à l'élévation de la production de ROS éventuelle, ainsi qu'à toute variation du potentiel membranaire mitochondrial pouvant biaiser les résultats. Sham, condition contrôle sans potassium ni zinc en excès. **B.** Neurones en cultures marqués immunologiquement pour le Cyt-c et l'AIF respectivement 1 heure ou 3 heures après l'induction de l'entrée de zinc par une exposition de 6 minutes à une solution de potassium (60 mM) et Zn (300  $\mu$ M). CsA, cyclosporine A ; Sham, condition contrôle sans potassium ni zinc en excès ; Flèches noirs, neurones négatifs pour Cyt-c ou AIF ; Flèches rouges, neurones positifs pour Cyt-c ou AIF. Bar d'échelle, 25  $\mu$ m. **C.** et **D.** Quantification de la libération de facteurs pro-apoptotiques Cyt-c et AIF après une exposition de 6 minutes à différentes conditions pharmacologiques. K/Zn, potassium (60 mM) et zinc (300  $\mu$ M) ; CsA, cyclosporine A (10  $\mu$ M) ; NMDA (100  $\mu$ M) ; BA, acide bongkrekiq (5  $\mu$ M) ; Sham, condition contrôle sans potassium ni zinc en excès. **E.** L'utilisation de bloqueurs du MPTP atténue la mort neuronale. Les cultures ont été exposées pendant 6 minutes à une solution enrichie en potassium et en zinc (respectivement 60 mM et 300  $\mu$ M) avec ou sans cyclosporine A (10  $\mu$ M, CsA) ou acide bongkrekiq (5  $\mu$ M, BA). La mort neuronale a été mesurée 6 heures après l'exposition. \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) selon un test de Student apparié. Les bars d'erreurs représentent l'écart-type. Adapté de Jiang et al., 2001.

Ainsi, en conditions excitotoxiques, l'induction du MPTP par le zinc constitue une voie privilégiée de sortie de facteurs pro-apoptotiques et d'espèces réactives de l'oxygène directement depuis le compartiment mitochondrial vers le compartiment cytoplasmique (Jiang et al., 2001; Bossy-Wetzels et al., 2004). Ces facteurs, une fois libérés dans le cytoplasme et après liaison du Cyt-c à APAF1 (un facteur d'activation de protéines apoptotiques), déclenchent l'induction de caspases et divers enzymes protéolytiques conduisant à la formation d'apoptosomes et aboutissent à la mort cellulaire programmée. L'ouverture du MPTP provoque également un choc osmotique conduisant au gonflement et à l'éclatement des mitochondries, libérant par la même occasion le zinc qu'elles s'étaient efforcées de tamponner. La rupture de ce compartiment crée, non seulement une interruption létale (pour le neurone) des fonctions mitochondriales mais également une boucle d'auto-augmentation des concentrations intracellulaires en zinc, aggravant les dommages associés à l'élévation de ses concentrations intracellulaires (Cf. partie III.A.3.c).

Le MPTP est un canal perméable à toutes molécules d'une taille inférieure à 1500 daltons, qui, en l'apparence augmente la perméabilité de la membrane mitochondriale et autorise l'entrée et la sortie de molécules ou ions de petites tailles selon leur gradient électrochimique. Comme évoqué plus haut, son ouverture par le zinc favorise la sortie de ROS et de facteurs pro-apoptotiques. Au même titre que le calcium, le zinc, peut entrer dans la mitochondrie via le MPTP. Bien que cette voie d'entrée ait été mise en évidence par plusieurs groupes (Wudarczyk et al., 1999; Jiang et al., 2001; Bossy-Wetzels et al., 2004; Gazaryan et al., 2007), d'autres remettent en question son existence (Brown and Dyck, 2004; Dineley et al., 2005). En effet, Dineley et al., montrent que l'utilisation de cyclosporine A (un inhibiteur du MPTP) ne protège pas de l'altération du potentiel de la membrane mitochondriale associée à l'exposition de ces organites (isolés) à de fortes concentrations en zinc (2.5  $\mu$ M). En revanche, le blocage de l'uniprotéine calcique (grâce au ruthénium red), une voie d'entrée du zinc dans la mitochondrie, bloque partiellement cette dépolarisation (Cf. partie III.A.5). En bloquant deux voies d'entrée potentielles du zinc et en ne voyant un effet qu'avec un bloqueur de l'uniprotéine calcique, Dineley et al., concluent que le MPTP n'est pas une voie d'entrée du zinc dans la mitochondrie. Cependant, à l'inverse du calcium qui dépolarise le potentiel de la

membrane mitochondrial à la suite de son entrée via l'uniporteur calcique (Malaiyandi et al., 2005b), le zinc dépolarise cette même membrane sans avoir besoin de rentrer dans la mitochondrie en agissant sur la face externe de la membrane interne mitochondriale (Cf. partie III.A.2, Dineley et al., 2005; Malaiyandi et al., 2005b). Ainsi, même s'il semble que sa part dans l'influx mitochondrial soit faible, le passage de zinc via le MPTP ne peut pas être exclu.

### III.A.2.f. Le zinc inhibe le mouvement des mitochondries

En plus de l'inhibition des fonctions mitochondriales et la production de ROS qui en résulte, le zinc excitotoxique inhibe le mouvement des mitochondries (Malaiyandi et al., 2005b). Cet effet passe, non pas par une action directe du métal sur l'organite, mais par l'activation de la phosphatidylinositol 3-Kinase (PIP-3K) cytoplasmique. En effet, l'application transitoire de wortmannin et de 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002), deux inhibiteurs de la PIP-3K, restaurent partiellement la mobilité mitochondriale (Malaiyandi et al., 2005b). Par diminution de leur mobilité, les mitochondries ne sont plus adressées à la synapse où elles sont indispensables à de nombreux mécanismes associés à la neurotransmission (apport en ATP pour le fonctionnement des pompes à protons à la membrane des vésicules synaptique, des pompes Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase qui rétablissent le potentiel de repos des membranes, ou encore leur rôle de tampon calcique lié à l'entrée du cation dans les neurones au travers des rNDMA, etc). Le défaut de mobilité des mitochondries favorise alors la dégénérescence des neurones.

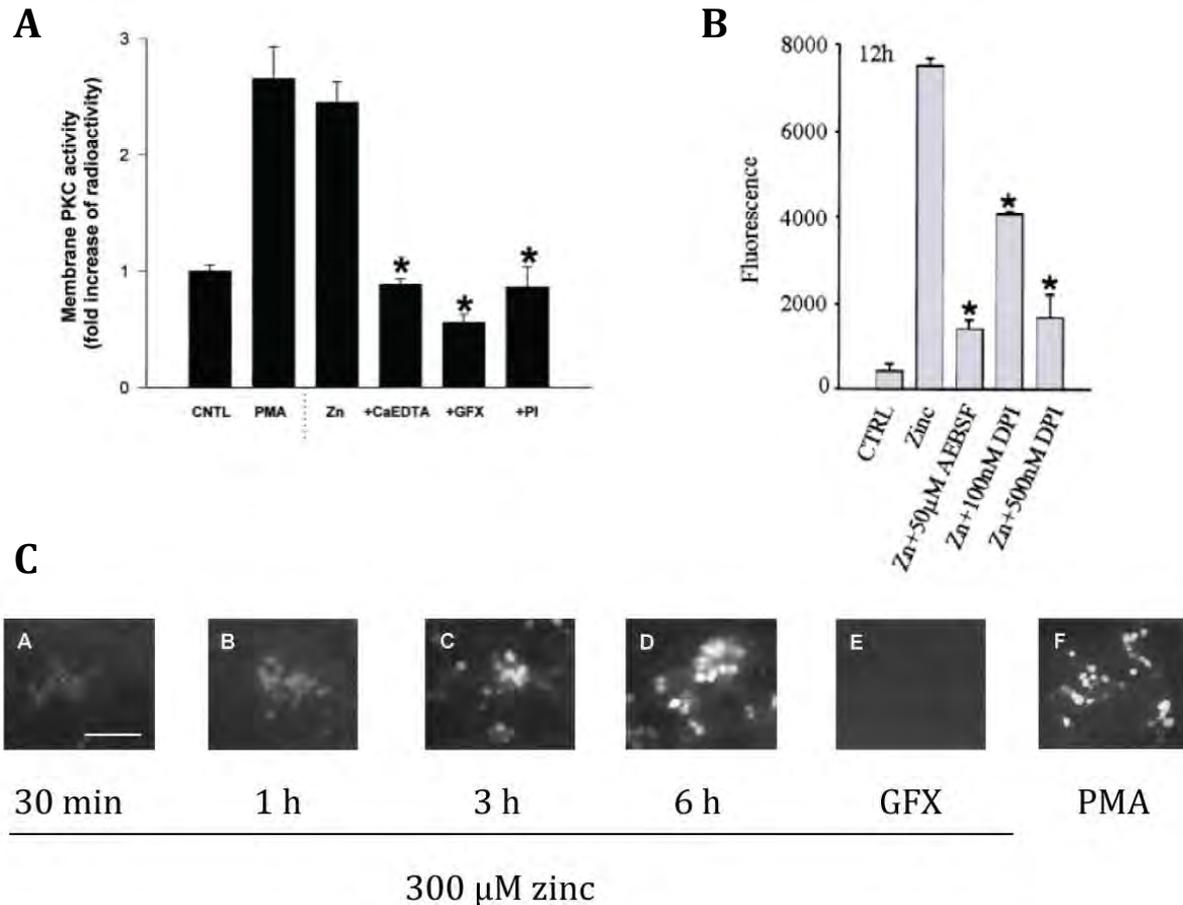
### III.A.3. Mécanismes indépendants de la mitochondrie

La mitochondrie est un acteur majeur de la production d'espèces radicalaires à la suite d'un choc ischémique mais la génération de ROS induite par le zinc ne se cantonne pas à une production mitochondriale. Via l'induction et l'activation de certaines voies enzymatiques, le zinc génère un stress oxydatif directement depuis le cytoplasme (Kim et al., 1999; Noh et al., 1999; Noh and Koh, 2000; Kim and Koh, 2002). Cette production

massive d'espèces réactives de l'oxygène entraîne une boucle d'auto-augmentation des concentrations intracellulaires en zinc (Jiang et al., 1998; Aravindakumar et al., 1999; Aizenman et al., 2000; Bossy-Wetzel et al., 2004; Medvedeva et al., 2017) ainsi que le déclenchement de mécanismes pro-apoptotiques associés au rétrécissement des neurones par effet osmotique (Aizenman et al., 2000; Bossy-Wetzel et al., 2004). L'ensemble de ces cascades intracellulaires déclenchées par le zinc sont autant de cibles thérapeutiques potentielles pouvant conduire à un traitement permettant la prise en charge de patients souffrant d'ischémie cérébrales.

### III.A.3.a. La voie PKC/NAPDH

La voie protéine kinase C (PKC) / nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase (NADPH oxydase) est l'une des cascades intracellulaires enclenchées par le zinc. La PKC est une enzyme de la famille des protéines kinases, agents de phosphorylation de groupements hydroxyles de résidus sérine ou thréonine. Cette enzyme joue un rôle clé dans la régulation des fonctions cellulaires au sein du SNC puisqu'elle est notamment impliquée dans la synthèse de neurotransmetteurs, la régulation des flux ioniques, l'exocytose et la neurosécrétion (Nishizuka, 1989; Shearman et al., 1989). Cette protéine, physiologiquement activée par la combinaison calcium - diacylglycerol - phosphatidylserine, peut également être induite par le zinc (Noh et al., 1999). A la suite de son entrée massive dans le cytoplasme lors d'évènements ischémiques excitotoxiques, le zinc augmente la fraction membranaire active de la PKC dans des neurones corticaux de souris en culture (**Figure 16A**, Noh et al., 1999). L'induction de cette protéine par le zinc provoque alors une élévation du stress oxydatif via la production de radicaux libres, conduisant à la peroxydation de lipides et la neurodégénérescence des neurones en culture (Noh et al., 1999). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la PKC (GF109203X) bloque partiellement la production de ROS dans des neurones en cultures exposés à 300  $\mu$ M de zinc pendant 15 minutes, témoignant d'une participation de l'enzyme dans la production d'espèces radicalaires (**Figure 16C**, Noh et al., 1999). La relation entre l'activation de la PKC et la production de ROS se fait par l'intermédiaire de la NADPH oxydase (Noh and Koh, 2000; Kim and Koh, 2002), une enzyme membranaire appartenant à la classe des oxydoréductases, dont la fonction est



**Figure 16 : Le zinc induit la production intracellulaire de radicaux libres par activation de la cascade PKC/NADPH oxydase.** A. L'entrée de zinc dans des neurones en culture est à l'origine de l'augmentation de l'activité de la PKC membranaire car la chélation du zinc (CaEDTA) ou l'utilisation d'inhibiteurs de la PKC (GFX (1 µM) et PI (50 µM)) bloque cet effet. Les neurones en culture ont été exposés pendant 40 minutes aux différentes drogues avec ou sans zinc (300 µM pendant 15 minutes). Le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, 100 nM), un puissant activateur de la PKC, a été appliqué pendant 40 minutes et sert de contrôle de l'activité de la PKC. Après ces traitements pharmacologiques, les neurones ont été lysés et l'activité de la PKC a été mesurée par la phosphorylation radioactive de substrats de la PKC à l'aide de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (220 cpm/pmol). B. Niveau d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le milieu de culture cellulaire estimé par l'utilisation de la sonde Amplex Red 12 heures après exposition à du zinc pendant 15 minutes seul ou en présence de 50 µM d'AEBSF ou 500 nM de DPI, deux inhibiteurs de la NADPH oxydase. \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) selon un test de Student apparié. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. C. La production d'espèces radicalaires est augmentée dans des neurones en culture exposés à du zinc ou du PMA. La production de ROS est révélée à l'aide de la sonde DCF sensible à l' $\text{O}_2^-$ . (A) 30 minutes ; (B) 1 heure ; (C) 3 heures ; (D) 6 heures après exposition de 15 minutes à 300 µM de zinc. (E) GFX (1 µM) bloque complètement la production de ROS par le zinc. (F) fluorescence 12 heures après exposition à du PMA (100 nM). Barre d'échelle, 50 µm. C. Adapté de Noh, Kim *et al.*, 1999 (A et C) et Noh and Koh, 2000 (B).

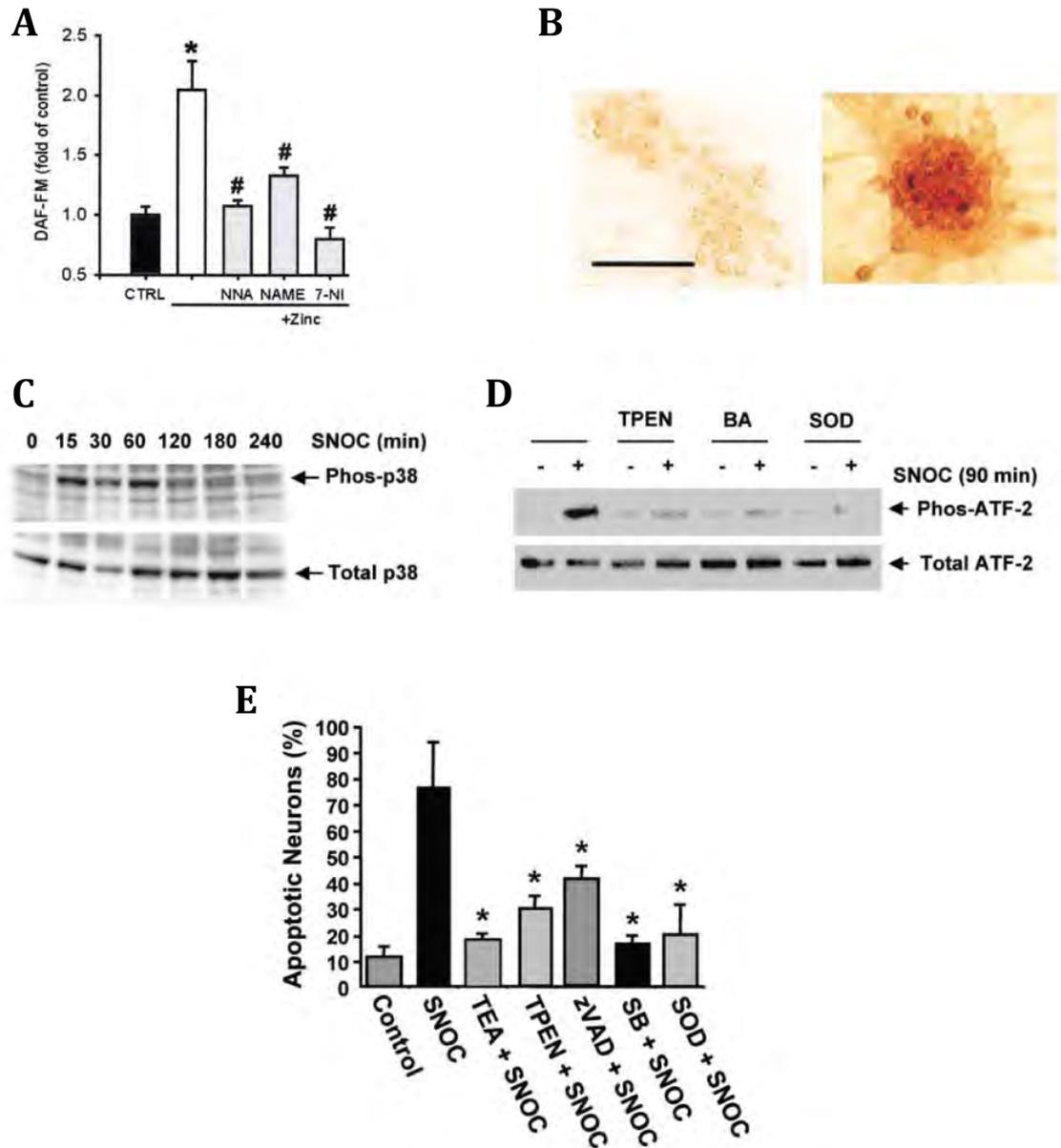
d'oxyder le NADPH en  $\text{NADP}^+$  par l'intermédiaire d'une molécule d' $\text{O}_2$ . Cette réaction conduit à la production d'un ROS : l'anion superoxyde. Cet effet a été mis en évidence par le fait que la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (produit de dégradation de l' $\text{O}_2^-$ ) est sensiblement réduite lors de l'exposition de neurones en cultures à zinc 400 µM pendant 15 minutes

en présence d'inhibiteurs de la NADPH (AEBSF (4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride) ou DPI (diphenyleneiodonium), **Figure 16B**, [Noh and Koh, 2000](#)).

### III.A.3.b. La voie p38 MAPK/canal I<sub>k</sub>

Une deuxième voie majeure de cytotoxicité est liée à l'activation par le zinc de la synthétase neuronale du monoxyde d'azote (nNOS), une enzyme impliquée dans la production de monoxyde d'azote (NO) au sein des neurones. En effet, l'utilisation de différents composés pharmacologiques inhibant l'activité de cette enzyme réduit significativement la production d'espèces radicalaires à la suite de l'exposition de neurones en cultures à 400 µM de zinc (**Figure 17A**, [Kim and Koh, 2002](#)). Cependant, la réaction entre le NO et l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est néfaste car elle conduit à la synthèse de l'anion peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>), une espèce radicalaire particulièrement réactive notamment à l'origine de dommages de l'ADN (*Cf.* partie III.A.4.b.i.). L'ONOO<sup>-</sup> affecte également le fonctionnement des protéines puisqu'il est à l'origine d'une nitrosylation de résidus tyrosines, visible notamment après exposition de neurones en culture à du zinc (**Figure 17B**, [Kim and Koh, 2002](#)).

En parallèle, le zinc, par l'intermédiaire de la production de ROS, initie le rétrécissement cellulaire, une des premières étapes de l'apoptose neuronale. Ce mécanisme est associé à un déséquilibre osmotique résultant de l'activation de canaux potassiques à rectification retardée, les canaux I<sub>k</sub>, par la protéine kinase p38 mitogen-activated (ou p38 MAPK), une enzyme capable, sous certaines conditions, de s'auto-activer par phosphorylation ([Bossy-Wetzel et al., 2004](#)). Ce phénomène d'autophosphorylation de la p38 MAPK est en effet augmenté dans des neurones en culture exposés à un donneur de monoxyde d'azote, la S-nitrocystéine (SNOC), (**Figure 17C**, [Bossy-Wetzel et al., 2004](#)). Cette autophosphorylation de la p38 MAPK induite par le zinc excitotoxique et la production de radicaux libres qui en résulte, augmente son activité enzymatique puisque l'utilisation de chélateurs de zinc, ou d'agents inhibant ses effets délétères, réduit l'activité de la p38 MAPK (**Figure 17D**, [Bossy-Wetzel et al., 2004](#)). En retour, la p38 MAPK activée génère un déséquilibre osmotique via l'activation des canaux I<sub>k</sub> ([Bossy-Wetzel et al., 2004](#)). Il en résulte une fuite de K<sup>+</sup> vers l'extérieur de la cellule entraînant un rétrécissement cellulaire par effet osmotique ([Bossy-Wetzel et](#)



**Figure 17 : L'induction de la production de NO par le zinc favorise la formation de ROS, l'activation de la p38 MAPK et l'ouverture subséquente de canaux  $I_k$  à l'origine de troubles osmotique cellulaires conduisant à l'apoptose neuronale.** **A.** Le zinc excitotoxique induit la production de NO car l'utilisation d'inhibiteurs de la nNOS tel que le N-nitro-L-arginine (NNA), le N-nitro-L-arginine methyl ester-HCl (NAME) et le 7-nitroindazole (7-NI) réduit l'élévation du stress oxydatif de neurones en cultures exposés à 400  $\mu$ M de zinc pendant 15 minutes. La production de ROS est révélée grâce à la sonde DAF 2 heures après exposition au zinc. \*Différence significative par rapport au contrôle (CTRL) et # différence significative par rapport aux cultures traitées avec du zinc ( $P < 0.05$ , test de Student apparié). **B.** La production de ROS favorise la nitrosylation de protéines comme le montre l'augmentation du marquage immunochimique obtenu à l'aide d'anticorps dirigée contre des tyrosines nitrosylés de neurones en culture 1 heure après une exposition de 15 minutes à une solution contrôle (gauche) ou à 400  $\mu$ M de zinc (droite). Barre d'échelle, 100  $\mu$ M. **C.** Induction de la phosphorylation de la p38 MAPK par le zinc après addition de 150  $\mu$ M de SNOC dans une culture de neurones. A noter que l'effet se dissipe au-delà de 60 minutes. **D.** Le zinc, par l'intermédiaire de la production de radicaux libres, augmente l'activité de la p38 MAPK car l'utilisation de chélateurs de zinc (TPEN, 20 nM), d'inhibiteur du MPTP (acide bongkreique, BA, 50  $\mu$ M) ou de l'enzyme de métabolisation l'anion superoxyde (superoxyde dismutase, SOD, 50 U/ml) réduit l'activité de la p38MAPK. Effet révélé par la diminution de la forme phosphorylée de l'ATF-2, un substrat de l'enzyme. **E.** L'utilisation d'inhibiteurs des voies excitotoxiques induites par le zinc favorise la survie des neurones en culture. Neurones mis en culture avec du TEA, 15 mM; TPEN, 5 nM; zVAD-fmk, 100  $\mu$ M (inhibiteur de caspase); SB203580, 1  $\mu$ M (inhibiteur de la p38 MAPK); SOD, 50 U/mL et exposé à 200  $\mu$ M de SNOC. Fixation et marquage de mort cellulaire 12 heures après les différents traitements. \* indique une différence significative ( $p < 0.01$ ) selon un test ANOVA. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Adapté de Kim and Koh, 2002 et Bossy-Wetzel et al., 2004.

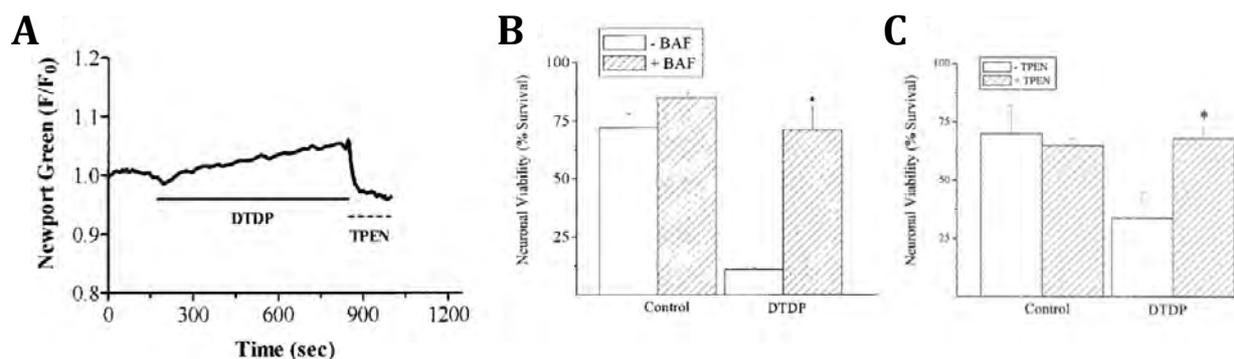
al., 2004). Cette fuite a directement été impliquée dans la dégénérescence des neurones puisque l'utilisation de tetraethylammonium (TEA), un bloqueur des canaux  $I_k$ , ou encore la chélation du zinc par le TPEN, la métabolisation de l' $O_2^{\cdot-}$  par la superoxyde dismutase (SOD) ou le blocage direct de l'action de la p38 MAPK par SB203580 (SB) réduit drastiquement la mort neuronale (**Figure 17G**, Bossy-Wetzel et al., 2004).

Ainsi, en favorisant la production de NO et d' $O_2^{\cdot-}$ , le zinc entraîne la génération d' $ONOO^{\cdot-}$ , un ROS extrêmement réactif. L'une des cibles de cet anion est la p38 MAPK. En oxydant cette protéine kinase, l' $ONOO^{\cdot-}$  permet son auto-activation par autophosphorylation. L'induction de la p38 MAPK engendre alors l'activation de canaux  $I_k$ , des canaux potassiques à rectification retardée responsables d'une fuite de potassium à l'extérieur de la cellule et donc d'un rétrécissement cellulaire par effet osmotique. Cette étape est l'une des premières conduisant à l'apoptose des neurones à la suite d'un processus excitotoxique.

### III.A.3.c. Mécanismes d'auto-augmentation des concentrations intracellulaires en zinc

#### III.A.3.c.i. La voie des MTs

La production massive d'espèces réactives de l'oxygène est à la base d'un mécanisme d'auto-entretien des concentrations intracellulaires élevées en zinc. Déjà observé avec la mitochondrie (*Cf.* partie III.A.2.c), cet effet a pour origine l'oxydation ou la nitro-oxydation de cibles protéiques impliquées dans le stockage du métal de transition. Parmi ces dernières, les métallothionéines (notamment les MT-III, isoforme neuronale) sont des protéines ubiquitaires permettant le stockage intracellulaire du zinc en condition physiologique (*Cf.* partie II.B.5) mais leur réaction avec l' $ONOO^{\cdot-}$  ou le NO entraîne une rupture de la liaison zinc-thiol formée entre le cation divalent et les cystéines des MTs (Jiang et al., 1998; Aravindakumar et al., 1999; Aizenman et al., 2000; Bossy-Wetzel et al., 2004; Medvedeva et al., 2017). Cette libération de zinc depuis les MTs augmente d'autant plus les concentrations cytoplasmiques en zinc et est associée à



**Figure 18 : La production de radicaux libres par le zinc favorise sa libération depuis les MTs. A.** Le DTDP favorise l'élévation des niveaux de zinc dans des neurones en cultures comme le révèle l'augmentation du signal de fluorescence de la sonde Newport green lors de l'application de 100  $\mu\text{M}$  de DTDP ainsi que l'extinction du signal après l'ajout de TPEN (25  $\mu\text{M}$ ). **B.** L'utilisation de BAF (100  $\mu\text{M}$ ) réduit de façon significative l'élévation des niveaux de zinc intracellulaire post DTDP. **C.** Effet neuroprotecteur du TPEN (10 nM) vis-à-vis des effets du DTDP (10  $\mu\text{M}$  pendant 10 minutes), viabilité estimée 18-20 heures post traitement. \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) selon un test de Student apparié. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type. Adapté de Aizenman et al., 2000.

la dégénérescence des neurones. En effet, l'exposition de neurones en culture à des agents pro-oxydants tels que le NO (Bossy-Wetzel et al., 2004) ou le 2,29-dithiodipyridine (DTDP, Aizenman et al., 2000), est associée à une augmentation de la concentration intracellulaire en zinc comme le révèle l'élévation du signal de fluorescence de la sonde Newport green (Figure 18A, Aizenman et al., 2000; Bossy-Wetzel et al., 2004; Stork and Li, 2006). Cependant, l'introduction de butoxy-carbonyl-aspartate-fluoromethyl ketone (BAF), un inhibiteur des protéases à cystéine, inhibant la réaction d'oxydation de la liaison cystéine-zinc au cœur des MTs, se révèle comme protecteur vis-à-vis de la neurotoxicité associée à l'exposition au DTDP (Figure 18B, Aizenman et al., 2000). En parallèle, l'utilisation de TPEN à faible dose (10 nM) permet également de prévenir la survenue des dommages neurotoxiques associés au zinc (Figure 18C, Aizenman et al., 2000; Bossy-Wetzel et al., 2004).

L'effet neuroprotecteur du BAF vis-à-vis de l'élévation des niveaux de zinc intracellulaire lors d'un stress oxydatif, signe que lors d'une exposition pathologique à des radicaux libres (en particulier l'ONOO<sup>-</sup>), ces derniers provoquent une libération de zinc depuis des stocks intracellulaires riches en cystéines. Une de ces cibles semble être les MTs et notamment les MT-III mais les études présentées ci-dessus n'apportent pas de preuves directes de l'implication des MTs dans la libération du zinc (via l'utilisation

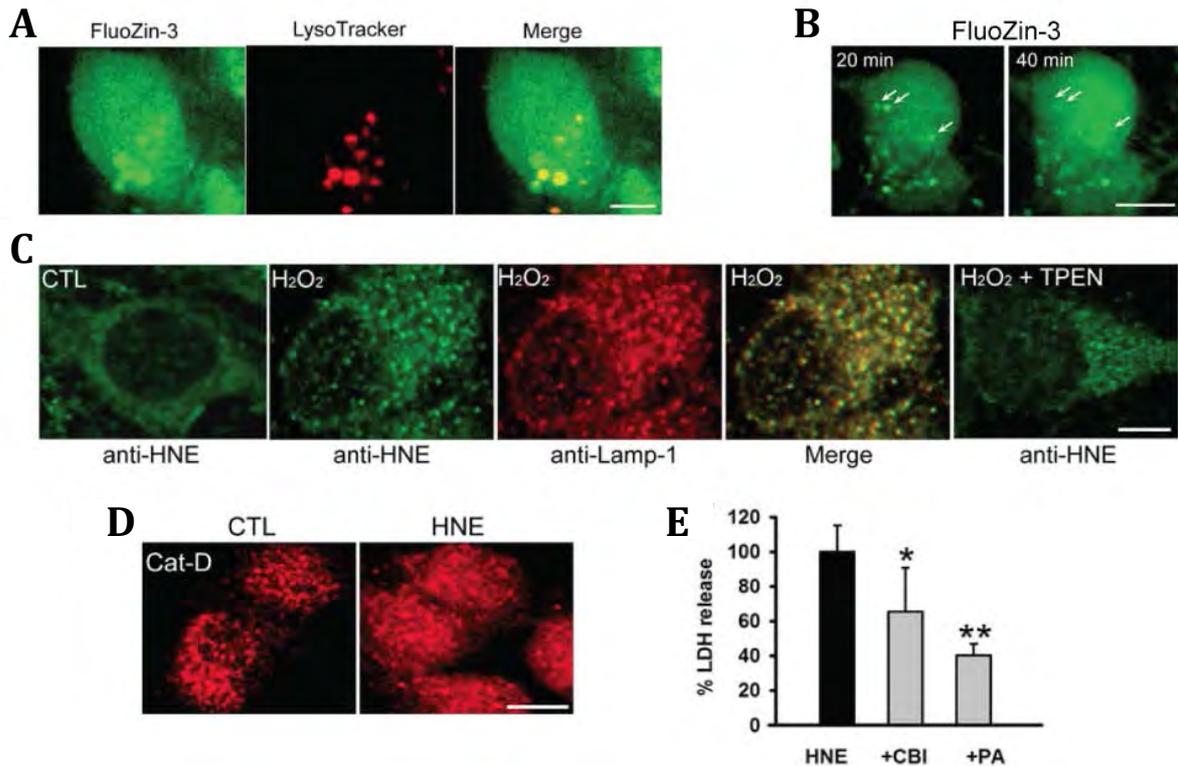
de lignées de souris MT-III KO ou la démonstration que le BAF prévient l'élévation des concentrations en zinc intracellulaire). Le fait que le BAF ainsi que le TPEN présentent des effets neuroprotecteur vis-à-vis des effets pro-oxydants du zinc excitotoxique, montre que la chélation du cation divalent ou la prévention de sa libération depuis des stocks intracellulaires sont des *pistes* thérapeutiques solides dans la prise en charge de chocs ischémiques tels que les AVCs (*Cf.* partie III.A.7).

### **III.A.3.c.ii. HNE, autophagie et libération de zinc depuis les lysosomes**

Une autre source d'augmentation des concentrations intracellulaires en zinc à la suite d'un choc excitotoxique provient des autres formes de stockage du cation. En plus des mitochondries ou des métallothionéines, l'appareil de golgi, le réticulum endoplasmique (Stork and Li, 2010; Lu et al., 2016), mais également les lysosomes (Smith et al., 2006; Hwang et al., 2008) sont capables de stocker le cation divalent. L'élévation du stress oxydatif *pourrait* être à l'origine d'une atteinte à la perméabilité membranaire de ces formes de réserves intracellulaires conduisant à la libération du zinc dans le cytoplasme.

Cet effet a été mis en évidence dans le cas des lysosomes (Smith et al., 2006; Hwang et al., 2008). Après exposition de neurones en culture de souris à de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, on observe la formation de vésicules zincergiques identifiées comme étant des lysosomes / endosomes tardifs grâce au co-marquage FluoZin-3 (sonde zinc) / Lyso-tracker (sonde lysosomale) (**Figure 19A**, Hwang et al., 2008). En condition de stress oxydatif, les lysosomes neuronaux sont donc capables d'emmagasiner du zinc. De la même façon que les mitochondries, ce processus permettrait dans un premier temps de protéger la cellule d'un excès de zinc intracellulaire. Cependant la façon dont le métal entre dans les lysosomes reste à identifier. Le mécanisme d'influx du zinc dans l'organite passerait soit par un transport vers le lysosome (similaire à celui observé pour les mitochondries), soit par libération de zinc lié aux MTs contenus à l'intérieur de l'organite.

Le stress oxydatif survenant à la suite du choc ischémique est, comme pour les mitochondries, néfaste. Après 40 minutes d'exposition de neurones en culture à de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, certaines lysosomes ayant accumulé du zinc disparaissent, signe d'une



**Figure 19:** Le zinc excitotoxique s'accumule dans les lysosomes et enclenche le processus de LMP via la production d'HNE conduisant à la libération d'enzymes acidophiles telles que la cathepsine D. **A.** L'application de 100  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  sur des neurones en culture provoque une accumulation de zinc dans les lysosomes. Barre d'échelle, 5  $\mu\text{m}$ . **B.** L'accumulation de zinc dans les lysosomes est accompagnée par leur disparition, signe du mécanisme de LMP. Images prises 20 minutes et 40 minutes après exposition de neurones en culture à 100  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Barre d'échelle, 10  $\mu\text{m}$ . **C.** Le stress oxydatif favorise la production d'HNE lysosomale, révélé à l'aide d'anticorps dirigés contre les produits de l'HNE après exposition de neurones en culture à 100  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'utilisation de TPEN (500 nM) prévient l'accumulation d'HNE. Barre d'échelle, 5  $\mu\text{m}$ . **D.** Libération de cathepsine D par les lysosomes après traitement de neurones en culture par 300  $\mu\text{M}$  de HNE. Barre d'échelle, 10  $\mu\text{m}$ . **E.** L'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes lysosomales tels que l'inhibiteur de la cathepsine B (CBI 0.1  $\mu\text{M}$ ) ou la pepstatine A (PA, 150 nM) favorise la survie neuronale évaluée par la libération de lactate déshydrogénase (LDH). \* et \*\* indique une différence significative (respectivement  $p < 0.05$  et  $p < 0.01$ ) selon un test de Student. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type. Adapté de [Hwang et al., 2008](#).

perméabilisation de leur membrane (ou LMP pour *lysosomal membrane permeabilization*, **Figure 19B**, [Hwang et al., 2008](#)). Cet effet est lié à la production de 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), un aldéhyde, sous-produit de la peroxydation des lipides, ayant été associé au processus de LMP ([Castino et al., 2007](#)). Son implication est révélée par l'accumulation de HNE à l'intérieur des lysosomes grâce à un co-marquage anti-HNE / anti-Lamp-1 (*lysosomal-associated membrane protein*) (**Figure 19C**, [Hwang et al., 2008](#)) et par le fait que l'exposition à cet aldéhyde réduit le nombre de lysosomes ([Hwang et al., 2008](#)). Ainsi, la rupture de la perméabilité membranaire favorise la libération du zinc contenu transitoirement dans les lysosomes. Cet effet entraîne par conséquent une aggravation de l'élévation des concentrations cytoplasmiques en zinc.

Parallèlement, l'HNE semble être également capable de se lier au transporteur ZP1, responsable de l'efflux de zinc depuis la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire (Smith et al., 2006). La liaison de l'HNE pourrait alors altérer les fonctions du transporteur, inhibant l'évacuation de l'excès de zinc vers l'extérieur de la cellule, aggravant une nouvelle fois l'accumulation du métal de transition dans le cytosol.

D'une autre part, les lysosomes sont impliqués dans la dégradation des protéines via, notamment, un pH acide et l'utilisation d'enzymes telles que des hydrolases fonctionnant en milieu acide. A la suite de la perméabilisation de la membrane lysosomale, une de ces enzymes, la cathepsine D, protéase ubiquitaire distribuée dans les lysosomes, est libéré dans le cytoplasme (Figure 19D et 19E, Hwang et al., 2008), favorisant la dégénérescence neuronale.

L'HNE est donc un autre médiateur des effets toxiques générés par le zinc en conditions excitotoxiques. En dehors de son effet direct sur la perméabilisation de la membrane lysosomale et l'aggravation de l'accumulation du zinc intracellulaire qui en découle, la production d'HNE déclenche un processus d'autophagie astrocytaire (Lee et al., 2009). Les astrocytes représentent une autre population cellulaire du système nerveux central et ont un rôle fondamental dans le fonctionnement physiologique des neurones. Ces cellules gliales sont notamment impliquées dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique, l'approvisionnement en nutriments des neurones, mais également dans la transmission synaptique puisqu'ils sont le troisième acteur dans le modèle de la synapse tripartite (Figure 20). Dans ce modèle, les astrocytes sont, entre autres, impliqués dans la recapture et le réapprovisionnement des neurones en neurotransmetteurs.

Le zinc est un élément clé dans la formation des vacuoles autophagiques (Lee et al., 2009) qui jouent un rôle majeur dans la dégradation des organites et des protéines cellulaires (Mizushima et al., 2008). L'exposition de cultures astrocytaires à un stress oxydatif ( $H_2O_2$ ) ou bien directement à du zinc, favorise la formation de ces vacuoles ainsi que d'autophagolysosomes, fusion entre des vacuoles autophagiques et des lysosomes. Ces vacuoles sont, comme les lysosomes (Hwang et al., 2008), gorgées de zinc et la chélation de ce cation par du TPEN apparaît comme étant protecteur non seulement de

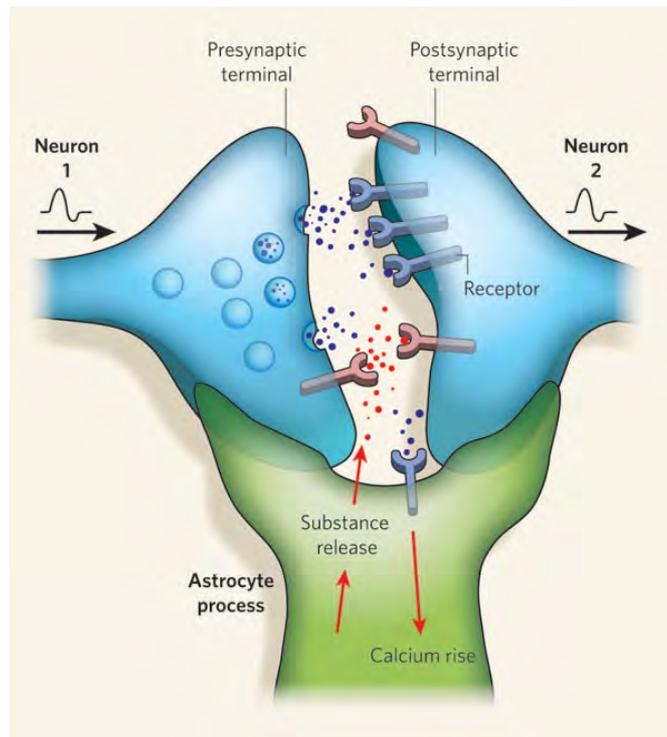


Figure 20 : Schéma d'une synapse tripartite. Allen and Barres, 2009.

la formation de ces vésicules mais également de la mort neuronale qui en résulte (Lee et al., 2009).

Ainsi, le zinc est impliqué dans divers processus délétères associés aux lysosomes via la production d'HNE. Ces organites, comme les mitochondries, ont un rôle de 'puits' de zinc lors de la phase initiale du processus excitotoxique afin de tamponner le cation divalent qui s'accumule dans le neurone. L'élévation du stress oxydatif conduit ensuite à la formation de HNE, un aldéhyde issu de la peroxydation des lipides. Ce composé favorise la rupture de la perméabilité membranaire des lysosomes (LMP) et la fuite d'enzymes protéolytiques dans le cytoplasme. En parallèle, l'accumulation de zinc dans les astrocytes favorise le développement de vacuoles autophagiques et la destruction de nombreuses protéines et organites astrocytaires. En favorisant la dégénérescence de ces cellules gliales impliquées notamment dans l'apport en nutriments des neurones, le mécanisme d'autophagie aggrave le processus de dégénérescence initiée dans les neurones. Bien que ce mécanisme n'ait pas été identifié à ce jour dans les neurones, il peut cependant être facilement envisagé.

A la suite d'une ischémie de parenchyme cérébral (*p. ex.* AVC) ou d'une crise d'épilepsie prolongée, les neurones en souffrance accumulent du zinc. Cette première vague conduit à la production de radicaux libres puisque le cation favorise la rupture des fonctions mitochondriales, l'activation de la cascade PKC/NAPDH ainsi que la génération de NO par la nNOS. L'élévation du stress oxydatif mène à la libération de zinc alors séquestré dans des stocks intracellulaires tels que les mitochondries, les MTs ou encore les lysosomes. Cette deuxième vague de zinc provoque alors un emballement de la production de ROS qui réagissent avec un certain nombre de cibles protéiques dont la p38 MAPK, qui, associée à la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux, déclenchent les phases initiales de l'apoptose neuronale. La peroxydation des lipides génère également des dérivés d'aldéhydes tels que l'HNE. Ce dernier, en induisant le processus de LMP et d'autophagie, participe à la dégénérescence neuronale. En activant de nombreuses voies dont les effets se recoupent, le zinc agit comme un puissant médiateur de la mort neuronale en conditions excitotoxiques. En dehors de ses effets nocifs passant par la production et la réactivité des ROS, le zinc est également capable d'agir directement sur le métabolisme énergétique des neurones en amont de la chaîne respiratoire.

#### **III.A.4. Mécanismes indépendants de la mitochondrie conduisant à une réduction de la production d'ATP**

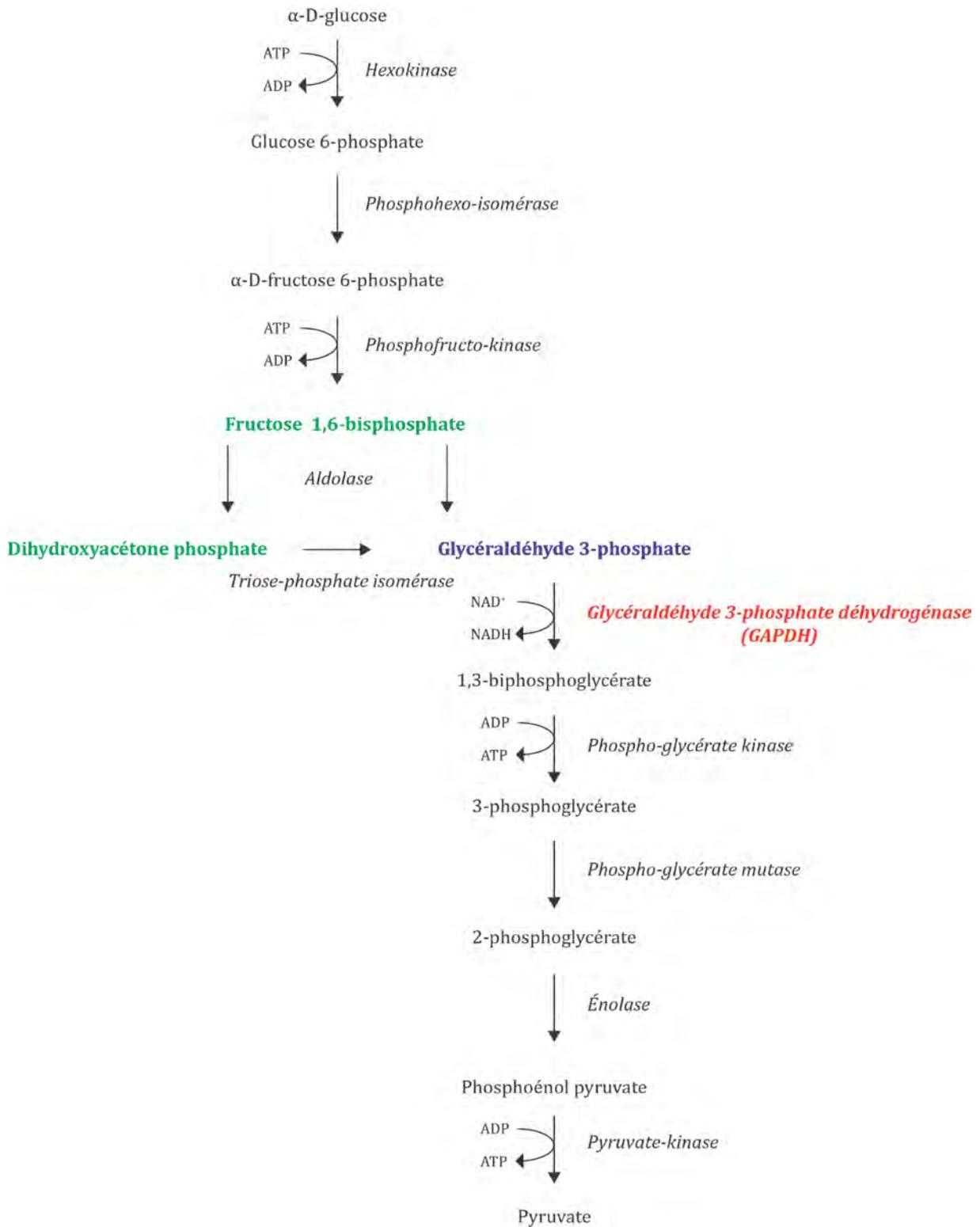
Comme évoqué plus haut (*Cf.* partie III.A.2), les fortes concentrations intracellulaires en zinc excitotoxique sont associées à une perturbation des fonctions mitochondriales et notamment à un affaissement de la production d'ATP par inhibition du complexe III de la chaîne de transport des électrons (Hunter and Ford, 1955; Skulachev et al., 1967; Link and von Jagow, 1995; Bossy-Wetzel et al., 2004; Dineley et al., 2005). Le zinc peut également interférer avec les systèmes de production énergétique de la cellule en amont de la chaîne respiratoire, directement depuis le cytoplasme, en favorisant le catabolisme du nicotinamide adénine dinucléotide sous forme oxydée (NAD<sup>+</sup>, Krotkiewska and Banas, 1992; Sheline et al., 2000; Kim and Koh, 2002; Cai et al., 2006) ou bien en bloquant la glycolyse, une étape clé du métabolisme glucidique.

#### III.A.4.a. Inhibition de la GAPDH par le zinc

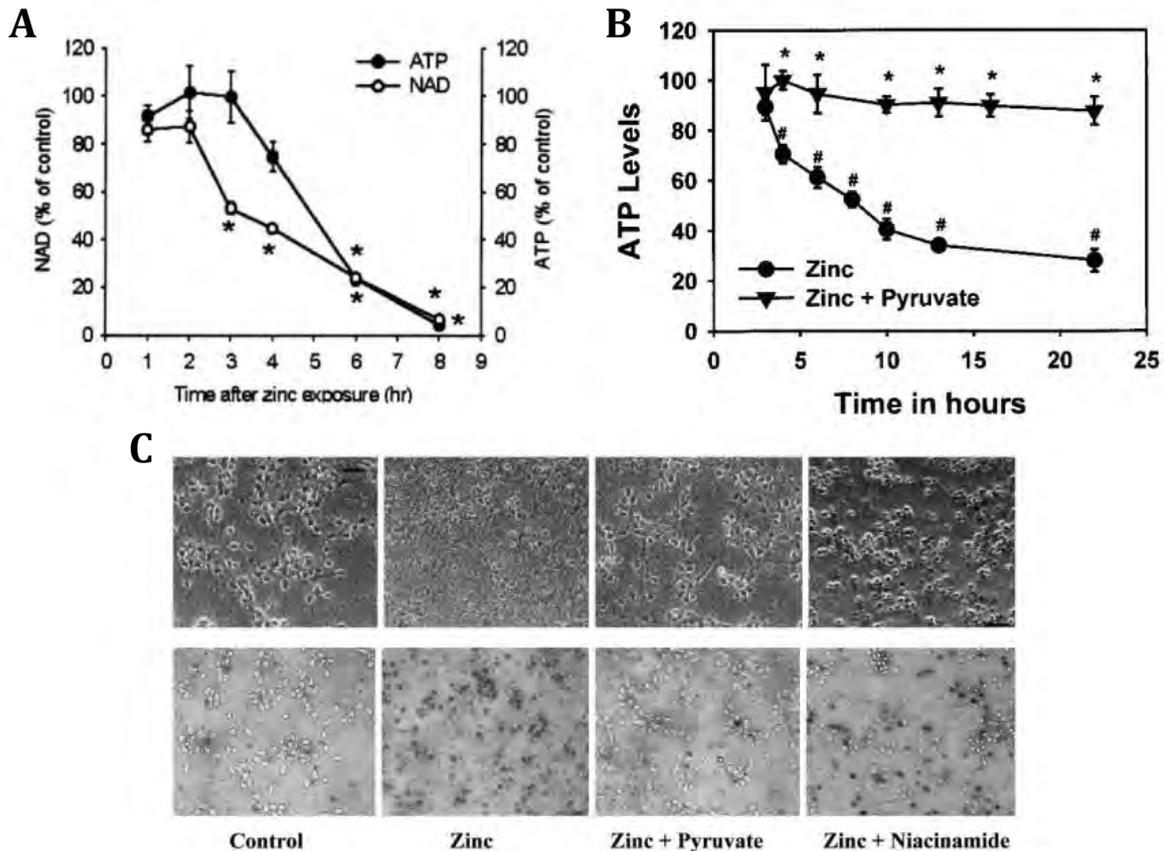
La glycolyse est la première étape du métabolisme glucidique. Cette chaîne de réactions enzymatiques est essentielle puisqu'elle permet la synthèse de pyruvate à partir du glucose (**Figure 21**). Le pyruvate est un élément clé, seul produit capable de pénétrer au cœur des mitochondries, il est l'intermédiaire entre la glycolyse et le cycle de Krebs. L'une des enzymes impliquée dans la synthèse du pyruvate est la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), un oxydoreductase utilisant comme co-facteur le  $\text{NAD}^+$  pour catalyser la synthèse de 1,3-biphosphoglycérate à partir de glycéraldéhyde-3-phosphate (**Figure 21**). Le zinc est capable de bloquer cette enzyme en solution ([Krotkiewska and Banas, 1992](#)) mais également dans un milieu plus natif. En effet, l'exposition de neurones en culture de souris à  $40 \mu\text{M}$  de zinc pendant 4 heures est à l'origine d'une accumulation intracellulaire de fructose 1,6-bisphosphate (FBP) et de dihydroxyacetone phosphate (DHAP), deux précurseurs du glycéraldéhyde-3-phosphate, témoins de l'arrêt de sa conversion en 1,3-biphosphoglycérate (**Figure 21**, [Sheline et al., 2000](#)). En bloquant directement la GAPDH, le zinc empêche non seulement la synthèse d'une des deux molécules d'ATP produites au cours de la glycolyse, mais surtout l'obtention de pyruvate, élément intermédiaire essentiel au bon fonctionnement du cycle de Krebs et par conséquent de la chaîne de transport des électrons.

#### III.A.4.b. Induction du catabolisme du $\text{NAD}^+$ par le zinc

En amont de la chaîne respiratoire, la glycolyse et le cycle de l'acide citrique permettent, entre autre, la production de NADH via la réduction enzymatique du  $\text{NAD}^+$ . Le NADH est en retour oxydé en  $\text{NAD}^+$  au cours des nombreuses étapes de la chaîne de transport des électrons, réaction participant notamment à la formation d'un gradient de proton nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (ou complexe V de la chaîne de transport des électrons). Cet effet du zinc sur le catabolisme du  $\text{NAD}^+$  (et par conséquent sur la production d'ATP), a notamment été mis en évidence par le fait que la production de  $\text{NAD}^+$  et d'ATP chute drastiquement après exposition de neurones en cultures à  $400 \mu\text{M}$  de zinc (**Figure 22A**, [Sheline et al., 2000](#); [Kim and Koh, 2002](#)). L'effet du zinc sur les niveaux de ces deux molécules passe bien par une augmentation du catabolisme du



**Figure 21 : Schéma de la glycolyse.** En rouge, GAPDH, enzyme inhibé par le zinc. En vert, Fructose 1,6-bisphosphate et Dihydroxyacétone phosphate, les précurseurs du Glycéraldéhyde 3-phosphate (en bleu).



**Figure 22 : Le zinc accélère le catabolisme du NADH.** A. L'exposition de neurones en culture à 400  $\mu\text{M}$  de zinc pendant 15 minutes affaïsse les niveaux cellulaires de NADH et d'ATP. B. La présence de pyruvate (4 mM) prévient la déplétion en ATP à la suite de l'exposition de neurones en cultures à 40  $\mu\text{M}$  de zinc. C. Le zinc induit une neurodégénérescence des neurones partiellement inhibée par l'utilisation de pyruvate (4 mM) ou de niacinamide (1 mM). Ligne du haut, microscopie à fond clair. Ligne du bas, marquage des neurones morts à l'aide de bleu de trypan. Barre d'échelle, 50  $\mu\text{M}$ . \* et # indiquent une différence significative ( $p < 0.05$ ) selon un test de Student. Adapté de Kim and Koh, 2002 (A) et Sheline et al., 2000 (B et C).

NAD<sup>+</sup> car l'addition de niacinamide, un inhibiteur du catabolisme du NAD<sup>+</sup>, favorise la survie des neurones en culture (Figure 22C, Sheline et al., 2000). Ces résultats sont également renforcés par le fait que l'ajout de pyruvate dans le milieu permette à la fois de restaurer les niveaux de NAD<sup>+</sup> et d'ATP mais également d'améliorer la survie neuronale (Figure 22B et 22C, Sheline et al., 2000). Dans ce contexte, l'action du pyruvate passe majoritairement par une restauration des niveaux de NAD<sup>+</sup> grâce à sa transformation en lactate par la pyruvate déshydrogénase, enzyme permettant la synthèse du cofacteur. En effet l'ajout de pyruvate augmente les niveaux de lactate et en parallèle, l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase n'améliore pas les paramètres cellulaires (Sheline et al., 2000).

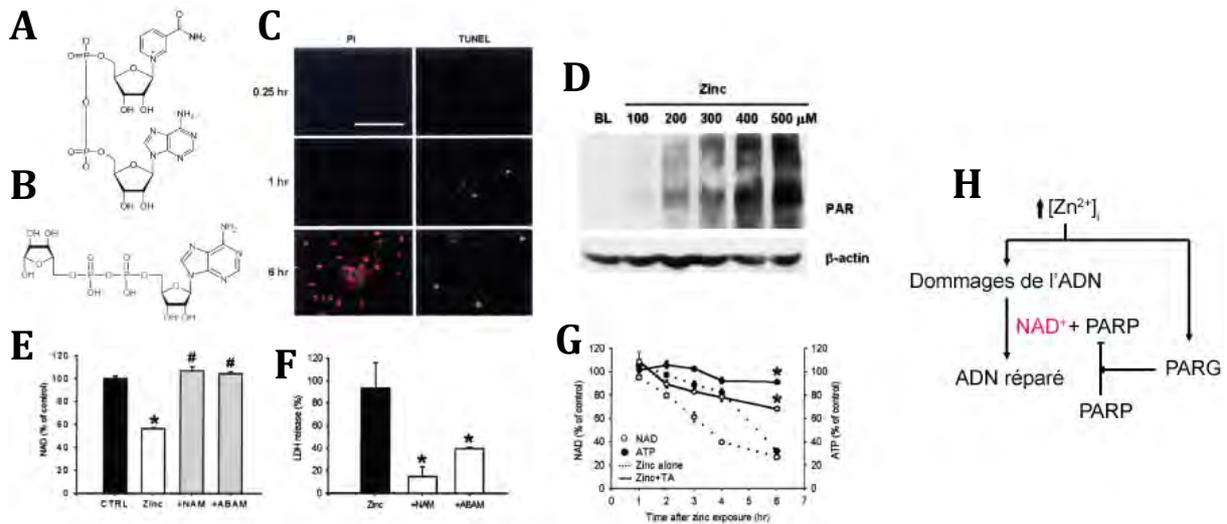
Ainsi, bien que l'action directe du zinc sur le catabolisme du NAD<sup>+</sup> n'ait pas été formellement démontrée (par utilisation de TPEN par exemple), il semble que le cation divalent soit capable d'activer des systèmes permettant d'affaiblir les niveaux cellulaires de NAD<sup>+</sup> indispensable au fonctionnement physiologique du métabolisme énergétique. En réduisant la concentration de NAD<sup>+</sup>, le zinc entrave le fonctionnement du cycle de l'acide citrique et de la chaîne respiratoire, favorisant l'affaiblissement de la production d'ATP. De plus, l'épuisement des stocks de NAD<sup>+</sup> ne facilite pas le fonctionnement de la GAPDH qui, indépendamment de son inhibition par le zinc, est dépendante du NAD<sup>+</sup> pour son activité enzymatique.

Deux voies principales de catabolisation du NAD<sup>+</sup> ont été identifiées à ce jour.

#### **III.A.4.b.i. Activation de la boucle PARP/PARG par le zinc**

La première voie de catabolisation du NAD<sup>+</sup> passe par l'activation de la boucle poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) / poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG), l'une des voies majoritaires de catabolisation du NAD<sup>+</sup> activées par le zinc (Kim and Koh, 2002). Le système PARP/PARG est physiologiquement impliqué dans les processus de réparation de l'ADN. A la suite d'une cassure dans le matériel génétique (Cf. parties III.A.2.d et III.A.3), l'enzyme PARP transfère de façon covalente des polymères de 50 à 200 ADP-riboses sur des protéines nucléaires chargées de réparer l'ADN. Or la source d'ADP-ribose utilisée par l'enzyme PARP provient du NAD<sup>+</sup> (Figure 23A et 23B). Ce cofacteur est donc indispensable au fonctionnement de l'enzyme. Afin d'éviter un emballement du système, et donc une surconsommation de NAD<sup>+</sup>, la PARP transfère également des poly(ADP-riboses) (PAR) sur elle-même ayant pour conséquence une auto-inhibition de l'enzyme. Cependant, ces PAR peuvent être rapidement excisés par l'enzyme PARG, réactivant ainsi la PARP (Figure 23H).

De par la production de ROS, l'accumulation intracellulaire de zinc excitotoxique favorise la formation de cassures dans l'ADN des neurones (Cf. parties III.A.2.d et III.A.3, Figure 23C, Kim and Koh, 2002). Ces dernières engendrent en retour l'activation de la PARP (Figure 23D, Kim and Koh, 2002), qui, pour initier les mécanismes de réparation de l'ADN, consomme le NAD<sup>+</sup> entraînant une déplétion d'abord du co-facteur, puis en



**Figure 23 : Dommages de l'ADN, activation de la boucle PARP/PARG et déplétion en NADH induite par le zinc excitotoxique.** **A.** Structure chimique du NAD. **B.** Structure chimique d'un ADP ribose. **C.** Le zinc favorise la formation de cassure de l'ADN en parallèle de la mort neuronale. Marquage de neurones en culture par de l'iodure de propidium (PI, mort neuronale) et par la technique TUNEL (cassure de l'ADN) 15 minutes, 1 et 6 heures après une exposition de 15 minutes à 400  $\mu\text{M}$  de zinc. Barre d'échelle, 100  $\mu\text{M}$ . **D.** L'exposition de neurones en cultures à différentes concentrations de zinc pendant 15 minutes favorise l'induction de la PARP.  $\beta$ -actine, protéine témoin assurant que la même quantité d'extrait cellulaire a été chargée lors de la réalisation du western blot. **E.** L'inhibition de la PARP prévient la déplétion en  $\text{NAD}^+$  induite 3 heures après une exposition de neurones en culture à 400  $\mu\text{M}$  de zinc pendant 15 minutes. NAM et ABAM 20 mM. **F.** L'inhibition de la PARP prévient la mort neuronale estimée à l'aide de la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) induite 18 heures après une exposition de neurones en culture à 400  $\mu\text{M}$  de zinc pendant 15 minutes. NAM et ABAM 20 mM. **G.** L'utilisation d'acide tannique (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), un inhibiteur de la PARG après une exposition de 15 minutes à 400  $\mu\text{M}$  de zinc prévient la déplétion en ATP et NADH induite par le zinc excitotoxique. \* et # indiquent une différence significative ( $p < 0.05$ ) selon un test de Student. Les bars d'erreur représentent l'écart-type. **H.** Schéma des effets du zinc sur la boucle PARP/PARG. Adapté de *Kim and Koh, 2002* (A-G).

ATP (**Figure 22A**, *Kim and Koh, 2002*). C'est cette dépression énergétique retardée qui sera par la suite à l'origine de la dégénérescence des neurones (**Figure 23C**, *Kim and Koh, 2002*). En effet, l'inhibition de la PARP par du nicotinamide (NAM) ou du 3-aminobenzamide (ABAM), atténue la déplétion en  $\text{NAD}^+$  ainsi que la mort neuronale (**Figure 23E et 23F**, *Kim and Koh, 2002*).

Le zinc provoque en parallèle l'activation excessive de la PARG, cette enzyme qui empêche l'auto-inhibition de la PARP (*Cf.* ci-dessus). En effet, l'application d'acide tannique, un inhibiteur de la PARG, diminue la mort neuronale sans affecter les niveaux de PARP (**Figure 23G**, *Kim and Koh, 2002*).

En activant la boucle PARP/PARG, le zinc met en œuvre une voie majeure de catabolisation du  $\text{NAD}^+$ . En épuisant les réserves neuronales de ce cofacteur

indispensable au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire, le zinc favorise une déplétion cellulaire en ATP menant, à terme, à la dégénérescence des neurones (**Figure 23H**).

### III.A.4.b.ii. Activation de la voie des sirtuines par le zinc

Les sirtuines sont des déacétylases qui catalysent l'élimination de groupements acétyles issus de résidus lysine en utilisant comme cofacteur le  $\text{NAD}^+$  (**Figure 24**). Ces enzymes sont impliquées dans la régulation de la vieillesse, de la transcription mais également de l'apoptose car l'élimination de ces groupements à la surface des facteurs de transcription et des histones influence leur activité (Cai et al., 2006). Indispensable au fonctionnement physiologique des neurones, la voie des sirtuines est cependant activée de façon excessive lors des processus excitotoxiques et accélère par conséquent la déplétion du stock de  $\text{NAD}^+$  nécessaire à leur activité. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie des sirtuines tels que le sirtinol ou 2-hydroxynaphthaldehyde (tous deux à 10 ou 30  $\mu\text{M}$ ) atténue à la fois les effets neurotoxiques chroniques et aigus provoqués par l'application de 400  $\mu\text{M}$  de zinc pendant 15 minutes sur des neurones en culture. A l'inverse, le resveratrol ou la fisétin (tous deux à 10  $\mu\text{M}$ ), deux activateurs de cette voie, montrent des effets opposés, favorisant le catabolisme du  $\text{NAD}^+$  et la neurotoxicité qui en découle. (Cai et al., 2006).

Ainsi, à la suite d'événements excitotoxiques, tels qu'observés après une ischémie cérébrale, le zinc, entrave directement et indirectement le métabolisme énergétique neuronal. Par la voie des sirtuines et l'activation de la boucle PARP/PARG, le zinc excitotoxique accélère le catabolisme du  $\text{NAD}^+$ . En parallèle, il promeut l'inhibition de la

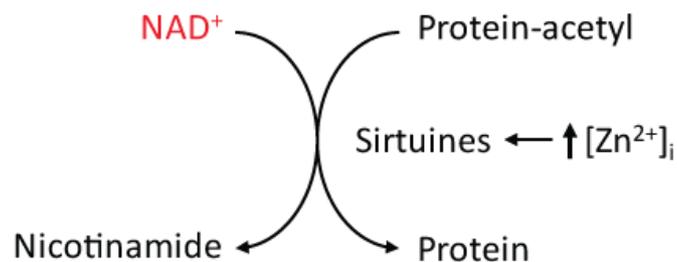


Figure 24 : Effet du zinc sur la voie des sirtuines.

GAPDH qui, associé à la raréfaction de son co-facteur (NAD<sup>+</sup>), bloque la glycolyse et réduit la synthèse de pyruvate, l'intermédiaire avec le cycle de Krebs. L'action nette du zinc excitotoxique sur le métabolisme énergétique conduit à un épuisement des stocks en ATP favorisant la dégénérescence neuronale. Les cascades cellulaires activées par le zinc et ses effecteurs moléculaires sont autant de pistes thérapeutiques potentiellement intéressantes dans la prise en charge des troubles associés à l'excitotoxicité.

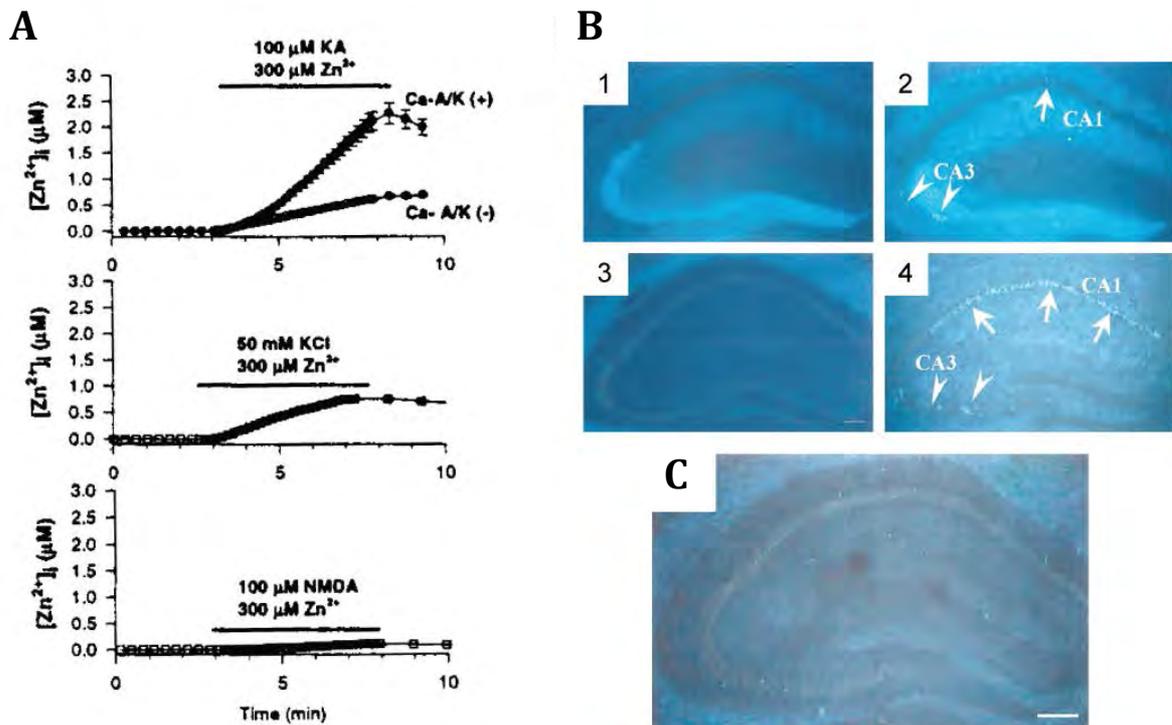
### III.A.5. Sources du zinc excitotoxique, une question débattue

L'augmentation excessive des concentrations cytoplasmiques en zinc sont délétères. Bien que l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde sur son rôle essentiel dans l'initiation et la perpétuation du processus excitotoxiques, la source même du zinc fait toujours débat. Deux visions s'opposent: une origine extracellulaire vs intracellulaire.

L'hypothèse extracellulaire de l'origine du zinc vient notamment du constat que ce dernier est co-stocké avec le glutamate dans les vésicules synaptiques ([Sindreu et al., 2003](#)). La répartition spatiale du zinc dans ces vésicules en fait un excellent candidat pour participer à l'excitotoxicité depuis le milieu extracellulaire puisque lors de la survenue d'une ischémie cérébrale ou d'une crise d'épilepsie prolongée (*status epilepticus*), l'hyperactivité du réseau neuronale conduit à un excès de libération de glutamate et de zinc à la synapse (pour revue, voir [Dong et al., 2009](#) et [Wang and Qin, 2010](#)). Or, de la même façon que le calcium, le zinc libre peut diffuser vers le milieu intracellulaire des neurones au travers de certains iGluRs (*Cf.* partie II.C.1.c). En effet, dès le début des années 1990, de nombreux laboratoires rapportent une « translocation » du zinc du compartiment vésiculaire présynaptique vers le compartiment cytoplasmique postsynaptique lors de la survenue de ces situations pathologiques (**Figure 10**, [Frederickson et al., 1989](#); [Koh et al., 1996](#); [Wei et al., 2004](#)). Le fait que la concentration en zinc augmente parallèlement dans l'espace extracellulaire (et donc théoriquement à la synapse) et dans le cytoplasme des neurones lors d'événements ischémiques ([Wei et](#)

al., 2004) laisse penser que le cation divalent entre dans les neurones en utilisant les canaux et récepteurs ionotropiques participant à la transmission synaptique.

A la différence du calcium qui a la même capacité à passer au travers les rNMDAs, rAMPA-CPs et les VGCCs, le zinc lui entre dans les neurones majoritairement via les rAMPA-CPs (Cf. partie II.C.1.c, Sensi et al., 1999; Noh et al., 2005; Medvedeva et al., 2017). La contribution des VGCCs semble être plus limitée, voir quasi inexistante pour les rNDMA (rAMPA-CP > VGCC > rNMDA, **Figure 25A**, Sensi et al., 1999; Noh et al., 2005). Il est cependant important de noter que l'évaluation du passage du zinc au travers des rNMDAs a été faite sans dépolarisation des neurones en culture ou, plus simplement, en l'absence de magnésium dans le milieu extracellulaire (Cf. conditions expérimentales décrites en légende de la **Figure 25A**). En effet, en conditions



**Figure 25 : Remise en cause de l'origine synaptique du zinc excitotoxique.** **A.** Le zinc peut passer au travers des récepteurs AMPA perméables au calcium. Les concentrations en zinc sont estimées par l'intermédiaire de l'élévation du signal de fluorescence de la sonde Newport green dans des neurones en culture. L'exposition au kainate (KA) se fait en présence d'un bloqueur des rNMDA (MK-801, 10 µM). L'exposition au KCl (afin de déclencher l'ouverture des canaux VGCCs par dépolarisation) se fait en présence de bloqueurs des rAMPA et rNMDA (respectivement NBQX, 10 µM et MK-801, 10 µM). L'exposition au NMDA (agoniste des récepteurs NMDA) se fait en présence d'un bloqueur des rAMPA (NBQX, 10 µM). **B.** Accumulation de zinc dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe de souris ZnT3 KO. Crise d'épilepsie (status epilepticus) déclenchée par injection intrapéritonéal de kainate (40mg/kg) et stoppée deux heures après par injection de phénytoïne (50 mg/kg). Marquage de fluorescence du zinc à l'aide de la sonde TFL-Zn. (1) et (2), souris de type sauvage. (3) et (4) souris ZnT3 KO. **C.** L'utilisation du CaEDTA atténue le marquage zinc dans les neurones de l'hippocampe. Mêmes conditions expérimentales que B. sur des souris ZnT3 KO. L'injection de kainate a été réalisée en parallèle d'une injection intra-ventriculaire de 300 mM de CaEDTA. Barre d'échelle, 500 µM. Adapté de Sensi et al., 1999 (A) et de Lee et al., 2000 (B-C).

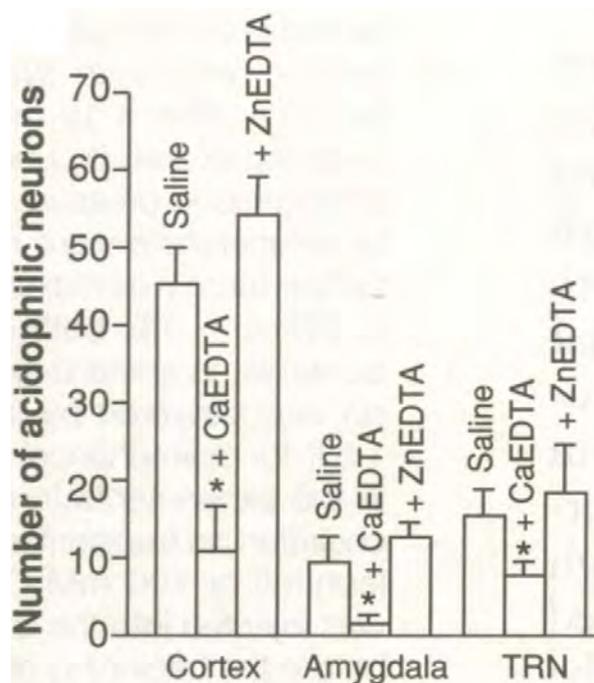
physiologiques et en l'absence de dépolarisation membranaire, les rNMDAs sont bloqués par le magnésium. Ainsi, en ne favorisant pas la levée du blocage du canal par le magnésium, le passage du zinc au travers du rNMDA a probablement été sous-évalué.

Dans cette vision d'une origine extracellulaire du zinc excitotoxique, le zinc vésiculaire serait ainsi transféré depuis l'élément présynaptique vers les neurones postsynaptiques via certains iGluRs, engendrant les effets délétères décrits précédemment.

En parallèle de l'hypothèse extracellulaire s'est développée celle prônant une origine intracellulaire des augmentations cytotoxiques en zinc. Cette théorie part du constat que des souris pour lesquelles le gène du transporteur neuronal du zinc vésiculaire (ZnT3, *Cf.* partie II.B.3) a été sélectivement supprimé (souris ZnT3-KO, [Palmiter et al., 1996](#); [Cole et al., 1999](#)), accumulent le cation divalent dans le corps cellulaires des cellules CA1 et CA3 de l'hippocampe après injection épiléptogène de kaïnate (**Figure 25B**, [Lee et al., 2000](#)). En observant une accumulation neuronale de zinc en absence de son pool vésiculaire, ces résultats remettent en cause la théorie de selon laquelle le zinc excitotoxique résulte d'un transfert du zinc vésiculaire depuis les vésicules synaptiques vers le neurone postsynaptique ([Frederickson et al., 1989](#); [Koh et al., 1996](#); [Wei et al., 2004](#)). L'origine du métal de transition pourrait quand même être extracellulaire sans pour autant être synaptique car l'injection de CaEDTA, un chélateur du zinc *non perméable aux membranes*, atténue l'accumulation intracellulaire de zinc (**Figure 25C**, [Lee et al., 2000](#)). Cependant, il est important de pondérer ce résultat. En effet, [Lee et al.](#), utilisent des concentrations élevées de CaEDTA (300 mM). Or il a été démontré que des concentrations aussi élevées que 100 mM peuvent affecter les concentrations intracellulaires en zinc par équilibre cinétique ([Frederickson et al., 2002](#)). Le fait que le marquage (**Figure 25C**, [Lee et al., 2000](#)) ne soit pas complètement aboli en présence du chélateur, indique qu'une autre source de zinc pourrait être à l'origine de l'augmentation de la concentration du cation divalent dans le neurone. Cette source serait intracellulaire et proviendrait d'un relargage du zinc depuis les stocks internes des neurones tels que les mitochondries, les métallothionéines ou les lysosomes (*Cf.* partie III.A.3.c, [Jiang et al., 1998](#); [Aizenman et al., 2000](#); [Bossy-Wetzel et al., 2004](#); [Dineley et al., 2005](#); [Malaiyandi et al., 2005b](#); [Smith et al., 2006](#); [Hwang et al., 2008](#); [Medvedeva et al., 2017](#)). Dans ce modèle, l'augmentation des concentrations

intracellulaires serait la conséquence d'une élévation du stress oxydatif (Aizenman et al., 2000; Bossy-Wetzel et al., 2004). L'acteur principal de la montée de la production de ROS serait le calcium. En situation excitotoxique, en entrant par les rNMDAs, le calcium induirait l'activation de la nNOS neuronale, entraînant la synthèse de NO et d'ONOO<sup>-</sup>, engendrant les effets évoqués précédemment (Cf. partie III.A.3.b). Ce modèle développé par Bossy-Wetzel et al., 2004 implique donc que les dérégulations calciques précèdent les dérégulations zincergiques, ce qui est en opposition avec les observations de Medvedeva et al., (Cf. partie III.A.6).

Ainsi, même si la communauté scientifique s'accorde sur le fait que le zinc participe, *en parallèle du calcium*, à la dégénérescence neuronale, son origine fait toujours débat. Alors qu'il semble clair que la participation du zinc *vésiculaire* soit limitée dans les modèles utilisés *in vitro*, il semble audacieux d'éliminer sa contribution *in vivo*. En effet, compte tenu du fait que le zinc puisse être libéré massivement à la synapse lors d'événements excitotoxiques et qu'il soit capable de passer au travers des rAMPA-CPs et potentiellement des rNMDAs, il semble difficile de ne pas considérer la



**Figure 26 : L'injection de CaEDTA réduit la mort neuronale induite par le zinc excitotoxique.** Nombre de neurones positifs au marquage par l'acide fuchsin (marqueur de mort neuronale) 72 heures après une ischémie de 10 minutes chez des rats injectés par une solution contrôle (saline), un chélateur de zinc (CaEDTA) ou de calcium (ZnEDTA). TRN, noyaux réticulés du thalamus. \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) selon un test de Student. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Adapté de Koh et al., 1996.

contribution du zinc vésiculaire dans l'augmentation de ses concentrations cytoplasmiques dans les neurones. En dehors d'une origine synaptique, les concentrations physiologiques extracellulaires en zinc restent faibles (Pandey et al., 1982; Palm et al., 1986; Kapaki et al., 1989; Frederickson et al., 2006). L'élévation du stress oxydatif dans l'ensemble du tissu, comme observé lors d'une ischémie cérébrale, pourrait cependant favoriser une libération de zinc depuis des MTs extracellulaires (Uchida et al., 2002), augmentant les concentrations extracellulaires en zinc sans que son origine ne soit synaptique. Ainsi, dans ce modèle, toute augmentation significative en zinc extracellulaire pourrait être à l'origine d'un influx cytoplasmique. Ce modèle est appuyé par le fait que l'injection intra-hippocampique de CaEDTA (1 mM), un chélateur du zinc *non perméable aux membranes*, 30 minutes avant la survenue d'un épisode ischémique, réduit la mort neuronale (Figure 26, Koh et al., 1996). En parallèle, le fait que le zinc puisse être libéré depuis des stocks intracellulaires est également reconnu. Dans l'hypothèse selon laquelle le zinc excitotoxique a une origine intracellulaire, c'est le calcium qui initierait l'élévation du stress oxydatif engendrant par la suite la libération de zinc d'origine intracellulaire (Bossy-Wetzel et al., 2004 vs Medvedeva et al., 2009; Medvedeva et al., 2017). Cependant, grâce aux expériences conduites par Medveda et al., (Cf. partie III.A.6), nous savons que les dérégulations calciques surviennent après les montées de zinc, remettant en question cette séquence d'événements. Une origine mixte, extra et intracellulaire, de l'augmentation cytoplasmique en zinc doit probablement être privilégiée. Stress oxydatif et montée de zinc extracellulaire ont toutes les chances de se chevaucher *in vivo* au cours la survenue d'un processus excitotoxique. La contribution relative des deux sources pouvant varier en fonction de la région du cerveau (Medvedeva et al., 2017). Il est également important de rappeler que dans ce contexte, calcium et zinc agissent de façon conjointe sur la dégénérescence neuronale (Medvedeva et al., 2009; Medvedeva et al., 2017).

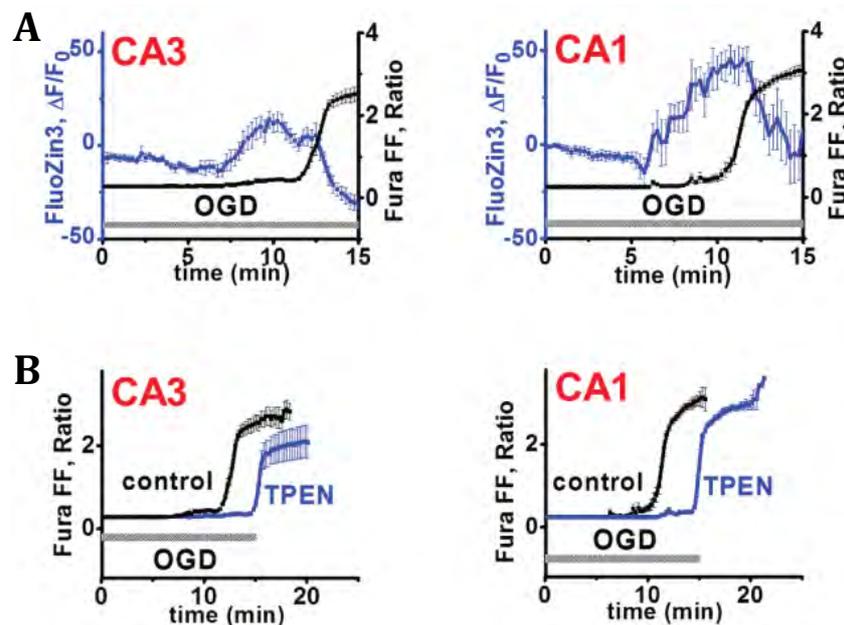
### III.A.6. La contribution relative du zinc et du calcium dans l'excitotoxicité

Bien que l'augmentation cytoplasmique en zinc et son implication dans les processus de neurodégénérescence semblent être claires lors d'une ischémie du parenchyme cérébral ou d'une crise d'épilepsie prolongée, sa contribution relative par

rapport au calcium reste à définir, tant en terme de cinétique d'élévation de leur concentration dans les neurones, que de leur rôle respectifs dans les dommages cellulaires.

### III.A.6.a. Cinétiques relative d'élévation des concentrations en zinc et en calcium excitotoxique

Grâce à l'injection simultanée dans les neurones CA1 et CA3 de l'hippocampe de souris de deux sondes sélectives, l'une pour le calcium (Fura-6F,  $K_d$  calcium = 5.3  $\mu$ M ou Fura-FF,  $K_d$  calcium = 5.5  $\mu$ M) et l'autre pour zinc (FluoZinc-3,  $K_d$  zinc = 15,0.10<sup>-9</sup> M), Medvedeva et al., ont réussi à disséquer les cinétiques d'augmentation des concentrations de ces deux cations l'un par rapport à l'autre (Medvedeva et al., 2009; Medvedeva et al., 2017). Il apparait que l'augmentation du zinc précède et induise les



**Figure 27: Cinétique relative d'augmentation des concentrations en zinc et en calcium excitotoxique.** *A.* L'ischémie induit des montées de zinc intracellulaires précédant les dérégulations calciques dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe. CA3, montée de zinc à partir de 7.7 minutes ; calcium, 11.6 minutes ( $n = 9$ ). CA1, montée de zinc à partir de 7.5 minutes ; calcium, 10.6 minutes ( $n = 8$ ). Pas de différence significative entre CA3 et CA1 ( $p = 0.452$ , ANOVA). *B.* L'augmentation du zinc intracellulaire conditionne mais est non nécessaire aux dérégulations calciques. TPEN, 40  $\mu$ M. CA3, contrôle, montée de calcium à partir de 11.2 minutes ; TPEN, 14.4 minutes ( $n = 6$ ) ; CA1, contrôle, montée de calcium à partir de 10.6 minutes ; TPEN, 14.7 minutes ( $n = 9$ ). Pas de différence significative entre CA3 et CA1 ( $p = 0.62$ , ANOVA). Adapté de Medvedeva et al., 2017.

dérégulations calciques classiquement observées lors d'un protocole d'ischémie (OGD). Cet effet est observable dans les cellules principales des deux régions CA1 et CA3 de l'hippocampe, comme le montre l'augmentation du signal de fluorescence de la sonde FluoZin-3 en amont de celle de la sonde Fura-FF (**Figure 27A**, Medvedeva et al., 2009; Medvedeva et al., 2017). L'augmentation du zinc intracellulaire conditionne mais n'est pas nécessaire à l'apparition de la dérégulation calcique car dans ces deux régions, la vague de calcium est retardée, mais bien présente, en absence de zinc (grâce à l'utilisation de TPEN, **Figure 27B**, Medvedeva et al., 2009; Medvedeva et al., 2017).

Ainsi, la montée de zinc survenant à la suite d'une ischémie cérébrale joue un rôle clé dans le déclenchement des dérégulations calciques. Bien que non nécessaire, elle accélère cependant son apparition.

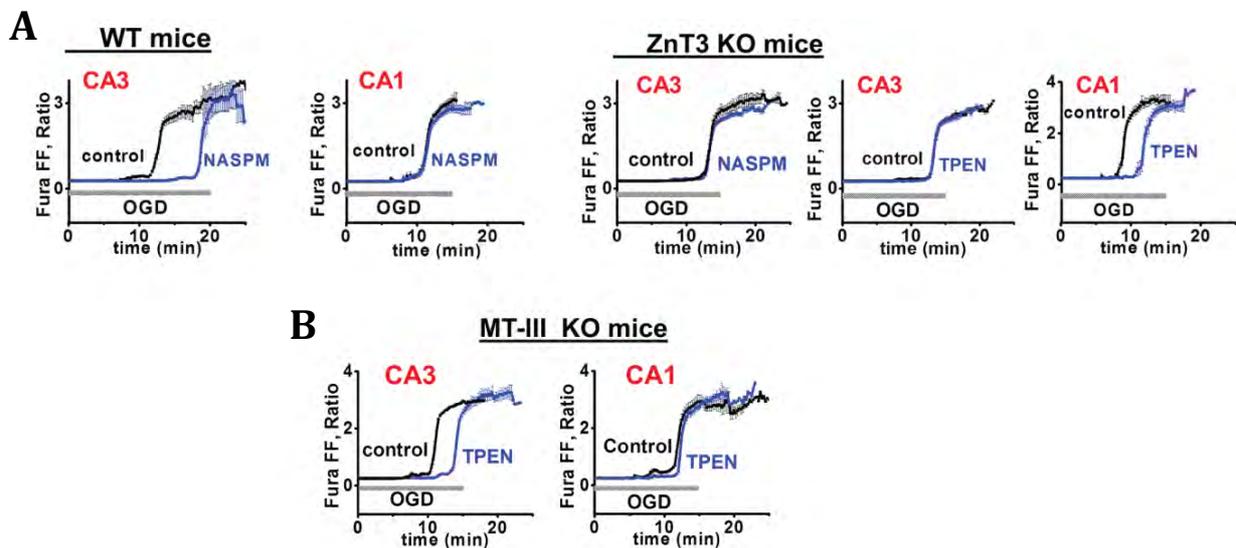
### III.A.6.b. La source de zinc excitotoxique est région-dépendante

En parallèle, Medvedeva et al., montrent *pour la première fois* que la source de zinc excitotoxique (extracellulaire vs intracellulaire, Cf. partie III.A.5) est dépendante de la région cérébrale. En effet, le blocage pharmacologique du passage du zinc ou du calcium *synaptique* au travers des rAMPA-CPs (à l'aide de 1-naphthyl acetyl spermine - NASPM, un bloqueur du pore de ces récepteurs canaux) décale la survenue de la dérégulation calcique (**Figure 28A**, Medvedeva et al., 2017) uniquement dans la région CA3 de l'hippocampe et uniquement dans le cas où les souris possèdent du zinc synaptique (que l'on peut enlever soit pharmacologiquement à l'aide de TPEN, ou en utilisant comme modèle d'étude des souris ZnT3-KO, **Figure 28A**, Medvedeva et al., 2017). Cet effet reflète l'importance du zinc vésiculaire dans les dommages des cellules CA3 de l'hippocampe puisqu'en empêchant son passage dans le neurone via les rAMPA-CPs ou en l'éliminant de la synapse, on décale dans le temps la survenue des dérégulations calciques et donc la mort neuronale.

Le cas inverse se produit dans la région CA1 de l'hippocampe, le blocage des AMPA-CP par le NASPM n'entraîne aucun effet, cependant, la chélation du zinc avec du TPEN, *malgré l'absence de zinc synaptique*, engendre une protection vis-à-vis de la

dérégulation calcique (**Figure 28A**, Medvedeva et al., 2017). Cela implique que la source de zinc est, dans ce cas, intracellulaire puisque le blocage de son entrée dans les neurones grâce au NASPM associé à son absence dans les vésicules synaptiques, n'a pas d'effet protecteur vis-à-vis de la vague calcique, à la différence de la chélation du zinc intracellulaire par le TPEN.

Ainsi, dans le cas de CA3, le zinc excitotoxique est principalement d'origine vésiculaire et passerait via les rAMPA-CPs pour pénétrer dans les cellules avant d'exercer ses effets délétères décrits précédemment. Inversement, dans le cas des cellules principales de la région CA1 de l'hippocampe, la source de zinc est intracellulaire. Cette source de zinc correspond en réalité aux MT-III puisque la délétion de leur gène chez la souris (souris MT-III KO, Erickson et al., 1997) abolit l'effet protecteur du TPEN sur la dérégulation calcique (**Figure 28B**, Medvedeva et al., 2017). Ces résultats montrent, non seulement que la source de zinc est dépendante du contexte, mais qu'il en va également des protéines de stockages intracellulaires de zinc, tels que les MT-III. Dans le cas des cellules principales de CA1, en libérant le zinc vésiculaires, les



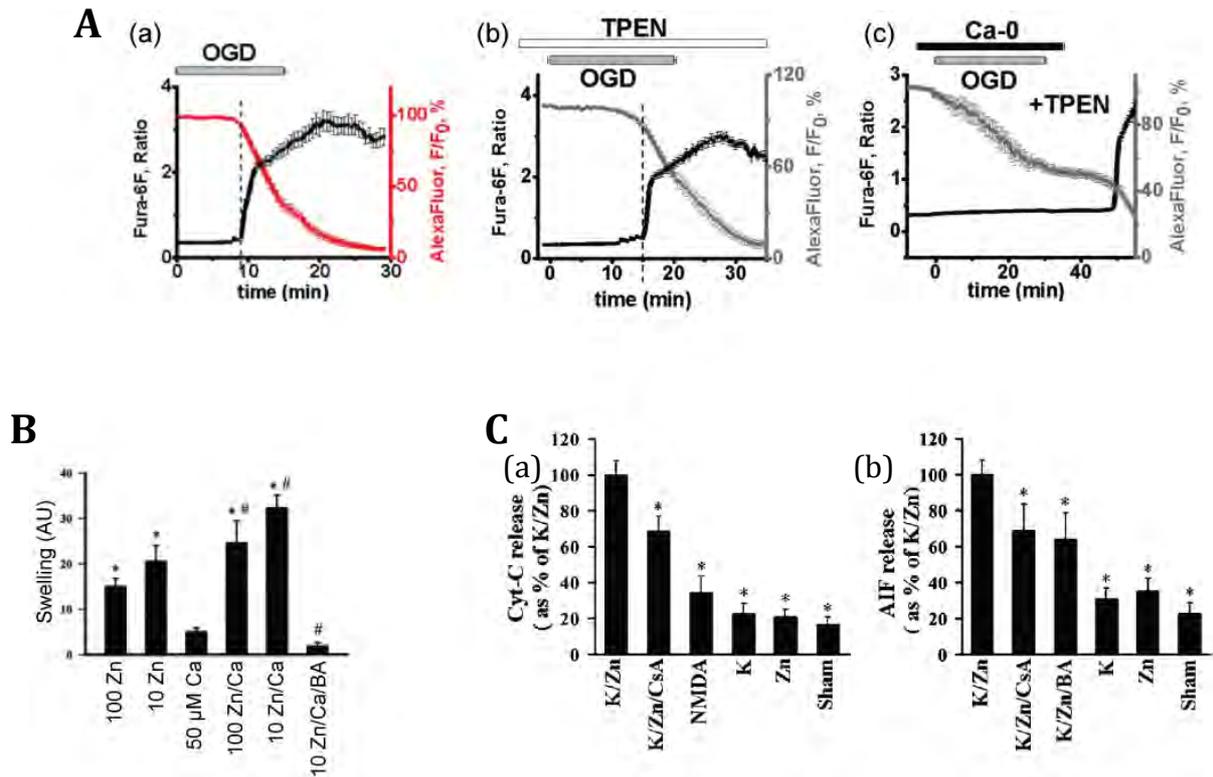
**Figure 28 : La source de zinc excitotoxique est région-dépendante. A.** La source de zinc excitotoxique (extracellulaire vs intracellulaire) est région dépendante. Le blocage de l'entrée du zinc synaptique à l'aide de NASPM, un bloqueur des rAMPA-CPs, ou bien par élimination du cation à la synapse (grâce au TPEN ou aux souris ZnT3 KO) décale la survenue des dérégulations calciques dans CA3 (gauche) mais n'a aucun effet dans CA1 (droite). NASPM, 100  $\mu$ M, TPEN, 40  $\mu$ M. **B.** La délétion génétique des MT-III révèle leur contribution dans la libération de zinc excitotoxique puisque leur absence élimine la contribution du zinc sur la dérégulation calcique (même profil qu'en B.). TPEN, 40  $\mu$ M. CA3, contrôle, montée de calcium à partir de 10.2 minutes ; TPEN, 13.6 minutes ( $n = 8$ ) ; CA1, contrôle, montée de calcium à partir de 11.6 minutes ( $n=9$ ) ; TPEN, 12.0 minutes ( $n = 7$ ). Adapté de Medvedeva et al., 2017.

MT-III ont un effet pro-toxique dans un contexte ischémique, favorisant l'augmentation des concentrations intracellulaires. A l'inverse, dans les cellules CA3, les MT-III sont peu impliquées dans les phénomènes d'excitotoxicité, ayant plutôt une fonction de tampon zinc, limitant l'élévation de ses concentrations intracellulaires. Ces effets ont été validés sur le modèle de souris MT-III KO sujettes à des crises d'épilepsie par injection de kaïnate. L'absence de ces protéines ayant un effet protecteur pour les cellules de CA1 de l'hippocampe et toxique pour CA3 (Erickson et al., 1997).

### III.A.6.c. Contribution relative du zinc et du calcium aux dommages cellulaires

Lors de la survenue d'un événement excitotoxique, zinc et calcium entrent dans les neurones et activent diverses cascades enzymatiques associées à la dégénérescence cellulaire (Dong et al., 2009; Sensi et al., 2009; Wang and Qin, 2010). Bien que le zinc favorise la survenue des dérégulations calciques (Cf. ci-dessus), la contribution relative de ces deux cations quant à leurs effets neurotoxiques reste à définir. Ce paramètre a notamment été caractérisé par Medvedeva et al., en évaluant l'incidence du zinc et du calcium sur la perméabilisation de la membrane des neurones, un symptôme majeur de neurodégénérescence.

AlexaFluor-488, est un marqueur de fluorescence insensible aux ions et aux diverses conditions oxydoréductives de la cellule. Une fois injecté dans les neurones CA1 de l'hippocampe de souris, toute diminution de son intensité de fluorescence indique alors une rupture de la perméabilité membranaire et de sa diffusion dans le milieu extracellulaire. Le décalage dans le temps de la diminution de l'intensité de fluorescence de ce marqueur en absence de zinc, indépendamment de la présence de calcium dans le milieu, révèle la participation essentielle du zinc dans l'induction, non seulement de la dérégulation calcique, mais également dans la phase initiale des dommages cellulaires (Figure 29A, Medvedeva et al., 2009). Ainsi, en décomposant les cinétiques d'augmentation du zinc et du calcium intracellulaire par rapport à la diminution de la perméabilité membranaire des neurones, Medvedeva et al., montrent que lors de processus ischémiques associés à des phénomènes excitotoxiques, l'élévation précoce



**Figure 29 : Contribution relative du zinc et du calcium aux dommages cellulaires.** *A.* Le zinc participe à l'initiation des dommages cellulaires excitotoxiques. (a), OGD en présence de zinc et de calcium. (b), OGD en absence de zinc grâce à l'utilisation de TPEN, 40 μM. (c), OGD sans zinc (TPEN, 40 μM) ni calcium. Que ce soit en présence de calcium (b) ou non (c), l'absence de zinc décale dans le temps la survenue de la perte d'intégrité membranaire révélant sa participation dans le processus (a). *B.* Le zinc provoque un gonflement (swelling) plus important que le calcium sur mitochondries isolées. BA, acide bongkreque, 5 μM. Concentrations en nM. \* et # indiquent une différence significative ( $p < 0.05$  respectivement comparé à 50 μM calcium et 100 nM zinc). Les bars d'erreurs représentent l'écart-type. *C.* Le zinc favorise le relargage de facteurs pro-apoptotiques sur des neurones en culture. (a), cytochrome C ; (b), AIF. Les cultures ont été exposées pendant 6 minutes aux composés indiqués. K/Zn, potassium (60 mM), zinc (300 μM) ; CsA, cyclosporine A, 10 μM ; NMDA, 100 μM ; BA, acide bongkreque, 5 μM. \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) comparé à la condition K/Zn. Les bars d'erreurs représentent l'écart-type. Adapté de [Jiang et al., 2001\(B-C\)](#), [Medvedeva et al., 2009\(A\)](#).

du zinc cytoplasmique est impliquée dans la perte initiale de l'intégrité neuronale. Cette montée de zinc précède et favorise les dérégulations calciques ainsi que la neurodégénérescence qui en découle.

Le zinc semble cependant présenter un pouvoir toxique supérieur à celui du calcium. En effet, sur des mitochondries isolées, le zinc induit un gonflement de l'organe plus important que le calcium (**Figure 29B**, [Jiang et al., 2001](#)). Comme détaillé plus haut (*Cf.* partie III.A.2.e), ce gonflement est associé à l'ouverture du MPTP et au relargage de facteurs pro-apoptotiques tels que le Cyt-c et l'AIF. En accord avec les résultats précédents, le zinc favorise un relargage plus important de facteurs pro-apoptotiques que le calcium sur des neurones en culture de rat (**Figure 29C**, [Jiang et al., 2001](#)). Il est cependant important de noter que le gonflement et le relargage de Cyt-c et

d'AIF sur des mitochondries isolées est plus important lorsqu'elles sont exposées à une association de zinc et de calcium que lorsqu'elles sont exposées à un seul des deux cations, en faveur d'une action synergique du zinc et du calcium dans la dégénérescence associée à l'excitotoxicité.

Lors de la survenue d'un choc ischémique, et notamment lors d'AVCs, l'élévation des concentrations intracellulaires en zinc est un élément déclencheur favorisant l'apparition des dérégulations calciques. Bien qu'ayant un pouvoir toxique supérieur au calcium vis-à-vis du déclenchement des processus apoptotiques, ces deux ions agissent de concert dans l'initiation et la perpétuation des processus neurotoxiques. Les nombreuses voies cellulaires et cibles moléculaires à l'origine des effets délétères du zinc sont autant de pistes thérapeutiques pouvant potentiellement conduire à l'identification de traitements permettant la prise en charge de patients souffrants de chocs ischémiques.

### **III.A.7. Perspectives de traitements**

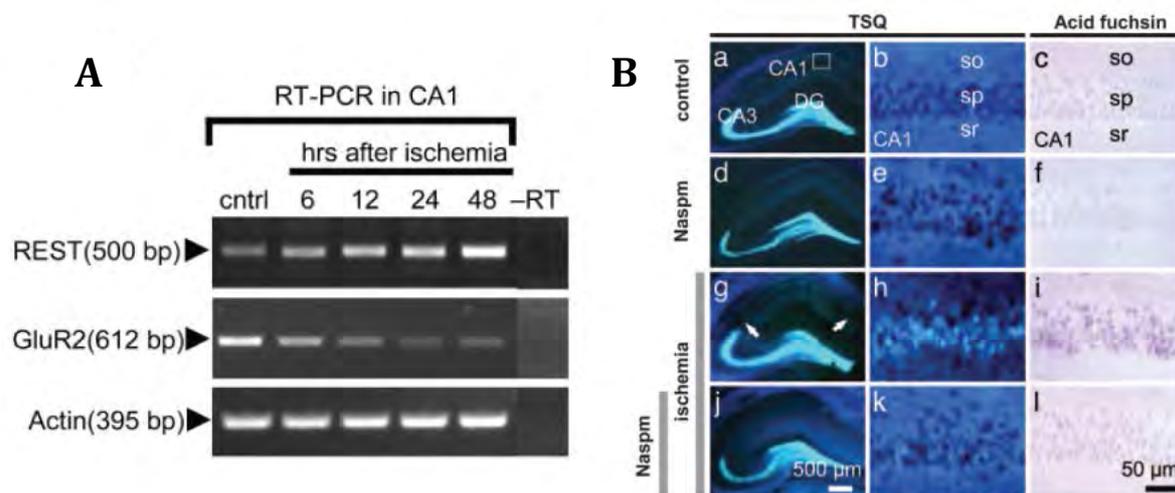
Jusqu'au début des années 1990, le calcium était considéré comme seul médiateur des dommages neuronaux associés à l'excitotoxicité. L'échec des stratégies visant à maintenir ce cation dans des concentrations « physiologiques » lors de la survenue de troubles ischémiques, est en partie dû au fait que la fenêtre thérapeutique de ces traitements est relativement étroite. Depuis, le zinc est apparu comme un acteur clé de ces phénomènes pathologiques et la découverte de son influence sur de nombreuses cascades intracellulaires a permis de révéler de nombreuses cibles médicamenteuses originales, potentiellement intéressantes dans le traitement de pathologies associées à l'ischémie (*p. ex.* AVC).

#### **III.A.7.a. Stratégie visant à restreindre l'entrée neuronale du zinc excitotoxique**

Les effets neurotoxiques du zinc ont pour point de départ l'élévation de sa concentration dans le cytoplasme ([Frederickson et al., 1989](#); [Koh et al., 1996](#); [Aizenman](#)

et al., 2000; Bossy-Wetzler et al., 2004; Wei et al., 2004; Medvedeva et al., 2017). Bloquer l'une des voies d'entrée du métal dans les neurones postsynaptiques, afin de limiter l'augmentation de sa concentration cytoplasmique, s'est révélé comme étant une voie potentiellement intéressante de traitement des troubles ischémiques (Noh et al., 2005).

Le zinc extracellulaire (synaptique ou non) entre dans les neurones via certains iGluRs et notamment via une sous-population de rAMPAs, les rAMPA-CPs. Ces récepteurs sont dépourvus de la sous-unité GluA2, les rendant perméables au zinc et au calcium (Cf. partie II.C.1.c, Sensi et al., 1999; Noh et al., 2005; Medvedeva et al., 2017). Or, il apparaît que dans les heures qui suivent la crise ischémique, l'expression de la sous-unité GluA2 chute drastiquement grâce à l'expression du facteur de transcription *restrictive-element-1-silencing transcription factor* (REST), qui, comme beaucoup de ces facteurs, est doté d'un doigt zinc. Ce facteur a notamment pour cible le gène de la sous-unité GluA2 et est responsable de la réduction de l'expression de ce dernier (Figure 30A, Noh et al., 2005). Cet effet a pour conséquence une augmentation de l'expression à la synapse de rAMPAs dépourvus de la sous-unité GluA2 (rAMPA-CPs), à l'origine d'une entrée massive de zinc dans les neurones postsynaptiques lors de chocs ischémiques (Noh et al., 2005).



**Figure 30 : Neuroprotection associée à la prévention de l'entrée du zinc dans les neurones.** A. L'ischémie induit l'activation du facteur de transcription REST provoquant une réduction de l'expression de la sous-unité GluA2 (notée GluR2 ici) des rAMPA. Gel d'électrophorèse d'ADN obtenue par RT-PCR d'extraits d'hippocampe (CA1) de rats, après traitement par DNase. Les animaux ont été sacrifiés 6, 12, 24 ou 48 heures après un épisode ischémique ou non (contrôle). Actine, témoin assurant que la même quantité a été chargée lors de la réalisation du gel d'électrophorèse. B. Le blocage des rAMPA-CP par le NASPM prévient l'élévation des niveaux de zinc post-ischémique (révélé par la sonde fluorescente TSQ, gauche et centre) et la neurodégénérescence qui en suit (révélé par l'acide fuchsin, droite) dans les cellules CA1 de l'hippocampe. NASPM ou contrôle, injection intra-hippocampique, 40 heures post-ischémiques. Marquages réalisés 72 heures après la chirurgie. Adapté de Noh et al., 2005.

Dans ce contexte, l'injection unique, intra-hippocampique d'un bloqueur des rAMPA-CPs, le NASPM (250  $\mu\text{M}$ ), 40h *après* la survenue de l'épisode ischémique, permet de limiter l'entrée de zinc dans les neurones, révélant un effet neuroprotecteur (**Figure 30B**, [Noh et al., 2005](#)). Dans cette publication [Noh et al.](#), affirment que les montées de zinc *in vivo* surviendraient dans les neurones au moins 48 heures après l'épisode ischémique (corrélées avec la diminution de l'expression de GluA2). Or la demi-vie du NASPM (non précisée) ne serait que de quelques heures. L'effet protecteur des administrations « précoces » de NASPM viendrait alors d'un blocage des rAMPA-CPs exprimés en faible nombre à la synapse au début du choc ischémique. Ce blocage empêcherait l'augmentation initiale de la concentration en zinc. Ainsi, en bloquant la première vague de zinc, le NASPM permettrait de favoriser la survie des neurones et ce, plusieurs heures après la survenue d'un choc ischémique.

Même si les effets observés ici sont relativement faibles (maximum 32,4% de survie neuronale) et que le mécanisme avancé doit être précisé, le blocage de l'entrée du zinc par le NASPM semble être une stratégie intéressante car elle présente une fenêtre thérapeutique large permettant la prise en charge tardive de patients souffrant de troubles ischémiques et notamment d'AVCs.

### III.A.7.b. Stratégies visant à éliminer l'excès de zinc cytoplasmique

Une autre façon permettant de limiter les effets neurotoxiques de l'excès de zinc serait de l'éliminer du cytoplasme. Pour ce faire, de nombreux laboratoires ont montré des effets neuroprotecteurs résultants de l'utilisation de chélateurs sélectifs du zinc en contexte ischémique ([Koh et al., 1996](#); [Bossy-Wetzel et al., 2004](#); [Stork and Li, 2006](#); [Medvedeva et al., 2009](#); [Medvedeva et al., 2017](#)). En particulier, l'administration de CaEDTA (1 mM), un chélateur non perméable aux membranes, directement injecté dans l'hippocampe de rats 30 minutes avant la survenue d'un choc ischémique, montre des effets protecteurs vis-à-vis de la mort neuronale (**Figure 26**, [Koh et al., 1996](#)). De la même façon, l'utilisation d'un chélateur perméable aux membranes tel que le TPEN (100  $\mu\text{M}$ ), appliqué sur des tranches de cerveau de rat au cours d'un épisode ischémique (OGD), révèle les mêmes effets de neuroprotection (**Figure 10D**, [Stork and Li, 2006](#)). De façon intéressante, que le composé soit capable de rentrer dans les neurones (TPEN) ou

non (CaEDTA), il protège des effets délétères du zinc. Ces deux types de chélateurs limitent l'augmentation des niveaux de zinc intracellulaire en agissant à deux niveaux. En restant cantonné à l'espace extracellulaire, le CaEDTA limite les montées de zinc autour des cellules, empêchant ainsi son entrée dans les neurones via les iGluRs. Son action se rapprocherait alors de celle du NASPM, présentée précédemment. D'un autre côté, en passant la membrane, le TPEN chélate le zinc dans le cytoplasme. En réduisant directement la disponibilité du métal dans le neurone, ce chélateur prévient sa réaction avec ses nombreuses cibles intracellulaires qui sont les effecteurs de ses divers effets neurotoxiques.

Même si ces deux chélateurs révèlent des effets neuroprotecteurs, à ce jour, aucune étude n'a montré leur efficacité à distance de l'épisode ischémique, ni même leur impact sur le comportement de souris ou de rats à la suite du choc. En effet, séquestrer le zinc à l'extérieur des neurones pourrait impacter les mécanismes physiologiques de transmission neuronale dans lesquels le zinc est impliqué et ainsi causer des effets secondaires à court ou à moyen terme. En parallèle, la balance des niveaux de zinc dans les neurones est très fine. L'excès de zinc a été démontré comme toxique, mais son absence totale pourrait également s'avérer délétère. Le fait que les cellules aient développé des systèmes complexes permettant de réguler finement les niveaux de zinc dans le cytoplasme (Dittmer et al., 2009; Sensi et al., 2009), indique que le zinc libre intracellulaire joue un rôle physiologique important. Huit à dix pourcent de l'ensemble des protéines de notre corps lient du zinc (Frederickson et al., 2000), dont une grande majorité de facteurs de transcription (Frederickson et al., 2000). Il est ainsi possible que ces faibles niveaux de zinc soient impliqués dans une sorte d'équilibre permettant d'alimenter ces protéines en zinc libre, qui participera alors au maintien de leur structure ou à diverses réactions enzymatiques au cœur des protéines. L'utilisation de chélateurs perméables aux membranes pourrait alors perturber ce système et engendrer des effets secondaires néfastes dépassant les effets thérapeutiques escomptés. Ainsi, même si l'utilisation de chélateurs semble prometteuse, des études complémentaires sur leur impact dans la prévention ou le traitement de l'ischémie doivent être conduites.

### III.A.7.c. Stratégies visant à bloquer les cascades neurotoxiques zincergiques

L'ensemble des stratégies présentées ci-dessus visent à agir directement sur le zinc, en amont de l'ensemble des cascades réactionnelles qu'il active dans les neurones. En excès, le zinc favorise l'élévation du stress oxydatif (Kim et al., 1999; Noh et al., 1999; Sensi et al., 1999; Sensi et al., 2000; Kim and Koh, 2002; Bossy-Wetzell et al., 2004; Dineley et al., 2005) et interfère avec des nombreuses cibles protéiques (Kim et al., 1999; Noh et al., 1999; Sheline et al., 2000; Kim and Koh, 2002; Bossy-Wetzell et al., 2004; Cai et al., 2006; Smith et al., 2006; Hwang et al., 2008). Un intérêt tout particulier doit être apporté à ces nombreuses cibles du zinc dans la prévention de ses effets néfastes associés à l'ischémie.

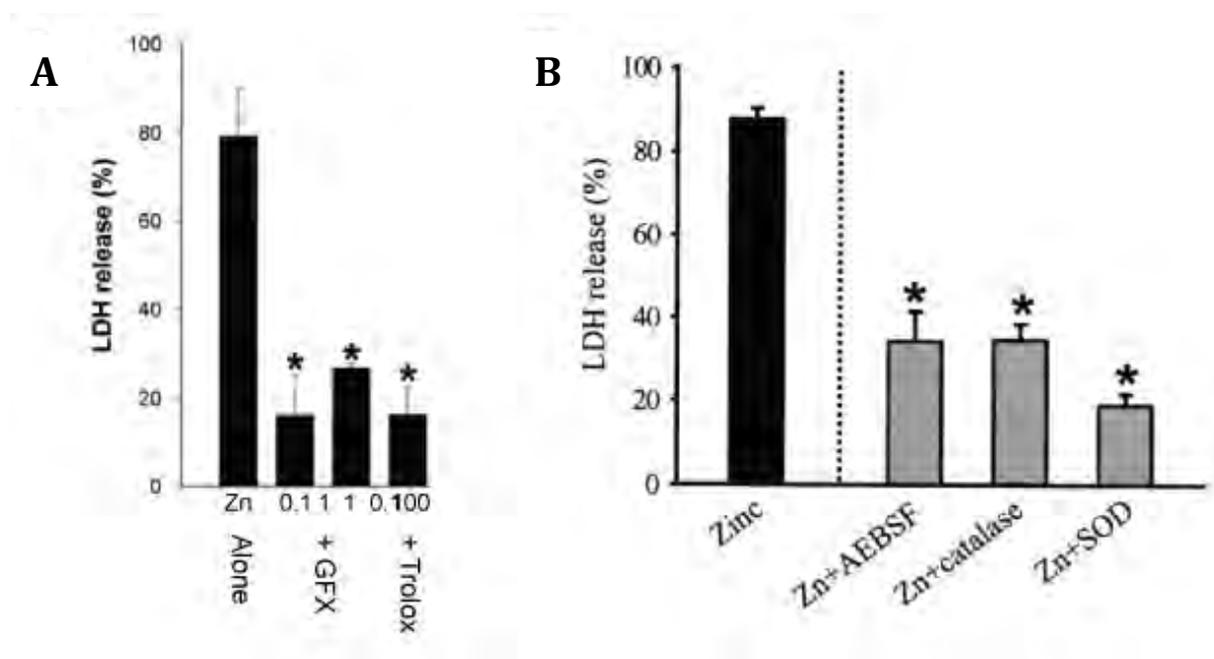
Dans ce contexte, les mitochondries fonctionnent dans un premier temps comme un tampon rapide du zinc libre entrant en excès dans les neurones. Ce processus se solde notamment par l'ouverture du MPTP et le relargages de facteurs pro-apoptotiques (Jiang et al., 2001; Bossy-Wetzell et al., 2004). Bloquer ce port de transition serait une stratégie intéressante permettant de limiter la libération de ces facteurs (Cyt-C et AIF) qui déclenchent la mort cellulaire programmée. Cet effet protecteur de la survie des neurones a notamment été observé après application d'acide bongkreique ou de cyclosporine A, deux inhibiteurs du MPTP (**Figure 15E**, Jiang et al., 2001).

En parallèle, le zinc a un effet pro-oxydant et favorise l'élévation du stress oxydatif dans les neurones. Les radicaux libres produits, dont le très réactif ONOO<sup>-</sup>, réagissent avec de nombreuses cibles cellulaires, notamment protéiques telles que la p38 MAPK ou les MTs (Bossy-Wetzell et al., 2004), lipidiques via la synthèse d'HNE qui déclenche le phénomène de LMP (Hwang et al., 2008), et finalement nucléaires en provoquant des dommages dans l'ADN qui, en retour, activent la boucle PARP/PARG (Kim and Koh, 2002).

L'utilisation d'agents antioxydants s'est révélée efficace dans la prévention de la mort neuronale associée à l'ischémie. C'est le cas par exemple de l'utilisation du trolox (100 µM), un antioxydant analogue de la vitamine E, appliqué sur des cultures neuronales exposées à 300 µM de zinc pendant 15 minutes. Ce protocole, bien qu'éloigné d'un protocole d'ischémie, permet d'augmenter les concentrations en zinc

dans le cytoplasme des neurones comme observé au cours d'événements excitotoxiques. Dans ce contexte, le trolox a permis de réduire la mort neuronale de façon significative (estimée par le relargage de lactate déhydrogénase (LDH), **Figure 31A**, Noh et al., 1999). Avec un protocole similaire, l'exposition des neurones en culture à la superoxyde dismutase (enzyme catabolisant l' $O_2^{\cdot-}$ ) a également permis de réduire le relargage neuronale de LDH (**Figure 31B**, Noh and Koh, 2000). L'utilisation de ces deux antioxydants révèle donc des effets neuroprotecteurs en réponse à l'accumulation de zinc dans le cytoplasme des neurones.

Le stress oxydatif peut également être augmenté par activation de la cascade PKC/NAPDH, deux nouvelles cibles d'intérêt dans la prise en charge des troubles ischémiques associés à l'excitotoxicité. L'inhibition à la fois de la PKC grâce au GF109203X (**Figure 31A**, Noh et al., 1999) et de sa cible cellulaire, la NAPDH, par son inhibiteur l'AEBSF (**Figure 31B**, Noh and Koh, 2000), favorise la survie neuronale en affichant une diminution de la libération de LDH.



**Figure 31 : Neuroprotection associée à la prévention de l'action du zinc sur ses effecteurs cellulaires. A. et B.** Les effets neurotoxiques du zinc sont bloqués par les antioxydants trolox et SOD ainsi que par des inhibiteurs de la PKC (GFX) et de la NAPDH (AEBSF). Neurodégénérescence estimée 24 heures après exposition de 15 minutes à 300 μM (E) ou 400 μM (D) de zinc par le relargage de lactate déhydrogénase (LDH) sur des neurones en culture. GFX, 0.1 et 1 μM ; Trolox, 100 μM ; AEBSF, 50 μM ; catalase, 300 mU/mL ; SOD, 50 U/mL. \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) selon un test de Student. Les bars d'erreur représentent l'écart-type. Adapté de Noh et al., 1999 (A) et Noh and Koh, 2000 (B).

L'identification du zinc comme agent médiateur de l'excitotoxicité lors d'ischémies apporte donc un réel espoir dans la prise en charge de ces événements pathologiques. De nouvelles voies de signalisation impliquant ce métal de transition sont régulièrement découvertes et l'identification de nouvelles cibles du zinc constitue autant de points d'actions pour d'éventuelles nouvelles molécules médicamenteuses. Cependant, les voies thérapeutiques décrites précédemment n'ont été que peu défrichées et ont été obtenues à partir de modèles expérimentaux majoritairement *ex vivo*, très éloignés d'un contexte physiologique. La vaste majorité des molécules ayant montré des effets neuroprotecteurs, a été administrée par injection intracérébrale et non par voie orale. Bien que certaines semblent passer la barrière hématoencéphalique (BHE, [Mitchell and Barnes, 1993](#); [Takeda et al., 2013](#) Cf. partie III.C.1.c), ce mode d'administration complique de façon considérable l'utilisation de ces composés et il est nécessaire d'investiguer en profondeur si leur utilisation par voie orale permet d'observer les mêmes effets. De plus, la spécificité de leurs effets peut également être remise en question. En agissant sur des voies de signalisation cellulaire impliquées dans un nombre important d'autres processus physiologiques, il est possible que leur utilisation provoque des effets indésirables importants.

La découverte de l'implication du zinc dans l'initiation et la perpétuation des phénomènes excitotoxiques à la suite d'événement ischémique reste récente. Or, depuis, de nombreuses molécules ciblant les voies zincergiques ont démontré des effets neuroprotecteurs importants et tout à fait intéressants. Ce constat souligne donc le fort potentiel que représentent les stratégies thérapeutiques visant à réguler les dyshoméostasies du zinc en contexte ischémique et l'effort nécessaire de chercher dans cette direction.

### **III.A.8. Conclusion**

Le zinc est au centre d'un intérêt grandissant depuis le début des années 1990. Son implication dans des pathologies associées aux chocs ischémiques tels que les AVCs, ainsi que dans le *status epilepticus*, ont mis en évidence un nombre important de nouvelles cibles médicamenteuses pouvant potentiellement venir combler le vide thérapeutique auquel nous faisons face aujourd'hui pour ces maladies. Face à l'échec des

stratégies développées précédemment, les voies neurotoxiques enclenchées par le zinc en condition excitotoxique constituent une alternative intéressante. Les montées de zinc survenant dans les neurones à la suite d'un choc ischémique, entraînent des effets multiples qui forment autant de points d'action pour prévenir la neurodégénérescence induite par ce métal. Cependant, l'identification de ces cibles est encore récente, et l'absence de résultats d'essais cliniques ou de données de pharmacovigilance sur des médicaments déjà mis sur le marché fait défaut. Bien que le recul scientifique ne soit pas suffisant aujourd'hui pour savoir si les cibles du zinc présenteront un réel intérêt thérapeutique, elles restent prometteuses compte tenu de la large fenêtre thérapeutique qu'elles apportent. Les pathologies associées aux chocs ischémiques ou aux épilepsies prolongées sont brèves et imprévisibles et les stratégies thérapeutiques visant le zinc ou ses cibles présentent l'avantage d'autoriser la prise en charge du patient à distance du choc ischémique. En dehors de l'efficacité thérapeutique, le passage de la BHE, en absence d'effets indésirable, sera un autre défi.

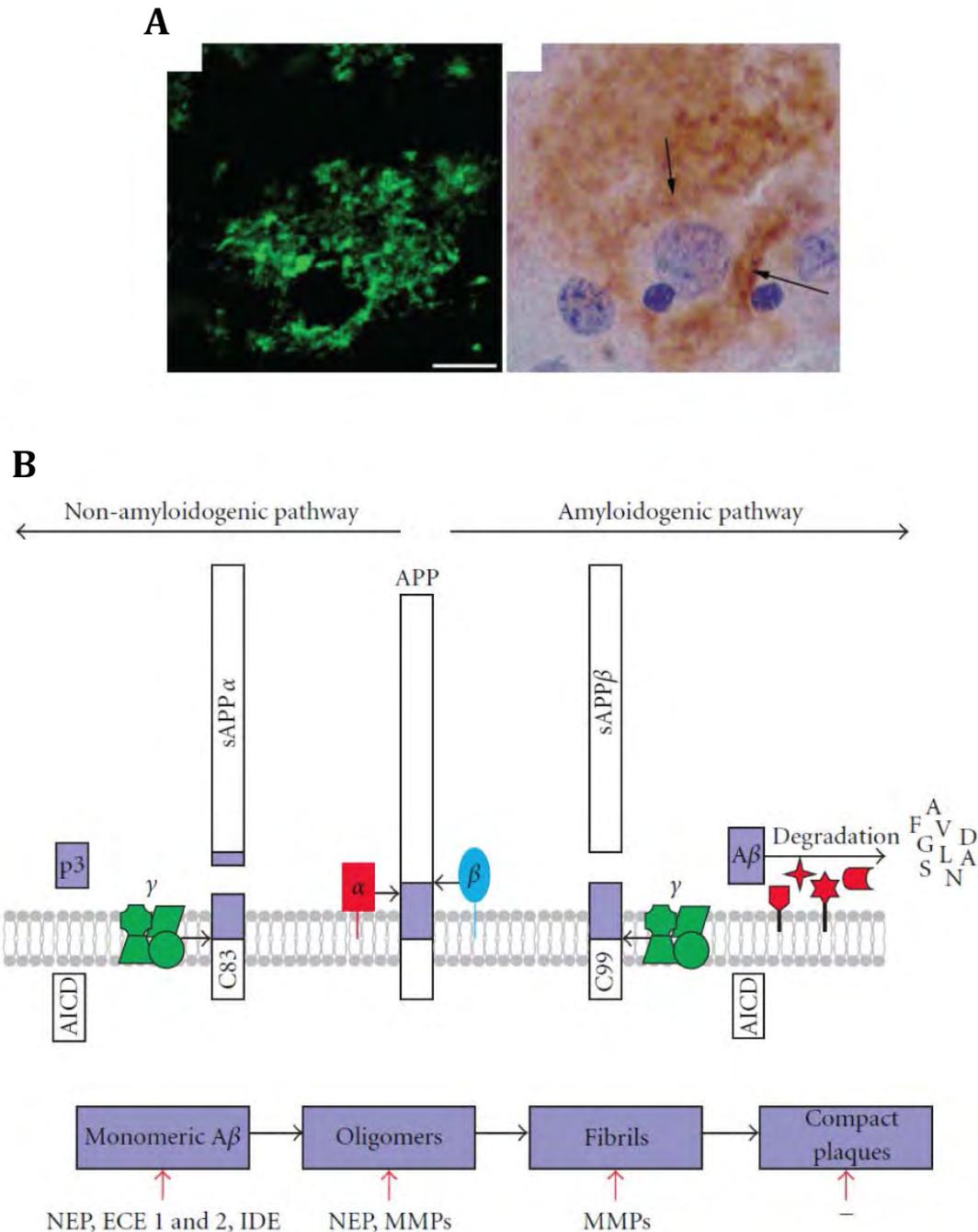
### III.B. La maladie d’Alzheimer

La maladie d’Alzheimer est une maladie neurodégénérative liée à l’âge caractérisée par des troubles de la mémoire à court terme, des fonctions exécutives et de l’orientation dans le temps et l’espace (Cuajungco and Lees, 1997). Rare avant 65 ans, elle affecte 2 à 4 % de la population générale après cette âge, pour atteindre près de 15% au-delà de 80 ans (INSERM, 2014). Avec 37 millions de patients affectés à travers le monde (Watt et al., 2010) et 900 000 personnes en France (INSERM, 2014), la maladie d’Alzheimer est la maladie avec la plus forte prévalence.

Biologiquement, la maladie d’Alzheimer est caractérisée par la dégénérescence de neurones, notamment cholinergiques, rattachée à une atrophie de certaines régions corticales et de ses structures associées telles que l’hippocampe, ainsi qu’une disparition d’un nombre important de synapses (Cuajungco and Lees, 1997). L’un des signes pathognomoniques de la maladie est l’accumulation dans la matrice extracellulaire de plaques amyloïde, également appelées plaques séniles, composées majoritairement de protéines d’A $\beta$  polymérisées (Figure 32A, Masters et al., 1985; Lacor et al., 2004; Mount and Downton, 2006; Watt et al., 2010). L’accumulation de cette protéine est également observée dans l’angiopathie amyloïde cérébrale, une pathologie associée à la maladie d’Alzheimer, au cours de laquelle les plaques se forment dans certains vaisseaux sanguins (Watt et al., 2010).

La protéine d’A $\beta$  est un des produits de dégradation de l’*amyloid precursor protein* (APP), une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire qui peut être dégradée selon deux voies métaboliques, dont l’une est amyloïdogénique. Au cours de ce processus, l’APP est clivée par une  $\beta$ -sécrétase donnant naissance à deux fragments : la forme sécrétée de l’APP, appelée sAPP $\beta$  et la partie C-terminale de l’APP, toujours ancrée à la membrane, appelé C99 (pour *C-terminal fragment of 99 amino acids*). Cette dernière est alors dégradée par une  $\gamma$ -sécrétase, une isoforme de la  $\beta$ -sécrétase et entraîne la production de la protéine AICD (pour *APP intracellular domain*) et d’un peptide de 40 à 42 acides aminés : l’A $\beta$  (Figure 32B, Watt et al., 2010).

Physiologiquement, la voie amyloïdogénique est minoritaire et les quelques peptides d’A $\beta$  formés sont rapidement dégradés par diverses enzymes dont de nombreuses métalloprotéases utilisant le zinc comme cofacteur. Cependant, dans le cas de la maladie d’Alzheimer, la production d’A $\beta$  s’emballe. Sous forme monomérique, ces



**Figure 32 : Formation de la plaque amyloïde.** **A.** Dépôts d’oligomères d’ $A\beta$  dans le cerveau marqués à l’aide d’anticorps fluorescents (gauche), ou d’anticorps révélés par peroxydase (droite). Issus de coupes coronales de cerveaux de patients souffrants de la maladie d’Alzheimer. Barre d’échelle, 10  $\mu$ M. **B.** Voies de métabolisation des peptides d’ $A\beta$ . En rouge à droite du schéma, métalloprotéases zinc impliquées dans la dégradation des peptides d’ $A\beta$  ;  $\alpha$ ,  $\alpha$ -sécrétase ;  $\beta$ ,  $\beta$ -sécrétase ;  $\gamma$ ,  $\gamma$ -sécrétase ; ECE: Endothelin-converting enzyme; IDE: Insulin degrading enzyme; MMP: Matrix metalloprotease; NEP: Neprilysin. Adapté de [Lacor et al., 2004\(A\)](#) et [Watt et al., 2010\(B\)](#).

peptides s’agrègent pour former dans un premier temps des oligomères d’ $A\beta$ , puis des fibrilles et progressivement conduisent à la formation de plaques amyloïdes compactes (**Figure 32B**, pour revue voir [Watt et al., 2010](#)). La formation de ces plaques a été

montrée comme favorisant l’hyper-phosphorylation de la protéine tau, une protéine associée aux microtubules, induisant sa polymérisation et la formation à l’intérieur des neurones de dégénérescences neurofibrillaires, un autre signe pathognomonique de la maladie d’Alzheimer (pour revue voir [Cuajungco and Lees, 1997](#) et [Watt et al., 2010](#)).

Face à l’absence de traitements permettant de stopper ou d’inverser la progression de la maladie d’Alzheimer, un effort considérable est mené afin de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Parmi ces dernières, le zinc semble être une nouvelle fois une cible d’intérêt potentielle. Plusieurs études ont montré que les niveaux de zinc sont altérés dans le sérum et le LCR de patients souffrant de la maladie d’Alzheimer ([Brewer et al., 2010](#)). En particulier, certaines études de spectroscopie de masse ont révélé des concentrations anormales en zinc dans l’hippocampe de patients ayant souffert de la maladie ([Corrigan et al., 1993](#); [Deng Q.S., 1994](#); [Danscher et al., 1997](#)). De plus, la distribution des plaques suit la distribution du zinc dans le cerveau puisqu’on en observe en quantité abondante dans le bulbe olfactif, le cortex et l’hippocampe, des régions particulièrement riches en zinc libre (**Figure 1**). En revanche, leur présence est faible dans le cervelet, une région potentiellement dépourvue de zinc vésiculaire ([Zhan et al., 1995](#)). Une des caractéristiques de cette maladie est la dégénérescence de certains neurones notamment cholinergiques. Or le zinc est impliqué dans la médiation de l’apoptose en conditions excitotoxiques survenant à la suite d’épisodes ischémiques, comme c’est le cas par exemple, dans l’angiopathie amyloïde cérébrale (*Cf.* partie III.A). Ce sont ces premiers constats qui ont poussé les scientifiques à s’intéresser à l’implication du métal dans le développement de la maladie d’Alzheimer.

### III.B.1. Le zinc favorise l’agrégation des peptides d’A $\beta$

Chez les patients souffrant de la maladie d’Alzheimer, la dégradation de l’APP est déviée vers des voies enzymatiques favorisant la formation de la plaque amyloïde (*Cf.* ci-dessus **Figure 32B**). L’élévation de la production de peptides d’A $\beta$  est pensée comme étant à la base de ce déséquilibre, cependant en solution, ces peptides restent solubles jusqu’à des concentrations de 3.7 mM ([Tomski and Murphy, 1992](#)). Il est alors difficile

d’imaginer que la hausse de la production d’A $\beta$  soit à elle seule responsable de la formation de plaques séniles. D’autres acteurs doivent favoriser son agrégation.

### III.B.1.a. Le site zinc des monomères d’A $\beta$

Tout comme l’APP (Bush et al., 1993), les peptides d’A $\beta$  sont capables de lier le zinc (Bush et al., 1994b; Bush et al., 1994a; Rezaei-Ghaleh et al., 2011; Alies et al., 2016) selon une stœchiométrie 1:1 (un ion zinc pour un monomère A $\beta$ , Bush et al., 1994b). L’analyse de la fixation de zinc radioactif ( $^{65}\text{Zn}^{2+}$ ) sur des peptides synthétiques d’A $\beta$  humains ont révélé deux sites de fixation, l’un de haute affinité ( $K_a = 107 \text{ nM}$ , Bush et al., 1994a) et l’autre de basse affinité ( $K_a = 5.2 \text{ }\mu\text{M}$ , Bush et al., 1994a). D’un autre côté, en disséquant la séquence du peptide à l’aide de diverses enzymes protéolytiques, Bush et al., ont identifié pour la première fois la composition en résidus du site de haute affinité zinc. Comme beaucoup de protéines qui lient ce métal, le site est composé d’histidines (ici au nombre de trois, His6, His13 et His14) et de groupements carboxyliques chargés négativement favorisant sa chélation (Figure 33, Bush et al., 1994a; Kozlowski et al., 2012; Alies et al., 2016). La liaison du zinc engendre alors des changements conformationnels favorisant l’agrégation des monomères d’A $\beta$ . En cause, une rigidification du domaine N-terminal ainsi que de la région comprise entre la valine 24 et la lysine 28 ayant pour effet de réduire l’entropie conformationnelle du peptide, provoquant une déstabilisation thermodynamique qui facilite son agrégation (Rezaei-Ghaleh et al., 2011).

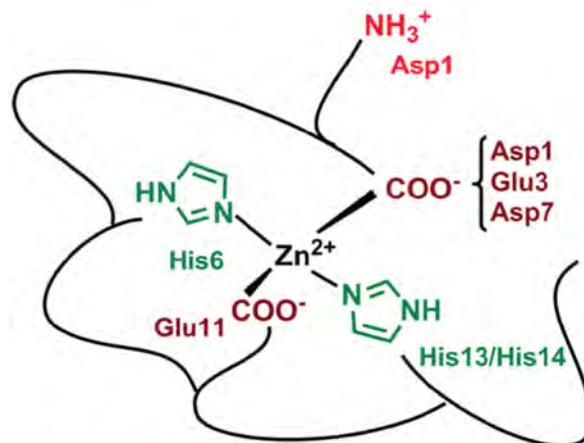
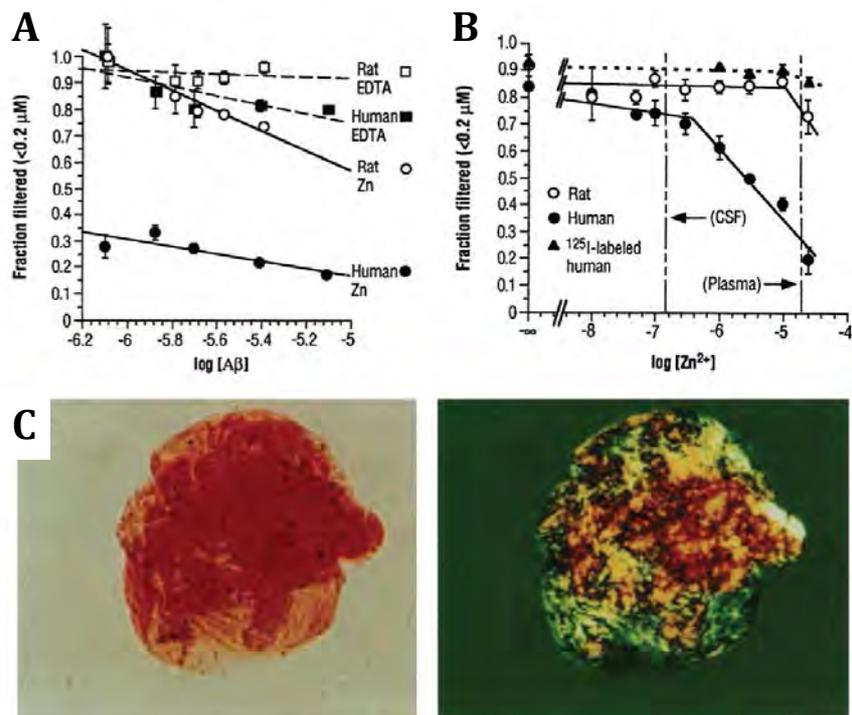


Figure 33 : Site de fixation du zinc au sein d'un monomère d'A $\beta$ . Adapté d'Alies et al., 2016.

### III.B.1.b. Le zinc induit la formation d’oligomères d’A $\beta$ et prolonge leur demi-vie

La liaison du zinc à des monomères d’A $\beta$  fournit donc la base chimique à leur polymérisation. *In vitro*, le zinc favorise l’agrégation de ce peptide amyloïdogénique puisque la mise en contact pendant 30 minutes de zinc (25  $\mu$ M) avec différentes concentrations d’A $\beta$  entraîne l’agrégation de 70 à 80% des peptides disponibles (révélée par filtration < 0.2  $\mu$ m, **Figure 34A**, Bush et al., 1994b). De même, l’exposition de 1.6  $\mu$ M d’A $\beta$  à des concentrations croissantes en zinc, révèle que la quantité de métal nécessaire à l’agrégation du peptide doit être suffisamment élevée afin de saturer le site de haute affinité (en accord avec la stœchiométrie 1:1) puisque la formation d’agrégats n’est observée qu’à partir d’une concentration de 300 nM en zinc (**Figure 34B**, Bush et al., 1994b). La teinte verte que prennent ces agrégats sous lumière polarisée ainsi que leur coloration rouge au rouge Congo (colorant organique), confirment que la polymérisation des monomères induite par le zinc entraîne la production de plaques amyloïdes (**Figure 34C**, Bush et al., 1994b). Il est intéressant de noter que les peptides d’A $\beta$  issus de rats ne



**Figure 34 : Le zinc induit la formation d’oligomères d’A $\beta$ .** A. et B. Effet du zinc sur des peptides d’A $\beta_{1-40}$  humains et de rats. Les peptides d’A $\beta$  en solution sont incubés avec ou sans zinc ou EDTA, puis filtrés à l’aide d’un filtre < 0.2  $\mu$ m. Les peptides filtrés sont ensuite titrés. A., zinc (25  $\mu$ M) ; EDTA (50  $\mu$ M). B. A $\beta$  (1.6  $\mu$ M). C. Le zinc induit la formation de plaques amyloïdes révélées à l’aide de rouge Congo (gauche) ou par sa biréfringence verte sous lumière polarisée (droite). Les particules ont un diamètre de 40  $\mu$ m et ont été obtenus en incubant 25  $\mu$ M de peptides d’A $\beta_{1-40}$  avec 25  $\mu$ M de zinc pendant 30 minutes à 37°C. Adapté de Bush et al., 1994b.

polymérisent pas sous l’action du zinc et constituent ainsi un excellent contrôle négatif. Cette différence entre les monomères humains et de rats est notamment liée à la mutation en arginine de deux histidines du site de haute affinité zinc empêchant sa fixation aux peptides (Shivers et al., 1988; Rezaei-Ghaleh et al., 2011). Ces mutations expliquent également pourquoi ces rongeurs ne produisent peu ou pas de plaques amyloïdes en vieillissant.

La fixation du zinc sur les monomères d’A $\beta$  ne se cantonne pas à la promotion de la formation de plaques, elle allonge également leur demi vie. En effet, le métal favorise la résistance de ces peptides à divers enzymes protéolytiques impliqués dans leur dégradations, notamment des sécrétases, comme le montre la résistance des monomères liés au zinc à l’action de la trypsine, une sérine-protéase (Bush et al., 1994a).

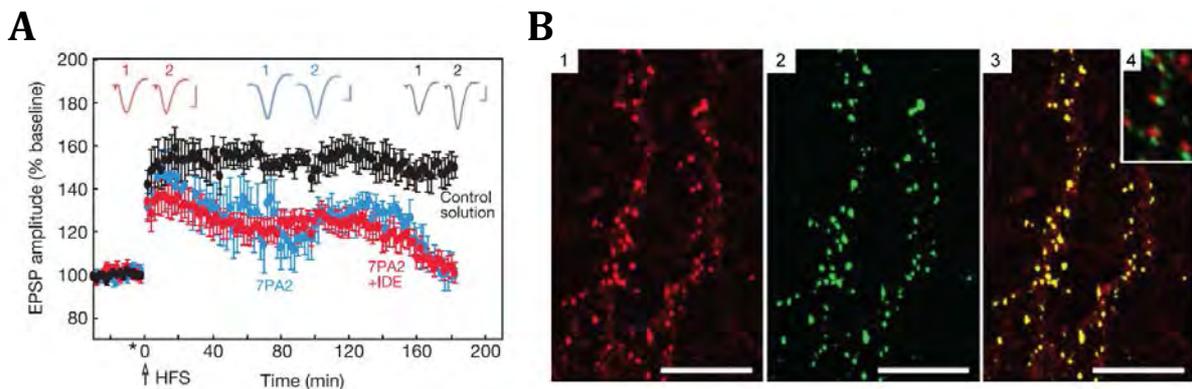
La seule accumulation de peptides A $\beta$  est insuffisante pour expliquer la formation de plaques séniles, mais la découverte de l’effet amyloïdogénique du zinc a permis d’identifier ce métal comme un nouvel acteur de la maladie d’Alzheimer. La promotion de la formation de plaques par le zinc se fait à deux niveaux. Dans un premier temps, l’existence d’un site de haute affinité au cœur des monomères d’A $\beta$  révèle une action du zinc sur chaque molécule individuelle. En rigidifiant la structure de chaque peptide, le zinc facilite leur polymérisation et la formation d’oligomères puis de plaques amyloïdes. Dans un deuxième temps, la fixation du zinc rend les peptides d’A $\beta$  résistants à l’action de protéases physiologiquement impliquées dans leur dégradation. En prolongeant la demi-vie des molécules d’A $\beta$ , le zinc augmente la probabilité de leur agrégation.

Le zinc pourrait donc constituer une cible thérapeutique d’intérêt dans la prise en charge de la maladie d’Alzheimer. Compte tenu du fait que le zinc participe à la formation des oligomères d’A $\beta$  pendant la phase initiale de la maladie et que ces derniers ont un pouvoir toxique supérieur à ceux se trouvant au cœur des plaques (Cf. ci-dessous, Walsh et al., 2002), les traitements développés devraient potentiellement permettre une action précoce, inhibant la formation de ces oligomères toxiques.

### III.B.2. Le zinc vésiculaire favorise la formation d’oligomères toxiques au voisinage des synapses

#### III.B.2.a. Inhibition de la LTP par les oligomères d’A $\beta$

Alors que le zinc a été identifié comme participant à la formation des plaques séniles, la question de son origine demeure. L’hypothèse selon laquelle la formation de ces plaques est à l’origine de la perte initiale de mémoire *est aujourd’hui remise en*



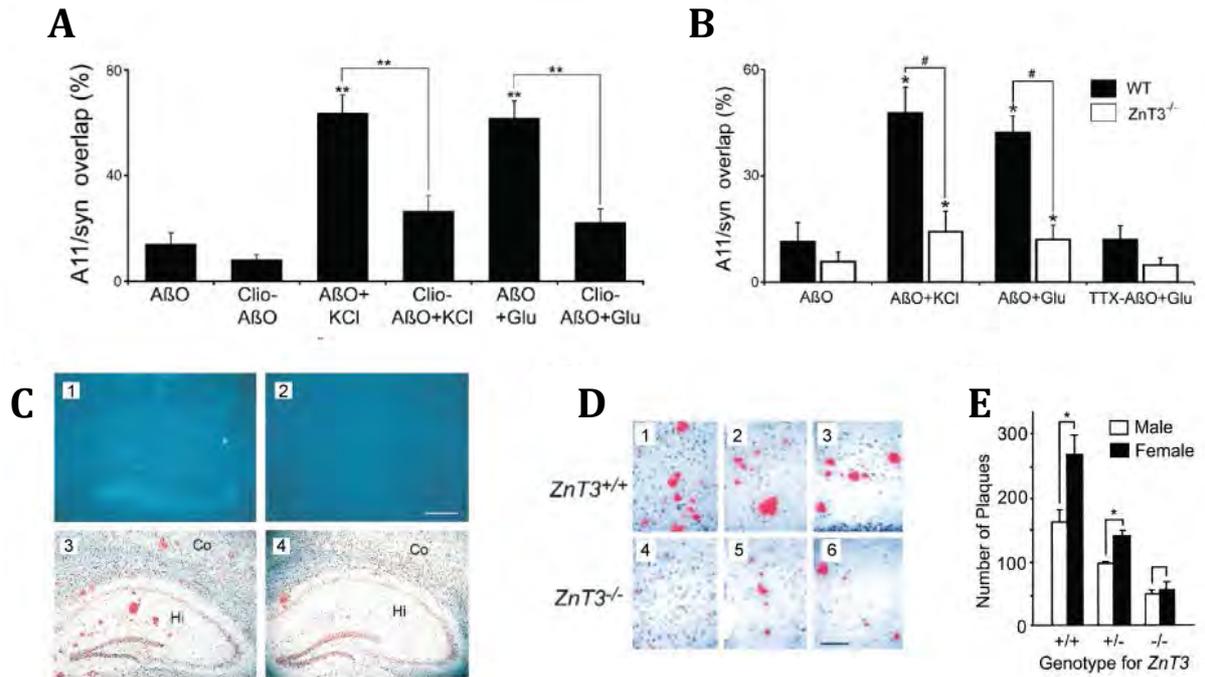
**Figure 35 : Effets négatifs des oligomères d’A $\beta$  sur les processus à la base de la mémorisation.** **A**. In vivo, les oligomères d’A $\beta$  bloquent le processus de LTP. Enregistrements réalisés à l’aide d’électrodes extracellulaires placées dans l’hippocampe de rats anesthésiés. Ces électrodes permettent d’enregistrer des variations du potentiel électrique extracellulaire associées aux transmissions synaptiques. A la synapse entre deux neurones, lors de l’arrivée d’un potentiel d’action, la libération de neurotransmetteurs (ici glutamate) entraîne l’ouverture de récepteurs ionotropiques postsynaptiques tels que les iGluR (rAMPA, rNMDA notamment). Leur ouverture laisse passer des ions chargés positivement (sodium, potassium, calcium) entraînant la formation d’un courant électrique excitateur dans le neurone postsynaptique appelé EPSC pour excitatory postsynaptic current. Ce courant provoque localement une dépolarisation de la membrane du neurone postsynaptique et cette variation du potentiel de membrane est appelée EPSP pour excitatory postsynaptic potential. EPSC et EPSP reflètent tout deux le même événement, l’entrée de charge dans le neurone postsynaptique à la suite de la libération vésiculaire de neurotransmetteurs. Ces variations du potentiel membranaire peuvent être enregistrées par les électrodes extracellulaires implantées dans l’hippocampe du rat. Lors d’une situation contrôle, la stimulation électrique des neurones présynaptiques à l’aide d’une électrode de stimulation (permet le déclenchement de potentiels d’action et la libération de neurotransmetteurs) provoque une réponse stable des neurones postsynaptiques puisque les valeurs des EPSP ne varient pas avant la stimulation haute fréquence (HFS). L’utilisation de HFS est un protocole classique de déclenchement du phénomène de plasticité synaptique. A la suite de ce protocole, les mêmes stimulations que lors de la phase contrôle entraînent des réponses plus importantes dans les neurones postsynaptiques (cercles noirs). Cet effet traduit du fait qu’un même événement synaptique entraîne une réponse plus importante des neurones en aval. Cependant, l’injection intracérébrale de peptides A $\beta$  mutés (1.5  $\mu$ l), réduit le processus de LTP (cercles bleus). Ces peptides ont été identifiés comme favorisant la formation de plaques amyloïde et sont produits à partir de cultures cellulaires 7PA2 (Chinese hamster ovary, cellules CHO). Cependant, cette forme de peptides d’A $\beta$  injecté contient à la fois des monomères et des oligomères. La dégradation préalable des monomères par l’insulin-degrading enzyme (IDE, 37°C pendant 12 heures) et l’injection des oligomères dans le cerveau de rats, révèle également une inhibition du processus de LTP (cercles rouges) indiquant que les oligomères participent au phénomène d’inhibition de la plasticité synaptique. **B**. Les oligomères d’A $\beta$  s’accumulent à la synapse des neurones en culture. Neurones exposés à 500 nM de peptides d’A $\beta$  synthétique. (1) marquage immunologique de la PSD-95; (2) marquage immunologique des peptides d’A $\beta$  synthétique; (3) la fusion des images (1) et (2) montre une colocalisation des marquages PSD-95 et peptides d’A $\beta$ ; (4) le marquage immunologique de la synaptophysine (rouge, protéine présynaptique) et des peptides d’A $\beta$  (vert) montre une juxtaposition entre les deux protéines et non une colocalisation. Barres d’échelle, 10  $\mu$ M. Adapté de [Walsh et al., 2002](#) et [Lacor et al., 2004](#).

*question*. En effet, lors des premiers stades de la maladie, la densité des plaques reste faible alors que la démence est déjà installée (Dickson et al., 1995). En revanche, la corrélation est forte entre démence et quantité de peptides A $\beta$  solubles dans le liquide céphalorachidien (Lue et al., 1999). Des micro-injections intra-cerebroventriculaires de peptides A $\beta$  ont révélé, grâce à l’enregistrement *in vivo* de l’activité des neurones CA1 de l’hippocampe de rats, que les oligomères et non les monomères d’A $\beta$ , inhibent le processus de potentialisation à long terme (ou LTP pour *long-term potentiation*, **Figure 35A**, Walsh et al., 2002). Ce mécanisme de plasticité synaptique est pensé comme étant à la base de la mémoire et de l’apprentissage et prédit qu’à la suite de stimulations répétées d’une même connexion neuronale, la réponse du neurone postsynaptique à ces mêmes stimuli augmente, ce qui renforce la synapse en question (pour revue, voir Purves, 2012). Ce mécanisme permet d’augmenter sur le long terme (plusieurs heures) la force de transmission entre deux neurones. La colocalisation des oligomères avec la PSD95, une protéine d’échafaudage spécifique de l’élément postsynaptique (**Figure 35B**, Lacor et al., 2004; Deshpande et al., 2009) révèle qu’au cours de la phase initiale de la maladie d’Alzheimer, les oligomères d’A $\beta$  s’accumulent sélectivement aux synapses.

### III.B.2.b. Le zinc attire les oligomères au voisinage de la synapse

Un des signes caractéristiques de la maladie d’Alzheimer est la raréfaction du nombre de synapses. L’identification des mécanismes par lesquels les oligomères d’A $\beta$  toxiques ciblent ces connexions neuronales est donc cruciale pour notre compréhension de l’évolution de la maladie ainsi que pour l’identification de nouvelles cibles médicamenteuses. De nombreux éléments pointent vers un rôle du zinc vésiculaire dans l’agrégation des oligomères aux synapses. En effet, l’existence d’un site de haute affinité zinc dans les monomères d’A $\beta$  favorise leur polymérisation (Bush et al., 1994b), facilitant alors la formation des oligomères. En parallèle, leur accumulation s’est révélée comme étant dépendante de l’activité neuronale (Deshpande et al., 2009), or l’activité synaptique est également associée à la libération de zinc libre vésiculaire (Vergnano et al., 2014).

L’identification du zinc vésiculaire comme médiateur de l’agrégation des oligomères à la synapse a été permise grâce au travail de Deshpande et al., en 2009. Afin



**Figure 36 : Le zinc synaptique favorise l'accumulation d'oligomères d'Aβ à la synapse.** **A.** Prévention de l'accumulation d'oligomères d'Aβ à la synapse à l'aide du clioquinol. Réalisés sur des tranches d'hippocampe de cerveau de rats incubés pendant 1 heure avec ou sans oligomères d'Aβ synthétiques (AβO, 500 nM) ou clioquinol (Clio, 1 μM). La présence des oligomères a été évaluée à l'aide du pourcentage de juxtaposition entre la synaptophysine et les oligomères d'Aβ après marquage immunologiques. KCl, 20 mM et glutamate, 100 μM (Glu) permettent d'augmenter l'activité synaptique et donc de libérer du zinc vésiculaire. **B.** L'accumulation synaptique d'oligomères d'Aβ est significativement réduite chez les souris ZnT3 KO. Mêmes conditions expérimentales qu'en A. TTX, tétrotoxine, 2 μM, ajouté 20 minutes avant l'exposition aux oligomères et au glutamate, permet de bloquer l'activité synaptique. A et B. \*, \*\* et # indiquent une différence significative (respectivement  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  et  $p < 0.05$ ). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. **C.** Diminution du nombre de plaques amyloïdes chez des souris dépourvues de zinc synaptique ZnT3 KO. Coupe coronales de cerveaux de souris hAPP dépourvues ((2) et (4)) ou non ((1) et (3)) de zinc vésiculaire. Ces souris hAPP expriment constitutivement une forme mutée de l'APP favorisant la formation de plaques amyloïdes. (1) et (2), marquage du zinc libre par la sonde fluorescente TFL-Zn. (3) et (4), marquage des plaques amyloïdes grâce au rouge Congo. Co, cortex cérébrale ; H, hippocampe. Barre d'échelle, 100 μm. **D.** La taille des plaques amyloïdes est réduite chez les souris ZnT3 KO. Même contexte expérimentale qu'en C. Plaques amyloïdes révélés par marquage au rouge Congo. De (1) à (3), souris sauvages pour ZnT3. De (4) à (6), souris ZnT3 KO. (1) et (4), cortex frontale. (2) et (5), cortex pariétale. (3) et (6), hippocampe. Barre d'échelle 100 μm. **E.** Nombre de plaques amyloïdes plus élevé chez les femelles que chez les mâles. \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Adapté de *Deshpande et al., 2009* (A et B) et *Lee et al., 2002* (C-E).

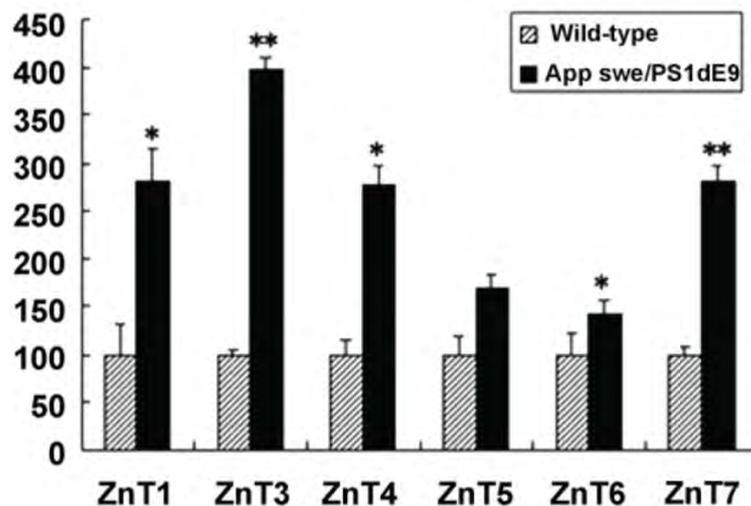
de sonder leur présence aux connexions neuronales, les auteurs ont appliqué simultanément sur des tranches d'hippocampe de cerveau de rats, des anticorps dirigés contre les oligomères d'Aβ (anti-oligomères A11) et contre la synaptophysine, une protéine exprimée sélectivement à la synapse de façon présynaptique (anti-synaptophysine). Cette expérience a permis de révéler l'accumulation des oligomères aux connexions neuronales. Compte tenu du fait que les monomères d'Aβ de rat ne lient pas le zinc (*Shivers et al., 1988; Rezaei-Ghaleh et al., 2011*), et pour ne pas biaiser l'expérience, cette dernière a été conduite en incubant au préalable les tranches

d’hippocampe avec 500 nM d’oligomères d’A $\beta$  d’origine humaine pendant une heure. De façon intéressante, l’utilisation de clioquinol (1  $\mu$ M pendant 1 heure avant stimulation,  $K_{d\text{ zinc}} = 10^{-7}$  M), un chélateur et ionophore du zinc se fixant au complexe [A $\beta$  – Zn $^{2+}$ ] et le dissociant sans interagir avec la protéine d’A $\beta$ , provoque une diminution de la juxtaposition des oligomères et de la synaptophysine lors de l’activité neuronale (stimulée par ajout de KCl ou de glutamate, **Figure 36A**, [Deshpande et al., 2009](#)). Ces résultats reflètent une réduction du nombre de ces oligomères à la synapse. La même expérience, réalisée cette fois-ci sur des souris dépourvus de zinc vésiculaire (souris ZnT3 KO), montre les mêmes effets que l’application de clioquinol (**Figure 36B**, [Deshpande et al., 2009](#)). Ces résultats témoignent donc que le *zinc vésiculaire favorise l’agrégation des oligomères d’A $\beta$  à la synapse*. De plus, l’utilisation de clioquinol semble être une stratégie thérapeutique intéressante puisque son application sur des tranches de cerveau réduit le tropisme des oligomères aux connexions neuronales.

Un autre élément mettant en avant le rôle du zinc synaptique dans la survenue de la maladie d’Alzheimer, est le fait que dans un modèle de souris possédant une mutation de l’APP favorisant la formation de plaques amyloïdes (souris Tg2576), la production de plaques est dépendante de la quantité de zinc synaptique ([Lee et al., 2002](#)). En effet, en comparaison, le nombre et la taille des plaques dans l’hippocampe est plus important chez des souris ZnT3 $^{+/+}$  (souris de type sauvage, possédant les deux allèles du transporteur vésiculaire du zinc) que chez des souris ZnT3 $^{-/-}$  (ZnT3 KO, **Figure 36C** et **36D**, [Lee et al., 2002](#)). Étonnement, le nombre de plaques est plus élevé chez les femelles que chez les mâles (**Figure 36E**, [Lee et al., 2002](#)). Cette différence en fonction du sexe s’explique notamment par le fait que la quantité de zinc libre dans le cerveau des souris femelles est plus importante que chez les mâles ([Lee et al., 2002](#)). En effet, il a été montré que la quantité de zinc vésiculaire est sous la dépendance des œstrogènes puisque l’ablation des ovaires augmente la quantité de zinc synaptique ([Lee et al., 2004](#)).

### III.B.2.c. L’homéostasie du zinc est perturbée dans la maladie d’Alzheimer

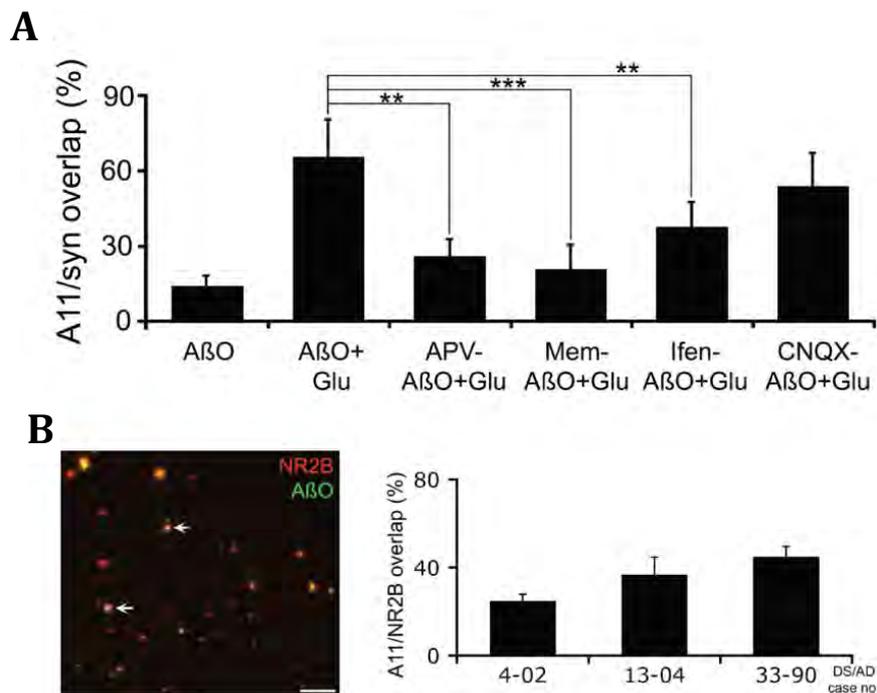
Le zinc vésiculaire n’est probablement pas la seule source de zinc favorisant l’agrégation des monomères d’A $\beta$ . Dans des modèles murins de la maladie d’Alzheimer (souris APP/PS1), les niveaux d’expression des transporteurs du zinc ‘ZnTs’ sont augmentés (**Figure 37**, Zhang et al., 2010). Impliqués dans l’évacuation du zinc à l’extérieur du cytoplasme des neurones, l’élévation de l’expression des ZnTs pourrait également expliquer les niveaux de zinc anormaux observés chez les patients souffrant de cette maladie (Corrigan et al., 1993; Deng Q.S., 1994; Danscher et al., 1997). Alors que l’élévation des niveaux de ZnT3 favorise l’accumulation de zinc dans les vésicules synaptiques, et donc l’agrégation des monomères d’A $\beta$  à la synapse au cours de l’activité synaptique (Cf. ci-dessus), l’augmentation du nombre de ZnTs à la membrane plasmique des neurones (en particulier ZnT1) pourraient augmenter l’export du zinc cytoplasmique, favorisant son élévation dans le milieu extracellulaire.



**Figure 37:** Expression modifiée des transporteurs du zinc ZnTs dans un modèle murin de la maladie d’Alzheimer (App swe/PS1dE9). \*, \*\* indiquent une différence significative (respectivement  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). Les barres d’erreur représentent l’écart-type. Adapté de Zhang et al., 2010.

### III.B.2.d. Les oligomères d’A $\beta$ se lient à la sous-unité GluN2B des rNMDAs

Les oligomères d’A $\beta$ , accumulés à la synapse sont idéalement placés pour interférer avec des protéines impliquées dans la transmission synaptique. La mémantine (1-amino-3,5-diméthyladamantane), un composé classiquement utilisée dans la prise en charge des patients souffrant de la maladie d’Alzheimer, est un antagoniste des rNMDAs contenant la sous-unité GluN2B. L’utilisation de cette molécule (5  $\mu$ M) dans les mêmes conditions expérimentales que celles exposées ci-dessus, révèle une diminution de l’accumulation des oligomères à la synapse (**Figure 38A**, [Deshpande et al., 2009](#)). Ces mêmes résultats sont obtenus avec l’ifenprodil (4-[2-[4-(cyclohexylmethyl)-1-piperidiny]-1-hydroxypropyl]phenol, 5  $\mu$ M), un modulateur allostérique négatif des rNMDAs contenant la sous-unité GluN2B, ainsi qu’avec l’APV (acide 2-amino-5-



**Figure 38 : La sous-unité GluN2B des rNMDA est une cible synaptique des oligomères d’A $\beta$ .** **A.** L’utilisation d’inhibiteurs des rNMDA contenant la sous-unité GluN2B (ifenprodil, mémantine) réduit l’accumulation à la synapse des oligomères d’A $\beta$ . Conditions expérimentales, Cf. Fig. 28A. Mem, mémantine, 5  $\mu$ M ; Ifen, ifenprodil, 5  $\mu$ M ; APV, 10  $\mu$ M ; CNQX, 10  $\mu$ M (bloqueur des rAMPA). **B.** Colocalisation de la sous-unité GluN2B (noté NR2B) des rNMDA et des oligomères d’A $\beta$  dans une tranche coronale de cerveau de patients souffrant de la maladie d’Alzheimer. En vert, marquage immunologique d’oligomères d’A $\beta$ . En rouge marquage immunologique de la sous-unité GluN2B. . \*\* et \*\*\* indiquent une différence significative (respectivement  $p < 0.01$  et  $p < 0.001$ ). Les barres d’erreur représentent l’écart-type. Adapté de [Deshpande et al., 2009](#).

phosphonovalérique, 10  $\mu\text{M}$ ), un antagoniste des rNMDAs (**Figure 38A**, [Deshpande et al., 2009](#)). De plus, sur des sections de cerveaux humains souffrant de la maladie d’Alzheimer, l’utilisation d’anticorps dirigés contre les rNMDAs contenant la sous-unité GluN2B ainsi que contre les oligomères d’A $\beta$ , révèle leur colocalisation (**Figure 38B**, [Deshpande et al., 2009](#)). Ces résultats identifient pour la première fois une cible synaptique des oligomères d’A $\beta$ , les sous-unités GluN2B des rNMDAs. Leur fixation à ces sous-unités permettrait donc de les stabiliser aux synapses, favorisant leur action toxique et l’élimination des connexions neuronales qui en résulte.

En parallèle, grâce à leur forte perméabilité calcique, les rNMDAs sont impliqués dans les processus à la base de la plasticité synaptique et de la mémorisation. La fixation des oligomères sur ces protéines (qui semble être dépendante de l’activité, *Cf.* ci-dessus) pourrait entraver leur fonctions et par extension, rendre silencieuses certaines synapses. Or, les synapses silencieuses sont fréquemment éliminées dans le SNC ([Purves, 2012](#)). La fixation des oligomères d’A $\beta$  aux sous-unités GluN2B des rNMDAs apporte une potentielle base moléculaire aux troubles de la mémoire observés lors de la phase initiale de la maladie d’Alzheimer, avant même la formation de plaques amyloïdes et la dégénérescence neuronale.

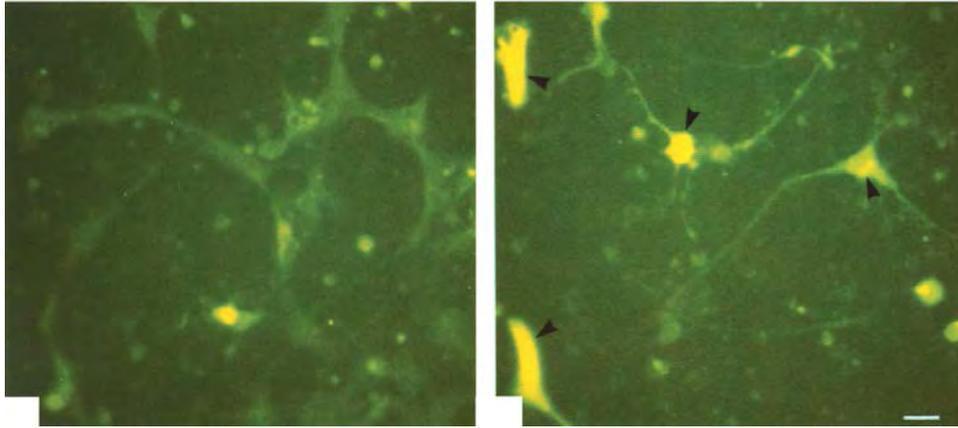
Chez les patients souffrant de la maladie d’Alzheimer, la production de peptides A $\beta$  est augmentée. Libéré à la synapse avec le glutamate à la suite d’une activité synaptique ([Vergnano et al., 2014](#)), le zinc se fixe sur les monomères d’A $\beta$ , allongeant leur demi-vie et favorisant leur agrégation au voisinage des connexions neuronales. La formation d’oligomères toxiques dans la phase initiale de la maladie d’Alzheimer explique l’existence chez les patients de troubles mnésiques malgré la faible densité des plaques amyloïdes. Ces oligomères inhibent le processus de LTP, mécanisme à la base de la mémorisation. Leur fixation sur les sous-unités GluN2B des rNMDAs pourrait impacter le fonctionnement de ces récepteurs clés dans le déroulement du processus de LTP. Le zinc apparaît comme étant une cible thérapeutique d’intérêt dans le traitement de la maladie d’Alzheimer. L’utilisation de clioquinol, un chélateur du zinc, mais également de mémantine ou d’ifenprodil, deux inhibiteurs des rNMDAs, ont permis de réduire l’agrégation des oligomères d’A $\beta$  à la synapse. Alors que la mémantine est déjà utilisée dans le traitement de la maladie d’Alzheimer avec un bénéfice très relatif sur

l’amélioration des symptômes, l’ifenprodil est une molécule disposant déjà d’une autorisation de mise sur le marché mais pour des indications autres que cette maladie. Utilisée jusqu’en mai 2015 comme vasodilatateur périphérique ainsi que dans le traitement des claudications intermittente des artériopathies chroniques oblitérantes des membres inférieurs, il serait intéressant d’évaluer son effet dans le traitement de la maladie d’Alzheimer.

### III.B.3. Effets neurotoxiques des peptides d’A $\beta$ et production de ROS

La production d’espèces radicalaires et le stress oxydatif qui en découle, sont impliqués dans de nombreuses pathologies, notamment des maladies associées à l’ischémie cérébrale (Cf. partie III.A). Avec l’identification de taux anormalement élevés de protéines oxydées (Hensley et al., 1995), de produits de peroxydations de lipides tels que l’HNE (Lovell et al., 1995) ainsi que produits d’oxydations de l’ADN (Mecocci et al., 1994) à partir de sections de cerveaux, de liquide céphalo-rachidien et de sérum de patients atteints de la maladie d’Alzheimer, il semble que les dommages causés par cette pathologie soient également associés à un stress oxydatif excessif.

Alors que l’oligomérisation des monomères d’A $\beta$  au voisinage des synapses est impliquée dans le déclenchement des troubles mnésiques, ces peptides favorisent également l’élévation du stress oxydatif (Behl et al., 1994). Les effets pro-oxydants des monomères ont été révélés grâce à l’utilisation de la sonde 2’,7’-dichlorofluorescinediacetate (DCFDA) appliquée sur des cultures neuronales en présence de peptides d’A $\beta$ . Cette sonde perméable aux membranes est rapidement transformée en 2’,7’-dichlorofluorescin (DCF), un composé restant bloqué dans le compartiment intracellulaire. Le DCF se comporte alors comme une sonde fluorescente sensible aux peroxydes tels que l’H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Exposés à 20  $\mu$ M de monomères d’A $\beta$ , les neurones en culture de rats révèlent une élévation du signal de fluorescence du DCF retenu dans le compartiment intracellulaire (Figure 39, Behl et al., 1994). Le niveau d’augmentation de la fluorescence s’avère être significativement plus important que dans des cultures contrôles (86% de différence, Behl et al., 1994). En parallèle, l’exposition préalable de ces neurones à de la vitamine E, un agent antioxydant, inhibe la



**Figure 39 :** Les peptides d’A $\beta$  induisent la production de radicaux libres dans le cytoplasme des neurones. Cultures corticales de neurones de rats exposés à 20  $\mu$ M d’A $\beta_{1-40}$  de synthèse pendant 23 heures. Production de radicaux libres révélés à l’aide de DCF (10  $\mu$ M, 1 heure). Gauche, contrôle ; Droite, culture exposée à A $\beta$ . Flèches noirs, augmentation des niveaux de fluorescence de DCF dans les neurones indiqués. Barre d’échelle, 50  $\mu$ M. Adapté de Behl et al., 1994.

production de peroxydes (Behl et al., 1994) et montre également un effet neuroprotecteur vis-à-vis de la toxicité des peptides d’A $\beta$  (Behl et al., 1992). D’après ces résultats, il semble que les monomères d’A $\beta$  soient capables de promouvoir la production de ROS dans le cytoplasme qui en retour favorise la dégénérescence neuronale. L’inhibition de cet effet par l’utilisation de DPI, un inhibiteur de la NADPH, montre qu’une partie de la production de ROS passe par cette enzyme (Behl et al., 1994).

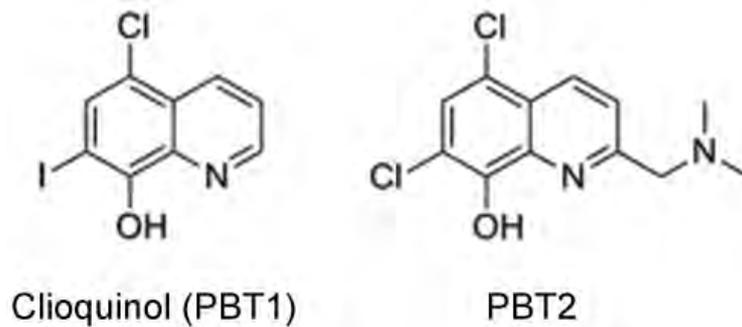
L’implication directe des monomères dans l’élévation du stress oxydatif pourrait avoir des conséquences sur les niveaux de zinc intra- et extracellulaires. Dans un premier temps, nous avons défini dans la section précédente (Cf. partie III.A.3.c) que l’élévation de la production de ROS dans le cytoplasme des neurones participe à la libération de zinc depuis les stocks intracellulaires et en retour favorise la dégénérescence des neurones, ce qui est probablement le cas dans la maladie d’Alzheimer. Dans un second temps, l’élévation de la production de radicaux libres pourrait agir directement sur les MT-III extracellulaires (Uchida et al., 2002). Ces protéines, comme celles localisées dans le cytoplasme des neurones (Cf. partie II.B.5) sont capables de stocker individuellement 7 ions zinc et la liaison [MT-Zinc] est sensible au stress oxydatif (Jiang et al., 1998; Aravindakumar et al., 1999; Aizenman et al., 2000; Bossy-Wetzl et al., 2004; Medvedeva et al., 2017). Les monomères d’A $\beta$  étant capable d’induire l’élévation du stress oxydatif dans les neurones, il est également envisageable

qu’elles favorisent une production de radicaux libres dans l’ensemble du parenchyme cérébral (Mecocci et al., 1994; Hensley et al., 1995; Lovell et al., 1995). Cet effet favoriserait l’élévation des niveaux de zinc dans la matrice extracellulaire et par extension, la polymérisation des monomères d’A $\beta$  (Cf. partie III.B.1.b).

#### III.B.4. Perspectives de traitements

Le zinc participe à l’initiation de la maladie d’Alzheimer par la mise en place de deux mécanismes toxiques. En favorisant la polymérisation des monomères d’A $\beta$  et la formation d’oligomères toxiques au voisinage des synapses, le zinc perturbe les mécanismes à la base de la mémorisation et de l’apprentissage (LTP) et favorise également l’élimination de connexions neuronales. Ce processus est pensé comme étant un des mécanismes à la base des troubles mnésiques observés au cours des premières étapes de la maladie. En parallèle, les monomères d’A $\beta$  initient la production d’espèces radicalaire. Bien que la relation entre la production de ROS et ces peptides ne soit pas encore finement identifiée, cet effet pourrait entraîner des montées de zinc dans la matrice extracellulaire (via les MT-III extracellulaires), encourageant la polymérisation des monomères d’A $\beta$  et en parallèle, conduire à des montées de zinc intracellulaire, mécanisme associé à la dégénérescence neuronale.

*In vitro*, différentes stratégies ont permis de réduire les dommages induits par le zinc dans la maladie d’Alzheimer. Grâce à la dissociation du complexe [A $\beta$  – Zn<sup>2+</sup>] par l’utilisation de clioquinol (également appelé PBT1), Deshpande et al., ont réduit la formation d’oligomères toxiques au voisinage des synapses. *In vivo*, utilisée par voie orale sur des modèles murins (souris APP2576 Tg, 30 mg/kg/jour pendant 9 semaines), cette molécule permet de réduire de 49% la formation de plaques amyloïdes par rapport aux groupes contrôles (Cherny et al., 2001). Cet effet est associé à une amélioration des fonctions cognitives, notamment dans les tâches d’acquisition et de mémoire spatiale (Adlard et al., 2008). Le clioquinol a fait l’objet d’essais cliniques et a atteint la phase IIa du processus. Bien qu’améliorant lentement les fonctions cognitives et réduisant de façon significative les niveaux plasmatiques d’A $\beta$  (Ritchie et al., 2003),



*Figure 40 : Structure chimique du clioquinol (PBT1) et du PBT2.*

l’essai a été arrêté avant le passage en phase III en raison d’effets secondaires importants. En cause, un de ses métabolites, le di-iodo-8-hydroxy quinoline.

C’est la raison pour laquelle le PBT2, un dérivé du clioquinol, a été mis au point. Structuellement proche (délétion d’une fonction iodine), le PBT2 présente les avantages d’avoir une synthèse plus simple, une plus grande solubilité ainsi qu’un passage amélioré de la BHE (**Figure 40**). En effet, le ratio cerveau/plasma de ce composé est 24 à 31 fois plus élevé que pour le clioquinol chez la souris ([Adlard et al., 2008](#)). Ces deux composés sont des chélateurs du zinc mais agissent également par leur fonction de ionophore, facilitant le franchissement des membranes par le métal. Dans ce contexte, l’effet thérapeutique de ces composés proviendrait d’un passage favorisé du cation à l’intérieur des cellules, accélérant la clairance en zinc depuis la matrice extracellulaire. Or, le PBT2 s’avère avoir un pouvoir « ionophorique » supérieur à celui de son aîné ([Adlard et al., 2008](#)). Sur des modèles murins (souris APP/PS1, 30 mg/kg/jour pendant 9 semaines), ce composé réduit la formation de plaques de l’ordre de 80% et démontre une amélioration dans les 6 jours des fonctions cognitives. Le PBT2 est un composé prometteur, ayant montré des effets positifs lors d’un essai clinique de phase Iia ([Lannfelt et al., 2008](#)), ce composé serait actuellement en phase III d’essai clinique.

Une des cibles synaptiques des oligomères d’A $\beta$  sont les rNMDAs contenant la sous-unité GluN2B. Ces récepteurs, impliqués dans la mémorisation, sont une cible d’intérêt pour la prise en charge de la maladie d’Alzheimer. L’utilisation de composés réduisant l’activité de ces récepteurs tels que la mémantine, l’APV ainsi que l’ifenprodil, a révélé des effets intéressants de diminution de la formation de plaques amyloïdes au

voisinage des synapses (Deshpande et al., 2009). La mémantine est une molécule disposant actuellement d’une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des formes modérées à sévères de la maladie d’Alzheimer. Le mécanisme d’action proposé pour ce composé passe par la normalisation de l’activité excessive des rNMDAs. En effet, cette molécule est un antagoniste non compétitif de faible affinité qui agit en se fixant dans le pore des rNMDA contenant la sous-unité GluN2B. Pour entrer dans son site de fixation, il est donc nécessaire que le canal du récepteur soit ouvert, impliquant que la protéine soit dans une conformation active. Ce mécanisme explique donc que la mémantine agisse préférentiellement sur des rNMDAs activés. Or, dans la maladie d’Alzheimer il y a une hyperactivité des rNMDAs, ce qui permet à la mémantine de normaliser leur activité. Le fait que son affinité pour le récepteur soit faible et que sa cinétique de dissociation soit rapide, permettent à la mémantine de ne bloquer que partiellement le passage des ions au travers du canal et donc de ne pas rendre silencieuse la transmission NMDA, indispensable à la physiologie synaptique et à la mémorisation (Lipton, 2004; Mony et al., 2009). Cependant, l’amélioration des symptômes cognitifs apportée par la mémantine est relative et la molécule ne prévient pas non plus l’avancée de la maladie. L’une des raisons de cette faible efficacité est due au fait que la mémantine, une molécule chargée, passe peu la BHE.

Face au manque d’efficacité de ce traitement, des alternatives existent, bien qu’elles ne fassent actuellement pas l’objet d’essais cliniques. Comme évoqué précédemment (Cf. partie III.B.2.d), l’ifenprodil est une molécule ayant disposé d’une autorisation de mise sur le marché jusqu’en mai 2015. Utilisée dans des indications cardio-vasculaires, cette molécule prévient également l’agrégation des oligomères à la synapse dans le cas de la maladie d’Alzheimer. Cependant, cette molécule ne franchit pas la BHE et son utilisation en clinique impose de remanier sa structure sans perdre son activité (pharmacomodulations). Les implications physiologiques des rNMDAs étant vastes, aussi bien en périphérie que dans le système nerveux central, bloquer ces récepteurs pourrait-être associé à de nombreux effets indésirables notamment cardio-vasculaires voir cytotoxiques (Mony et al., 2009). L’utilisation de molécules ciblant ces récepteurs doit donc se faire avec beaucoup de précautions. Une stratégie consisterait à cibler certains sous-types de rNMDAs impliqués dans la maladie d’Alzheimer, comme ceux contenant la sous-unité GluN2B.

D’autres stratégies thérapeutiques peuvent également être envisagées. Les monomères d’A $\beta$  générant un stress oxydatif, l’utilisation de vitamine E a permis à la fois de réduire la production de ROS mais également de protéger les neurones face à leur action toxique (Behl et al., 1992; Behl et al., 1994).

Il est important de préciser que beaucoup de ces potentielles voies thérapeutiques ont été identifiées en utilisant des modèles d’animaux transgéniques développant naturellement la maladie d’Alzheimer. Ces modèles sont construits sur la base d’une, deux voire trois mutations génétiques identifiées comme favorisant la formation de plaques amyloïdes. C’est le cas notamment des lignées de souris comportant une mutation de l’APP (souris « APP ») ou de la preseniline 1 (souris « PS1 »), mutations ayant été identifiées dans des formes familiales de la maladie d’Alzheimer. Il est donc important de garder en mémoire qu’aucun de ces modèles ne reproduit la complexité des formes *de novo* de la maladie pour lesquels l’impact de l’environnement est prépondérant. De plus, il n’est pas rare que des molécules présentant des effets thérapeutiques chez l’animal ne montrent peu ou pas d’activité chez l’homme. Une des conditions indispensables est, encore une fois, le passage de la BHE.

### III.C. L'épilepsie

Le syndrome épileptique, plus communément appelée épilepsie, est une pathologie caractérisée par la récurrence spontanée de crises épileptiques résultant d'une décharge anormale et simultanée de neurones. Décrite depuis l'antiquité, cette maladie chronique affecte 50 millions de personnes à travers le monde (OMS, 2017) et 0.6 à 0.7% de la population en France. L'épilepsie peut se manifester sous plusieurs formes parmi lesquelles figurent les épilepsies partielles et généralisées. Dans le cadre d'une épilepsie partielle (également appelée épilepsie focale), la décharge synchrone et excessive des neurones est, soit localisée dans une région précise du cerveau, soit limitée à un seul hémisphère. La localisation du foyer épileptogène détermine la clinique de la crise et il est alors possible de suivre la progression de l'activité épileptique dans le cerveau en fonction de l'évolution de la symptomatologie. Ainsi, une crise d'épilepsie prenant naissance dans une aire motrice se manifesterait dans la majorité des cas par des tremblements du membre ou de la partie du corps prise en charge par la région du cerveau affectée. En parallèle, si la décharge se produit dans une aire sensitive elle conduira fréquemment à des hallucinations visuelles ou auditives en fonction de la région atteinte. Quel que soit la symptomatologie, le patient est conscient lors des crises partielles, à la grande différence des crises généralisées au cours de laquelle l'hyperactivité neuronale affecte les deux hémisphères cérébraux. Ces crises se manifestent également sous plusieurs formes dont la célèbre crise tonico-clonique au cours de laquelle le patient perd connaissance et chute en affichant des phases de contractions musculaires intenses (phase tonique) et de secousses musculaires (phase clonique). Crises partielles et généralisées sont toutes deux résolutive mais dans le cas où le patient ne reprend pas conscience et que la crise d'épilepsie se poursuit, le pronostic vital est engagé avec un risque de lésions cérébrales graves. On parle alors d'état de mal épileptique généralisé, ou *status epilepticus*, une urgence thérapeutique associée au processus excitotoxique (Cf. partie III.A, pour revue, voir INSERM, 2012; OMS, 2017).

Un certain nombre de données permettent de penser que le zinc est un acteur du processus épileptique (pour revue, voir Frederickson, 1989; Paoletti et al., 2009; Prakash et al., 2015). En effet, les régions particulièrement sujettes à la naissance de

crises d'épilepsie, telles que le cortex et l'hippocampe, sont riches en zinc (**Figure 1**, [Frederickson et al., 2000](#)). De plus, les niveaux sériques de zinc sont réduits de façon significative chez 653 patients souffrant de syndromes épileptiques, traités par mono ou polythérapies, par rapport à leurs groupes contrôles ([Saghazadeh et al., 2015](#)). Enfin, le zinc est impliqué dans la modulation de l'activité synaptique et de l'excitabilité neuronale ([Paoletti et al., 1997](#); [Smart et al., 2004](#); [Rachline et al., 2005](#); [Gielen et al., 2009](#); [Vergnano et al., 2014](#)). De nombreuses études se sont alors intéressées à révéler la part du métal dans le déclenchement ou la protection de syndromes épileptiques.

### **III.C.1. Manipuler les concentrations en zinc affecte la susceptibilité au déclenchement des crises d'épilepsie**

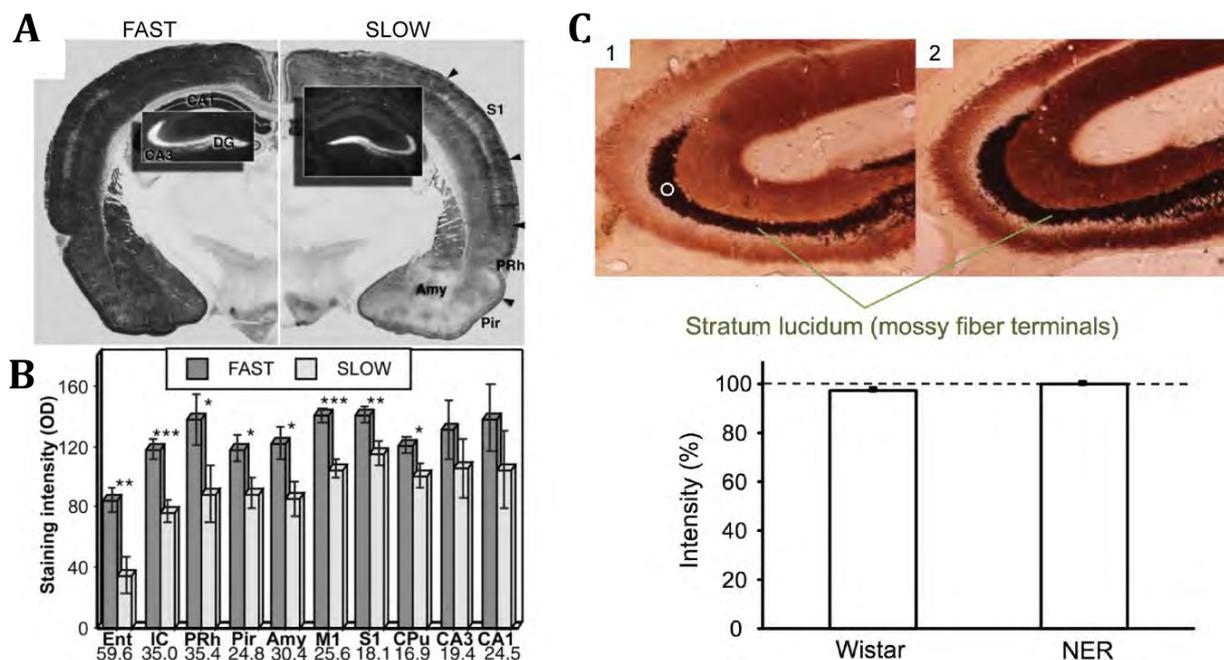
Différentes stratégies peuvent être employées afin de mettre en évidence les implications du zinc dans la susceptibilité au déclenchement des crises d'épilepsie. Une technique communément employée consiste à faire varier les niveaux de zinc, directement dans le cerveau de l'animal, à l'aide d'outils pharmacologiques ou génétiques. La question du rôle du zinc en tant qu'agent endogène pro- ou antiépileptique reste encore aujourd'hui fortement débattue (*Cf.* ci-dessous et pour revue voir notamment [Paoletti et al., 2009](#) et [Prakash et al., 2015](#)).

#### **III.C.1.a. Effets d'injections intracérébrales de zinc sur la susceptibilité au déclenchement de crises d'épilepsie**

La notion que le zinc agit comme un agent pro-épileptogène a notamment été portée par l'étude de [Pei and Koyama, \(1986\)](#). Ces derniers montrent qu'en injectant dans l'hippocampe de cerveaux de lapins 10 µL de sulfate de zinc (200 µg/kg), ces derniers développent pendant plusieurs semaines des symptômes typiques de crises partielles cloniques et de crises partielles secondairement généralisées. L'injection de zinc est alors suggérée à l'époque comme étant un modèle d'épilepsie valable chez l'animal. Cependant, ces injections provoquent une élévation importante des niveaux de zinc dans le compartiment extracellulaire et nous avons vu précédemment (*Cf.* partie

III.A) que ces élévations sont à l'origine de troubles excitotoxiques associés à la dégénérescence neuronale. Les effets proépileptiques déclenchés par les injections de zinc pourraient donc être artéfactuelles car elles seraient la conséquence de son accumulation excitotoxique dans le compartiment intracellulaire, ne reflétant pas l'action du zinc vésiculaire *in vivo* sur la susceptibilité à déclencher des crises d'épilepsie. De façon intéressante, une autre étude utilisant des injections intra-hippocampiques de zinc, révèle quant à elle des effets antiépileptiques (Elsas et al., 2009). Des différences sur la forme du zinc délivré (sulfate de zinc vs chlorure de zinc), le mode d'injection (aiguë vs chronique), le site exact de l'injection, le modèle animal (lapin vs souris) ainsi que sur la technique de chirurgie employée pourraient être à l'origine de ces effets contraires. Ces résultats diamétralement opposés mettent en avant l'importance de la méthodologie utilisée ainsi que la complexité de l'interprétation des données qui ne doivent pas être biaisées par le mode opératoire.

Une autre piste intéressante de l'implication du zinc dans la susceptibilité au déclenchement des crises d'épilepsie, est le fait que les niveaux de zinc sont altérés chez des rats épileptiques (Flynn et al., 2007). Ces rats génétiquement modifiés (appelés FAST) déclenchent des crises de façon quotidienne. En analysant les niveaux de zinc libre dans leur cerveau à l'aide du marquage de Timm, il s'avère que ces animaux ont 30% de zinc en plus par rapport à des rats résistants à l'épilepsie (appelés SLOW). Les quantités de zinc sont particulièrement augmentées dans des régions connues pour abriter des foyers épileptogènes telles que le cortex entorhinal, insulaire et perirhinal ainsi que l'amygdale (Figure 41A et 41B, Flynn et al., 2007). Même si l'absence de comparaison avec des rats de type sauvage fait défaut dans cette étude, ces résultats suggèrent que des altérations des niveaux de zinc peuvent être à l'origine d'une modification de la susceptibilité au déclenchement de crises d'épilepsie. Deux conclusions peuvent alors être tirées. La première, allant dans le sens d'un effet proépileptique du zinc, est que l'élévation des niveaux de ce cation divalent favorise le déclenchement de crises d'épilepsie. L'autre conclusion serait en faveur d'un effet antiépileptique. L'élévation des niveaux de zinc vésiculaire chez les rats FAST pourrait être un mécanisme de protection au déclenchement des crises d'épilepsies. Cet effet pourrait se justifier par l'action inhibitrice du zinc sur les rNMDAs contenant la sous-unité GluN2A (Cf. partie II.C.1.a, Paoletti et al., 2000). Ces récepteurs excitateurs présents



**Figure 41 : Niveaux de zinc altérés dans le SNC de rats épileptiques ?** **A.** Marquage de Timm sur des tranches coronales de cerveaux de rats FAST (gauche) et SLOW (droite). **B.** Quantification des niveaux de zinc issus du marquage de Timm (A.). Les niveaux de zinc sont augmentés dans les régions sujettes aux foyers épileptogènes, notamment cortex entorhinal (Ent), insulaire (IC) et perirhinal (PRh) ainsi que l'amygdale (Amy). Pir, cortex pyriforme ; M1, cortex moteur primaire ; S1, cortex somatosensoriel primaire ; CPu, Septum et caudate putamen (striatum) ; CA3 et CA1, région 3 et 1 de la corne d'Ammon (hippocampe) ; DG, gyrus denté (hippocampe). \*, \*\* et \*\*\* représentent une différence significative (respectivement  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. **C.** Marquage de Timm sur des tranches d'hippocampe de cerveaux de rats de type sauvage (1) et Noda déclenchant des crises d'épilepsie spontanément (2). Cercle, région d'intérêt sur laquelle l'intensité du marquage est mesurée. En bas, quantification issue du marquage de Timm. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Adapté de Flynn et al., 2007 (A et B) et Takeda et al., 2013 (C).

aux synapses glutamatergiques sont idéalement positionnés pour subir les effets du zinc vésiculaire. En inhibant ces récepteurs glutamatergiques excitateurs, le zinc diminuerait l'excitabilité du réseau à la base de son effet antiépileptique. Une autre possibilité est son action sur les récepteurs métabotropiques du zinc (mZnR) ou la promotion indirecte d'effets antiépileptique via les récepteurs GABA<sub>A</sub> (Cf. partie III.C.2, Chorin et al., 2011)

Dans le cadre d'une littérature controversée, les résultats obtenus par Flynn et al., sont remis en question. Takeda et al., (2013) n'observent aucune différence de niveaux de zinc entre des rats de type sauvage et un autre modèle de rats sujets à des crises d'épilepsie (rats Noda déclenchant spontanément une crise toutes les 30 heures, **Figure 41C**, Takeda et al., 2013). Cette différence trouve probablement son origine sur la technique de marquage du zinc employée. Les concentrations de ce métal dans les vésicules synaptiques sont faibles ([1-5 mM], Vergnano et al., 2014). Alors que l'affinité des sondes zinc fluorescentes (TSQ et ZP-1 en particulier) ne permette pas d'accéder à

de telles concentrations en zinc (Flynn et al., 2007), en utilisant le marquage de Timm, Flynn et Takeda s'assurent de révéler des niveaux de zinc libre même en très faible quantité et en particulier dans les vésicules synaptiques. En effet, ce marquage est basé sur un principe d'*amplification* autométallographique de nanocristaux de zinc-sélénium (ou zinc-argent). Dans une première étape, le zinc est précipité par des sulfures (apportés ici par du sulfure de sodium NaS). Cette réaction catalyse ensuite la réduction d'ions sélénium (ou argent) à l'aide de divers agents réducteurs. Bien que le phénomène d'auto-amplification du marquage de Timm soit utile pour révéler de faibles concentrations en zinc, la linéarité de cette technique (quantité de zinc par rapport au signal) n'est pas certaine (Danscher, 1981). Il est donc difficile d'utiliser ce mode de révélation du zinc pour effectuer des comparaisons quantitatives comme c'est le cas avec Flynn et al., 2007 et Takeda et al., 2013, expliquant probablement, la différence de résultats.

L'interprétation des effets du zinc sur le déclenchement des crises d'épilepsies apparait donc comme complexe, notamment liée aux techniques expérimentales utilisées ainsi qu'à son action pharmacologique inhibitrice à la fois sur les rNMDAs et les rGABA<sub>A</sub> (Paoletti et al., 2000; Smart et al., 2004; Flynn et al., 2007). Cependant, les rapports décrivant des effets antiépileptiques du zinc sont nombreux.

### **III.C.1.b. Effets d'un régime appauvrie en zinc sur la susceptibilité au déclenchement de crises d'épilepsie**

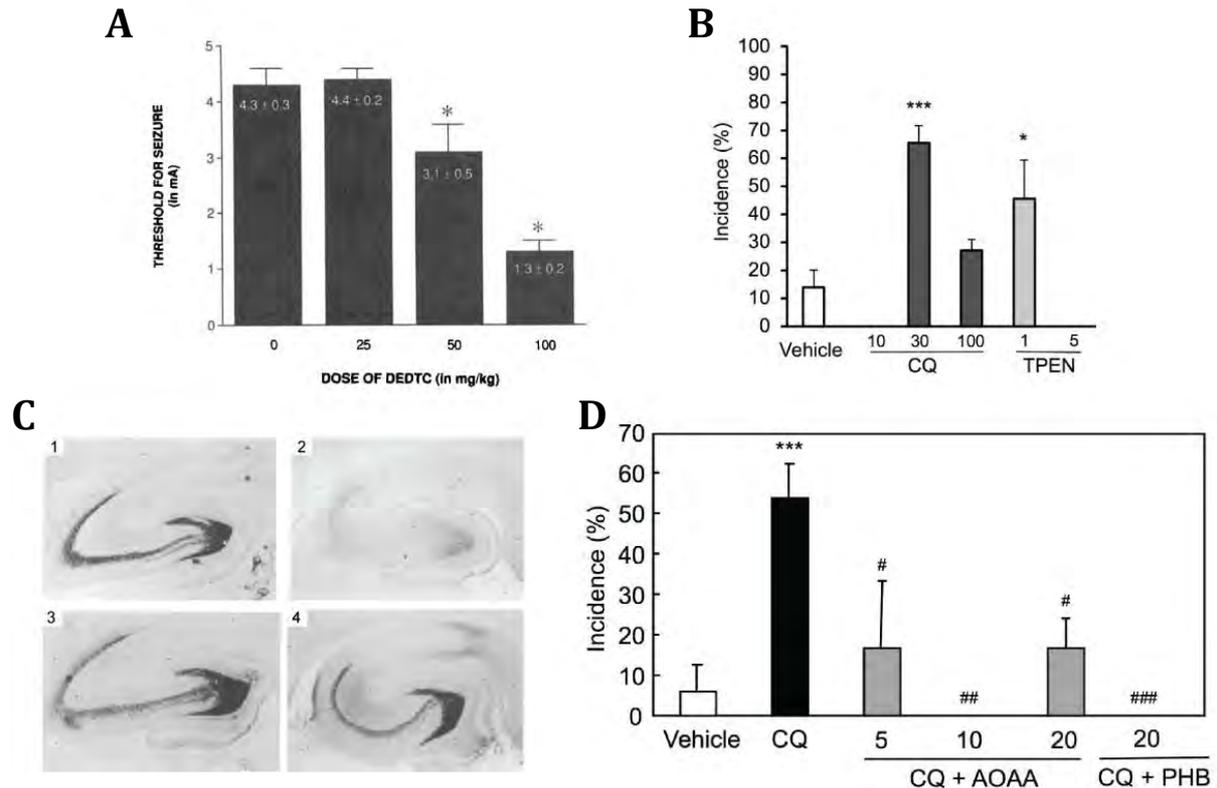
Une stratégie permettant d'affecter de façon non invasive les niveaux de zinc synaptiques consiste à faire subir à des rats un régime appauvri en zinc. Dans ce contexte, les niveaux de zinc vésiculaire sont effectivement diminués au bout de 4 semaines de privation, correspondant à la demi-vie estimée du zinc dans le SNC (Takeda et al., 1995; Takeda et al., 2003; Takeda et al., 2006). Ce régime favorise cependant la survenue des crises d'épilepsie puisque la latence de déclenchement des crises après injection de kaïnate est réduite chez ces animaux. De façon intéressante seules les épilepsies de type 'wet dog shakes' (tremblements paroxystiques de la tête, du cou et du

tronc) et les myoclonies sont affectées par ce régime. Aucun effet n'est observé sur les crises tonico-cloniques, ni même sur le niveau de mort neuronale post-épileptique (Takeda et al., 2006).

D'après ces résultats, le zinc libre semble jouer un rôle de facteur protecteur au déclenchement des crises d'épilepsie puisque son élimination partielle des vésicules synaptiques augmente la susceptibilité au déclenchement des crises. Le métal se comporterait donc comme un agent endogène antiépileptique (Takeda et al., 2006). Il est important de noter que ce modèle, basé sur un régime appauvri en zinc, permet en réalité de n'apprécier que des effets globaux du zinc sur la susceptibilité au déclenchement de crises d'épilepsie (ici induites par le kaïnate). En effet, en réduisant les apports en zinc, d'autres sources que le zinc libre (en particulier vésiculaire) peuvent être affectées. Ce régime impacte probablement le réservoir de zinc participant à la structure ou à la fonction de certaines protéines, de la même façon que des régimes appauvris en fer affectent le taux d'hémoglobine et ont des conséquences multiples sur la santé. Cependant, ces résultats sont intéressants compte tenu du fait que 50% de la population mondiale n'a pas d'apports suffisants en zinc (Brown KH, 2001). Ce type d'études, bien que peu spécifique, est intéressant pour apprécier les conséquences pathologiques d'une carence en zinc. Dans ce contexte, il semble que la carence n'augmente pas nativement la susceptibilité de déclencher des crises d'épilepsie (pas de crise sans injection de kaïnate). Cependant, l'effet protecteur du zinc est révélé lorsque la crise est provoquée par l'injection de kaïnate. L'effet antiépileptique du métal se manifesterait uniquement lors d'une activité neuronale anormalement intense.

### **III.C.1.c. Effets de l'utilisation de chélateurs du zinc sur la susceptibilité au déclenchement de crises d'épilepsie**

L'utilisation de chélateurs perméables aux membranes est une autre stratégie permettant de réduire les niveaux de zinc synaptique. Une des premières études ayant employé cet outil pharmacologique a montré que l'injection *intrapéritonéale* d'un chélateur de zinc perméable aux membranes, le diethyldithiocarbamate (DEDTC), réduit le seuil de déclenchement des crises d'épilepsie de rats uniquement lorsqu'une



**Figure 42 : Effets protecteur du zinc vis-à-vis du déclenchement des crises d'épilepsie.** **A.** La chélation du zinc abaisse le seuil de déclenchement des crises d'épilepsie chez le rat. Valeur moyenne du seuil de déclenchement des crises d'épilepsie (exprimé en mA) à la suite d'une stimulation électrique de l'hippocampe de rats après injection intrapéritonéale de différentes concentrations en DEDTC. **B.** Augmentation de la susceptibilité au déclenchement des crises d'épilepsie chez des rats Noda injectés avec du clioquinol ou du TPEN à différentes concentrations (par voie intrapéritonéale). Axe des ordonnées, incidence au déclenchement des crises d'épilepsie. \* et \*\*\* indiquent une différence significative (respectivement  $p < 0.05$  et  $p < 0.001$  par rapport au véhicule (contrôle)). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. **C.** Effets de DEDTC administré par voie intrapéritonéale sur les niveaux de zinc dans l'hippocampe de cerveau de rats révélé par marquage de Timm. Condition contrôle, administration de liquide céphalorachidien artificiel par voie intrapéritonéale (1, en haut à gauche). L'injection intrapéritonéale de DEDTC (100 mg/kg) réduit drastiquement les niveaux de zinc dans l'hippocampe, 30 minutes après l'injection (2, en haut à droite). Les niveaux de zinc reviennent rapidement à la normale 60 et 120 minutes après l'injection de DEDTC (respectivement 3 et 4, en bas à gauche et droite). **D.** Suppression de l'effet proépileptique de la chélation du zinc chez des rats Noda grâce à l'utilisation de potentialisateurs de la transmission GABAergique à différentes concentrations. CQ, clioquinol (30 mg/kg); AOAA, l'acide aminooxyacétique (5, 10 et 20 mg/kg); PHB, phenobarbital (20 mg/kg). #, ##, ### et \* indiquent une différence significative (respectivement,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  par rapport au clioquinol seul et  $p < 0.001$  par rapport au véhicule (contrôle)). Les barres d'erreur indiquent une différence significative. Adapté de [Mitchell and Barnes, 1993](#) (A et D) et [Takeda et al., 2013](#) (B et C).

stimulation électrique intrahippocampale est effectuée à l'aide d'électrodes (pas de crise en absence de stimulation, **Figure 42A**, [Mitchell and Barnes, 1993](#)).

D'un autre côté, le clioquinol, molécule présentée précédemment comme un potentiel candidat médicament dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (*Cf.* partie III.B.4), a également été testé *in vivo* pour évaluer l'effet du zinc sur la susceptibilité au déclenchement des crises d'épilepsie. En parallèle du TPEN (1 et 5  $\mu$ M), l'injection par

voie intra-péritonéale de ces deux chélateurs (Clioquinol 10, 30 et 100  $\mu\text{M}$ ) sur des rats Noda (*Cf.* ci-dessus) augmente eux aussi l'incidence des crises tonico-cloniques (**Figure 42B**, [Takeda et al., 2013](#)). Ces résultats sont doublement intéressants. Premièrement, comme dans le cadre de régimes appauvris en zinc ([Takeda et al., 2006](#)) ou lors de l'utilisation de DEDTC ([Mitchell and Barnes, 1993](#)), ces résultats tendent à confirmer qu'un déficit en zinc libre augmente la susceptibilité au déclenchement de crises d'épilepsies puisque les effets de la chélation du zinc ne sont observés que lorsque l'on augmente artificiellement la probabilité de déclencher une crise d'épilepsie (rats épileptiques, stimulation électrique ou injection d'agents proépileptiques). L'action antiépileptique du zinc apparaît donc une nouvelle fois comme dépendante du contexte et son action ne se manifesterait qu'en protection d'un excès d'activité neuronale. Dans un deuxième temps, ces résultats démontrent que des chélateurs du zinc perméables aux membranes, tels que le DEDTC ou le TPEN, sont capables de franchir la BHE, renforçant leur intérêt pour une éventuelle utilisation en thérapeutique (ischémie, maladie d'Alzheimer ou épilepsie). Administré par voie intrapéritonéale, ces agents pharmacologiques vident *transitoirement* les stocks vésiculaires en zinc (**Figure 42C**, [Mitchell and Barnes, 1993](#)).

Cependant, ces études lèvent également un *problème majeur*. Les chélateurs de zinc tels que le clioquinol, le PBT2 voir éventuellement le TPEN ont démontré un intérêt certain dans la prise en charge de chocs ischémiques (*Cf.* partie III.A.7) ou dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (*Cf.* partie III.B.4). Or, leur utilisation dans des modèles de souris ayant des prédispositions génétiques au déclenchement de crises d'épilepsies exacerbe la survenue de ces crises, conduisant régulièrement à des formes de *status epilepticus* ([Mitchell and Barnes, 1993](#); [Takeda et al., 2006](#); [Takeda et al., 2013](#)). Ce constat limiterait fortement leur utilisation en thérapeutique. Cependant, l'utilisation en parallèle de potentialisateurs de la transmission GABAergique, tels que l'acide aminooxyacétique (un inhibiteur de la GABA transaminase, 5, 10, 20 mg/kg) et de phenobarbital (20mg/kg), permet de réduire significativement l'incidence des crises tonico-cloniques chez les rats Noda même co-injectés avec de clioquinol (**Figure 42D**, [Takeda et al., 2013](#)), ouvrant la possibilité d'une bithérapie chez les patients à risque.

### III.C.1.d. Modification de l'homéostasie du zinc avec des modèles de souris génétiquement modifiées

L'effet antiépileptique du zinc se confirme également dans des modèles de souris génétiquement modifiées. En éliminant le zinc libre dans les vésicules synaptiques (souris ZnT3 KO), l'incidence de survenue des crises myocloniques et tonico-cloniques augmente (Cole et al., 2000). Ces résultats sont identiques chez des souris MT-III KO pour lesquelles ces protéines de stockage intra et extracellulaire de zinc ont été supprimées (Cole et al., 2000). De la même façon qu'avec l'utilisation de chélateurs ou de régimes appauvris en zinc, l'ablation génétique du zinc vésiculaire montre des effets proépileptiques uniquement à la suite de l'injection de kaïnate. De façon intéressante, l'effet n'est pas plus important sur des souris doubles mutantes ZnT3 KO et MT-III KO.

Une piste potentiellement intéressante permettant de révéler la voie moléculaire principale des effets antiépileptiques du zinc, vient du fait que l'injection de drogues inhibant l'action inhibitrice des récepteurs GABA<sub>A</sub> (telles que la bicuculline), n'entraîne aucune différence en terme d'incidence de crises d'épilepsies entre des souris ZnT3 KO et sauvages (Cole et al., 2000). Cette absence d'effet suggère qu'il est nécessaire que les récepteurs GABA<sub>A</sub> soient fonctionnels pour exacerber les effets du zinc dans la survenue de crises d'épilepsie. Ces résultats impliquent donc que l'action de contrôle de l'excitabilité du zinc passerait potentiellement par une augmentation de l'inhibition neuronale, rétablissant la balance avec l'excès d'excitation observé dans un contexte épileptique. Ces observations seront confirmées plus tard, en révélant que le zinc favorise la transmission GABAergique en déstabilisant le gradient électrochimique des ions chlorures au travers de la membrane (abordé dans la partie III.C.2, Chorin et al., 2011).

Le fait que l'injection de sulfate de zinc par voie intrapéritonéale (rats) révèle des effets pro ou antiépileptiques en fonction de la dose est intéressant. Alors que des concentrations élevées (60 mg/kg) augmentent la sévérité des symptômes déclenchés par une injection concomitante de pilocarpine, un agoniste des récepteurs muscariniques, classiquement utilisé comme déclencheur de crises d'épilepsie, l'utilisation de doses plus faibles de zinc (3 mg/kg) réduit la sévérité des crises et

retarde la survenue des tremblements (Baraka et al., 2012). La multiplication des systèmes régulant l'homéostasie du zinc dans et en dehors des cellules laisse penser que l'action physiologique de ce cation divalent dépend du contrôle fin de sa concentration. Toute déviation par rapport aux valeurs physiologiques favoriserait le développement de diverses pathologies telles que l'excitotoxicité ou la maladie d'Alzheimer. La dichotomie entre effet pro- et antiépileptique du zinc semble là encore, être une question de dose.

De nombreux groupes se sont attelés à identifier des effets neurotoxiques ou neuroprotecteurs du zinc vis-à-vis de la susceptibilité au déclenchement des crises d'épilepsie. Les techniques employées pour étudier l'impact du zinc dans le syndrome épileptique sur animal entier montrent des effets probablement éloignés de la physiologie et biaisent potentiellement les observations qui en découlent. Même si les indices s'accumulent au regard de l'effet du zinc sur la protection vis-à-vis de l'épilepsie, aucune preuve directe de ses implications n'a été obtenue à l'aide de ces diverses études. Affectant 50 millions de personnes à travers le monde, seul 70% des cas peuvent être traités à ce jour (OMS, 2017). Les besoins d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques sont donc réels et le zinc apparaît une nouvelle fois comme une piste intéressante.

Récemment, de nouvelles découvertes ont mis à jour de nouveaux acteurs moléculaires activés par le zinc et probablement impliqués dans l'épilepsie. Ces nouvelles cibles sont potentiellement intéressantes pour le développement de stratégies thérapeutiques innovantes.

### **III.C.2. L'effet antiépileptique du zinc passe par son action sur les mZnRs**

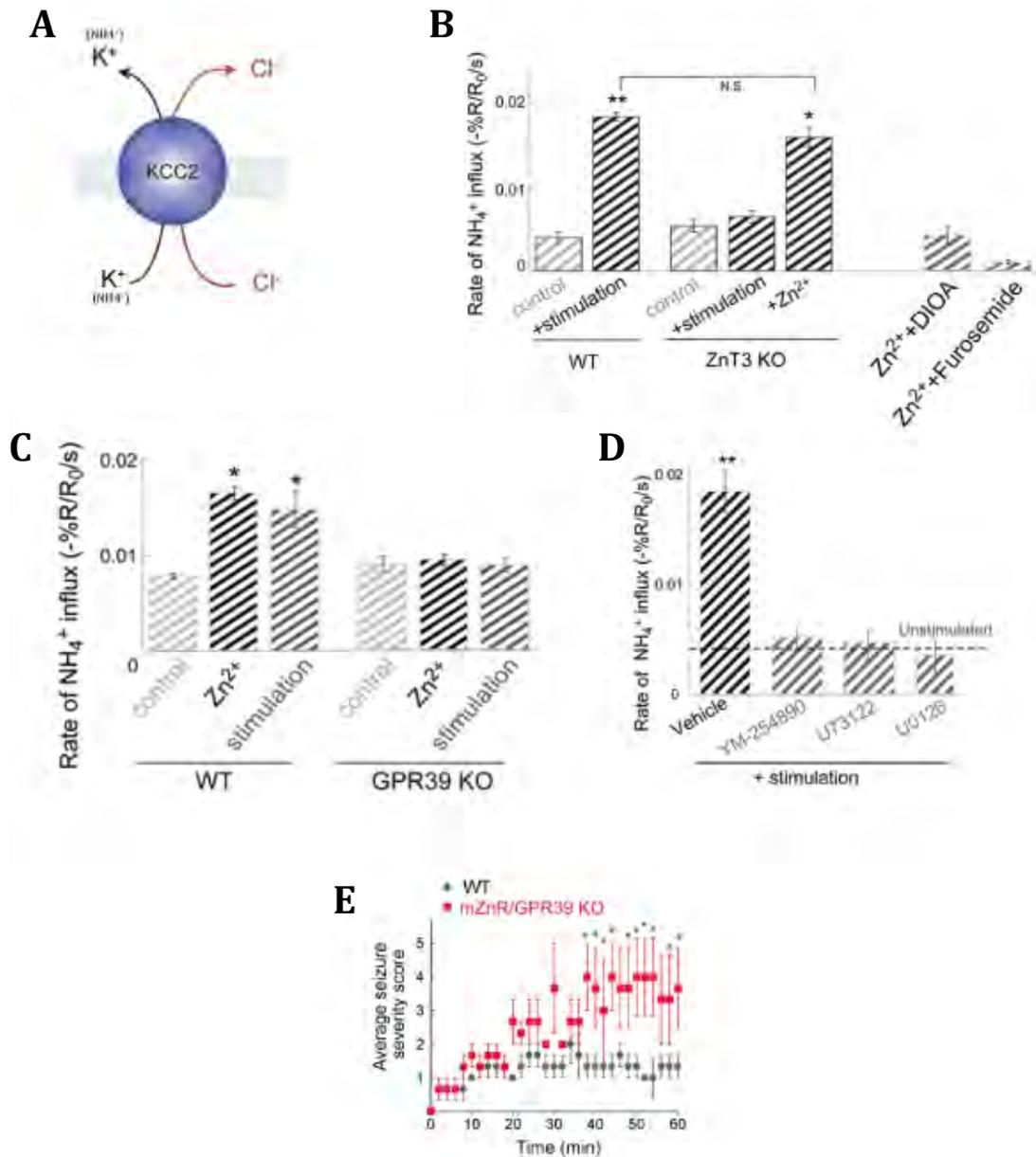
Une stratégie thérapeutique communément utilisée dans la prise en charge des syndromes épileptiques consiste à administrer des médicaments augmentant le tonus inhibiteur dans le système nerveux central, notamment via la potentialisation de la transmission GABAergique (diazepam, clonazepam, phenobarbital, etc...). L'activation de ces récepteurs pentamériques (rGABA<sub>A</sub>) par le GABA entraîne l'ouverture de leur canal ionique engendrant la diffusion d'ions chlorures (Cl<sup>-</sup>) selon leur gradient

électrochimique vers l'intérieur des neurones. Cette entrée de charges négatives hyperpolarise le potentiel de membrane et réduit l'excitabilité des neurones.

Afin de maintenir le gradient électrochimique des ions  $\text{Cl}^-$ , les co-transporteurs  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  2 neuronaux (KCC2, **Figure 43A**) transportent ces ions du cytoplasme vers la matrice extracellulaire. C'est grâce à leur action que le GABA, en agissant sur les  $\text{rGABA}_A$ , a un effet inhibiteur de la transmission synaptique. En parallèle, les récepteurs GPR39 couplés aux protéines Gq, anciennement considérés comme étant des récepteurs orphelins, ont récemment été identifiés comme une cible du zinc (d'où leur nouvelle appellation : mZnR pour *métabotropic zinc receptor* (Yasuda et al., 2007)). L'activation de ces récepteurs par le zinc a été montré comme provoquant la libération de calcium depuis des stocks intracellulaires (Besser et al., 2009; Chorin et al., 2011) ainsi qu'activant la voie de phosphorylation MAPK/ERK1/2 (Hershinkel et al., 2007; Chorin et al., 2011).

Le fait que le zinc puisse activer la cascade MAPK/ERK1/2 par l'intermédiaire de mZnR et que les transporteurs KCC2 soient sensibles aux variations de niveau de phosphorylation (Rinehart et al., 2009) laisse penser que le cation divalent puisse directement impacter le transport des ions  $\text{Cl}^-$ . Or, ce transporteur a été directement impliqué dans la survenue du syndrome épileptique puisque son élimination génétique chez les souris provoque leur décès précoce après la naissance due à des crises d'épilepsies fulminantes (Woo et al., 2002; Zhu et al., 2008). L'ensemble de ces constats pointent vers un rôle du zinc sur la modulation des fonctions de KCC2 dans la protection du syndrome épileptique.

Le zinc augmente effectivement l'activité de KCC2 (Chorin et al., 2011; Gilad et al., 2015). Cet effet a été observé par le prisme de l'internalisation d'ions ammoniums ( $\text{NH}_4^+$ , Hershinkel et al., 2009). Cet ion pouvant servir de substitut au  $\text{K}^+$ , il est co-transporté avec les ions  $\text{Cl}^-$  par KCC2 et peut donc être utilisé pour suivre son activité de transporteur (**Figure 43A**, Chorin et al., 2011). En déclenchant la libération de zinc vésiculaire par stimulation électrique ou en appliquant directement du zinc (200  $\mu\text{M}$ ) sur des tranches de cerveaux de souris, il apparaît que l'internalisation de  $\text{NH}_4^+$ , et donc l'activité de KCC2, est augmentée (**Figure 43B**, Chorin et al., 2011). L'absence de cet effet lors de l'utilisation d'inhibiteurs de KCC2 (furosémide et DIOA (ou acide dihydroindenyl-oxy-alkanoïque)) ainsi que chez la souris ZnT3 KO, confirme que le *zinc*



**Figure 43 : Par son action sur les mZnR, le zinc accélère la cinétique de fonctionnement des transporteurs neuronaux du chlore KCC2.** **A.** Fonctionnement schématique du transporteur KCC2. **B.** Le zinc synaptique accélère la cinétique de fonctionnement de KCC2 car la libération de zinc vésiculaire par stimulation électrique ou l'application de 200  $\mu\text{M}$  de zinc sur des tranches de cerveaux de souris accélère la cinétique d'internalisation de  $\text{NH}_4^+$  et donc de KCC2. Cet effet est annulé par l'utilisation de DIOA et de furosémide (100  $\mu\text{M}$ ), deux inhibiteurs de KCC2, ainsi que chez des souris dépourvus de zinc vésiculaire (ZnT3 KO). **C.** En agissant sur mZnR, le zinc induit l'augmentation de l'activité de KCC2 car l'effet d'accélération de la cinétique d'internalisation de  $\text{NH}_4^+$  disparaît chez des souris GPR39 KO. **D.** L'action de mZnR sur KCC2 passe par l'activation d'une protéine Gq car l'utilisation d'un inhibiteur de cette dernière YM-254890 (1  $\mu\text{M}$ ) prévient l'augmentation de l'activité de KCC2, mais également par une modification des niveaux de calcium et de phosphorylation intracellulaire car l'utilisation de U73122 (1  $\mu\text{M}$ ) et de U0126 (1  $\mu\text{M}$ ), des inhibiteurs respectivement de la PLC et de l'activation de ERK1/2 par MAPK, empêche également l'augmentation de son activité. **E.** Les souris GPR39 KO sont plus susceptibles au déclenchement des crises d'épilepsies induites par l'injection de kainate (10 mg/kg, intrapéritonéal). Score progressif de sévérité : 0 = pas de réponse ; 3 = crise tonico-clonique ; 6 = status épilepticus. \* indique une différence significative ( $p < 0.01$ ). B., C. et D., \* et \*\* indiquent des différences significative (respectivement  $p < 0.05$  et  $p < 0.01$ ). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Adapté de [Chorin et al., 2011](#) (A-D) et de [Gilad et al., 2015](#) (E).

*synaptique* est capable de moduler l'activité de ce transporteur clé impliqué dans le contrôle de l'excitabilité des neurones.

L'effecteur moléculaire à la base des effets du zinc sur l'activité de KCC2 est le récepteur mZnR. En effet, l'ablation sélective du gène de ce récepteur chez la souris (souris GPR39 KO) inhibe l'augmentation de l'activité de KCC2 à la suite de stimulations électriques (**Figure 43C**, Chorin et al., 2011; Gilad et al., 2015). Ce récepteur métabotropique exerce son action sur KCC2 par l'intermédiaire d'une protéine Gq qui agit à la fois en modifiant les niveaux de calcium intracellulaire mais également en activant la voie MAPK/ERK1/2 puisque l'utilisation d'un bloqueur des protéines Gq (YM-254890, 1  $\mu$ M), d'un inhibiteur de la PLC (U73122, 1  $\mu$ M) ou encore d'un inhibiteur de l'activation de ERK1/2 par la MAPK (U0126, 1  $\mu$ M) empêche l'augmentation de l'activité de KCC par le zinc (**Figure 43D**, Chorin et al., 2011; Gilad et al., 2015).

Cette voie de signalisation activée par le zinc vésiculaire est physiologiquement importante dans la prévention du déclenchement des crises d'épilepsies puisque les souris GPR39 KO présentent une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie induite par l'injection intrapéritonéale de kaïnate par rapport à des souris contrôles (10 mg/kg, Gilad et al., 2015) mais également la sévérité de la crise est accentuée chez ces dernières (**Figure 43E**, Gilad et al., 2015).

Le lien entre zinc vésiculaire et transporteur neuronal KCC2 apporte une des premières bases cellulaires d'un effet antiépileptique du zinc. Par son action sur le mZnR, le zinc augmente l'activité de KCC2. Il en résulte une augmentation de l'extrusion d'ions Cl<sup>-</sup> à l'extérieur des neurones, hyperpolarisant le potentiel de réversion du GABA (**Chorin et al., 2011; Gilad et al., 2015**). En conséquence, le gradient électrochimique des ions Cl<sup>-</sup> est modifié et favorise un passage plus important de ces ions au travers des récepteurs GABA<sub>A</sub> pour un même stimulus (augmentation du *drive* inhibiteur). De ce fait, la libération de zinc favorise une élévation de l'inhibition dans le SNC pouvant potentiellement contrebalancer l'excès d'excitation observé dans l'épilepsie. Ce mécanisme expliquerait en partie les effets neuroprotecteurs du zinc décrit précédemment (*Cf.* partie III.C.1) et apporterait un élément de réponse sur l'absence de différence sur la susceptibilité aux crises d'épilepsies induites par des inhibiteurs de la

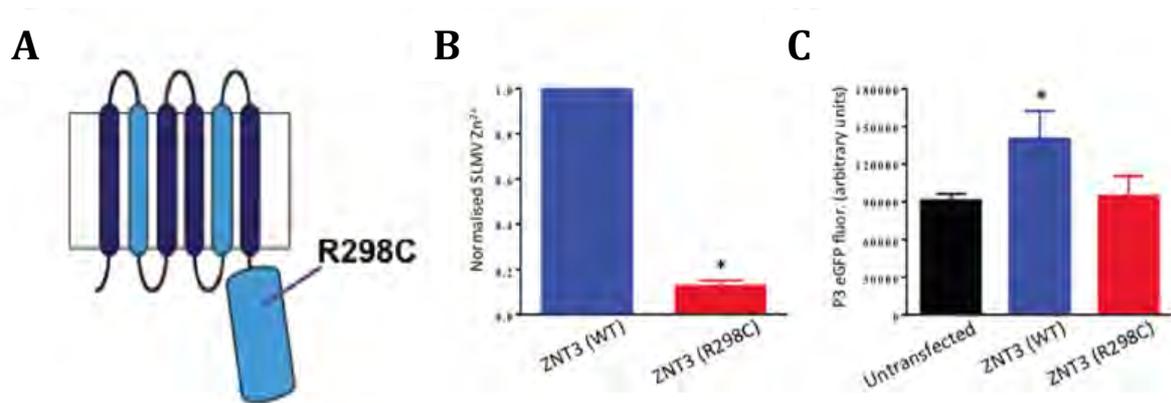
transmission GABAergique entre des souris ZnT3 KO et sauvages (Cole et al., 2000). En effet, dans ce contexte expérimental les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont bloqués. En présence de zinc (souris sauvages), l'effet de l'augmentation du gradient d'ions Cl<sup>-</sup> (via l'activation de mZnR puis de KCC2) n'aura aucune conséquence puisque ces ions ne peuvent pas entrer dans les neurones à cause du blocage des récepteurs GABA<sub>A</sub>. D'un autre côté, chez des souris dépourvues de zinc synaptique (ZnT3 KO), l'absence de zinc ne produit aucune modification du potentiel de réversion des ions Cl<sup>-</sup> via les mZnR, ce qui n'a aucune conséquence puisque les rGABA<sub>A</sub> sont bloqués. Ces résultats (Cole et al., 2000; Chorin et al., 2011; Gilad et al., 2015) impliquent que l'action antiépileptique majeure du zinc passe par son effet de potentialisation du *drive* inhibiteur dans le cerveau entier, plus que par une inhibition des rNMDAs excitateurs. Cependant, une action synergique sur les transmissions GABAergique et glutamatergique est fortement probable.

### III.C.3. Epilepsie et mutations génétiques affectant des protéines associées au zinc libre

Le développement des techniques de séquençage à haut débit et de l'analyse du génome ont permis d'associer de nombreuses mutations génétiques à des pathologies du système nerveux au sein desquelles figure le syndrome épileptique (Soto et al., 2014; Burnashev and Szepetowski, 2015; Yuan et al., 2015). L'identification de ces altérations génétiques au sein de cohortes de patients malades permet par la suite la synthèse et l'analyse *in vitro* des cibles moléculaires affectées, favorisant l'extension de nos connaissances sur ces pathologies dont l'étiologie reste bien souvent méconnue. Le fait que les niveaux de zinc dans les liquides biologiques (sérum et LCR) soient altérés chez les patients qui souffrent d'épilepsie conduit à s'intéresser aux cibles du zinc pouvant être modifiées génétiquement (Saghazadeh et al., 2015; Reid et al., 2017).

#### III.C.3.a. Altération génétique de ZnT3 dans l'épilepsie fébrile

L'épilepsie fébrile est la forme la plus répandue du syndrome épileptique, affectant 3 à 8% des enfants avant l'âge de 7 ans. Cette pathologie se caractérise par le



**Figure 44 : Perte de fonction du transporteur vésiculaire du zinc ZnT3 muté chez des patients épileptique. A.** Schéma du transporteur ZnT3 et localisation de la mutation. **B.** Diminution du transport de zinc dans les vésicules par la forme mutée du transporteur ZnT3. Valeurs normalisées des concentrations en zinc dans les SLMV de phéochromocytomes de rats. \* indique une différence significative ( $p=0.0013$ ). **C.** Diminution de l'adressage à la membrane des transporteurs ZnT3 mutés. Ce paramètre est évalué par l'intermédiaire de la mesure de l'intensité de fluorescence de la protéine eGFP qui est attachée aux transporteurs ZnT3 sauvages et mutés. Chaque transporteur étant relié à une eGFP fluorescente, plus il y a de ZnT3 exprimés à la membrane de la vésicule, plus l'intensité de fluorescence mesurée sera importante. La mesure d'intensité de fluorescence étant inférieure dans le cadre du transporteur muté, cela signifie que cette protéine est moins exprimée à la membrane des vésicules. \* indique une différence significative ( $p=0.0001$ ). Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type. Adapté de [Hildebrand et al., 2015](#).

développement de crises d'épilepsies associée à de la fièvre (au moins 38°C), en absence d'infection du SNC ou de troubles électrolytiques chez le jeune enfant (entre 6 mois et 6 ans). Ces crises se manifestent dans la majorité des cas par des épilepsies brèves (<10min dans 87% des cas) se généralisant fréquemment sous forme tonico-clonique. La composante héréditaire est importante dans l'épilepsie fébrile puisque 24% des cas ont un historique familial d'épilepsie fébrile et 4% d'autres formes d'épilepsie (pour revue, voir [Sadleir and Scheffer, 2007](#)).

Le séquençage à haut débit de cohortes de patients souffrant d'épilepsie fébrile et leurs contrôle ont permis d'identifier un variant rare du gène du transporteur vésiculaire du zinc *SLC30A3* codant pour la protéine ZnT3 ([Hildebrand et al., 2015](#)). Cette mutation génétique (c.892C > T; p.R298C) affecte 1% de la population malade (3/286 patients) et est totalement absente dans le groupe contrôle (0/643). Cette altération génétique touche un domaine conservé de ZnT3, le domaine cytoplasmique (**Figure 44A**, [Hildebrand et al., 2015](#)), via la substitution d'une arginine chargée positivement en une cystéine sensible à l'oxydation et à la formation potentielle de ponts disulfures. Les scores élevés aux tests de Grantham (180) et PolyPhen-2 (0.995/1), deux tests permettant de prédire l'impact de mutations sur la fonction des protéines, suggèrent que cette mutation faux-sens est dommageable pour la protéine.

L'expression de la protéine mutée dans des phéochromocytomes de rats, révèle qu'en effet, cette mutation impacte l'adressage aux vésicules synaptiques de ZnT3 (Hildebrand et al., 2015). Pour ce faire, le gène *SLC30A3* muté a été transfecté dans des phéochromocytomes de rats, des cellules produisant naturellement des microvésicules aux propriétés proches des vésicules synaptiques (appelées SLMV pour *synaptic like microvesicles*). En isolant les SMLV par centrifugation, puis lyse et analyse de leur contenu par spectroscopie de masse, il apparaît que la forme mutée de ZnT3 concentre moins de zinc dans les vésicules (Figure 44B, Hildebrand et al., 2015). Ce résultat s'explique par le fait que ces protéines sont en moyenne moins adressées à la vésicule par rapport à la protéine sauvage entraînant une perte de fonction de ZnT3 (Figure 44C, Hildebrand et al., 2015).

L'identification de mutations du transporteur vésiculaire pour le zinc chez des patients souffrant d'épilepsie fébrile renforce l'hypothèse selon laquelle ce métal joue un rôle dans la susceptibilité au développement de crises d'épilepsie. Entraînant une perte de fonction de la protéine ZnT3 par défaut d'adressage à la membrane vésiculaire, la concentration en zinc par vésicule décroît et le cation divalent est par conséquent quantitativement moins libéré à la synapse lors de l'arrivée d'un potentiel d'action. La chaleur favorisant l'hyperexcitabilité neuronale et la libération excessive de glutamate, la diminution de la libération de zinc associée à la mutation faux-sens c.892C > T de ZnT3 réduit potentiellement à la fois l'inhibition des récepteurs NMDA par ce métal (Vergnano et al., 2014; Hildebrand et al., 2015), et son action sur la transmission GABAergique (Chorin et al., 2011) aggravant potentiellement l'hyperexcitabilité neuronale. Le fait que la susceptibilité aux crises d'épilepsie, notamment déclenchées par la chaleur, soit plus importante chez les souris dépourvue de zinc vésiculaire (ZnT3 KO, Cole et al., 2000; Hildebrand et al., 2015), conforte cette hypothèse.

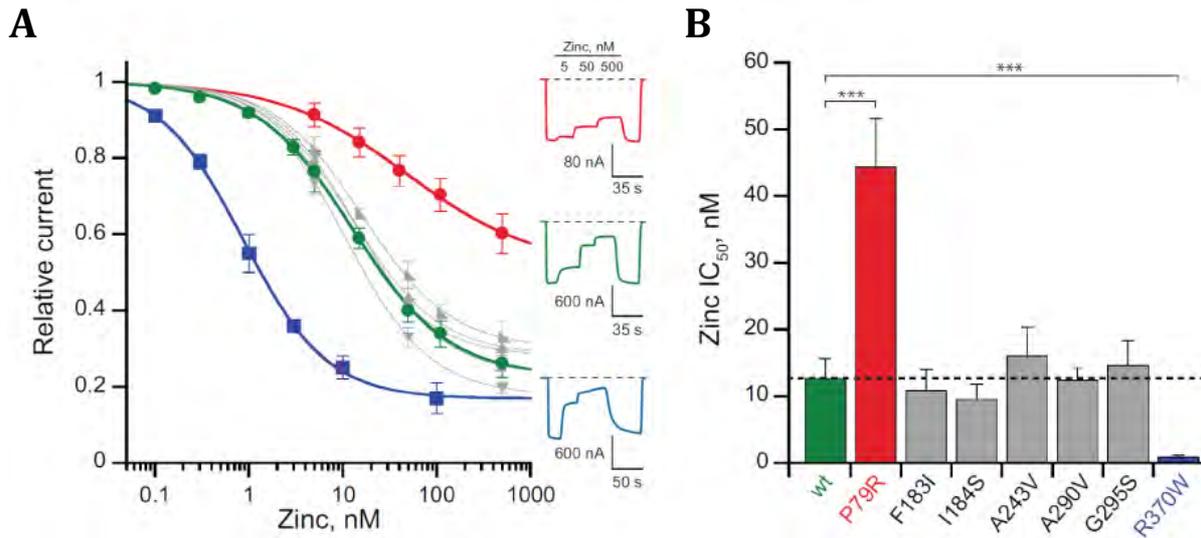
De façon intéressante, sur les 3 patients affectés par la mutation de ZnT3, deux ont des frères jumeaux (homozygotes) ne souffrant pas d'épilepsie fébrile ou uniquement d'épilepsie focale. De plus, l'existence de membres de famille touchés par la mutation mais non pathologique, implique que la mutation de ZnT3 est *facteur de risque* au développement de syndrome épileptique et non une mutation causative.

### III.C.3.b. Altérations génétique de la sous-unité GluN2A des rNMDAs chez des patients épileptiques

Depuis le début des années 2010, d'autres formes d'épilepsies infantiles se sont vues attribuer des mutations associées à des cibles du zinc, en particulier les récepteurs NMDA. Parmi l'ensemble des sous-unités composant ce récepteur, les mutations du gène *GRIN2A*, codant pour la sous-unité GluN2A des rNMDAs, sont associées à plus de 80% des pathologies liés aux mutations des récepteurs ionotropiques du glutamate (pour revue, voir [Soto et al., 2014](#); [Burnashev and Szepetowski, 2015](#); [Yuan et al., 2015](#)). Dans une étude que j'ai conduite au sein de l'équipe du docteur Paoletti à l'Institut de Biologie de l'ENS ([Serraz et al., 2016](#), voir en annexe), je me suis intéressé à des mutations faux-sens identifiées à l'aide de techniques de séquençage à haut débit ([Lemke et al., 2013](#); [Lesca et al., 2013](#)) chez des patients souffrant d'épilepsie rolandique (une forme bénigne d'épilepsie de l'enfance) mais également des formes graves d'épilepsie conduisant à des encéphalopathies associées à des retards moteurs, des troubles du langage et des aphasies (syndrome de Landau-Kleffner et encéphalopathie épileptique avec pointes ondes continues au cours du sommeil).

L'une des particularités des rNMDAs par rapport aux autres iGluRs, est leur capacité à lier de petits ligands endogènes tels que le zinc, les protons et les polyamines (spermine), qui, en se fixant, vont moduler leur activité (*Cf.* partie II.C.1.a). Cette modulation allostérique des rNMDAs est conférée par le domaine le plus externe de ces récepteurs, le domaine N-terminal. Accolé au domaine de liaison des agonistes, la fixation de molécules ou d'ions sur le NTD entraîne des changements conformationnels transmis par la suite au reste de la protéine se traduisant par des modifications fonctionnelles du récepteur ([Gielen et al., 2009](#); [Yuan et al., 2009](#); [Hansen et al., 2010](#); [Farina et al., 2011](#); [Mony et al., 2011](#)).

Neuf mutations ont été étudiées sur des ovocytes de xénopes, des cellules HEK et des neurones d'hippocampe en culture (trois modèles permettant l'expression de protéines recombinante et leur analyse électrophysiologique). Deux de ces mutations associées à l'épilepsie ont révélé un phénotype clair d'altération de la sensibilité au zinc des rNMDAs contenant la sous-unité GluN2A mutée ([Serraz et al., 2016](#)). Alors que GluN2A-P79R réduit l'affinité apparente pour le zinc, reflétée par une augmentation de la concentration inhibitrice 50 ( $IC_{50}$ , 44 nM vs 12.7 nM pour des récepteurs sauvages),



**Figure 45 : Altération de la sensibilité au zinc de rNMDA contenant une sous-unité GluN2A mutée identifiée chez des patients épileptiques. A.** Courbe d'inhibition zinc de récepteurs NMDA sauvages (vert) et mutés (rouge, GluN2A-P79R ; bleu, GluN2A-R370W ; gris, autres récepteurs mutés). Encart, trace représentative d'inhibition des courants NMDA par 5, 50, 500 nM de zinc. **B.** Valeurs d'IC<sub>50</sub> déterminées à partir des courbes dose-réponse. \*\*\* indiquent une différence significative ( $p=0.0007$ ). Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. Adapté de [Serraz et al., 2016](#).

ainsi que le pourcentage d'inhibition maximale (48% vs 44%), GluN2A-R370W affiche un phénotype diamétralement opposé d'augmentation de la sensibilité zinc d'un facteur supérieur à 10 (IC<sub>50</sub> 0.87 nM vs 12.7 nM, **Figure 45A** et **45B**, [Serraz et al., 2016](#)). L'identification de deux mutations ayant des effets opposés *in vitro* mais conduisant à des signes cliniques identiques (épilepsie) *in vivo* souligne la difficulté à faire un lien clair entre génotype et phénotype. Une hypothèse permettant de concilier ces deux mutations aux effets opposés et conduisant à une même pathologie associée à l'hyperexcitabilité neuronale, serait que les effets de ces mutations soient favorisés ou prédominants sur certains types cellulaires. La diminution à la fois de l'affinité (IC<sub>50</sub>) et de l'efficacité (inhibition maximale) du zinc avec la mutation GluN2A-P79R entrainerait une hyper activation des récepteurs NMDA à la synapse d'où des effets proépileptiques. Cependant, un défaut d'activité des rNMDAs dans les interneurons pourrait avoir les mêmes conséquences. En augmentant l'affinité pour le zinc de façon drastique, GluN2A-R370W favorise un excès d'inhibition de ces récepteurs excitateurs. En diminuant l'excitation de cellules inhibitrices telles que les interneurons, GluN2A-R370W déséquilibrerait la balance excitation-inhibition conduisant à des effets proépileptiques. Cette hypothèse est renforcée par le fait que ces mutations existent à l'état hétérozygote chez les patients (la forme homozygote étant probablement létale). Une expression

privilegiée de sous-unités mutées dans des interneurons ou des cellules excitatrice est alors envisageable.

Le fait que certains membres de familles soient touchés par ces mutations sans développer de syndrome épileptique indique que les mutations du rNMDA associées à l'épilepsie constituent des facteurs de risque et mais ne sont pas causatives.

#### III.C.4. Perspectives de traitements

Les syndromes épileptiques affectent une proportion importante de la population mondiale et bien que la couverture thérapeutique soit développée, 30% des cas ne peuvent pas être traités à ce jour (OMS, 2017). Représentant 1/200<sup>ème</sup> des urgences pédiatriques, les épilepsies fébriles sont le plus souvent bénignes mais peuvent cependant engendrer des dommages neuronaux favorisant le développement de syndromes épileptiques après l'enfance (Sadleir and Scheffer, 2007; Reid et al., 2017). Alors que la majorité des rapports pointent vers des propriétés neuroprotectrices et antiépileptiques du zinc, l'identification d'altérations de ses niveaux dans les liquides biologiques des patients (Reid et al., 2017) ainsi que de mutations héréditaires de cibles du zinc associées à l'épilepsie (Hildebrand et al., 2015; Serraz et al., 2016; Addis et al., 2017) posent la question de l'utilisation de ce métal dans la prévention des épilepsies. Cette stratégie a notamment été mise en place dans deux études récentes (Elsas et al., 2009; Aydin et al., 2016). L'injection intra-hippocampique de zinc à l'aide d'une pompe délivrant 1 mM de ZnCl<sub>2</sub> (0.25 µL/h en continue) chez des rats pour lesquels l'épilepsie est déclenchée par stimulation électrique de l'hippocampe (Elsas et al., 2009) a permis de réduire le délai de survenue des crises. En parallèle, la supplémentation alimentaire en zinc de rats, 5 jours avant le déclenchement de crises d'épilepsie par la chaleur (bain d'eau à 45°C) a également permis d'augmenter le délais de survenue de ces crises ainsi que d'apporter une résistance aux épilepsies fébriles compte tenu du fait que la température nécessaire que devait atteindre le corps des rats pour déclencher les crises était plus élevé (Aydin et al., 2016).

La supplémentation alimentaire en zinc semble être une stratégie intéressante compte tenu de la faible toxicité pour l'homme par voie orale. Un des problèmes sous-jacents à l'apport direct de zinc, notamment sous forme d'acétate de zinc, est que pour

agir, des concentrations potentiellement élevées doivent pouvoir passer la BHE. Même si la vitesse d'absorption intestinale du zinc peut être accélérée à l'aide de vitamine B6, le passage de la BHE reste problématique car le passage de la barrière intestinal est également influencé par le contenu en protéines du bolus alimentaire. Compte tenu du fait que son homéostasie soit finement régulée par de nombreux systèmes de transporteurs, il semble peu probable que la supplémentation en zinc soit utilisée en aigue (pour revue, voir [Grabrucker et al., 2011](#)). Cependant, sa supplémentation sur le long terme pourrait s'avérer intéressante. Une stratégie thérapeutique utilisant des nanoparticules chargées de zinc, permettant de favoriser le passage de la BHE et l'apport du métal directement dans les cellules après endocytose, pourrait s'avérer utile pour augmenter la biodisponibilité du zinc dans le SNC ([Chhabra et al., 2015](#)).

### III.D. Autres pathologies impliquant le zinc libre

L'identification du zinc comme étant un acteur majeur au cœur du développement de certaines pathologies (décrites précédemment) est le fruit de nombreuses années de recherches. Alors que certains de ses effets néfastes font déjà l'objet d'investigations thérapeutiques, notamment dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, les implications du zinc dans de nombreuses autres pathologies du SNC n'ont été découvertes que très récemment. Dans ce contexte, l'état de la recherche sur le zinc en est souvent limité au stade de la découverte, loin des aspects thérapeutiques. Au travers de cette partie, seules les pistes les plus solides sur les implications du zinc dans les maladies du SNC seront abordées.

#### III.D.1. Lésions du nerf optique

Le nerf optique est un long faisceau composé des axones des cellules ganglionnaires de la rétine et permet la transmission du message nerveux de l'œil vers les aires visuelles du cerveau (**Figure 46**). Les lésions de ce nerf sont fréquentes et sont notamment associées à des traumatismes crâniens faisant suite à des accidents de la circulation (fractures du crâne, forces de cisaillements, *etc.*) ou encore à des maladies dégénératives telles que le glaucome au cours de laquelle l'augmentation de la pression oculaire entraîne des lésions du nerf optique (pour revue, voir [Sarkies, 2004](#)).

Ces lésions provoquent généralement une cécité unilatérale et les cellules ganglionnaires, incapables de régénérer leurs axones, meurent. Les lésions du nerf optique peuvent également être générées expérimentalement par chirurgie et constituent un modèle reconnu d'étude de la réponse du SNC à divers traumatismes. Récemment, le zinc a été identifié comme un agent neurotoxique majeur participant à la dégénérescence des neurones ganglionnaires post-lésions du nerf optique. Les outils pharmacologiques permettant de limiter son action délétère apportent une stratégie thérapeutique efficace de prévention de la cécité faisant suite aux traumatismes du nerf optique ([Li et al., 2017](#)).

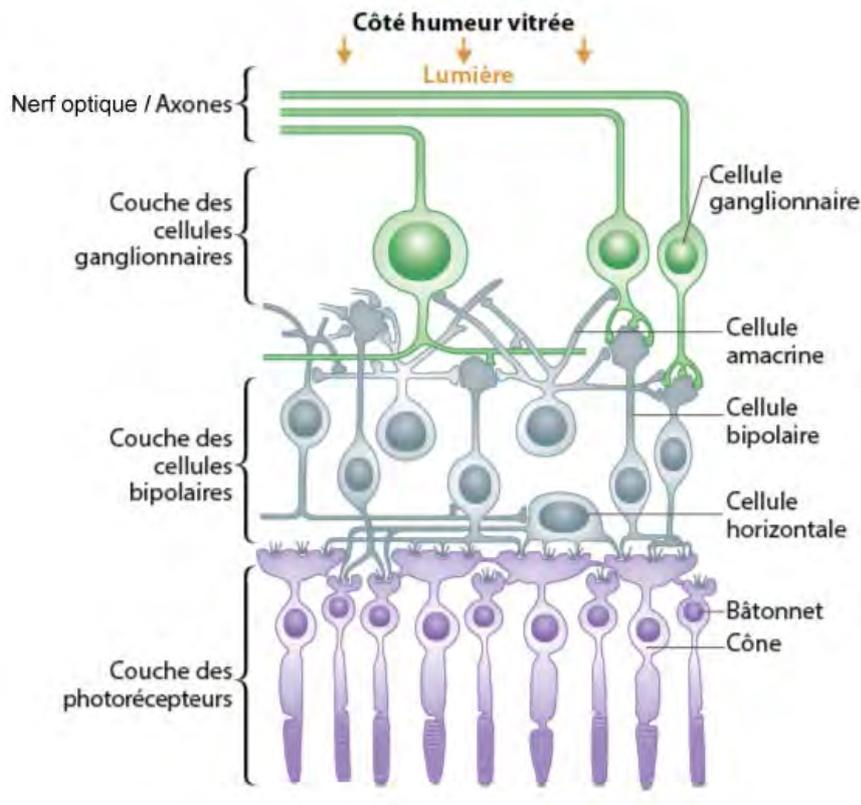


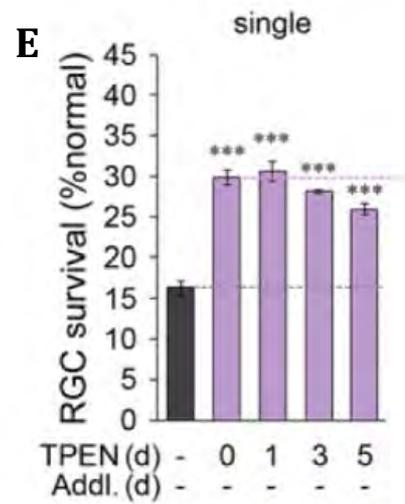
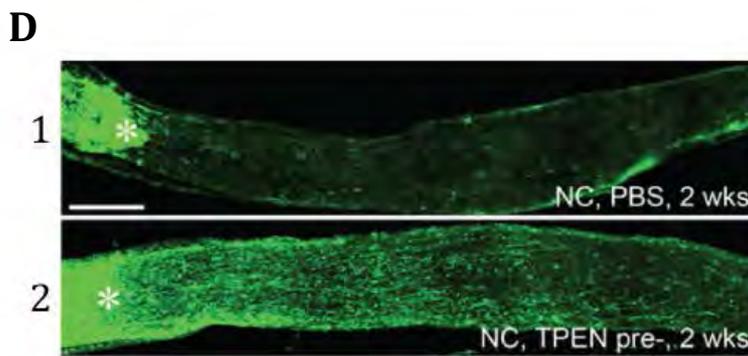
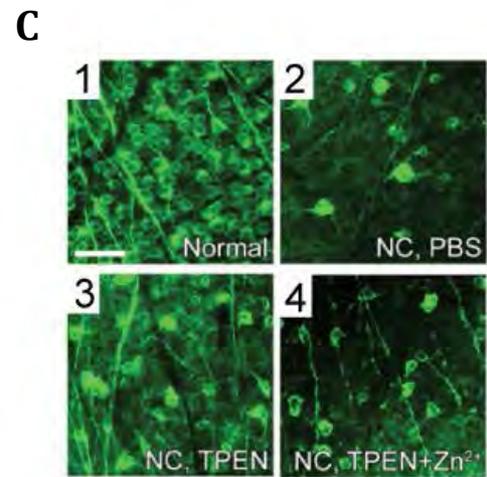
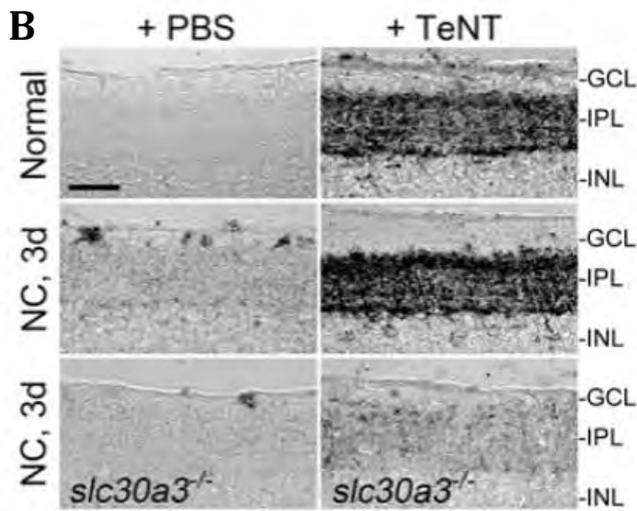
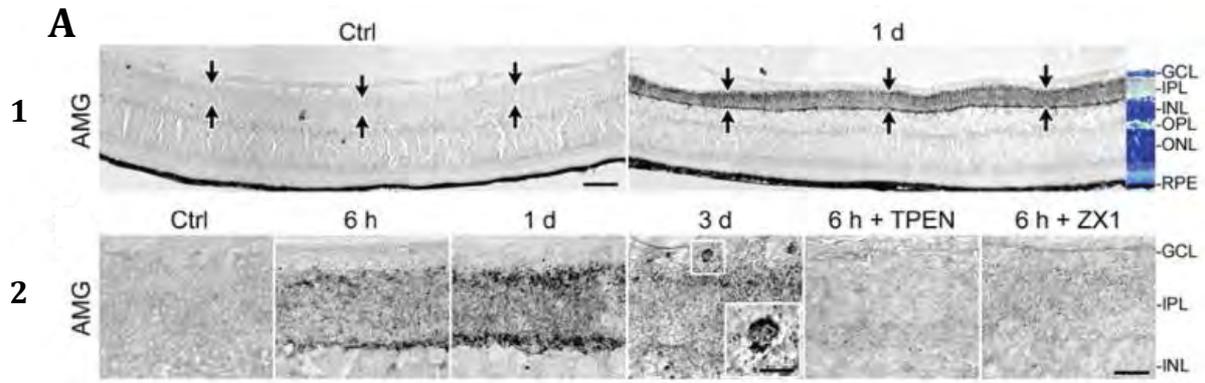
Figure 46 : Schéma de l'organisation cellulaire de la rétine. Adapté d'Annabac, 2012.

Révélaées grâce au marquage de Timm, les lésions du nerf optique provoquent des montées spatio-temporellement régulées de zinc dans la rétine. Les cellules amacrynes sont des interneurons des sous-couches externes de la couche plexiforme interne de la rétine (IPL). Alors qu'elles sont physiologiquement dépourvues de zinc, ces cellules se gorgent du métal dans les 24 premières heures suivant une lésion du nerf optique qui est ensuite transféré, 3 jours après, dans les cellules ganglionnaire de la couche du même nom (GCL, **Figure 47A**, Li et al., 2017). Ce transfert de zinc entre les cellules amacrynes et les cellules ganglionnaires se fait par libération vésiculaire de zinc libre. En effet, associé au fait que les cinétiques d'augmentation du zinc dans les cellules amacrynes soit superposables à celles du transporteur ZnT3, l'injection intraoculaire de TeNT (tétanus neurotoxine), une drogue inhibant la transmission vésiculaire à la synapse, juste après la lésion du nerf optique, prévient uniquement le remplissage des cellules ganglionnaires tout en augmentant l'accumulation de zinc dans les cellules amacrynes (**Figure 47B**, Li et al., 2017). En parallèle, les cellules amacrynes et les cellules ganglionnaires n'accumulent pas de zinc à la suite d'une lésion du nerf optique chez des souris ZnT3 KO.

Comme énoncé précédemment, lors d'une lésion du nerf optique, les cellules ganglionnaires meurent. Emmagasinant du zinc dans leurs corps cellulaires à la suite de son transfert depuis les cellules amacrines, il semble que le métal soit associé à leur dégénérescence. Confirmant cette hypothèse, les souris ZnT3 KO ou bien des souris ayant reçu une injection intraoculaire de TeTN immédiatement après la lésion du nerf optique, conservent deux fois plus de cellules ganglionnaires en vie et ont une régénération de leurs axones (formant le nerf optique) jusqu'à 10 fois plus importante deux semaines après la lésion du nerf optique que des souris sauvages ou non injectées (Li et al., 2017). Ce processus est très intéressant et tout à fait singulier. En effet, dans ce contexte pathologique, des cellules *inhibitrices* sont capables d'emmagasiner temporairement du zinc dans leurs vésicules synaptiques. Ce mécanisme donne lieu à un *transfert toxique* de zinc vers les cellules ganglionnaires favorisant leur dégénérescence par accumulation du métal dans leur corps cellulaire (Cf. partie III.A).

L'inhibition de ce transfert toxique de zinc ayant un effet bénéfique sur la survie des neurones ganglionnaires, l'injection intraoculaire de chélateurs de zinc s'est également révélée comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans la prévention des cécités post-traumatiques. Cette stratégie présente en plus une large fenêtre thérapeutique puisque l'injection de ZX1 ou de TPEN (100 µM) directement et 4 jours après la lésion, double le nombre de cellules ganglionnaires en vie (**Figure 47C**, Li et al., 2017) et multiplie par 25 la régénération des axones par rapport au groupe contrôle (**Figure 47D**). Alors qu'au bout de 12 semaines post-lésion, seuls 2% des cellules ganglionnaires survivent sans traitement, à l'aide de l'administration de chélateurs (TPEN directement et 4 jours après la lésion), le nombre de neurones en vie reste stable sur le long terme (>30%, Li et al., 2017). En parallèle, que l'injection de chélateurs soit réalisée directement ou 1 à 5 jours après la lésion, ne change que peu le taux de survie des neurones qui est significativement différent des groupes contrôles (**Figure 47E**, Li et al., 2017).

Le mécanisme sous-jacent à la cécité unilatérale faisant suite à une lésion du nerf optique implique un mécanisme complexe et originale d'élévation des niveaux de zinc dans une population d'interneurones de la rétine, les cellules amacrines, avant que ce



**Figure 47 : Zinc, une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des lésions du nerf optique.** **A.** Les lésions du nerf optique conduisent à une élévation rapide des niveaux de zinc libre dans la rétine. (1) Image à faible grossissement de la rétine. Barre d'échelle, 50  $\mu\text{m}$ . Zinc marqué par autometallographie (AMG). Gauche, condition contrôle (pas de lésion du nerf optique). Droite, 1 jour post lésion du nerf optique. En bleu à droite, marquage cellulaire par toluidine. (2) Accumulation de zinc dans la rétine 6 heures, 1 et 3 jours après lésion du nerf optique ou 6 heures après injection de TPEN ou ZX1. Barre d'échelle, 25  $\mu\text{m}$ . En haut, marquage du zinc par AMG. EN bas, marquage du zinc par la sonde fluorescente ZP-1. Encart, grossissement sur les neurones ganglionnaires de la rétine, barre d'échelle, 10  $\mu\text{m}$ . CGL, couche ganglionnaire ; IPL, couche plexiforme interne ; INL, couche nucléaire interne ; OPL, couche plexiforme externe ; ONL, couche nucléaire externe ; RPE, épithélium pigmentaire de la rétine. **B.** Élévation de l'expression de ZnT3 post lésion du nerf optique dans l'IPL. Quantification issue du marquage immunologique de ZnT3 dans l'IPL avant et après lésion du nerf optique et avec ou sans injection intraoculaire de TPEN (100  $\mu\text{M}$ ). \*\*, \*\*\* et ††, ††† indiquent une différence significative (respectivement,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  comparé au contrôle et  $p < 0.01$  et  $p < 0.001$  comparé à 1 jour post lésion du nerf optique). Barre d'erreur représentent l'écart-type. **C.** ZnT3 est localisé dans les cellules amacrynes. Pourcentage de colocalisation entre le marquage immunologique de ZnT3 et différents marqueurs. La colocalisation est significative avec les marqueurs des interneurons (cellules amacrynes), VGAT (transporteur vésiculaire du GABA) et GAD65/67 (glutamic acid decarboxylase 65 ou 67, synthèse du GABA). VGLUT1, transporteur vésiculaire du glutamate 1 et la PKC $\alpha$  sont deux marqueurs des cellules bipolaires. CRALBP (cellular retinaldehyde binding protein, marqueur des cellules de Müller). \*\*, \*\*\* et ††† indiquent une différence significative (respectivement,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  comparé VGAT et  $p < 0.001$  comparé à GAD65/67). Barre d'erreur représentent l'écart-type. **D.** Transfert toxique du zinc des cellules amacrynes vers les cellules ganglionnaires. Marquage du zinc par autometallographie 1 ou 3 jour après lésion ou non du nerf optique chez des souris sauvages (en haut) ou dépourvus de zinc vésiculaire ZnT3 KO (en bas). Slc30a3<sup>+/+</sup>, ZnT3 sauvage. Slc30a3<sup>-/-</sup>, ZnT3 KO. Barre d'échelle, 25  $\mu\text{m}$ . **E.** Marquage du zinc par autometallographie 3 jour après lésion ou non du nerf optique chez des souris sauvages (en haut) ou dépourvus de zinc vésiculaire ZnT3 KO (en bas) et avec injection intraoculaire ou non de TeNT (20 nM, à droite). Barre d'échelle, 50  $\mu\text{m}$ . **F.** L'élimination du zinc vésiculaire favorise la survie neuronale et la régénération des axones au-delà du nerf optique. (1) Marquage de la  $\beta$ III-tubuline. Ligne du haut, souris sauvages ; ligne du bas, souris ZnT3 KO ; colonne de gauche, pas de lésion du nerf optique ; colonne de droite, 2 semaines après lésion du nerf optique. Barre d'échelle, 50  $\mu\text{m}$ . (2) Quantification de la survie neuronale et de la régénération du nerf optique. NC, lésion du nerf optique. \*\*\* indique une différence significative ( $p < 0.001$  comparé à ZnT3 sauvage). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. (3) Marquage de la GAP-43 chez des souris ZnT3 sauvage ou KO 2 semaines après lésion du nerf optique (indiquée par \*). Barre d'échelle, 200  $\mu\text{m}$ . **G.** Effets neuroprotecteur de l'injection intraoculaire de TPEN (100  $\mu\text{M}$ ). Marquage de la  $\beta$ III-tubuline 2 semaines après lésion (2) ou non (1) du nerf optique, avec (3) ou sans (2) injection de TPEN avec (4) ou sans zinc (3). Barre d'échelle, 50  $\mu\text{m}$ . TPEN ou PBS (contrôle) injectés 1 jour avant la lésion. **H.** Effet sur la régénération du nerf optique de l'injection intraoculaire de TPEN (100  $\mu\text{M}$ ). Marquage de la GAP-43 2 semaines après lésion (indiquée par \*) du nerf optique et injection de PBS (1, contrôle) ou de TPEN 1 jour avant la lésion (2). Barre d'échelle, 200  $\mu\text{m}$ . **I.** Fenêtre thérapeutique de l'injection intraoculaire de TPEN (100  $\mu\text{M}$ ). \*\*\* indique une différence significative ( $p < 0.001$ ). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Adapté de [Li et al., 2017](#).

métal ne soit transféré dans les cellules ganglionnaires. Ces neurones, incapables de régénérer leurs axones, meurent par la suite en lien avec l'accumulation de zinc dans leur cytoplasme. La prévention de l'élévation des niveaux de zinc à l'aide d'injections intraoculaires de chélateurs (en particulier TPEN), présente une stratégie très intéressante pour la prise en charge de ces traumatismes. Efficaces jusqu'à 5 jours après la survenue de la lésion (injection unique), cette approche apporte une fenêtre thérapeutique incroyablement large permettant la gestion du patient à distance de l'événement traumatique. En effet, les lésions du nerf optique font régulièrement suite à des accidents de la circulation et la prise en charge des risques vitaux est réalisée en priorité avant même le dépistage d'atteintes du nerf optique (pour revue, voir [Sarkies, 2004](#)). Il est donc indispensable que les traitements envisagés, comme c'est le cas avec la

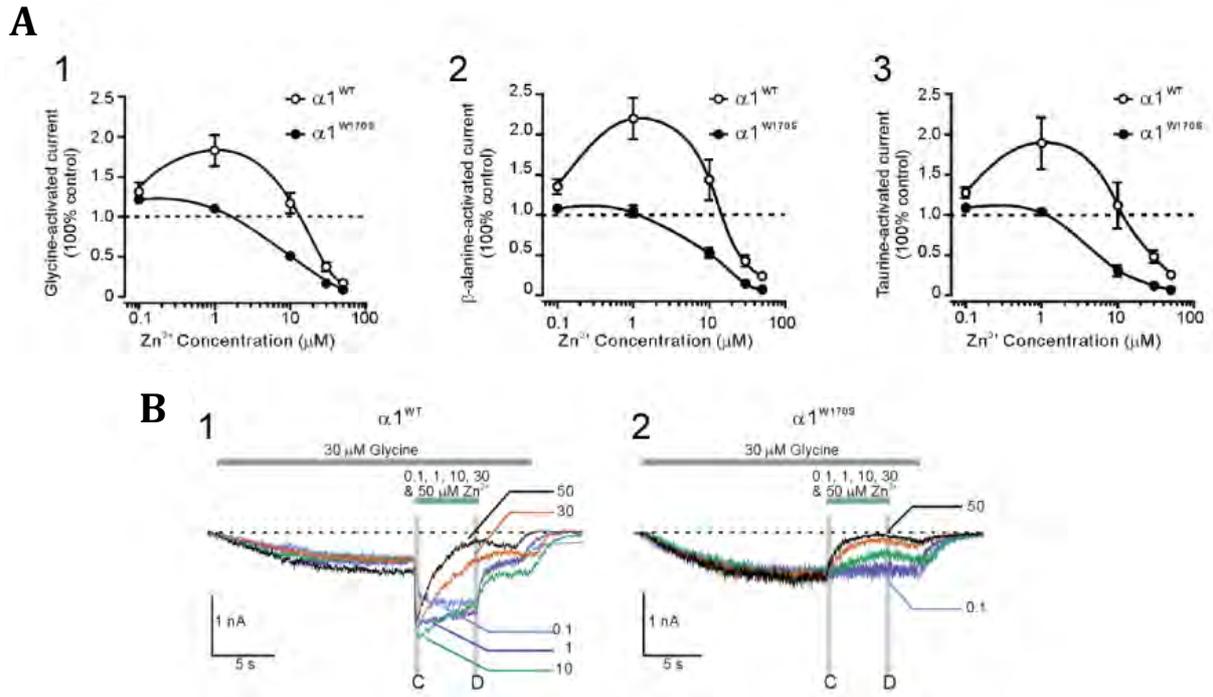
chélation du zinc, permettent une gestion à distance du trauma. L'utilisation de ces chélateurs dans ce contexte s'avère donc comme étant une stratégie prometteuse, seule piste thérapeutique actuellement disponible dans ce genre de pathologie.

### III.D.2. Hyperekplexie

L'hyperekplexie est une maladie neurologique rare se manifestant dès la naissance par des raideurs épisodiques ou généralisées du corps s'estompant durant les premières années de la vie. Cette maladie augmente également le risque d'attaques, d'apnées et de retards mentaux et du langage chez l'enfant. L'un des symptômes caractéristiques de cette pathologie est l'existence de sursauts réflexes exagérés survenant à la suite de stimuli auditifs ou tactiles inattendus. Ces sursauts entraînent des raideurs corporelles caractéristiques pouvant conduire à des chutes. A la différence de l'épilepsie, le patient est conscient durant l'ensemble de la crise. Même si une proportion importante de cas n'a pas de cause génétique, cette maladie trouve en partie son origine dans des mutations héréditaires du gène *GLRA1* codant pour la sous-unité  $\alpha 1$  des récepteurs glycinergiques inhibiteurs (*Cf.* partie II.C.2).

Récemment, une mutation de cette sous-unité (W170S) a été identifiée chez des patients souffrant d'hyperekplexie et de retards mentaux modérés ([Al-Futaisi et al., 2012](#)). D'après un modèle par homologie du récepteur glycinergique, le tryptophane 170 se trouve à proximité du site de fixation du zinc et sa mutation en sérine pourrait impacter la sensibilité des récepteurs glycinergique à ce modulateur allostérique ([Miller et al., 2005](#); [Zhou et al., 2013](#)).

Après analyse électrophysiologique sur un modèle de récepteurs recombinants exprimés dans des cellules HEK (confirmé sur des neurones en culture), il apparait que la mutation W170S impacte effectivement la sensibilité du récepteur pour le zinc ([Zhou et al., 2013](#)). Les récepteurs glycinergiques sont physiologiquement potentialisés par de faibles concentrations en zinc ( $< 10 \mu\text{M}$ ) et inhibés par des concentrations plus élevées ( $> 10 \mu\text{M}$ ). Alors que cette mutation n'affecte pas de façon biologiquement significative la sensibilité pour les agonistes connus des récepteurs glycinergiques (glycine,  $\beta$ -alaline et taurine), ni même les propriétés électrophysiologiques de base telles que la relation



**Figure 48 : Impact de la mutation W170S identifié chez des patients sur la sensibilité zinc des récepteurs glycinergiques.** A. La mutation W170S affectent réduit la sensibilité zinc des récepteurs glycinergique quel que soit l'agoniste utilisé. B. La mutation W170S supprime la phase de potentialisation initiale des récepteurs glycinergiques. (1) L'application de différentes concentrations de zinc (0.1 à 50 μM) entraîne une première phase de potentialisation des courants glycinergiques (noté C), puis une inhibition de ces courants (noté D). (2) la phase de potentialisation est supprimée avec la mutation W170S. A et B. réalisés sur des récepteurs α1 homomériques sauvages ou mutés. Adapté de Zhou et al., 2013.

courant – voltage (courbe I/V), seule la sensibilité zinc est affectée quel que soit l'agoniste utilisé (Figure 48A, Zhou et al., 2013). L'effet du zinc sur la potentialisation des courants glycinergiques est complexe car composée d'une phase de modulation allostérique positive puis négative (Lynch et al., 1998). C'est cette phase de potentialisation initiale qui est inhibée avec la mutation W170S (Figure 48B, Zhou et al., 2013).

Les mutations entravant l'effet allostérique positif du zinc sur les récepteurs glycinergiques pourraient être causatives de la maladie, à la différence des mutations affectant l'affinité pour le zinc des rNMDAs qui sont, elles, des facteurs de risque de déclenchement d'épilepsie (Serraz et al., 2016). En effet, en insérant une unique mutation dans le site de liaison du zinc de la sous-unité α1 du récepteur glycinergique (D80A), il est possible de générer des souris génétiquement modifiées évoquant des

réflexes de sursauts exagérés, de façon similaire à ceux observés dans le cadre de l'hyperékplexie (Hirzel et al., 2006).

Le zinc apparaît comme un modulateur clé de la transmission synaptique. Dans le cadre de l'hyperékplexie, une mutation *unique* d'un récepteur, le récepteur glycinergique, est capable d'engendrer une maladie neurologique grave se manifestant par des signes cliniques spectaculaires. Même si la majorité des fibres glycinergiques sont concentrés dans la moelle épinière ainsi que dans le cervelet, il n'est pas impossible que cette mutation affecte les récepteurs glycinergiques concentrés dans le cerveau. L'effet du zinc sur ces récepteurs passerait alors par un mécanisme de *spill-over* (Cf. partie II.C.2). Cette maladie met en exergue l'importance fondamentale de la régulation zincergique dans le SNC. Pour ce faire, il est nécessaire que l'homéostasie du zinc soit parfaitement contrôlée en amont de la synapse mais également que la composition en sous-unités des récepteurs postsynaptiques sensibles à ce métal soit régulée en amont pour que les bonnes sous-unités soient adressées à la membrane au bon moment.

### III.D.3. Vers une implication du zinc dans d'autres pathologies ?

Ce manuscrit s'est concentré uniquement sur des pathologies mettant en cause le zinc libre affectant sélectivement le cerveau. Cependant, le cation divalent est régulièrement identifié comme participant au développement de nombreuses autres pathologies ciblant d'autres régions du SNC.

Il est ainsi important de noter que le zinc libre a récemment été identifié comme un acteur clé de régulation des signaux douloureux dans la moelle épinière. En effet, des souris pour lesquelles la sous-unité GluN2A des rNMDAs a perdu son affinité pour le zinc (Cf. partie II.C.1.a), montrent une sensibilité accrue aux signaux douloureux convoyés par les fibres C (notamment induites par la chaleur, Nozaki et al., 2011). Ces souris développant des allodynies d'origine inflammatoire ainsi que des douleurs neuropathiques. Le zinc semble donc prévenir le développement de réponses douloureuses excessives via son action sur les rNMDAs (Nozaki et al., 2011). Une fonction

« analgésique » du zinc libre a également été rapporté pour son action sur les transporteurs KCC2 ([Kitayama et al., 2016](#)).

En parallèle, dans le système gastro-intestinal, l'excès de zinc dans le bolus alimentaire a été rattaché à des irritations de l'estomac accompagnées de douleurs ([Grabrucker et al., 2011](#)). Cet effet pourrait passer par son action sur les récepteurs TRPA1 qui activent certains neurones sensibles à la douleur ([Hu et al., 2009](#)).

Les preuves s'accumulent également pour un rôle indirect du zinc dans la sclérose latérale amyotrophique. Cette maladie dégénérative grave touche les motoneurones et conduit au décès du patient dans les 3 à 5 ans suivant son diagnostic. Dans le cadre de cette pathologie, des phénomènes excitotoxiques semblent se développer, associés à une production massive d'espèces radicalaires. Dans ce contexte, l'ensemble des cascades excitotoxiques impliquant le zinc et décrites précédemment (*Cf.* partie III.A) pourrait favoriser le développement de la maladie. De plus, certaines des formes de cette maladie sont associées à des mutations de la superoxyde dismutase 1, une enzyme liant le zinc et impliquée dans le catabolisme des ROS. Dans le cadre de cette mutation, sa fonction enzymatique est altérée par défaut de liaison du zinc (pour revue, voir [Smith and Lee, 2007](#)).

Les maladies du spectre autistique sont également concernées. La protéine Shank2 est une protéine d'échafaudage participant à la stabilisation à la synapse des rNMDAs et sa suppression dans des souris génétiquement modifiées constitue un modèle largement utilisé pour l'étude des maladies du spectre autistique. Chez ces souris, l'administration de clioquinol permet de restaurer des comportements « normaux » d'interactions sociales ([Lee et al., 2015](#)). Ce traitement, sans effet sur les autres symptômes typiques de l'autisme tels que les comportements répétitifs, l'hyperactivité ou encore l'anxiété vis-à-vis de nouveautés sociales, agirait par un effet ionophorique. Ce mécanisme permettrait de transférer du zinc depuis l'élément présynaptique vers les neurones postsynaptiques. En favorisant son passage dans les neurones, le zinc rétablirait une transmission NMDA normal par l'intermédiaire de l'activation de la tyrosine kinase Src qui a la propriété de moduler l'activité de ces

récepteurs. Ce traitement par clioquinol offre une perspective intéressante pour la prise en charge de ces pathologies affectant 1% de la population mondiale.

Enfin, quelques études rapportent des modifications des concentrations en zinc dans le sérum et le LCR de patients souffrant de dépression, de schizophrénie ainsi que de la maladie de Parkinson. Pour cette dernière, l'action du zinc pourrait impliquer des phénomènes excitotoxiques (pour revue, voir notamment [Chasapis et al., 2012](#) et [Kozlowski et al., 2012](#)).

## IV. Conclusion

Le zinc est un élément aux propriétés uniques dans le corps humain. Seul métal existant sous forme libre, il est indispensable à de nombreuses fonctions cellulaires. Transporteurs, échangeurs, protéines tampons et organites sont autant d'éléments contrôlant les variations du zinc libre dans les cellules. L'incroyable complexité de ses systèmes de régulation de son homéostasie reflète l'importance fondamentale de la stricte régulation de ses concentrations dans le cytoplasme des neurones. Physiologiquement, le zinc libre est un modulateur de la transmission synaptique et, même si son effet global sur le réseau neuronal reste mystérieux, tout porte à croire qu'il confère des propriétés particulières d'intégration et de plasticité aux synapses auxquelles il est concentré. Confiné dans les mitochondries ainsi que dans les MTs, le zinc libre participe à la signalisation intracellulaire en activant un certain nombre de protéines et d'enzymes. La multiplication de ses interactions avec divers cibles cytoplasmiques est à la base des effets pléiotropes associés aux troubles de son homéostasie. De nombreuses pathologies sont liées à des perturbations importantes des concentrations intracellulaires en zinc libre. La balance zinc au sein des cellules est fine, et tout écart par rapport à ses valeurs physiologiques entraîne des conséquences délétères. Alors qu'un excès de zinc est associé aux processus de neurodégénérescence, une carence en zinc est rattachée à une augmentation de l'excitabilité du réseau neuronal. Paradoxalement, la diversité des effets du zinc en situation pathologique en fait une cible thérapeutique extrêmement intéressante. Les dyshoméostasies zincergiques activent un nombre important de voies neurotoxiques qui représentent autant de points d'actions potentiels pour des molécules utilisées en thérapeutique. De plus, les effets du zinc sur la neurodégénérescence sont communs à de nombreuses pathologies. Que ce soit la maladie d'Alzheimer, les chocs ischémiques faisant suite à des AVCs ou encore des lésions du nerf optique, tous ont pour dénominateur commun le même événement, une augmentation des concentrations en zinc dans certains neurones. Cette universalité des effets délétères du zinc constitue ainsi une force, dans la mesure où les stratégies thérapeutiques visant à limiter ses effets neurotoxiques seront potentiellement applicables à plusieurs pathologies. Finalement, les traitements ciblant les diverses cibles du zinc libre toxique ont des fenêtres thérapeutiques larges

permettant la prise en charge des patients à distance de l'épisode pathologique initial. Cette caractéristique est la clé du potentiel succès des stratégies thérapeutiques visant le zinc. En effet, le diagnostic des pathologies citées précédemment est souvent tardif, survenant bien après l'initiation des processus neurotoxiques. Le traitement différé de ces maladies est donc fondamental pour que les molécules employées aient un réel bénéfice thérapeutique.

La prise en charge des maladies affectant le cerveau est complexe. Les stratégies visant à réguler les niveaux de calcium dans des processus pathologiques parallèles à ceux du zinc se sont toutes avérées décevantes, ce qui est notamment dû à une étroite fenêtre thérapeutique. Cependant, le zinc constitue une cible thérapeutique d'intérêt majeur pour la prise en charge de nombreuses pathologies. Identifiée que très récemment, et face à la difficulté de produire des molécules franchissant BHE de façon efficace, seul l'avenir nous dira si la piste du zinc libre présente un réel intérêt.

## V. Références bibliographiques

- Addis L, Virdee JK, Vidler LR, Collier DA, Pal DK, Ursu D (2017) Epilepsy-associated GRIN2A mutations reduce NMDA receptor trafficking and agonist potency - molecular profiling and functional rescue. *Scientific reports* 7:66.
- Adlard PA, Cherny RA, Finkelstein DI, Gautier E, Robb E, Cortes M, Volitakis I, Liu X, Smith JP, Perez K, Laughton K, Li QX, Charman SA, Nicolazzo JA, Wilkins S, Deleva K, Lynch T, Kok G, Ritchie CW, Tanzi RE, Cappai R, Masters CL, Barnham KJ, Bush AI (2008) Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial Abeta. *Neuron* 59:43-55.
- Aizenman E, Stout AK, Hartnett KA, Dineley KE, McLaughlin B, Reynolds IJ (2000) Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release. *Journal of neurochemistry* 75:1878-1888.
- Al-Futaisi AM, Al-Kindi MN, Al-Mawali AM, Koul RL, Al-Adawi S, Al-Yahyaee SA (2012) Novel mutation of GLRA1 in Omani families with hyperekplexia and mild mental retardation. *Pediatric neurology* 46:89-93.
- Alies B, Conte-Daban A, Sayen S, Collin F, Kieffer I, Guillon E, Faller P, Hureau C (2016) Zinc(II) Binding Site to the Amyloid-beta Peptide: Insights from Spectroscopic Studies with a Wide Series of Modified Peptides. *Inorganic chemistry* 55:10499-10509.
- Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457:675-677.
- Annabac (2012) <https://www.annabac.com/annales-bac/retine-et-voies-visuelles>.
- Aravindakumar CT, Ceulemans J, De Ley M (1999) Nitric oxide induces Zn<sup>2+</sup> release from metallothionein by destroying zinc-sulphur clusters without concomitant formation of S-nitrosothiol. *The Biochemical journal* 344 Pt 1:253-258.
- Atlas AMB (2004) <http://atlas.brain-map.org/#atlas=1&plate=100960224&structure=303&x=6043.000139508929&y=3984.624982561384&zoom=-3&resolution=11.97&z=7>.
- Aydin L, Erdem SR, Yazici C (2016) Zinc supplementation prolongs the latency of hyperthermia-induced febrile seizures in rats. *Physiology international* 103:121-126.
- Baraka AM, Hassab El Nabi W, El Ghotni S (2012) Investigating the role of zinc in a rat model of epilepsy. *CNS neuroscience & therapeutics* 18:327-333.
- Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D (1992) Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochemical and biophysical research communications* 186:944-950.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-827.
- Besser L, Chorin E, Sekler I, Silverman WF, Atkin S, Russell JT, Hershfinkel M (2009) Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:2890-2901.
- Bossy-Wetzell E, Talantova MV, Lee WD, Scholzke MN, Harrop A, Mathews E, Gotz T, Han J, Ellisman MH, Perkins GA, Lipton SA (2004) Crosstalk between nitric oxide and

- zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 41:351-365.
- Bresink I, Ebert B, Parsons CG, Mutschler E (1996) Zinc changes AMPA receptor properties: results of binding studies and patch clamp recordings. *Neuropharmacology* 35:503-509.
- Brewer GJ, Kanzer SH, Zimmerman EA, Molho ES, Celmins DF, Heckman SM, Dick R (2010) Subclinical zinc deficiency in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 25:572-575.
- Brown CE, Dyck RH (2004) Distribution of zincergic neurons in the mouse forebrain. *The Journal of comparative neurology* 479:156-167.
- Brown KH WS, Peerson JM. (2001) The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency. *Food Nutr Bull* 22, 113-125.
- Burnashev N, Szepetowski P (2015) NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Current opinion in pharmacology* 20:73-82.
- Bush AI, Multhaup G, Moir RD, Williamson TG, Small DH, Rumble B, Pollwein P, Beyreuther K, Masters CL (1993) A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry* 268:16109-16112.
- Bush AI, Pettingell WH, Jr., Paradis MD, Tanzi RE (1994a) Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *The Journal of biological chemistry* 269:12152-12158.
- Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, d Paradis M, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters CL, Tanzi RE (1994b) Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science* 265:1464-1467.
- Cai AL, Zipfel GJ, Sheline CT (2006) Zinc neurotoxicity is dependent on intracellular NAD levels and the sirtuin pathway. *The European journal of neuroscience* 24:2169-2176.
- Castino R, Bellio N, Nicotra G, Follo C, Trincheri NF, Isidoro C (2007) Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. *Free radical biology & medicine* 42:1305-1316.
- Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME (2012) Zinc and human health: an update. *Archives of toxicology* 86:521-534.
- Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, Barnham KJ, Volitakis I, Fraser FW, Kim Y, Huang X, Goldstein LE, Moir RD, Lim JT, Beyreuther K, Zheng H, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 30:665-676.
- Chhabra R, Ruozi B, Vilella A, Belletti D, Mangus K, Pfaender S, Sarowar T, Boeckers TM, Zoli M, Forni F, Vandelli MA, Tosi G, Grabrucker AM (2015) Application of Polymeric Nanoparticles for CNS Targeted Zinc Delivery In Vivo. *CNS & neurological disorders drug targets* 14:1041-1053.
- Chorin E, Vinograd O, Fleidervish I, Gilad D, Herrmann S, Sekler I, Aizenman E, Hershinkel M (2011) Upregulation of KCC2 activity by zinc-mediated neurotransmission via the mZnR/GPR39 receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:12916-12926.
- Cino M, Del Maestro RF (1989) Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Archives of biochemistry and biophysics* 269:623-638.

- Cole TB, Robbins CA, Wenzel HJ, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (2000) Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. *Epilepsy research* 39:153-169.
- Cole TB, Wenzel HJ, Kafer KE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (1999) Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:1716-1721.
- Corrigan FM, Reynolds GP, Ward NI (1993) Hippocampal tin, aluminum and zinc in Alzheimer's disease. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 6:149-154.
- Cuajungco MP, Lees GJ (1997) Zinc and Alzheimer's disease: is there a direct link? *Brain research Brain research reviews* 23:219-236.
- 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.
- Danscher G, Jensen KB, Frederickson CJ, Kemp K, Andreasen A, Juhl S, Stoltenberg M, Ravid R (1997) Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer's diseased brains: a proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of cryostat sections from autopsy material. *Journal of neuroscience methods* 76:53-59.
- Danscher G, Jo SM, Varea E, Wang Z, Cole TB, Schroder HD (2001) Inhibitory zinc-enriched terminals in mouse spinal cord. *Neuroscience* 105:941-947.
- Deng Q.S, TGC, Brady D.R. et Smith Q.R. (1994) Evaluation of brain element composition in Alzheimer's disease using inductively-coupled plasma mass spectrometry. *Neurobiology of aging*.
- Deshpande A, Kawai H, Metherate R, Glabe CG, Busciglio J (2009) A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:4004-4015.
- Dickson DW, Crystal HA, Bevana C, Honer W, Vincent I, Davies P (1995) Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiology of aging* 16:285-298; discussion 298-304.
- Dineley KE, Richards LL, Votyakova TV, Reynolds IJ (2005) Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* 5:55-65.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews* 51:7-61.
- Dittmer PJ, Miranda JG, Gorski JA, Palmer AE (2009) Genetically encoded sensors to elucidate spatial distribution of cellular zinc. *The Journal of biological chemistry* 284:16289-16297.
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta pharmacologica Sinica* 30:379-387.
- Elsas SM, Hazany S, Gregory WL, Mody I (2009) Hippocampal zinc infusion delays the development of afterdischarges and seizures in a kindling model of epilepsy. *Epilepsia* 50:870-879.
- Erickson JC, Hollopeter G, Thomas SA, Froelick GJ, Palmiter RD (1997) Disruption of the metallothionein-III gene in mice: analysis of brain zinc, behavior, and neuron vulnerability to metals, aging, and seizures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:1271-1281.

- Farina AN, Blain KY, Maruo T, Kwiatkowski W, Choe S, Nakagawa T (2011) Separation of domain contacts is required for heterotetrameric assembly of functional NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:3565-3579.
- Flynn C, Brown CE, Galasso SL, McIntyre DC, Teskey GC, Dyck RH (2007) Zincergic innervation of the forebrain distinguishes epilepsy-prone from epilepsy-resistant rat strains. *Neuroscience* 144:1409-1414.
- Frederickson CJ (1989) Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *International review of neurobiology* 31:145-238.
- Frederickson CJ, Giblin LJ, Krezel A, McAdoo DJ, Mueller RN, Zeng Y, Balaji RV, Masalha R, Thompson RB, Fierke CA, Sarvey JM, de Valdenebro M, Prough DS, Zornow MH (2006) Concentrations of extracellular free zinc (pZn)<sub>e</sub> in the central nervous system during simple anesthetization, ischemia and reperfusion. *Experimental neurology* 198:285-293.
- Frederickson CJ, Hernandez MD, McGinty JF (1989) Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain research* 480:317-321.
- Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nature reviews Neuroscience* 6:449-462.
- Frederickson CJ, Suh SW, Koh JY, Cha YK, Thompson RB, LaBuda CJ, Balaji RV, Cuajungco MP (2002) Depletion of intracellular zinc from neurons by use of an extracellular chelator in vivo and in vitro. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 50:1659-1662.
- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB (2000) Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *The Journal of nutrition* 130:1471S-1483S.
- Gaither LA, Eide DJ (2000) Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *The Journal of biological chemistry* 275:5560-5564.
- Gaither LA, Eide DJ (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 14:251-270.
- Gazaryan IG, Krasinskaya IP, Kristal BS, Brown AM (2007) Zinc irreversibly damages major enzymes of energy production and antioxidant defense prior to mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry* 282:24373-24380.
- Gielen M, Siegler Retchless B, Mony L, Johnson JW, Paoletti P (2009) Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459:703-707.
- Gilad D, Shorer S, Ketzef M, Friedman A, Sekler I, Aizenman E, Hershinkel M (2015) Homeostatic regulation of KCC2 activity by the zinc receptor mZnR/GPR39 during seizures. *Neurobiology of disease* 81:4-13.
- Grabrucker AM, Rowan M, Garner CC (2011) Brain-Delivery of Zinc-Ions as Potential Treatment for Neurological Diseases: Mini Review. *Drug delivery letters* 1:13-23.
- Hansen KB, Furukawa H, Traynelis SF (2010) Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. *Molecular pharmacology* 78:535-549.
- HAS (2015) Prévention vasculaire après un infarctus cérébral ou un accident ischémique transitoire.
- Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, et al. (1995) Brain regional correspondence between

- Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of neurochemistry* 65:2146-2156.
- Hershinkel M, Kandler K, Knoch ME, Dagan-Rabin M, Aras MA, Abramovitch-Dahan C, Sekler I, Aizenman E (2009) Intracellular zinc inhibits KCC2 transporter activity. *Nature neuroscience* 12:725-727.
- Hershinkel M, Silverman WF, Sekler I (2007) The zinc sensing receptor, a link between zinc and cell signaling. *Molecular medicine* 13:331-336.
- Hildebrand MS, Phillips AM, Mullen SA, Adlard PA, Hardies K, Damiano JA, Wimmer V, Bellows ST, McMahon JM, Burgess R, Hendrickx R, Weckhuysen S, Suls A, De Jonghe P, Scheffer IE, Petrou S, Berkovic SF, Reid CA (2015) Loss of synaptic Zn<sup>2+</sup> transporter function increases risk of febrile seizures. *Scientific reports* 5:17816.
- Hirzel K, Muller U, Latal AT, Hulsmann S, Grudzinska J, Seeliger MW, Betz H, Laube B (2006) Hyperekplexia phenotype of glycine receptor alpha1 subunit mutant mice identifies Zn(2+) as an essential endogenous modulator of glycinergic neurotransmission. *Neuron* 52:679-690.
- Hu H, Bandell M, Petrus MJ, Zhu MX, Patapoutian A (2009) Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nature chemical biology* 5:183-190.
- Hunter FE, Jr., Ford L (1955) Inactivation of oxidative and phosphorylative systems in mitochondria by preincubation with phosphate and other ions. *The Journal of biological chemistry* 216:357-369.
- Hwang JJ, Lee SJ, Kim TY, Cho JH, Koh JY (2008) Zinc and 4-hydroxy-2-nonenal mediate lysosomal membrane permeabilization induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:3114-3122.
- INSERM (2012) <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/epilepsie>.
- INSERM (2013) <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/avc-accident-vasculaire-cerebral>.
- INSERM (2014) <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/alzheimer>.
- Jiang D, Sullivan PG, Sensi SL, Steward O, Weiss JH (2001) Zn(2+) induces permeability transition pore opening and release of pro-apoptotic peptides from neuronal mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 276:47524-47529.
- Jiang LJ, Maret W, Vallee BL (1998) The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3483-3488.
- Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
- Kalappa BI, Anderson CT, Goldberg JM, Lippard SJ, Tzounopoulos T (2015) AMPA receptor inhibition by synaptically released zinc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:15749-15754.
- Kalappa BI, Tzounopoulos T (2017) Context-Dependent Modulation of Excitatory Synaptic Strength by Synaptically Released Zinc. *eNeuro* 4.
- Kapaki E, Segditsa J, Papageorgiou C (1989) Zinc, copper and magnesium concentration in serum and CSF of patients with neurological disorders. *Acta neurologica Scandinavica* 79:373-378.
- Karakas E, Furukawa H (2014) Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* 344:992-997.

- Kim Y-H, Koh J-Y (2002) The Role of NADPH Oxidase and Neuronal Nitric Oxide Synthase in Zinc-Induced Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation and Cell Death in Cortical Culture. *Experimental neurology* 177:407-418.
- Kim YH, Kim EY, Gwag BJ, Sohn S, Koh JY (1999) Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* 89:175-182.
- Kitayama T, Morita K, Motoyama N, Dohi T (2016) Down-regulation of zinc transporter-1 in astrocytes induces neuropathic pain via the brain-derived neurotrophic factor - K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter-2 signaling pathway in the mouse spinal cord. *Neurochemistry international* 101:120-131.
- Koh JY, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW (1996) The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 272:1013-1016.
- Kozlowski H, Luczkowski M, Remelli M, Valensin D (2012) Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coordination Chemistry Reviews* 256:2129-2141.
- Krotkiewska B, Banas T (1992) Interaction of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from bovine heart and rabbit muscle. *The International journal of biochemistry* 24:1501-1505.
- Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:10191-10200.
- Lannfelt L, Blennow K, Zetterberg H, Batsman S, Ames D, Harrison J, Masters CL, Targum S, Bush AI, Murdoch R, Wilson J, Ritchie CW, group PEs (2008) Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* 7:779-786.
- Lee CH, Lu W, Michel JC, Goehring A, Du J, Song X, Gouaux E (2014) NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature* 511:191-197.
- Lee EJ, Lee H, Huang TN, Chung C, Shin W, Kim K, Koh JY, Hsueh YP, Kim E (2015) Trans-synaptic zinc mobilization improves social interaction in two mouse models of autism through NMDAR activation. *Nature communications* 6:7168.
- Lee JY, Cole TB, Palmiter RD, Koh JY (2000) Accumulation of zinc in degenerating hippocampal neurons of ZnT3-null mice after seizures: evidence against synaptic vesicle origin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:RC79.
- Lee JY, Cole TB, Palmiter RD, Suh SW, Koh JY (2002) Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7705-7710.
- Lee JY, Kim JH, Hong SH, Lee JY, Cherny RA, Bush AI, Palmiter RD, Koh JY (2004) Estrogen decreases zinc transporter 3 expression and synaptic vesicle zinc levels in mouse brain. *The Journal of biological chemistry* 279:8602-8607.
- Lee SJ, Cho KS, Koh JY (2009) Oxidative injury triggers autophagy in astrocytes: the role of endogenous zinc. *Glia* 57:1351-1361.
- Lemke JR, Lal D, Reinthaler EM, Steiner I, Nothnagel M, Alber M, Geider K, Laube B, Schwake M, Finsterwalder K, Franke A, Schilhabel M, Jahn JA, Muhle H, Boor R, Van Paesschen W, Caraballo R, Fejerman N, Weckhuysen S, De Jonghe P, Larsen J,

- Moller RS, Hjalgrim H, Addis L, Tang S, Hughes E, Pal DK, Veri K, Vaheer U, Talvik T, Dimova P, Guerrero Lopez R, Serratos JM, Linnankivi T, Lehesjoki AE, Ruf S, Wolff M, Buerki S, Wohlrab G, Kroell J, Datta AN, Fiedler B, Kurlemann G, Kluger G, Hahn A, Haberlandt DE, Kutzer C, Sperner J, Becker F, Weber YG, Feucht M, Steinbock H, Neophythou B, Ronen GM, Gruber-Sedlmayr U, Geldner J, Harvey RJ, Hoffmann P, Herms S, Altmuller J, Toliat MR, Thiele H, Nurnberg P, Wilhelm C, Stephani U, Helbig I, Lerche H, Zimprich F, Neubauer BA, Biskup S, von Spiczak S (2013) Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nature genetics* 45:1067-1072.
- Lesca G, Rudolf G, Bruneau N, Lozovaya N, Labalme A, Boutry-Kryza N, Salmi M, Tsintsadze T, Addis L, Motte J, Wright S, Tsintsadze V, Michel A, Doummar D, Lascelles K, Strug L, Waters P, de Bellescize J, Vrielynck P, de Saint Martin A, Ville D, Ryvlin P, Arzimanoglou A, Hirsch E, Vincent A, Pal D, Burnashev N, Sanlaville D, Szepietowski P (2013) GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. *Nature genetics* 45:1061-1066.
- Li Y, Andereggen L, Yuki K, Omura K, Yin Y, Gilbert HY, Erdogan B, Asdourian MS, Shrock C, de Lima S, Apfel UP, Zhuo Y, Hershinkel M, Lippard SJ, Rosenberg PA, Benowitz L (2017) Mobile zinc increases rapidly in the retina after optic nerve injury and regulates ganglion cell survival and optic nerve regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114:E209-E218.
- Link TA, von Jagow G (1995) Zinc ions inhibit the QP center of bovine heart mitochondrial bc1 complex by blocking a protonatable group. *The Journal of biological chemistry* 270:25001-25006.
- Lipton SA (2004) Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 1:101-110.
- Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR (1995) Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:1594-1601.
- Lu Q, Haragopal H, Slepchenko KG, Stork C, Li YV (2016) Intracellular zinc distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 8:35-43.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 155:853-862.
- Lynch JW, Jacques P, Pierce KD, Schofield PR (1998) Zinc potentiation of the glycine receptor chloride channel is mediated by allosteric pathways. *Journal of neurochemistry* 71:2159-2168.
- Malaiyandi LM, Honick AS, Rintoul GL, Wang QJ, Reynolds IJ (2005a) Zn<sup>2+</sup> inhibits mitochondrial movement in neurons by phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:9507-9514.
- Malaiyandi LM, Vergun O, Dineley KE, Reynolds IJ (2005b) Direct visualization of mitochondrial zinc accumulation reveals uniporter-dependent and -independent transport mechanisms. *Journal of neurochemistry* 93:1242-1250.

- Martel G, Hevi C, Friebely O, Baybutt T, Shumyatsky GP (2010) Zinc transporter 3 is involved in learned fear and extinction, but not in innate fear. *Learning & memory* 17:582-590.
- Martel G, Hevi C, Kane-Goldsmith N, Shumyatsky GP (2011) Zinc transporter ZnT3 is involved in memory dependent on the hippocampus and perirhinal cortex. *Behavioural brain research* 223:233-238.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:4245-4249.
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 36:747-751.
- Medvedeva YV, Ji SG, Yin HZ, Weiss JH (2017) Differential Vulnerability of CA1 versus CA3 Pyramidal Neurons After Ischemia: Possible Relationship to Sources of Zn<sup>2+</sup> Accumulation and Its Entry into and Prolonged Effects on Mitochondria. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37:726-737.
- Medvedeva YV, Lin B, Shuttleworth CW, Weiss JH (2009) Intracellular Zn<sup>2+</sup> accumulation contributes to synaptic failure, mitochondrial depolarization, and cell death in an acute slice oxygen-glucose deprivation model of ischemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:1105-1114.
- Miller PS, Da Silva HM, Smart TG (2005) Molecular basis for zinc potentiation at strychnine-sensitive glycine receptors. *The Journal of biological chemistry* 280:37877-37884.
- Mitchell CL, Barnes MI (1993) Proconvulsant action of diethyldithiocarbamate in stimulation of the perforant path. *Neurotoxicology and teratology* 15:165-171.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069-1075.
- Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P (2009) Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *British journal of pharmacology* 157:1301-1317.
- Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P (2011) Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *The EMBO journal* 30:3134-3146.
- Mount C, Downton C (2006) Alzheimer disease: progress or profit? *Nature medicine* 12:780-784.
- Nakashima AS, Dyck RH (2009) Zinc and cortical plasticity. *Brain research reviews* 59:347-373.
- Nishizuka Y (1989) The Albert Lasker Medical Awards. The family of protein kinase C for signal transduction. *Jama* 262:1826-1833.
- Noh KM, Kim YH, Koh JY (1999) Mediation by membrane protein kinase C of zinc-induced oxidative neuronal injury in mouse cortical cultures. *Journal of neurochemistry* 72:1609-1616.
- Noh KM, Koh JY (2000) Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:RC111.
- Noh KM, Yokota H, Mashiko T, Castillo PE, Zukin RS, Bennett MV (2005) Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against

- global ischemia-induced death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:12230-12235.
- Nozaki C, Vergnano AM, Filliol D, Ouagazzal AM, Le Goff A, Carvalho S, Reiss D, Gaveriaux-Ruff C, Neyton J, Paoletti P, Kieffer BL (2011) Zinc alleviates pain through high-affinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. *Nature neuroscience* 14:1017-1022.
- Ohana E, Segal D, Palty R, Ton-That D, Moran A, Sensi SL, Weiss JH, Hershfinkel M, Sekler I (2004) A sodium zinc exchange mechanism is mediating extrusion of zinc in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 279:4278-4284.
- OMS (2017) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/fr/>.
- Palm R, Strand T, Hallmans G (1986) Zinc, total protein, and albumin in CSF of patients with cerebrovascular diseases. *Acta neurologica Scandinavica* 74:308-313.
- Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD (1996) ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:14934-14939.
- Pandey VK, Parmeswaran M, Soman SD, Dacosta HJ (1982) Altered sensorium in neurological infections and the homeostasis of Mg, Zn, Cu and Ca. *The Science of the total environment* 25:277-285.
- Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *The European journal of neuroscience* 33:1351-1365.
- Paoletti P, Ascher P, Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:5711-5725.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews Neuroscience* 14:383-400.
- Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, Neyton J (2000) Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* 28:911-925.
- Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158:126-136.
- Pei YQ, Koyama I (1986) Features of seizures and behavioral changes induced by intrahippocampal injection of zinc sulfate in the rabbit: a new experimental model of epilepsy. *Epilepsia* 27:183-188.
- Prakash A, Bharti K, Majeed AB (2015) Zinc: indications in brain disorders. *Fundamental & clinical pharmacology* 29:131-149.
- Purves D (2012) *Neuroscience*. Sunderland, Mass. Basingstoke: Sinauer Associates ; Palgrave distributor.
- Qin Y, Thomas D, Fontaine CP, Colvin RA (2008) Mechanisms of Zn<sup>2+</sup> efflux in cultured cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 107:1304-1313.
- Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, Paoletti P (2005) The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:308-317.
- Rassendren FA, Lory P, Pin JP, Nargeot J (1990) Zinc has opposite effects on NMDA and non-NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 4:733-740.
- Reid CA, Hildebrand MS, Mullen SA, Hildebrand JM, Berkovic SF, Petrou S (2017) Synaptic Zn<sup>2+</sup> and febrile seizure susceptibility. *British journal of pharmacology* 174:119-125.

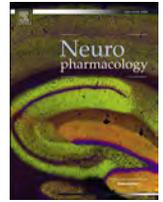
- Rezaei-Ghaleh N, Giller K, Becker S, Zweckstetter M (2011) Effect of zinc binding on beta-amyloid structure and dynamics: implications for A $\beta$  aggregation. *Biophysical journal* 101:1202-1211.
- Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson CA, Zhang J, Risinger M, Pan W, Wu D, Colangelo CM, Forbush B, Joiner CH, Gulcicek EE, Gallagher PG, Lifton RP (2009) Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell* 138:525-536.
- Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, MacGregor L, Kiers L, Cherny R, Li QX, Tammer A, Carrington D, Mavros C, Volitakis I, Xilinas M, Ames D, Davis S, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL (2003) Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting A $\beta$  amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Archives of neurology* 60:1685-1691.
- Romero-Hernandez A, Simorowski N, Karakas E, Furukawa H (2016) Molecular Basis for Subtype Specificity and High-Affinity Zinc Inhibition in the GluN1-GluN2A NMDA Receptor Amino-Terminal Domain. *Neuron* 92:1324-1336.
- Sadleir LG, Scheffer IE (2007) Febrile seizures. *Bmj* 334:307-311.
- Saghazadeh A, Mahmoudi M, Meysamie A, Gharedaghi M, Zamponi GW, Rezaei N (2015) Possible role of trace elements in epilepsy and febrile seizures: a meta-analysis. *Nutrition reviews* 73:760-779.
- Sarkies N (2004) Traumatic optic neuropathy. *Eye* 18:1122-1125.
- Sensi SL, Canzoniero LM, Yu SP, Ying HS, Koh JY, Kerchner GA, Choi DW (1997) Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:9554-9564.
- Sensi SL, Paoletti P, Bush AI, Sekler I (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nature reviews Neuroscience* 10:780-791.
- Sensi SL, Paoletti P, Koh JY, Aizenman E, Bush AI, Hershinkel M (2011) The neurophysiology and pathology of brain zinc. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:16076-16085.
- Sensi SL, Ton-That D, Sullivan PG, Jonas EA, Gee KR, Kaczmarek LK, Weiss JH (2003) Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn<sup>2+</sup> pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:6157-6162.
- Sensi SL, Yin HZ, Carriedo SG, Rao SS, Weiss JH (1999) Preferential Zn<sup>2+</sup> influx through Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:2414-2419.
- Sensi SL, Yin HZ, Weiss JH (2000) AMPA/kainate receptor-triggered Zn<sup>2+</sup> entry into cortical neurons induces mitochondrial Zn<sup>2+</sup> uptake and persistent mitochondrial dysfunction. *The European journal of neuroscience* 12:3813-3818.
- Serraz B, Grand T, Paoletti P (2016) Altered zinc sensitivity of NMDA receptors harboring clinically-relevant mutations. *Neuropharmacology* 109:196-204.
- Shearman MS, Sekiguchi K, Nishizuka Y (1989) Modulation of ion channel activity: a key function of the protein kinase C enzyme family. *Pharmacological reviews* 41:211-237.
- Sheline CT, Behrens MM, Choi DW (2000) Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:3139-3146.

- Shivers BD, Hilbich C, Multhaup G, Salbaum M, Beyreuther K, Seeburg PH (1988) Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *The EMBO journal* 7:1365-1370.
- Sindreu CB, Varoqui H, Erickson JD, Perez-Clausell J (2003) Boutons containing vesicular zinc define a subpopulation of synapses with low AMPAR content in rat hippocampus. *Cerebral cortex* 13:823-829.
- Skulachev VP, Chistyakov VV, Jasaitis AA, Smirnova EG (1967) Inhibition of the respiratory chain by zinc ions. *Biochemical and biophysical research communications* 26:1-6.
- Smart TG, Hosie AM, Miller PS (2004) Zn<sup>2+</sup> ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 10:432-442.
- Smith AP, Lee NM (2007) Role of zinc in ALS. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 8:131-143.
- Smith JL, Xiong S, Lovell MA (2006) 4-Hydroxynonenal disrupts zinc export in primary rat cortical cells. *Neurotoxicology* 27:1-5.
- Smith RM (2009) NIST critically selected stability constants of metal complexes: version 8. NIST Scientific and Technical Databases [online], <http://www.nist.gov/srd/nist46.htm>.
- Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462:745-756.
- Soto D, Altafaj X, Sindreu C, Bayes A (2014) Glutamate receptor mutations in psychiatric and neurodevelopmental disorders. *Communicative & integrative biology* 7:e27887.
- Stork CJ, Li YV (2006) Intracellular zinc elevation measured with a "calcium-specific" indicator during ischemia and reperfusion in rat hippocampus: a question on calcium overload. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:10430-10437.
- Stork CJ, Li YV (2010) Zinc release from thapsigargin/IP<sub>3</sub>-sensitive stores in cultured cortical neurons. *Journal of molecular signaling* 5:5.
- Stroebel D, Carvalho S, Grand T, Zhu S, Paoletti P (2014) Controlling NMDA receptor subunit composition using ectopic retention signals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:16630-16636.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Zysk M, Dys A, Ronowska A, Gul-Hinc S, Klimaszewska-Lata J (2017) Early and Late Pathomechanisms in Alzheimer's Disease: From Zinc to Amyloid-beta Neurotoxicity. *Neurochemical research* 42:891-904.
- Tajima N, Karakas E, Grant T, Simorowski N, Diaz-Avalos R, Grigorieff N, Furukawa H (2016) Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature* 534:63-68.
- Takeda A, Hirate M, Tamano H, Oku N (2003) Release of glutamate and GABA in the hippocampus under zinc deficiency. *Journal of neuroscience research* 72:537-542.
- Takeda A, Iida M, Ando M, Nakamura M, Tamano H, Oku N (2013) Enhanced susceptibility to spontaneous seizures of nodal epileptic rats by loss of synaptic zn(2+). *PLoS one* 8:e71372.
- Takeda A, Itoh H, Tamano H, Oku N (2006) Responsiveness to kainate in young rats after 2-week zinc deprivation. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 19:565-572.

- Takeda A, Sawashita J, Okada S (1995) Biological half-lives of zinc and manganese in rat brain. *Brain research* 695:53-58.
- Tomski SJ, Murphy RM (1992) Kinetics of aggregation of synthetic beta-amyloid peptide. *Archives of biochemistry and biophysics* 294:630-638.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62:405-496.
- Uchida Y, Gomi F, Masumizu T, Miura Y (2002) Growth inhibitory factor prevents neurite extension and the death of cortical neurons caused by high oxygen exposure through hydroxyl radical scavenging. *The Journal of biological chemistry* 277:32353-32359.
- Vallee BL, Falchuk KH (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews* 73:79-118.
- Vergnano AM, Rebola N, Savtchenko LP, Pinheiro PS, Casado M, Kieffer BL, Rusakov DA, Mulle C, Paoletti P (2014) Zinc dynamics and action at excitatory synapses. *Neuron* 82:1101-1114.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.
- Wang Y, Qin ZH (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 15:1382-1402.
- Watt NT, Whitehouse IJ, Hooper NM (2010) The role of zinc in Alzheimer's disease. *International journal of Alzheimer's disease* 2011:971021.
- Wei G, Hough CJ, Li Y, Sarvey JM (2004) Characterization of extracellular accumulation of Zn<sup>2+</sup> during ischemia and reperfusion of hippocampus slices in rat. *Neuroscience* 125:867-877.
- Woo NS, Lu J, England R, McClellan R, Dufour S, Mount DB, Deutch AY, Lovinger DM, Delpire E (2002) Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus* 12:258-268.
- Wudarczyk J, Debska G, Lenartowicz E (1999) Zinc as an inducer of the membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 363:1-8.
- Yasuda S, Miyazaki T, Munechika K, Yamashita M, Ikeda Y, Kamizono A (2007) Isolation of Zn<sup>2+</sup> as an endogenous agonist of GPR39 from fetal bovine serum. *Journal of receptor and signal transduction research* 27:235-246.
- Yoo MH, Kim TY, Yoon YH, Koh JY (2016) Autism phenotypes in ZnT3 null mice: Involvement of zinc dyshomeostasis, MMP-9 activation and BDNF upregulation. *Scientific reports* 6:28548.
- Yuan H, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Traynelis SF (2009) Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12045-12058.
- Yuan H, Low CM, Moody OA, Jenkins A, Traynelis SF (2015) Ionotropic GABA and Glutamate Receptor Mutations and Human Neurologic Diseases. *Molecular pharmacology* 88:203-217.
- Zhan SS, Veerhuis R, Kamphorst W, Eikelenboom P (1995) Distribution of beta amyloid associated proteins in plaques in Alzheimer's disease and in the non-demented elderly. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration* 4:291-297.

- Zhang LH, Wang X, Zheng ZH, Ren H, Stoltenberg M, Danscher G, Huang L, Rong M, Wang ZY (2010) Altered expression and distribution of zinc transporters in APP/PS1 transgenic mouse brain. *Neurobiology of aging* 31:74-87.
- Zhou N, Wang CH, Zhang S, Wu DC (2013) The GLRA1 missense mutation W170S associates lack of Zn<sup>2+</sup> potentiation with human hyperekplexia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:17675-17681.
- Zhu L, Polley N, Mathews GC, Delpire E (2008) NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy research* 79:201-212.
- Zhu S, Paoletti P (2015) Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. *Current opinion in pharmacology* 20:14-23.

## **VI. Annexe**



# Altered zinc sensitivity of NMDA receptors harboring clinically-relevant mutations



Benjamin Serraz, Teddy Grand, Pierre Paoletti\*

Ecole Normale Supérieure, PSL Research University, CNRS, INSERM, Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS), F-75005 Paris, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 22 March 2016

Received in revised form

17 May 2016

Accepted 6 June 2016

Available online 7 June 2016

### Keywords:

Glutamate receptor

NMDA receptor

Zinc

Mutation

Synapse

Epilepsy

## ABSTRACT

Recent human genetic studies have identified a surprisingly high number of alterations in genes encoding NMDA receptor (NMDAR) subunits in several common brain diseases. Among NMDAR subunits, the widely-expressed GluN2A subunit appears particularly affected, with tens of *de novo* or inherited mutations associated with neurodevelopmental conditions including childhood epilepsies and cognitive deficits. Despite the increasing identification of NMDAR mutations of clinical interest, there is still little information about the effects of the mutations on receptor and network function. Here we analyze the impact on receptor expression and function of nine GluN2A missense (i.e. single-point) mutations targeting the N-terminal domain, a large regulatory region involved in subunit assembly and allosteric signaling. While several mutations produced no or little apparent effect on receptor expression, gating and pharmacology, two showed a drastic expression phenotype and two resulted in marked alterations in the sensitivity to zinc, a potent allosteric inhibitor of GluN1/GluN2A receptors and modulator of excitatory synaptic transmission. Surprisingly, both increase (GluN2A-R370W) and decrease (GluN2A-P79R) of zinc sensitivity were observed on receptors containing either one or two copies of the mutated subunits. Overexpression of the mutant subunits in cultured rat neurons confirmed the results from heterologous expression. These results, together with previously published data, indicate that disease-causing mutations in NMDARs produce a wide spectrum of receptor alterations, at least *in vitro*. They also point to a critical role of the zinc-NMDAR interaction in neuronal function and human health.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

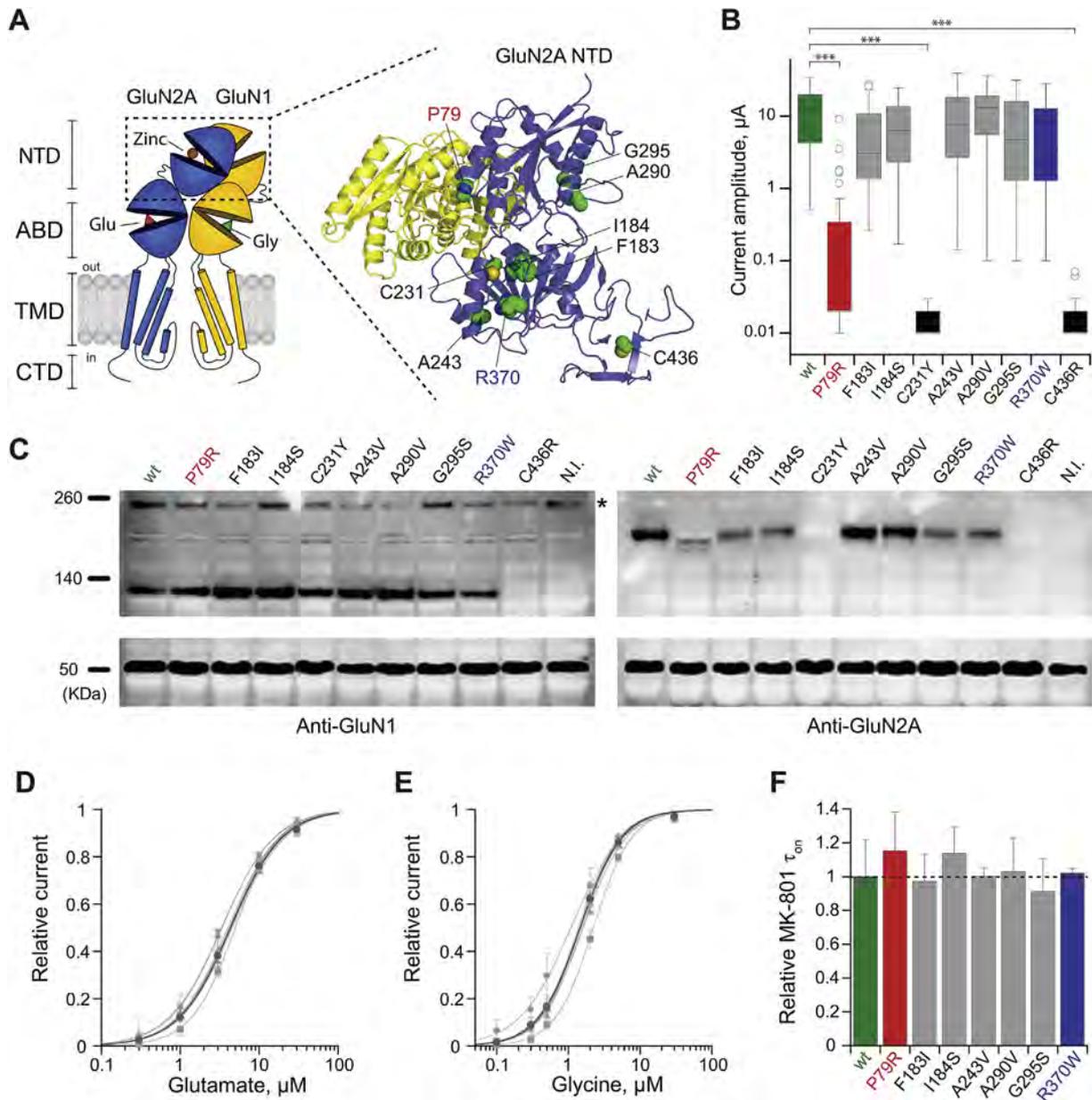
With the advent of massive sequencing technologies and whole-genome analysis, recent years have seen an explosion of data linking specific gene alterations to human brain disorders. A new and rather unexpected outcome from these sequencing efforts has been the surprisingly high number of mutations discovered in NMDA receptor (NMDAR) genes, most particularly in *GRIN2A*, the gene which encodes the GluN2A subunit and which accounts for >80% of all the disease-linked mutations identified in ionotropic glutamate receptor (iGluR) subunits (Burnashev and Szepetowski, 2015; Soto et al., 2014; Yuan et al., 2015). The GluN2A subunit appears to be a key locus for multiple neurodevelopmental phenotypes, of which seizures constitute the largest group (Burnashev and Szepetowski, 2015). Investigating how these mutations

identified in patients affect receptor function, circuit behavior and ultimately pathogenesis remains a largely unmet challenge.

NMDARs are widely expressed in the CNS where they are critically involved in many processes such as learning and memory. Functional disturbances of these receptors are also implicated in various neurological and psychiatric disorders. Overactivation of NMDARs can promote seizures and neuronal death, while NMDAR hypofunction has emerged as a leading hypothesis for schizophrenia (Paoletti et al., 2013). There is thus considerable interest in better understanding NMDARs and factors that control their expression and activation. At the molecular level, NMDARs are hetero-tetramers usually associating two GluN1 and two GluN2 subunits, of which there are four subtypes (GluN2A-D) (Glasgow et al., 2015; Paoletti et al., 2013; Wyllie et al., 2013). NMDARs form massive complexes with a typical layered organization comprising distal N-terminal domains (NTDs) and agonist-binding domains (ABDs) directly connected to the transmembrane pore region (TMD) (Fig. 1A) (Karakas and Furukawa, 2014; Lee et al., 2014). Besides their key roles in subunit assembly, the NTDs

\* Corresponding author. Institut de Biologie de l'ENS, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

E-mail address: [pierre.paoletti@ens.fr](mailto:pierre.paoletti@ens.fr) (P. Paoletti).



**Fig. 1. Effects of GluN2A mutations on receptor expression and activation.** A. Cartoon representation of a GluN1/GluN2A receptor (left; only one of the two dimers is represented) and location of the studied GluN2A mutations (right; modeled structure of the GluN1/GluN2A NTD heterodimer based on the GluN1/GluN2B NTD crystal structure (Lee et al., 2014)). NTD, N-terminal domain; ABD, agonist-binding domain; TMD, transmembrane domain; CTD, C-terminal domain. Glu, glutamate; Gly, glycine. B. Box plot of current amplitudes of wild-type (wt) and mutant GluN2A receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Number of cells: 67 (wt), 78 (P79R), 33 (F183I), 32 (I184S), 18 (C231Y), 70 (A243V), 35 (A290V), 37 (G295S), 62 (R370W), 19 (C436R). \*\*\*,  $p = 2.6 \cdot 10^{-18}$  (P79R),  $p = 5.2 \cdot 10^{-19}$  (C231Y),  $p = 5.3 \cdot 10^{-19}$  (C436R), Bonferroni-corrected two-tailed *post hoc t*-test. C. Immunoblots from oocytes expressing wt and mutant GluN2A receptors. The band around 50 kDa corresponds to  $\alpha$ -tubulin used as a loading control. \* indicates non-specific bands seen with the anti-GluN1 antibody. n.i., non-injected oocytes. D. Sensitivity to glutamate (wt, green; mutants, gray). E. Sensitivity to glycine (wt, green; mutants, gray). F. MK-801 inhibition kinetics. Values of MK-801  $\tau_{on}$ , dose-response curve fits and number of cells (n) are listed in Table 1.

endow NMDARs with unique signaling capacities, harboring binding sites for small ligands acting as subunit-specific allosteric modulators of ion channel activity (Hansen et al., 2010; Paoletti, 2011). In particular, the GluN2A NTD confers an exquisite sensitivity to zinc ions which are concentrated and released at many excitatory synapses where they act as powerful regulators of glutamatergic transmission (Kalappa et al., 2015; Vergnano et al., 2014; Vogt et al., 2000).

Here, we analyze the functional consequences of several missense mutations in NMDARs identified in children with rolandic epilepsies and encephalopathies associated with aphasia (Lemke et al., 2013; Lesca et al., 2013). We concentrate on mutations

clustering in the N-terminal region of the GluN2A subunit. Our *in vitro* studies on recombinant receptors reveal variable phenotypes including distinct alterations in expression level and zinc sensitivity.

## 2. Material and methods

### 2.1. Molecular biology

The pCDNA3-based plasmids for rodent NMDAR subunits (rat GluN1-1a, named GluN1 herein; rat GluN2A; mouse GluN2B), the site-directed mutagenesis and sequencing procedures have been

previously described (Mony et al., 2011). cRNAs were synthesized *in vitro* using a T7 transcription kit (Ambion). Selective expression of triheteromeric NMDARs was performed as previously described (Stroebele et al., 2014). The strategy employed is based on the use of ectopic retention signals from GABA-B receptors allowing control of NMDAR trafficking such that only triheteromeric receptors are expressed at the cell surface (co-expressed diheteromers being retained intracellularly). In experiments presented in Fig. 3, the following subunits were used: GluN2A-r2, GluN2B-r2, GluN2A-P79R-r1, GluN2A-R370W-r1, where r1 and r2 are retention signals derived from GABA-B1 and GABA-B2 subunits, respectively (see (Stroebele et al., 2014)). As control experiments, we verified that co-expression of GluN1+GluN2Ar2 or GluN1+GluN2B-r2 or GluN1+GluN2A-P79R-r1 or GluN1+GluN2A-R370W-r1 subunits resulted in an almost complete lack of receptor expression (no, or very tiny ( $\leq 30$  nA), NMDAR-mediated currents;  $n = 11–23$  oocytes for each condition), as expected if the corresponding diheteromeric receptors are efficiently retained in the ER. In contrast, following co-expression of r1 and r2 subunits, large currents ( $>0.5$   $\mu$ A; up to 7  $\mu$ A) were routinely measured indicating efficient cell surface expression of triheteromeric receptors.

## 2.2. Electrophysiology

Oocytes from female *Xenopus laevis* were prepared and voltage-clamped as described previously (Mony et al., 2011). Oocyte harvest was performed in accordance with the European directives 2010/63/EU on the Protection of Animals used for Scientific Purposes and in the framework of project authorization #05137.02 as delivered by the competent French authorities. Each oocyte was coinjected with a mixture of GluN1:GluN2 cDNAs (or mRNAs) each at concentration of 15–50 ng/ $\mu$ L and at a ratio of 1:1 for diheteromers and 1:1:1 for triheteromers. Data were collected using pClamp10 and analyzed using Kaleidagraph4. The standard external solution contained (in mM): 100 NaCl, 2.5 KCl, 0.3 BaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 0.01 DTPA (diethylenetriamine-pentaacetic acid), pH 7.3. For pH experiments, an HEPES-enriched external medium was used (Gielen et al., 2008). For zinc experiments, DTPA was omitted (except in the '0' no-added zinc solution) and tricine (10 mM) or ADA (N-(2-Acetamido)imidodiacetic acid, 1 mM) used to buffer zinc (Gielen et al., 2008). ADA was specifically used for mutant GluN2A-R370W receptors which display very high (i.e. sub-nanomolar) zinc sensitivity. Free zinc concentrations were calculated using the following relationships (Fayyazuddin et al., 2000; Paoletti et al., 1997): for tricine,  $[Zn]_{free} = [Zn]_{added}/200$ ; for ADA,  $[Zn]_{free} = [Zn]_{added}/17,000$ . NMDAR-mediated currents were induced by co-application of saturating concentrations of L-glutamate and glycine (100  $\mu$ M each). Recordings were performed at  $-60$  mV and at room temperature.

Whole-cell patch-clamp recordings were performed on HEK293 cells and primary cultures of neonatal (P0) rat hippocampal neurons. Neurons were transfected with GluN2A and eGFP (0.8  $\mu$ g/ml each) at DIV4 using Lipofectamine 2000 (Life Technologies), and recorded at DIV5–6. HEK293 cells were transfected with GluN1, GluN2A and eGFP (0.5  $\mu$ g/ml each) using Polyethylenimine (Sigma), and recorded 24–48 h later. The external solution contained (in mM): 140 NaCl, 2.8 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 tricine, 10 glucose (290–300 mOsm). The pipette solution contained (in mM): 115 CsF, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 BAPTA (270–290 mOsm). Tricine was used to buffer zinc as described above. In the zinc washout kinetic experiments, tricine was present throughout. Currents were sampled at 10 kHz and low-pass filtered at 2 kHz using an Axopatch 200 B amplifier and pClamp10.5. Agonists (100  $\mu$ M glutamate + 100  $\mu$ M glycine for HEK cells; 300  $\mu$ M NMDA + 50  $\mu$ M D-serine for neurons) were applied using a multibarrel rapid

solution exchanger (RSC 200; Bio-Logic). Recordings were performed at  $-60$  mV for HEK cells and  $-65$  mV for neurons, and at room temperature.

## 2.3. Pharmacology and data analysis

Glutamate and glycine dose-response curve (DRC) experiments were performed in the presence of 100  $\mu$ M of the respective co-agonist. Agonist DRCs were fitted with the following Hill equation:  $I_{rel} = 1/(1+(EC_{50}/[A])^{n_H})$ , with  $EC_{50}$  and  $n_H$  as free parameters. Determination of MK-801 inhibition time constant ( $\tau_{on}$ ) was performed as in Mony et al. (2011). MK-801 was applied at 10 nM. Proton DRCs were analyzed and fitted as in Gielen et al. (2008), with  $pH_{IC50}$  and  $n_H$  as free parameters. Zinc DRCs were fitted with the following equation:  $I_{rel} = 1-a/(1+(IC_{50}/[C])^{n_H})$ , where  $a$  is the maximal inhibition, and with  $IC_{50}$ ,  $a$  and  $n_H$  as free parameters. Zinc dissociation kinetics were fitted by single exponentials as previously performed (Paoletti et al., 1997).

## 2.4. Immunoblotting

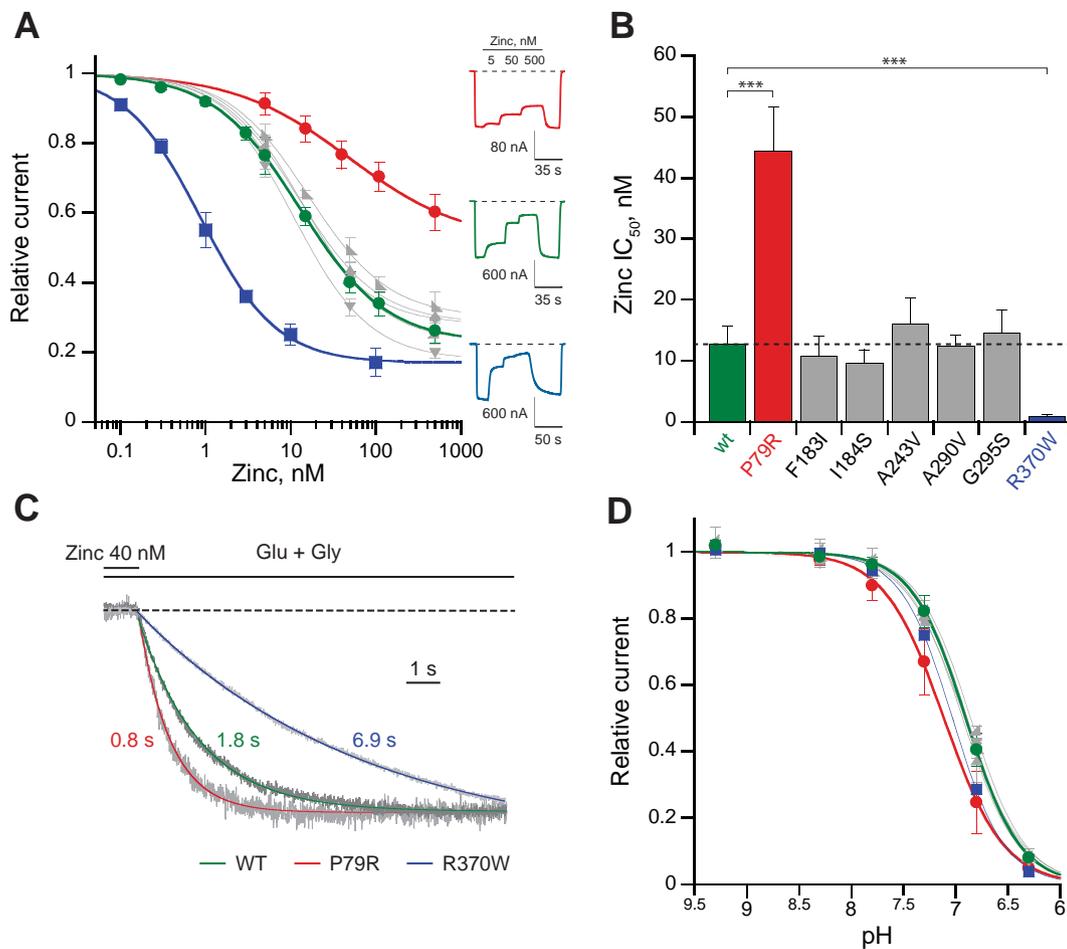
Samples for immunoblots were obtained from cRNA-injected oocytes. Two oocytes per condition were used. Samples were prepared and immunoblots performed as previously described (Mony et al., 2011), except that electrophoresis was done in reducing conditions (5%  $\beta$ -mercaptoethanol). The following antibodies were used: anti-GluN1 antibody (1:500, mouse monoclonal clone MAB363; Millipore), anti-GluN2A antibody (1:500, rabbit monoclonal clone A12W; Millipore), anti- $\alpha$ Tubuline (1:1000, mouse monoclonal clone DM1A; Upstate), secondary goat peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1:10,000, Jackson ImmunoResearch, #115-035-003) or secondary rabbit peroxidase-conjugated anti-goat antibody (1:10,000, Jackson ImmunoResearch, #305-035-003).

## 2.5. Statistical analysis

Analysis of statistical significance was assessed using either the two sample *t*-test (Fig. 3E,  $\alpha = 0.01$ ) or the Bonferroni-corrected two-tailed *post hoc t*-test (Fig. 1B,  $\alpha = 0.0011$ ; Fig. 2B,  $\alpha = 0.0014$ ). Error bars represent the standard deviation of the mean value (SD).

## 3. Results

While *GRIN2A* mutations identified in patients with neurodevelopmental and psychiatric disorders scatter throughout the subunit's domains, we decided to focus on mutations that locate in the receptor's N-terminal region. The membrane-distal GluN2 NTD together with the short connecting linker to the ABDs control a surprisingly diverse set of receptor functions including subunit assembly, channel open probability and allosteric regulation, rendering this region a target of therapeutic interest (Farina et al., 2011; Gielen et al., 2009; Hansen et al., 2010; Herguedas et al., 2013; Mony et al., 2011; Yuan et al., 2009). Based on two recent clinical reports (Lemke et al., 2013; Lesca et al., 2013), nine GluN2A cDNA single-point mutations associated with various epilepsy-cognitive phenotypes were generated (P79R, F183I, I184S, C231Y, A243V, A290V, G295S, R370W and C436R) and the resulting GluN2A-containing receptors studied in heterologous expression systems. All mutations locate in the NTD, except for C436R which resides in the ABD but in close proximity to the NTD lower lobe (Fig. 1A). The genetic origin of these mutations are either inherited (P79R, F183I, I184S, C231Y), de novo (C436R) or of unknown inheritance (A243V, A290V, G295S, R370W) (Lemke et al., 2013; Lesca et al., 2013).



**Fig. 2.** Mutations GluN2A-P79R and GluN2A-R370W alter zinc sensitivity. **A.** Zinc inhibition curves for wild-type (wt, green) and mutant (red, GluN2A-P79R; blue, GluN2A-R370W) receptors; grey, others) receptors. Inset: Representative NMDAR trace currents showing zinc inhibition by 5, 50 and 500 nM zinc. **B.** Zinc IC<sub>50</sub> values determined from the dose-response curves. \*\*\*,  $p = 0.00015$  (P79R,  $n = 6$ ),  $p = 1.6 \cdot 10^{-21}$  (R370W,  $n = 10$ ), Bonferroni-corrected two-tailed *post hoc* *t*-test. **C.** Zinc off-relaxation kinetics measured in HEK293 cells (normalized current responses). Zinc (40 nM) is applied and washed during a pulse of saturating glutamate and glycine (100  $\mu$ M each). Individual values of the exponential time-constant ( $\tau_{off}$ ) are indicated. **D.** Proton inhibition curves. All values of the dose-response curve fits and number of cells ( $n$ ) are listed in Table 1. Proton IC<sub>50</sub> values from mutant receptors are not different from that of wt receptors except for GluN2A-P79R (\*\*\*,  $p = 0.0007$ ,  $n = 7$ , Bonferroni-corrected two-tailed *post hoc* *t*-test).

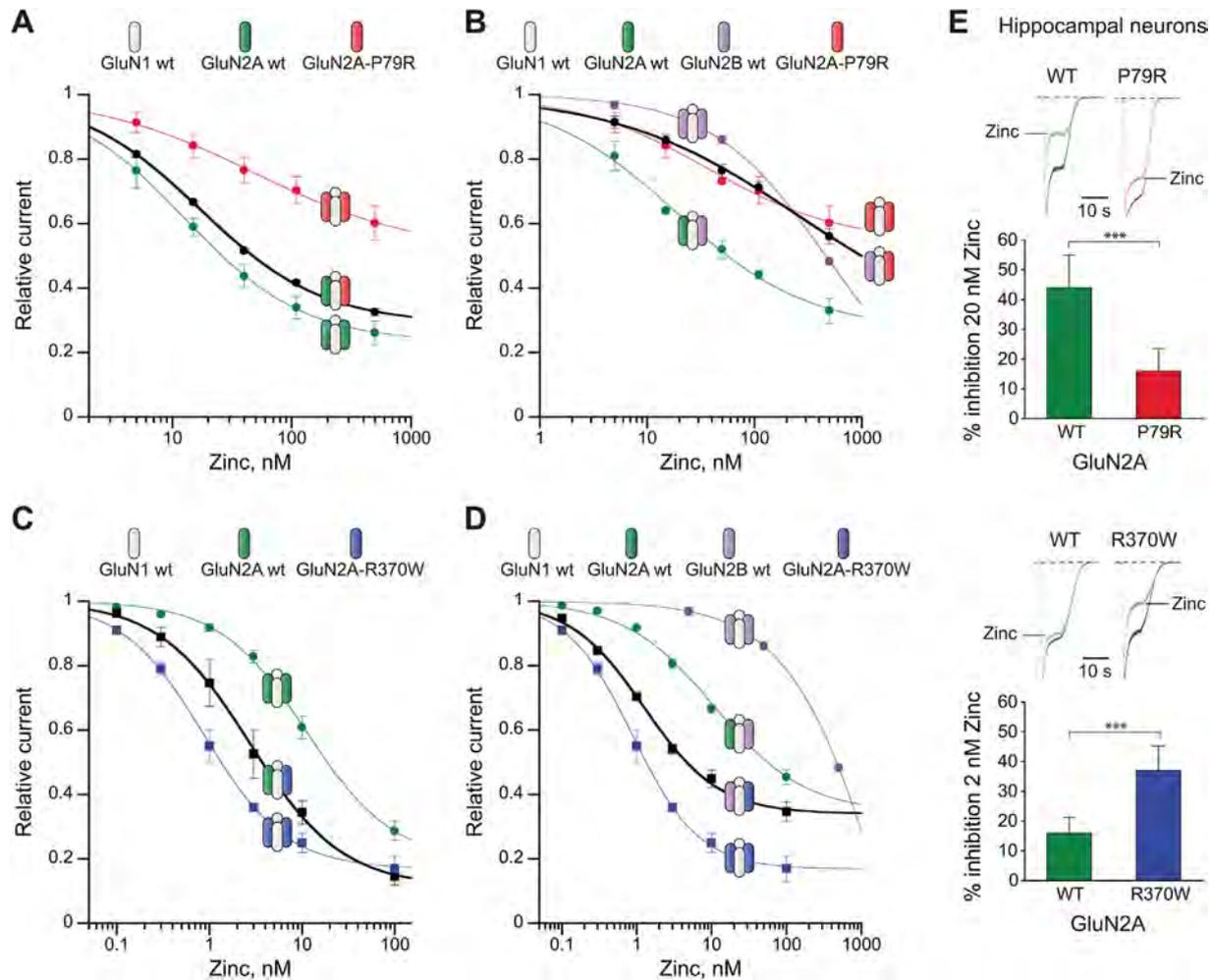
### 3.1. Effects of the mutations on receptor expression

To investigate the impact of the mutations on receptor expression and function, we first used *Xenopus* oocytes as a heterologous expression system. Both wild-type (wt) GluN1 and wt or mutant GluN2A subunits were injected in oocytes, and cells subsequently tested for NMDAR-mediated currents using two-electrode voltage-clamp recordings. For the majority of mutant receptors (F183I, I184S, A243V, A290V, G295S, R370W), currents of large amplitude, comparable to that of wt receptors, were recorded (Fig. 1B). In contrast, for the three remaining mutants, currents were either markedly diminished (P79R) or vanishingly small (C231Y, C436R). Western blots revealed that the decrease in functionality was likely due to a deficiency in GluN2A subunit expression (Fig. 1C). Surprisingly, in the case of the GluN2A-C436R cysteine mutation, immunoblotting with GluN1 antibody also revealed a major drop in GluN1 subunit expression (Fig. 1C). Patch-clamp experiments in mammalian HEK293 cells confirmed these strong expression phenotypes (current density of:  $231 \pm 153$  pA/pF [ $n = 6$ ] for wt receptors;  $43 \pm 42$  pA/pF [ $n = 6$ ] for P79R; no current detected for both C231Y [ $n = 6$ ] and C436R [ $n = 6$ ]). Thus, the three GluN2A missense mutations, C231Y, C436R, and to a lesser extent P79R, result in a marked expression phenotype likely involving impaired GluN subunit folding and/or assembly. For those mutations that

yielded functional receptors, we next investigated the gating and pharmacological attributes of the mutated receptors.

### 3.2. GluN2A NTD mutations have minimal effect on the receptor gating properties

GluN2 subunits are the major determinants of NMDAR functional diversity imparting distinct biophysical and pharmacological properties (Glasgow et al., 2015; Paoletti et al., 2013; Wyllie et al., 2013). In particular, the GluN2A subunit endows NMDARs with relatively high open channel probability and relatively low affinity to glutamate and to the co-agonist glycine. We first examined whether glutamate and glycine sensitivity were altered in mutant receptors. On the seven mutant receptors tested, full dose-response curve experiments revealed no or very modest effect on both glutamate and glycine sensitivity ( $\leq 1.5$  fold change in EC<sub>50</sub>; Fig. 1D–E, Table 1). We next estimated the channel maximal open probability ( $P_o$ ) by measuring kinetics of current inhibition by MK-801, a method classically used to index receptor channel  $P_o$  (Rosenmund et al., 1993; Zhu et al., 2013). Again, no significant difference between wt and the seven mutant receptors was observed (Fig. 1F, Table 1). Thus, the single-point GluN2A mutations P79R, F183I, I184S, A243V, A290V, G295S and R370W minimally impact the basal receptor activation properties.



**Fig. 3.** Effects of GluN2A-P79R and GluN2A-R370W mutations in triheteromeric NMDARs and in neuronal receptors. A–D. Zinc sensitivity of diheteromeric and triheteromeric NMDARs. Diheteromeric receptors contained either two wild-type (wt) subunits or two mutated subunits. Triheteromeric receptors are either composed of one wt GluN2A subunit and one mutant GluN2A subunit (A and C), or of one wt GluN2B subunit and one mutant GluN2A subunit (B and D). Subunit composition is color-coded as indicated. For triheteromeric receptors values of  $IC_{50}$  and maximal inhibition are, respectively:  $17 \pm 1$  nM,  $71 \pm 1\%$  ( $n = 8$ , GluN1/GluN2A-P79R/GluN2Awt);  $251 \pm 105$  nM,  $75 \pm 8\%$  ( $n = 7$ , GluN1/GluN2A-P79R/GluN2Bwt);  $18.6 \pm 7.4$  nM,  $73 \pm 9\%$  ( $n = 8$ , GluN1/GluN2Awt/GluN2Bwt);  $2.8 \pm 1$  nM,  $89 \pm 4\%$  ( $n = 9$ , GluN1/GluN2A-R370W/GluN2Awt);  $1.3 \pm 0.1$  nM,  $66 \pm 3\%$  ( $n = 5$ , GluN1/GluN2A-R370W/GluN2Bwt). For diheteromeric receptors, values are  $461 \pm 29$  nM,  $100\%$  ( $n = 7$ , GluN1/GluN2B) and see Table 1. E. Zinc inhibition recordings from rat hippocampal cultured neurons transfected with wt or mutant GluN2A subunits. Zinc was applied at 20 nM (P79R mutant) or 2 nM (R370W). Each trace is an average of 5–10 individual current traces. \*\*\*,  $p = 0.00006$  (P79R,  $n = 7$ ),  $p = 0.0003$  (R370W,  $n = 6$ ), Student's *t*-test.

### 3.3. Mutations GluN2A-P79R and GluN2A-R370W alter zinc sensitivity

A hallmark of NMDARs is their ability to be modulated by an array of small extracellular ligands, either synthetic or endogenous, acting as subunit-specific allosteric modulators (Paoletti et al., 2013). Among them, zinc ions have triggered particular interest since they are enriched and released at many glutamatergic synapses (Paoletti et al., 2009) and exert potent inhibition of NMDARs by selectively binding to a site in the GluN2A NTD (Hansen et al., 2010; Vergnano et al., 2014). Because our selected mutations target this domain, we assessed zinc sensitivity of each mutant receptor by performing full zinc inhibitory dose-response curve using zinc-buffered solutions. Two mutant receptors out of the seven tested displayed clear phenotypes (Fig. 2A–B, Table 1). P79R mutant receptors displayed decreased zinc sensitivity reflected as an increase in zinc  $IC_{50}$  (44 nM vs 12.7 nM for wt receptors) and a decreased level of maximal inhibition (48% vs 77%). Conversely, R370W receptors displayed greatly enhanced zinc sensitivity mostly reflected by a >10-fold decrease in zinc  $IC_{50}$  (0.87 nM vs

12.7 nM).

To gain further insights into the effects of the mutations on the zinc-receptor interaction, we performed fast zinc concentration jumps on transfected HEK cells and measured current relaxations upon zinc washout (i.e. zinc dissociation kinetics). Compared to wt receptors, off-relaxations were faster for P79R receptors but slower for R370W receptors ( $\tau_{off} = 1.0 \pm 0.2$  s [ $n = 8$ ] and  $5.2 \pm 1.3$  s [ $n = 11$ ], respectively, vs  $1.6 \pm 0.3$  s [ $n = 10$ ] for wt; Fig. 2C), in good agreement with the respective decrease and increase in zinc sensitivity observed at steady-state conditions. These results indicate that the shift in zinc affinity ( $IC_{50}$ ) induced by the mutations are attributable, at least in part, to a difference in residency time of zinc on its GluN2A NTD site.

Inhibition of GluN2A NMDARs by zinc is strongly pH-dependent, such that zinc sensitivity increases with increased proton concentrations (and vice-versa) (Choi and Lipton, 1999; Gielen et al., 2008; Low et al., 2000). Accordingly, we next investigated the pH sensitivity of all seven mutant receptors including GluN2A-P79R and GluN2A-R370W. Compared to wt receptors, no major change in pH sensitivity was observed for any of the mutants ( $\Delta pH_{IC_{50}} \leq 0.2$  pH

**Table 1**  
Effects of GluN2A mutations on NMDAR activation and pharmacological properties.

GluN2A mutants	Relative $\tau_{on}$ MK-801	Glutamate		Glycine		Zinc inhibition			H <sup>+</sup> inhibition	
		EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	$n_H$	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	$n_H$	IC <sub>50</sub> (nM)	Max. Inhib. (%)	$n_H$	pH IC <sub>50</sub>	$n_H$
Wild type	1 $\pm$ 0.2 (25)	4.3 $\pm$ 0.8 (12)	1.4	1.5 $\pm$ 0.3 (24)	1.5	12.7 $\pm$ 3 (34)	78 $\pm$ 4%	0.93	6.9 $\pm$ 0.05 (13)	1.7
P79R	1.2 $\pm$ 0.2 (13)	4.2 $\pm$ 0.5 (3)	1.4	1.3 $\pm$ 0.3 (8)	1.2	44.0 $\pm$ 7.3 (6)	48 $\pm$ 7%	0.7	7.1 $\pm$ 0.1 (7)	1.6
F183I	0.97 $\pm$ 0.2 (5)	3.4 $\pm$ 0.1 (4)	1.3	1.3 $\pm$ 0.2 (4)	1.6	10.8 $\pm$ 3.2 (5)	72 $\pm$ 4%	0.98	6.9 $\pm$ 0.009 (2)	1.7
I184S	1.1 $\pm$ 0.2 (3)	3.3 $\pm$ 0.3 (3)	1.3	1.4 $\pm$ 0.1 (3)	1.5	9.6 $\pm$ 2.2 (5)	81 $\pm$ 2%	0.94	6.9 $\pm$ 0.01 (3)	1.7
A243V	1.0 $\pm$ 0.1 (4)	4.8 $\pm$ 0.3 (3)	1.3	1.6 $\pm$ 0.1 (3)	1.5	16.0 $\pm$ 4.3 (8)	70 $\pm$ 4%	0.88	6.9 $\pm$ 0.04 (3)	1.5
A290V	1.0 $\pm$ 0.2 (3)	4.0 $\pm$ 1.1 (3)	1.4	1.6 $\pm$ 0.1 (4)	1.5	12.4 $\pm$ 1.9 (4)	72 $\pm$ 2%	0.94	7.0 $\pm$ 0.05 (6)	1.7
G295S	0.91 $\pm$ 0.2 (5)	4.0 $\pm$ 0.4 (4)	1.4	1.6 $\pm$ 0.01 (4)	1.6	14.6 $\pm$ 3.7 (5)	77 $\pm$ 4%	0.97	6.9 $\pm$ 0.02 (3)	1.7
R370W	1.0 $\pm$ 0.03 (5)	5.0 $\pm$ 0.2 (3)	1.6	2.2 $\pm$ 0.1 (5)	1.6	0.87 $\pm$ 0.2 (10)	83 $\pm$ 4%	0.86	7.0 $\pm$ 0.01 (3)	1.8

Values: mean  $\pm$  SD (number of recorded cells).

unit; Fig. 2D). The largest change was observed for GluN2A-P79R receptors which, surprisingly, showed enhanced proton sensitivity despite their decreased zinc sensitivity. To our knowledge, this absence of correlation between proton and zinc sensitivities is unprecedented and points to a unique and specific role of residue GluN2A-P79 in controlling intersubunit allosteric signaling (see Discussion).

#### 3.4. Impact of mutation copy number on receptor function

In vivo, NMDARs exist as multiple subtypes that differ in their subunit composition, being either diheteromeric (two identical GluN2 subunits) or triheteromeric (two distinct GluN2 subunits) (Paoletti et al., 2013). Since all clinical *GRIN2A* mutations identified to date are heterozygous (Burnashev and Szepietowski, 2015), mixtures of NMDAR populations are likely to co-exist in patients carrying the disease-causing mutation. Therefore, we aimed at investigating the properties of triheteromeric NMDARs, containing a single copy of the mutated GluN2A subunits combined with either a wt GluN2A subunit or a wt GluN2B subunit (GluN1/GluN2Awt/GluN2Amutant and GluN1/GluN2Amutant/GluN2Bwt receptors, respectively). This later subunit was chosen because triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B receptors constitute one of the most abundant NMDAR subtypes in the forebrain (Paoletti et al., 2013).

To selectively express triheteromeric NMDARs at the surface of *Xenopus* oocytes, we employed the methodology recently developed in our laboratory based on ectopic retention signals (Stroebel et al., 2014). We first verified that diheteromeric receptors containing two copies of the GluN2 subunit with the transplanted retention signals were properly retained in the ER (see Methods). In contrast, for triheteromeric receptors, large (>0.5  $\mu$ A) NMDAR-mediated currents were routinely obtained. For both GluN2A-P79R and GluN2A-R370W mutations, triheteromeric GluN1/GluN2Awt/GluN2Amutant receptors displayed zinc sensitivity intermediate between that of wt or doubly-mutated diheteromeric receptors (Fig. 3A,C). Similarly, a single mutant GluN2A-R370W subunit, when paired with a wt GluN2B subunit that harbors a low  $\mu$ M zinc binding site in its NTD (Karakas et al., 2009; Rachline et al., 2005), confers unique zinc sensitivity, distinct from both parent diheteromeric GluN1/GluN2 receptors and from wt triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B receptors (Fig. 3D). For GluN2A-P79R, the reduced zinc sensitivity conferred by the mutant GluN2A subunit was such that the zinc sensitivity of receptors containing one mutant GluN2A subunit and one wt GluN2B subunit was almost indistinguishable of that of receptors composed of two identical mutant GluN2A subunits (Fig. 3B). Altogether, these results demonstrate that a single copy of the GluN2A mutation is sufficient to alter the receptor's zinc sensitivity irrespective of the pairing GluN2 subunit. We thus anticipate that the majority of GluN2A-containing NMDARs in patients will display aberrant

modulation by extracellular zinc.

#### 3.5. Disrupted zinc sensitivity of mutant receptors expressed in neurons

The above results show that mutant GluN2A-P79R and GluN2A-R370W receptors display altered interaction with the allosteric inhibitor zinc in recombinant expression systems. To verify that this is also the case in a more native environment, we overexpressed wt or mutated GluN2A subunits in rat hippocampal cultured neurons and assessed sensitivity of NMDAR-mediated responses to zinc applications. Neurons overexpressing GluN2A-P79R subunits showed decreased inhibition of NMDAR-mediated currents to 20 nM zinc compared to neurons overexpressing wt GluN2A subunits (4  $\pm$  11% [n = 8] vs 16  $\pm$  7% inhibition [n = 7]; Fig. 3E). In contrast, neurons transfected with GluN2A-R370W subunits displayed marked zinc inhibition at a very low zinc concentration (2 nM) while only modest inhibition was observed for wt GluN2A overexpressing neurons (37  $\pm$  8% inhibition [n = 6] vs 16  $\pm$  5% [n = 10]; Fig. 3E). Overall, these results support our findings on heterologously expressed NMDARs and confirm that the altered zinc sensitivity of GluN2A-P79R and GluN2A-R370W receptors is a salient feature of these receptors encoding disease-causing mutations.

## 4. Discussion

By studying recombinant NMDARs expressed in heterologous systems and primary cultured neurons, we reveal that disease-linked mutations targeting the GluN2A N-terminal region produce distinct sets of receptor alterations that manifest either as impaired receptor expression or altered modulation by extracellular zinc (or a combination of both). These findings have implications both for NMDAR physiology and the underlying pathogenic mechanisms in patients with *GRIN2A* mutations.

Clinically-relevant *GRIN2A* mutations are spread across all NMDAR domains hinting to diverse impacts on receptor structure, abundance, localization and function. In agreement, TMD missense mutations have been shown to affect channel permeation (Endele et al., 2010), while ABD and ABD-TMD linker mutations specifically alter channel gating kinetics (Carvill et al., 2013; Lesca et al., 2013; Yuan et al., 2014). We now show that GluN2A mutations targeting the N-terminal region can also affect receptor function, yet through alternative mechanisms. We find that the two cysteine mutations C231Y and C436R, each leads to a drastic reduction in receptor expression. *In vivo*, this likely results in decreased receptor number and deficient NMDAR signaling, an effect also expected for nonsense, deletion and frameshift *GRIN2A* mutations identified in several patients (Burnashev and Szepietowski, 2015; Yuan et al., 2015). C231 sits within a buried hydrophobic cavity of the NTD lower lobe which likely does not tolerate a large hydroxyl-

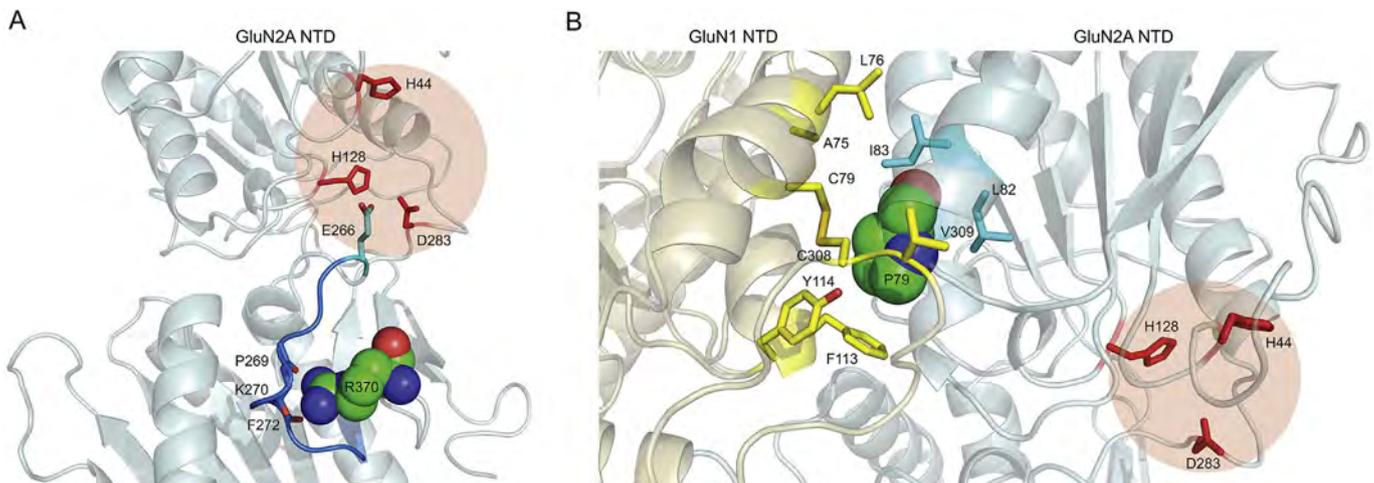
containing tyrosine residue. Therefore, we suggest that the C231Y mutation results in GluN2A misfolding and degradation. The GluN2A-C436R subunit is likely to share a similar destiny. By engaging in a disulfide bond with residue C456, C436 structures a large ABD loop specific to NMDARs (i.e. absent in other iGluRs). Our results now reveal that this loop has an essential role in GluN2A biogenesis, likely because of its extensive interactions with neighboring domains (Karakas and Furukawa, 2014; Lee et al., 2014; Regalado et al., 2001).

Besides subunit expression, our results unveil that zinc modulation is another conspicuous NMDAR property that is profoundly modified by specific sets of disease-linked mutations. Two mutations were found to alter GluN2A-mediated high-affinity zinc inhibition: P79R and R370W. While P79R diminishes zinc inhibition through a combined decrease in zinc 'efficacy' (i.e. decreased maximal level of inhibition) and 'affinity' (i.e. increased  $IC_{50}$ ), R370W enhances zinc inhibition mostly through an 'affinity' effect. Both residues locate away from the predicted zinc binding site in the GluN2A NTD interlobe cleft (Fig. 4; Hansen et al., 2010; Paoletti, 2011), and likely mediate their effects on zinc sensitivity through distinct mechanisms. According to the GluN1/GluN2B NTD structure (Karakas et al., 2011), GluN2A-R370 (which is conserved in GluN2B) interacts with a lower lobe loop which contains a residue critically involved in zinc binding (GluN2A-E266) (Fig. 4A; Fayyazuddin et al., 2000). Substitution of the arginine by a bulky hydrophobic tryptophan may favor a loop conformation which fortuitously results in enhanced zinc coordination. Such an effect would account for the observed slowing down of the zinc dissociation kinetics (Fig. 2C). We propose that the mutation P79R acts differently. The homologous proline in GluN2B (GluN2B-P80; conserved in all four GluN2 subunits) locates at the edge of GluN2 NTD and makes extensive hydrophobic contacts with the neighboring GluN1 NTD (Fig. 4B; Karakas et al., 2011). Its replacement by a positively charged arginine likely disrupts this hydrophobic cluster. We thus hypothesize that in GluN2A receptors the P79R mutation affects zinc (and proton) sensitivity indirectly, at least in part, by altering NTD dimerization. We have no clear explanation for why this mutation, which decreases zinc sensitivity but enhances proton sensitivity, deviates from the rule that positively correlates proton and zinc sensitivity in GluN2A receptors (Choi and Lipton, 1999; Gielen et al., 2008;

Low et al., 2000). We speculate that this unexpected result finds its origin both in the location of P79 at a specific subunit-subunit interface and in the nature of the substitution (a positively-charged arginine). The two factors may result in a reduced zinc-NTD interaction together with a 'distorted' GluN1-GluN2A NTD dimer configuration stabilizing a (proton favorable) inhibited state of the receptor. Whatever the scenario, our data further strengthen the importance of the subunit-subunit interfaces in controlling allosteric signaling in NMDARs, as hinted by previous structure-function studies (Gielen et al., 2008; Karakas et al., 2011; Low et al., 2003; Zhu et al., 2013, 2014).

The fact that two mutations (P79R and R370W) with opposite effects *in vitro* (decreased and increased zinc inhibition, respectively) lead to overlapping clinical symptoms (Rolandic epilepsy) is puzzling. The lack of any obvious receptor abnormalities for a number of disease-linked mutations (F183I, I184S, A243V, A290V and G295S) is another apparent paradox. Several reasons make the genotype-phenotype correlation difficult. Although the causative role of certain *GRIN2A* mutations in the disease is well established, others may act as susceptibility risk factors rather than monogenic traits (Burnashev and Szepietowski, 2015; Yuan et al., 2015). Cell autonomous effects are another confounding factor. Overactivation of NMDARs in principal cells may lead to network hyperexcitability and promotes pro-epileptic effects, but a similar outcome is expected from too little NMDAR activity in inhibitory interneurons (Belforte et al., 2010). Finally, mutations may result in abnormal coupling of the receptors to downstream intracellular cascades (Hardingham and Bading, 2010), effects that escape electrophysiological measurements. We note that an apparent discrepancy between overlapping clinical phenotypes and genetic alterations of opposite sign (loss- and gain-of-function mutations) has already been described for *SCN1A*, another epilepsy gene (Marini et al., 2011). Obviously, much work remains to fully understand the circuit level pathology of *GRIN2A* mutations.

By showing specific impairments in the zinc sensitivity of NMDARs harboring clinically-relevant mutations, our results support the idea that impaired synaptic zinc homeostasis contributes to human pathology. Zinc concentrates at many excitatory synapses and, in animal models, can modulate synaptic plasticity, memory formation and seizure susceptibility (Paoletti et al., 2009; Sensi



**Fig. 4. Structural interactions of residues GluN2A-P79 and GluN2A-R370.** Homology model of the GluN1/GluN2A NTD dimer based on the GluN1/GluN2B NTD crystal structure (Lee et al., 2014). The GluN1 and GluN2A NTDs are represented in light yellow and light blue, respectively. The location of the putative high-affinity GluN2A-specific zinc binding site is colored red with residues thought to directly coordinating zinc highlighted. A. Residue GluN2A-R370 makes multiple interactions with backbone carbonyls of a lower lobe loop that contains a glutamate residue (GluN2A-E266) critically involved in high-affinity zinc inhibition. B. Residue GluN2A-P79 is buried at a hydrophobic interface between GluN1 and GluN2A NTD upper lobes where it engages multiple Van der Waals interactions with neighboring residues.

et al., 2011; Sindreu and Storm, 2011). In humans, impaired zinc-glycine receptor interaction may cause hyperekplexia (Zhou et al., 2013), while loss of the synaptic zinc transporter ZnT3 increases the risk of febrile seizures (Hildebrand et al., 2015). The emerging concept that synaptic zinc is an important neuromodulator and contributing factor in human brain physiopathology opens interesting possibilities for novel therapeutic interventions.

### Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

### Acknowledgments

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale ('Equipe FRM' grant DEQ2000326520 to PP), the French government ('Investissements d'Avenir' ANR-10-LABX-54 MEMO LIFE and ANR-11-IDEX-0001-02 PSL\* Research University), and by the University Pierre-et-Marie-Curie (UPMC Paris 6; fellowship to BS). The authors declare no competing financial interests. We thank Laurine Bonet for preparing cultured hippocampal neurons.

### References

- Belforte, J.E., Zsiros, V., Sklar, E.R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., Quinlan, E.M., Nakazawa, K., 2010. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat. Neurosci.* 13, 76–83.
- Burnashev, N., Szepetowski, P., 2015. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* 20, 73–82.
- Carvill, G.L., Regan, B.M., Yendle, S.C., O'Roak, B.J., Lozovaya, N., Bruneau, N., Burnashev, N., Khan, A., Cook, J., Geraghty, E., Sadleir, L.G., Turner, S.J., Tsai, M.H., Webster, R., Ouvrier, R., Damiano, J.A., Berkovic, S.F., Shendure, J., Hildebrand, M.S., Szepetowski, P., Scheffer, I.E., Mefford, H.C., 2013. GRIN2A mutations cause epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Nat. Genet.* 45, 1073–1076.
- Choi, Y.B., Lipton, S.A., 1999. Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn<sup>2+</sup> inhibition of the NMDA receptor. *Neuron* 23, 171–180.
- Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., Milh, M., Kortum, F., Fritsch, A., Pientka, F.K., Hellenbroich, Y., Kalscheuer, V.M., Kohlhasse, J., Moog, U., Rappold, G., Rauch, A., Ropers, H.H., von Spiczak, S., Tonnie, H., Villeneuve, N., Villard, L., Zabel, B., Zenker, M., Laube, B., Reis, A., Wiczorek, D., Van Maldergem, L., Kutsche, K., 2010. Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat. Genet.* 42, 1021–1026.
- Farina, A.N., Blain, K.Y., Maruo, T., Kwiatkowski, W., Choe, S., Nakagawa, T., 2011. Separation of domain contacts is required for heterotetrameric assembly of functional NMDA receptors. *J. Neurosci.* 31, 3565–3579.
- Fayyazuddin, A., Villarreal, A., Le Goff, A., Lerma, J., Neyton, J., 2000. Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn<sup>2+</sup> binding to NMDA receptors. *Neuron* 25, 683–694.
- Gielen, M., Le Goff, A., Stroebel, D., Johnson, J.W., Neyton, J., Paoletti, P., 2008. Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* 57, 80–93.
- Gielen, M., Siegler Retchless, B., Mony, L., Johnson, J.W., Paoletti, P., 2009. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459, 703–707.
- Glasgow, N.G., Siegler Retchless, B., Johnson, J.W., 2015. Molecular bases of NMDA receptor subtype-dependent properties. *J. Physiol.* 593, 83–95.
- Hansen, K.B., Furukawa, H., Traynelis, S.F., 2010. Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. *Mol. Pharmacol.* 78, 535–549.
- Hardingham, G.E., Bading, H., 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 682–696.
- Herguedas, B., Krieger, J., Greger, I.H., 2013. Receptor heteromeric assembly-how it works and why it matters: the case of ionotropic glutamate receptors. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 117, 361–386.
- Hildebrand, M.S., Phillips, A.M., Mullen, S.A., Adlard, P.A., Hardies, K., Damiano, J.A., Wimmer, V., Bellows, S.T., McMahon, J.M., Burgess, R., Hendrickx, R., Weckhuysen, S., Suls, A., De Jonghe, P., Scheffer, I.E., Petrou, S., Berkovic, S.F., Reid, C.A., 2015. Loss of synaptic Zn(2+) transporter function increases risk of febrile seizures. *Sci. Rep.* 5, 17816.
- Kalappa, B.I., Anderson, C.T., Goldberg, J.M., Lippard, S.J., Tzounopoulos, T., 2015. AMPA receptor inhibition by synaptically released zinc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15749–15754.
- Karakas, E., Furukawa, H., 2014. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* 344, 992–997.
- Karakas, E., Simorowski, N., Furukawa, H., 2009. Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *EMBO J.* 28, 3910–3920.
- Karakas, E., Simorowski, N., Furukawa, H., 2011. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475, 249–253.
- Lee, C.H., Lu, W., Michel, J.C., Goehring, A., Du, J., Song, X., Gouaux, E., 2014. NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature* 511, 191–197.
- Lemke, J.R., Lal, D., Reinthaler, E.M., Steiner, I., Nothnagel, M., Alber, M., Geider, K., Laube, B., Schwake, M., Finsterwalder, K., Franke, A., Schilhabel, M., Jahn, J.A., Muhle, H., Boor, R., Van Paesschen, W., Caraballo, R., Fejerman, N., Weckhuysen, S., De Jonghe, P., Larsen, J., Moller, R.S., Hjalgrim, H., Addis, L., Tang, S., Hughes, E., Pal, D.K., Veri, K., Vaher, U., Talvik, T., Dimova, P., Guerrero Lopez, R., Serratos, J.M., Linnankivi, T., Lehesjoki, A.E., Ruf, S., Wolff, M., Buerki, S., Wohlrab, G., Kroell, J., Datta, A.N., Fiedler, B., Kurlemann, G., Kluger, G., Hahn, A., Haberlandt, D.E., Kutzer, C., Sperner, J., Becker, F., Weber, Y.G., Feucht, M., Steinbock, H., Neophythou, B., Ronen, G.M., Gruber-Sedlmayr, U., Geldner, J., Harvey, R.J., Hoffmann, P., Herms, S., Altmüller, J., Toliat, M.R., Thiele, H., Nurnberg, P., Wilhelm, C., Stephani, U., Helbig, I., Lerche, H., Zimprich, F., Neubauer, B.A., Biskup, S., von Spiczak, S., 2013. Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nat. Genet.* 45, 1067–1072.
- Lesca, G., Rudolf, G., Bruneau, N., Lozovaya, N., Labalme, A., Boutry-Kryza, N., Salmi, M., Tsitsadze, T., Addis, L., Motte, J., Wright, S., Tsitsadze, V., Michel, A., Doummar, D., Lascelles, K., Strug, L., Waters, P., de Bellescize, J., Vrielynk, P., de Saint Martin, A., Ville, D., Rylvlin, P., Arzimanoglou, A., Hirsch, E., Vincent, A., Pal, D., Burnashev, N., Sanlaville, D., Szepetowski, P., 2013. GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. *Nat. Genet.* 45, 1061–1066.
- Low, C.M., Lyuboslavsky, P., French, A., Le, P., Wyatte, K., Thiel, W.H., Marchan, E.M., Igarashi, K., Kashiwagi, K., Gernert, K., Williams, K., Traynelis, S.F., Zheng, F., 2003. Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. *Mol. Pharmacol.* 63, 1212–1222.
- Low, C.M., Zheng, F., Lyuboslavsky, P., 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.
- Marini, C., Scheffer, I.E., Nabbout, R., Suls, A., De Jonghe, P., Zara, F., Guerrini, R., 2011. The genetics of Dravet syndrome. *Epilepsia* 52 (Suppl. 2), 24–29.
- Mony, L., Zhu, S., Carvalho, S., Paoletti, P., 2011a. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J.* 30, 3134–3146.
- Paoletti, P., 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1351–1365.
- Paoletti, P., Ascher, P., Neyton, J., 1997. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J. Neurosci.* 17, 5711–5725.
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400.
- Paoletti, P., Vergnano, A.M., Barbour, B., Casado, M., 2009. Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158, 126–136.
- Rachline, J., Perin-Dureau, F., Le Goff, A., Neyton, J., Paoletti, P., 2005. The micro-molar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J. Neurosci.* 25, 308–317.
- Regalado, M.P., Villarreal, A., Lerma, J., 2001. Intersubunit cooperativity in the NMDA receptor. *Neuron* 32, 1085–1096.
- Rosenmund, C., Clements, J.D., Westbrook, G.L., 1993. Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse. *Science* 262, 754–757.
- Sensi, S.L., Paoletti, P., Koh, J.Y., Aizenman, E., Bush, A.I., Hershinkel, M., 2011. The neurophysiology and pathology of brain zinc. *J. Neurosci.* 31, 16076–16085.
- Sindreu, C., Storm, D.R., 2011. Modulation of neuronal signal transduction and memory formation by synaptic zinc. *Front. Behav. Neurosci.* 5, 68.
- Soto, D., Altafaj, X., Sindreu, C., Bayes, A., 2014. Glutamate receptor mutations in psychiatric and neurodevelopmental disorders. *Commun. Integr. Biol.* 7, e27887.
- Stroebel, D., Carvalho, S., Grand, T., Zhu, S., Paoletti, P., 2014. Controlling NMDA receptor subunit composition using ectopic retention signals. *J. Neurosci.* 34, 16630–16636.
- Vergnano, A.M., Rebola, N., Savtchenko, L.P., Pinheiro, P.S., Casado, M., Kieffer, B.L., Rusakov, D.A., Mulle, C., Paoletti, P., 2014. Zinc dynamics and action at excitatory synapses. *Neuron* 82, 1101–1114.
- Vogt, K., Mellor, J., Tong, G., Nicoll, R., 2000. The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 26, 187–196.
- Wyllie, D.J., Livesey, M.R., Hardingham, G.E., 2013. Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology* 74, 4–17.
- Yuan, H., Hansen, K.B., Vance, K.M., Ogden, K.K., Traynelis, S.F., 2009. Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *J. Neurosci.* 29, 12045–12058.
- Yuan, H., Hansen, K.B., Zhang, J., Pierson, T.M., Markello, T.C., Fajardo, K.V., Holloman, C.M., Golas, G., Adams, D.R., Boerkoel, C.F., Gahl, W.A., Traynelis, S.F., 2014. Functional analysis of a de novo GRIN2A missense mutation associated with early-onset epileptic encephalopathy. *Nat. Commun.* 5, 3251.
- Yuan, H., Low, C.M., Moody, O.A., Jenkins, A., Traynelis, S.F., 2015. Ionotropic GABA and glutamate receptor mutations and human neurologic diseases. *Mol. Pharmacol.* 88, 203–217.
- Zhou, N., Wang, C.H., Zhang, S., Wu, D.C., 2013. The GLRA1 missense mutation

W170S associates lack of Zn<sup>2+</sup> potentiation with human hyperekplexia. *J. Neurosci.* 33, 17675–17681.

Zhu, S., Riou, M., Yao, C.A., Carvalho, S., Rodriguez, P.C., Bensaude, O., Paoletti, P., Ye, S., 2014. Genetically encoding a light switch in an ionotropic glutamate receptor reveals subunit-specific interfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111,

6081–6086.

Zhu, S., Stroebel, D., Yao, C.A., Taly, A., Paoletti, P., 2013. Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 477–485.

**Vu, le Président du jury,**

Sylvie PIESARD

**Vu, le Directeur de thèse,**

François LANG

**Vu, le Directeur de l'UFR,**

---

**Nom - Prénoms : SERRAZ Benjamin**

**Titre de la thèse : « Homéostasie du zinc libre, un nouveau regard sur la physiopathologie du cerveau »**

---

**Résumé de la thèse :**

A la différence des autres métaux de transition tels que le fer ou le cuivre, le zinc existe dans notre organisme sous forme libre, non lié aux protéines. Concentré dans les vésicules synaptiques avec le glutamate, le zinc libre est apparu comme un modulateur essentiel de la transmission synaptique excitatrice. Depuis le début des années 1990, l'intérêt quant à ses effets délétères associés à des pathologies cérébrales est grandissant. Récemment, des troubles homéostatiques du zinc libre ont été impliqués dans de nombreuses conditions pathologiques. Libéré massivement dans les neurones, le zinc a été identifié comme un acteur majeur de la neurodégénérescence associée à l'épilepsie et aux troubles ischémiques. L'intérêt croissant pour le cation divalent ne s'arrête pas là. Impliqué dans la gestion de la douleur ainsi que dans des formes graves d'épilepsie familiale, le zinc a récemment été relié aux dommages du nerf optique faisant suite à des traumatismes crâniens. La chélation du cation divalent dans ce contexte a permis, pour la première fois, d'observer une survie de certains neurones de la rétine. Le zinc est également au cœur des problèmes actuels de santé publique. Avec le vieillissement de la population, l'incidence de pathologies tel que la maladie d'Alzheimer n'a jamais été aussi importante. Face au manque d'efficacité des thérapies actuelles, l'identification de nouvelles cibles médicamenteuses est indispensable. Le zinc a récemment été mis en évidence comme participant à l'établissement de la plaque amyloïde. Comprendre le rôle du zinc dans la transmission pathologique et les dommages cellulaires associés est donc un enjeu majeur qui permettra peut-être, le traitement ou la prévention des dommages causés par le zinc, un cation divalent encore aujourd'hui méconnu.

---

**MOTS CLÉS :** *ZINC, SYSTEME NERVEUX CENTRAL, EXCITOTOXICITE, ISCHEMIE, MALADIE D'ALZHEIMER, EPILEPSIE*

---

**JURY**

**PRÉSIDENT : Mme. Sylvie PIESARD**

Faculté de Pharmacie de Nantes

**ASSESSEURS : M. Samuel BULTEAU, Chef de clinique au CHU de Nantes**

M. François LANG, Professeur de pharmacologie

M. Clément PREVOST-SOLIÉ, Diplômé de l'École Normale Supérieure, doctorant en neuroscience

---

**Adresse de l'auteur : 2 place Iéna, 44150, ANCENIS**