

Synapses artificielles et stress oxydant

Christian Amatore, Stéphane Arbault, Manon Guille et Frédéric Lemaître

Résumé

La production de radicaux libres par les êtres vivants aérobiques a certainement une très mauvaise presse, car on ne s'attache généralement qu'à leurs effets délétères. Or les mécanismes de stress oxydant sont une composante essentielle de nos défenses immunitaires aussi bien que de plusieurs grands mécanismes de régulation. C'est en particulier vrai pour les espèces primaires du stress oxydant que sont les produits de l'anion superoxyde et du monoxyde d'azote. Cependant, l'étude directe de la production de ces espèces primaires et de leurs premiers sous-produits était impossible jusqu'à l'introduction dans cette problématique de la méthode de « synapse artificielle » par notre groupe. Cet article décrit tout d'abord le principe de la méthode en justifiant la performance analytique, puis illustre l'application à l'étude de deux grands mécanismes impliquant le stress oxydant : la phagocytose, qui nous procure un moyen non spécifique de lutter contre les microbes grâce à nos macrophages, et le couplage neurovasculaire cérébral, qui permet à nos neurones de réguler leur apport sanguin en fonction de leur activité et dont l'existence sous-tend l'imagerie actuelle du fonctionnement du cerveau.

Mots-clés

Amperométrie, anion superoxyde, électrochimie, microélectrodes, monoxyde d'azote, phagocytose, stress oxydant, vasodilatation cérébrale.

Abstract

Artificial synapses and oxidative stress

Free radical production in aerobic living beings is generally perceived only through a negative viewpoint since one focuses mostly on their deleterious effects. Yet, oxidative stress is an essential mechanism underlying many important functions in aerobic organisms including non specific immune defenses or many regulations. This is mostly true for the primary species of oxidative stress, namely the superoxide anion and nitric oxide. However, any direct investigation of the production of these primary species was hampered up to the introduction by our group of the "artificial synapse" in this context. This article describes in first instance the principle of the method and justifies its high analytical performance. It focuses then onto its application to the investigation of two central mechanisms relying on oxidative stress: phagocytosis, active in macrophages, which provides non-specific means of fighting against microbial infections, and neurovascular coupling in brain, which allows our neurons to regulate their blood supply as a function of their activity and which is at the very basis of the current imaging techniques of brain activity.

Keywords

Amperometry, superoxide anion, electrochemistry, microelectrodes, nitric oxide, phagocytosis, oxidative stress, vasodilatation.

Bref historique

Depuis leur invention au début des années 1980, les microélectrodes (ou ultramicroélectrodes) ont fait l'objet de nombreuses applications. Des réseaux de capteurs à l'électrochimie rapide, en passant par la microscopie électrochimique, leur utilisation a permis de repousser les limites de l'électrochimie inhérentes aux électrodes millimétriques. Le développement de nouveaux capteurs en chimie (bio)analytique en est l'une des conséquences. En particulier, leur utilisation pour la détection de l'émission d'espèces par des organismes cellulaires individuels ou au sein d'un tissu vivant représente une contribution importante et originale en biologie. Au sein de cet article, nous présenterons certaines de ces applications.

Principe de détection et propriétés des microélectrodes

Les microélectrodes (*figure 1*), dont une dimension au moins est micrométrique ou inférieure, constituent des capteurs de variations localisées de concentration et permettent

la détection de quantités infinitésimales de molécules électroactives relâchées par une cellule unique ou un tissu vivant [1]. Elles autorisent ainsi l'observation de processus fondamentaux de la biologie. Le premier avantage évident des microélectrodes est intrinsèquement lié à leur taille : il s'agit de la résolution spatiale qu'elles offrent car une taille donnée permet d'explorer des changements de concentration dans un domaine de taille comparable. **Une microélectrode de dimensions micrométriques peut donc être aisément placée au voisinage d'une cellule vivante** (dont le diamètre est de quelques microns) au moyen de micromanipulateurs sous le champ du microscope, et renseigner ainsi sur les modifications locales de la concentration des espèces détectées avec une résolution micrométrique.

Néanmoins, limiter la définition d'une microélectrode à sa taille n'est pas correct. En effet, les microélectrodes possèdent des propriétés électrochimiques spécifiques qui ne découlent qu'indirectement de leurs dimensions [2]. Ainsi, une expérience d'électrochimie consiste à perturber électriquement une solution *via* une électrode et à analyser le courant passant à travers cette électrode en fonction du temps pour un type de potentiel imposé (fréquence, amplitude,

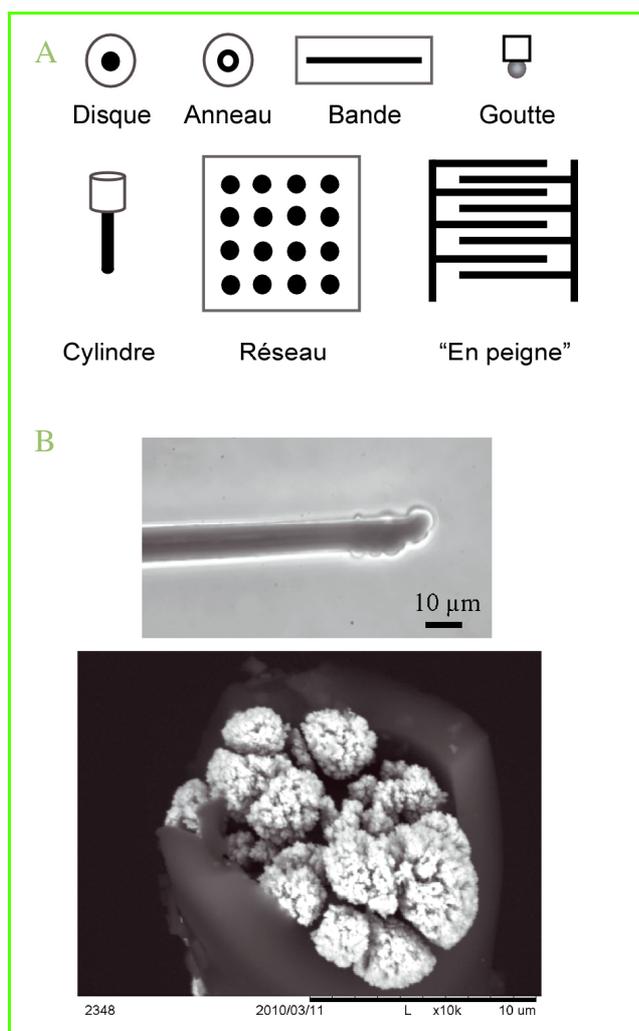


Figure 1 - A) Différentes configurations possibles de microélectrodes. B) Images d'une microélectrode à fibre de carbone platinée. Haut : réalisée par microscopie optique à contraste de phase. Bas : réalisée par microscopie à balayage électronique.

forme...) ou, à l'inverse, à interpréter l'évolution du potentiel quand le courant est imposé. Le courant détecté a deux origines. Le *courant capacitif* n'implique aucun échange d'électron ni aucune transformation chimique dans le milieu, mais provient uniquement d'une structuration électrostatique de l'interface électrode/solution : appauvrissement ou enrichissement ionique d'un type d'ion spécifique en réponse à la densité de charge imposée à l'électrode. Le *courant faradique*, au contraire, correspond à une réaction redox. Il est proportionnel au flux d'espèces consommées par oxydation ou réduction et mesure un flux d'électrons à travers l'interface électrochimique. Par ailleurs, la solution électrolysée est un milieu ionique résistif, dont la résistance R_{sol} est fonction de la forme et de la taille de l'électrode puisque celle-ci limite les tubes du champ électrocinétique. Comme dans tout conducteur ohmique, le passage du courant capacitif et/ou faradique s'accompagne donc d'une chute de potentiel qui dépend du courant suivant la loi d'Ohm. Le potentiel de l'électrode n'est ainsi connu qu'à cette chute de potentiel près, la *chute ohmique*, par rapport au potentiel de la solution. Celle-ci est égale à $(i_C + i_F) \times R_{sol}$, où i_C et i_F sont respectivement les courants capacitif et faradique. La capacité de l'interface électrode/solution, C_{el} , introduit elle aussi deux effets. D'une part, elle introduit du bruit dans la mesure

électrochimique (bruit proportionnel à la capacité C_{el}). D'autre part, elle constitue un filtre de constante de temps τ qui limite la vitesse des variations de potentiel que l'on peut imposer à l'électrode : $\tau = R_{sol} \times C_{el}$. La capacité d'une électrode constituée par un disque de rayon r_0 est proportionnelle à sa surface, c'est-à-dire à $(r_0)^2$. La résistance de la solution, R_{sol} , est inversement proportionnelle au rayon r_0 de l'électrode dès que celle-ci est suffisamment petite. Ainsi, la constante de temps dépend de r_0 . De fait, **plus l'électrode est petite, plus des signaux rapides pourront lui être appliqués**. Les microélectrodes sont donc des électrodes de choix pour l'étude de phénomènes rapides, jusqu'à la gamme de temps des nanosecondes [3-4].

De plus, l'expression du courant dépend du type d'électrode et de la gamme de temps considérée et est liée à la taille de la couche de diffusion, zone dans laquelle les concentrations en espèces électroactives diffèrent de celles au sein de la solution. En régime transitoire ($t \ll r_0^2/D$, avec D le coefficient de diffusion des espèces transformées à l'électrode), l'épaisseur de la couche de diffusion est suffisamment faible devant le rayon de l'électrode pour que sa courbure soit imperceptible (diffusion plane). En régime stationnaire ($t \gg r_0^2/D$), l'épaisseur de la couche de diffusion est très grande devant le rayon de l'électrode, le mode de diffusion devient alors convergent et stationnaire : il est dit sphérique. Les microélectrodes utilisées dans ce travail sont des électrodes assimilables à des disques dont l'expression du courant stationnaire est : $i = 4nFD C_0 r_0$, où n est le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday, et C_0 la concentration des espèces dans le sein de la solution à une distance $r \gg r_0$. L'expression du courant connue, et R_{sol} étant inversement proportionnelle à r_0 , il est possible de déduire la variation de la chute ohmique en fonction de la taille de l'électrode. En régime transitoire, i est proportionnel à l'aire de l'interface : r_0^2 ; la chute ohmique ($i \times R_{sol}$) est alors proportionnelle à r_0 . La diminution de la taille de l'électrode s'accompagne donc d'une baisse de la chute ohmique. En régime stationnaire, i est proportionnel à r_0 : **la chute ohmique est alors indépendante de la taille de l'électrode**.

Enfin, le rapport signal faradique sur bruit est lié au rapport des courants faradique et capacitif. En régime stationnaire, il varie donc inversement avec la taille de l'électrode r_0 . **Les microélectrodes permettent ainsi la détection de très faibles courants avec un rapport signal faradique sur bruit supérieur, toutes choses égales par ailleurs, à celui obtenu en utilisant des électrodes millimétriques classiques.**

Ces propriétés électrochimiques particulières au régime stationnaire découlent du fait que la couche de diffusion et la taille de la microélectrode sont alors du même ordre de grandeur, caractéristique impossible à atteindre pour les électrodes usuelles. Cela signifie que l'électrode ne « perçoit » que ce qui se passe dans une sphère de diamètre égal à quelques fois son rayon. Cette propriété majeure est à l'origine de l'utilisation des microélectrodes comme capteurs locaux micrométriques, et en particulier du travail sur cellule unique.

Mesures ampérométriques sur cellule unique : la configuration « synapse artificielle »

La détection de l'émission de molécules par une cellule unique au moyen d'une microélectrode située à son contact

constitue une configuration baptisée « synapse artificielle » du fait de son identification marquée, du double point de vue du concept et de la fonction, avec la synapse neuronale. En effet, la transmission rapide de l'information dans les synapses du système nerveux résulte *in fine* de la propagation d'un potentiel d'action (modification du potentiel membranaire des neurones) de la cellule émettrice vers la cellule réceptrice. Les synapses « électriques » et les synapses « chimiques » permettent d'assurer cette transmission rapide de l'information. Dans le second cas, la transmission de l'information est effectuée par libération d'un petit nombre (quelques milliers à quelques millions) de molécules de neurotransmetteurs chimiques dans la fente synaptique (*i.e.* dans l'espace séparant physiquement les deux cellules nerveuses). Les neurotransmetteurs se fixent ensuite sur les récepteurs de la membrane du neurone post-synaptique, déclenchant de nombreux effets sur ce neurone qui émettra, à son tour, un potentiel d'action. La fiabilité et la spécificité de la transmission de l'information nécessitent une sensibilité de détection élevée, c'est-à-dire un grand rapport signal/bruit. Compte tenu du faible nombre de molécules émises, la Nature a résolu ce problème en opérant la libération dans un volume très faible entre les deux neurones. La concentration en neurotransmetteurs y est donc élevée pendant la transmission synaptique, en tout cas assez importante pour permettre au récepteur de la membrane du neurone post-synaptique une détection très rapide, très sensible et très sélective de l'information.

Ce phénomène biologique primordial qu'est la transmission de l'information dans la synapse chimique peut ainsi être mimé par l'électrochimiste en réalisant, dans ce but, une synapse dite « artificielle », constituée de l'ensemble cellule/espace entre la cellule et l'électrode/microélectrode. En effet, le signal faradique détecté par la microélectrode répond instantanément de manière proportionnelle aux variations de la concentration locale de molécules, à l'instar de la rapidité de reconnaissance du récepteur du neurone post-synaptique. Le rôle de la membrane du neurone émetteur de neurotransmetteurs est donc joué par celle d'une cellule unique, principalement en culture dans une boîte de Petri. Celui de la membrane du neurone récepteur et de ses récepteurs biologiques est remplacé par celui de la microélectrode dont les propriétés, comme vu précédemment, permettent une détection de flux infinitésimaux de molécules électroactives, avec un temps de réponse de l'ordre de la milliseconde et une sensibilité de l'ordre de l'attomole (10^{-18} moles). La fente synaptique elle-même sera l'espace contenu entre la cellule et la microélectrode (distance $< 0,1 \mu\text{m}$), d'un volume de l'ordre du femtolitre ($1 \mu\text{m}^3$). La concentration résultante, lorsque quelques milliers de molécules sont libérés par la cellule émettrice, peut aller du micromolaire (μM) au millimolaire (mM). La mesure électrochimique est ainsi possible dans la mesure où le champ de perception de la microélectrode recouvre le champ de diffusion des espèces électroactives émises par la cellule unique émettrice (*figure 2*).

Cette configuration permet donc une détection idéale de molécules électroactives à l'échelle d'une cellule unique en termes de : i) *sensibilité*, puisque l'on peut analyser des flux aussi faibles que 1 000 molécules/ms ; ii) *temps de réponse* : la cinétique des phénomènes biologiques détectés est observée en temps réel de manière fidèle, sans distorsion temporelle, pourvu que leurs cinétiques caractéristiques

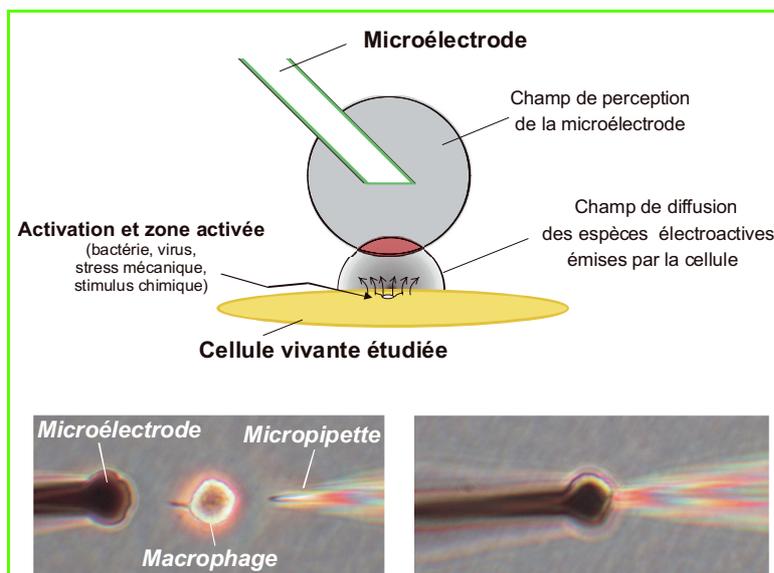


Figure 2 - Haut : principe de la synapse « artificielle ». Bas : stimulation mécanique d'un macrophage en présence d'une microélectrode (fibre de carbone platiné) au voisinage de ce dernier.

soient supérieures à la milliseconde (le temps de réponse de la microélectrode compte tenu de la diffusion extracellulaire) ; iii) *sélectivité* : celle-ci est offerte par le choix du potentiel d'oxydation adéquat et par la réalisation de mesures à différents potentiels en cas de nécessité ; iv) *résolution spatiale* : la microélectrode dont la taille est ajustable par rapport aux cellules étudiées est sensible aux variations de concentration ayant lieu dans un volume de solution égal à quelques fois son rayon ; elle permet donc une désignation de l'origine de l'émission très précise sur la cellule émettrice avec une résolution égale à sa taille. Les microélectrodes ont ainsi permis l'étude de mécanismes du vivant, notamment le « stress oxydant cellulaire », qui est présenté dans le paragraphe qui suit.

Qu'est-ce que le stress oxydant ? Nature labile des espèces mesurées

Le stress oxydant a généralement été défini comme l'ensemble des processus conduisant à la modification, la déstructuration, la dégénérescence ou à la mortalité de cellules suite à une production, par elles-mêmes ou par d'autres cellules (ex : les phagocytes), d'espèces à caractère oxydant, peroxydant, nitrant ou nitrosant [5]. Les sites d'action de ces espèces sont multiples, incluant l'ADN (à différents niveaux), les lipides membranaires, certains acides aminés des protéines, et des enzymes (*figure 3*). Les modifications de ces macromolécules sont normalement réparées par des enzymes spécialisées, ou prévenues par élimination directe des espèces nocives, grâce aux antioxydants et à des enzymes spécifiques (catalase, superoxyde dismutase ou SOD, peroxydases...). Néanmoins, lorsque ces modifications ont lieu avec une trop forte intensité et/ou se répètent trop fréquemment, elles peuvent conduire au cours du temps à la perte de fonctions d'un organe, d'un tissu ou d'un organisme tout entier. Il est maintenant démontré que le stress oxydant peut être à l'origine ou participer à un nombre important de pathologies humaines, telles que certains cancers (peau, foie, poumons...), des infections virales, des maladies neurodégénératives (Alzheimer), des maladies cardiovasculaires... [6].

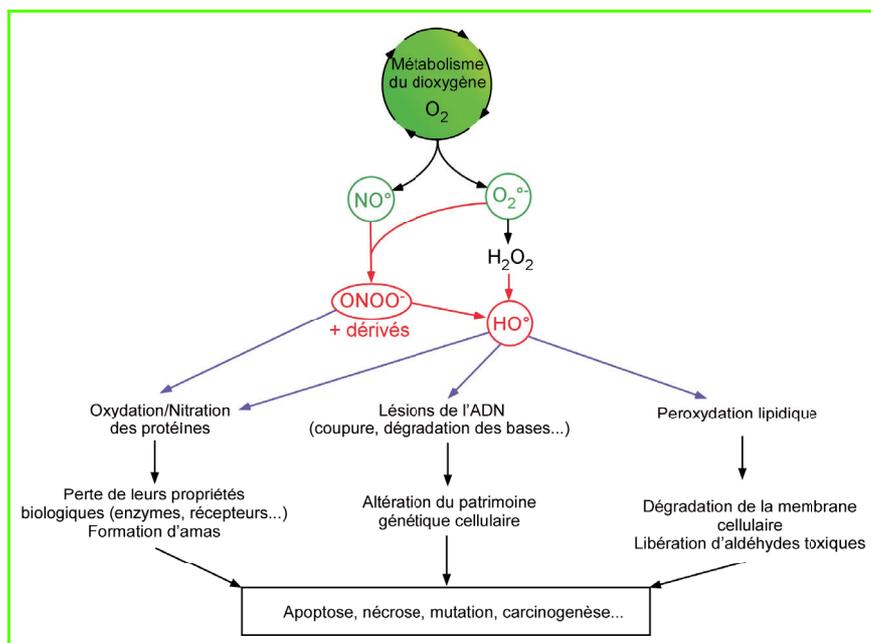


Figure 3 - Schéma général et simplifié de la production d'espèces responsables de la situation de stress oxydant.

Les méthodes analytiques employées dans ce domaine d'étude de la biologie et de la médecine étaient jusqu'à récemment de type indirect et fondées sur la détection des produits de dégradation issus à long terme du stress oxydant. L'apport essentiel de l'analyse à l'échelle de la cellule a donc été de pouvoir détecter les espèces chimiques initiatrices du stress oxydant et de caractériser leurs mécanismes de libération. Ces espèces issues du métabolisme de l'oxygène constituent une famille de composés dérivés de la production enzymatique par différentes sources de deux espèces de faible poids moléculaire et porteuses d'un électron non apparié : l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le monoxyde d'azote NO^{\bullet} . Ces espèces primaires ne sont, en tant que telles, que faiblement oxydantes (chimiquement, ce sont même plutôt des réducteurs). Elles ont un rôle de messenger, de régulateur de certaines activités métaboliques. Ainsi, la première fonction biologique de NO^{\bullet} ayant été démontrée est celle du contrôle de la dilatation des vaisseaux et artères par induction du relâchement des cellules musculaires lisses entourant les cellules endothéliales (productrices du NO^{\bullet}) composant le conduit vasculaire [7]. Ce mécanisme est illustré dans les études du couplage neurovasculaire ci-après (voir le dernier paragraphe). L'ion superoxyde a quant à lui pour cible principale des protéines de régulation du développement et de la multiplication cellulaire. Néanmoins, $O_2^{\bullet-}$ diminue rapidement, spontanément ou *via* la catalyse par les SOD, en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et conduit par les réactions dites de Fenton et d'Haber-Weiss à une espèce fortement réactive, le radical hydroxyle (HO^{\bullet}), initiatrice des peroxydations lipidiques et de modifications des bases de l'ADN (figure 3). L'anion superoxyde réagit par ailleurs à la vitesse limite de diffusion avec le monoxyde d'azote pour former les peroxynitrites ($ONOO^{\bullet}$ et sa forme acide $ONOOH$), mais aussi à quantité d'autres espèces encore plus réactives (NO_2^{\bullet} , NO_2^+ , $ONOOCO_2^{\bullet}$...), au fort pouvoir nitrant et nitrosant. On comprend dès lors l'intérêt pour la recherche biomédicale liée au stress oxydant de pouvoir quantifier et identifier, au niveau d'une cellule et en temps réel, les

espèces primaires conduisant aux modifications métaboliques et pathologiques observées par leurs conséquences à moyen et long termes.

L'analyse selon la méthode de synapse artificielle de la production d' $O_2^{\bullet-}$ et de NO^{\bullet} ou de leurs dérivés par une cellule vivante a été appliquée à différents types cellulaires, en particulier aux cellules de la peau (fibroblastes et kératinocytes) [8] et aux cellules du système immunitaire (lymphocytes, monocytes, macrophages) [9]. Ces analyses ont été le plus souvent effectuées sur des cellules isolées en culture et assez rarement au sein d'un tissu vivant, de par les difficultés expérimentales supplémentaires que cela représente. Nous présentons par la suite deux exemples représentatifs de chaque cas : la détection de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote par un macrophage en culture, et la détection de la libération du monoxyde d'azote à l'échelle d'un neurone au sein du tissu cérébral [10-11].

Caractérisation des espèces réactives conférant une activité antimicrobienne aux macrophages

La production d'espèces chimiques réactives, notamment celles issues de l'oxygène et de l'azote, est un mécanisme essentiel dans la défense cellulaire mis en œuvre par les cellules immunitaires. Notre groupe s'est intéressé à un système cellulaire, les macrophages, et à l'un des mécanismes élémentaires de l'immunité : la phagocytose. La phagocytose constitue la première barrière de l'immunité non spécifique, au cours de laquelle les macrophages (et les neutrophiles) présents dans les alvéoles pulmonaires ou le péritoine ingèrent (phagocytent) et inactivent des bactéries, virus et particules qui tentent de pénétrer l'organisme. Les voies d'inactivation sont enzymatiques mais aussi, et surtout, se font par production dans le phagosome, e.g. la vacuole où est ingéré l'élément étranger, d'espèces oxydantes ou nitrantes dérivées de $O_2^{\bullet-}$ et NO^{\bullet} . Cependant, bien que ce principe de la phagocytose ait été découvert il y a plus d'un siècle, la nature, la cinétique et les quantités d'espèces réactives produites au cours du processus n'étaient toujours pas clairement définies. En particulier, il était essentiel de répondre à la question de l'implication du peroxynitrite dans ce mécanisme, qui fait débat au sein de la communauté scientifique des immunologistes et des biologistes du métabolisme de NO^{\bullet} . Ces difficultés proviennent logiquement de l'impossibilité à détecter et analyser ces informations avec les techniques biochimiques classiques. Nous avons donc employé la méthode de la synapse artificielle basée sur des microélectrodes à fibre de carbone platiné pour recueillir des informations quantitatives et dynamiques sur la production des espèces oxydantes et nitrantes au cours de la phagocytose.

Ces études ont été rendues possibles grâce au développement de microélectrodes à fibre de carbone dont la surface a été modifiée par un dépôt nanostructuré de platine, dit « noir de platine » (voir figure 2). La grande surface active de ce dépôt, ses propriétés polycristallines et électrocatalytiques particulières, ont permis d'effectuer des détections très sensibles (jusqu'à 10 nM) et sélectives de

plusieurs dérivés de $O_2^{\circ-}$ et NO° , dont H_2O_2 , $ONOO^-$, NO_2^- et NO° , en condition *in vitro* puis sur cellules vivantes [9, 12]. Ces propriétés analytiques ont été mises à profit pour étudier la réponse de macrophages uniques en culture (d'origine murine ou humaine) soumis à une activation par des facteurs immunologiques en solution (l'interféron gamma ou $IFN\gamma$, et une endotoxine de bactéries, le lipopolysaccharide- α ou LPS). Cela représentait *a priori* un véritable défi de tenter une analyse sur cellule individuelle, de par les faibles flux de dérivés de $O_2^{\circ-}$ et NO° relargués, selon ce qu'il est possible de reconstituer à partir des résultats obtenus par méthodes spectroscopiques (UV ou fluorescence) sur de larges populations cellulaires [13].

Nous avons observé dans les conditions d'activation par des facteurs immunologiques, l'apparition d'un grand nombre de phagosomes dans les macrophages (figure 4) et avons détecté conjointement une réponse ampérométrique à l'électrode placée au plus proche de macrophages isolés. Chaque réponse cellulaire s'avère être de très faible amplitude (quelques picoampères au maximum), d'une grande complexité cinétique, souvent constituée de plusieurs patrons temporels, et par conséquent très variable [14]. L'examen microscopique suggère que les phagosomes fusionnent avec la membrane cellulaire, délivrant ainsi leur contenu vers le milieu extracellulaire avant de se résorber. Les caractéristiques cinétiques des signaux (pics soudains) suggèrent que l'on observe bien une production de monoxyde d'azote et de ses dérivés au cours de tels événements brefs et non pas une simple diffusion du contenu. En effet, un relargage par diffusion devrait donner, du fait du filtrage diffusif, une mesure très lissée sans pics à montée rapide comme observé sur la figure 4. L'analyse de ces réponses cellulaires à différents potentiels, sélectifs de l'oxydation de plusieurs dérivés de $O_2^{\circ-}$ et NO° (H_2O_2 , $ONOO^-$, NO_2^- et NO°), a permis de déterminer la composition et les quantités des espèces mises en jeu. Ces résultats ont démontré que l'activation d'enzymes de type NO synthases inductibles était responsable de la production initiale de NO° , et que du peroxy-nitrite était bien formé *in situ* dans chaque vésicule. Ces études démontrent donc le très fort intérêt de la méthode de synapse artificielle *via* l'analyse

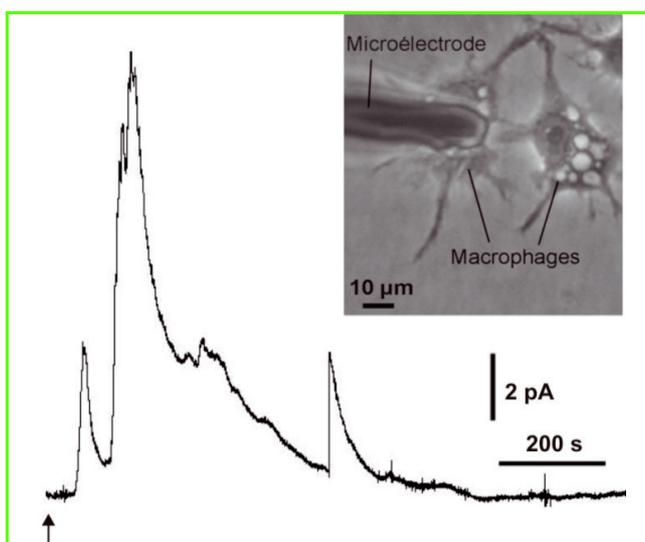


Figure 4 - Détection des espèces réactives produites par un macrophage au cours d'une réponse immunitaire.

Composition de la réponse cellulaire (flux des espèces) : 9 fmol/h de NO° , 8 fmol/h de $ONOO^-$, 4 fmol/h de NO_2^- .

qu'elle permet de chaque événement de libération et production de molécules réactives du stress oxydant et nitrant sur une cellule placée en condition d'activation [14].

Détection d'un vasodilatateur du cerveau (le monoxyde d'azote) émis par un neurone unique

De manière générale, la cellule, pour effectuer ses réactions métaboliques, utilise de l'énergie sous forme de glucose et d'oxygène et élimine du gaz carbonique. Elle trouve les premiers dans le sang : le glucose est issu des aliments et l'oxygène des poumons, et élimine aussi le dernier, le CO_2 , *via* la circulation sanguine. Or le cerveau consomme environ 25 % de notre énergie et son autonomie est limitée à quelques minutes. Ses réserves énergétiques et son fonctionnement sont par conséquent très tributaires d'un afflux de glucose et d'oxygène, donc de sang, proportionné à son activité. Cette autonomie limitée est contrebalancée par le phénomène nommé « couplage neurovasculaire », en l'occurrence la régulation de la distribution du flux sanguin cérébral localement et en fonction de l'activité neuronale des différentes zones du cerveau. En médecine, les techniques d'imagerie cérébrale exploitent d'ailleurs cette relation proportionnelle entre afflux de sang et activité neuronale. Avant les études présentées ici, les neurones en activité étaient supposés réguler ces flux sanguins en produisant eux-mêmes les agents vasodilatateurs, dont le NO° , nécessaires au maintien de leur activité [15]. L'idée que le gaz NO° pouvait être un messenger intercellulaire dans le système nerveux central provient des travaux effectués en 1988 par l'équipe de J. Garthwaite au Royaume-Uni [16]. Ces travaux ont élargi le concept de neurotransmission chimique classique car le NO° n'est pas stocké dans des vésicules comme c'est le cas des neurotransmetteurs « classiques », mais serait fabriqué pour l'occasion au moment où son émission est nécessaire. Celui-ci diffuse rapidement à travers les membranes ; il franchirait l'espace interneuronal et pénétrerait dans les cellules voisines. Néanmoins, la réalité de ce concept reposait sur une relation de cause à effet plutôt que sur une mise en évidence réelle *in situ* du flux de NO° et de son couplage avec la vasodilatation.

La détection et le titrage du NO° dans les systèmes biologiques est un enjeu analytique majeur au regard de la diversité des rôles de ce gaz dans les processus physiologiques fondamentaux (contrôle du flux sanguin, neurotransmission, stress oxydatif...). Il existe des méthodes indirectes de dosage du NO° par titrage de ses métabolites (absorptiométrie selon la méthode de Griess, chromatographie en phase liquide, électrophorèse capillaire, chimioluminescence pour les nitrites ou nitrates, fluorescence pour les nitrites, la RPE...), mais seules les méthodes électrochimiques au moyen de microélectrodes permettent la mesure directe, rapide et *in situ* du NO° , avec des sensibilités de l'ordre du nanomolaire. Il peut s'agir des microélectrodes de type Clark, fondées sur la présence d'une membrane sélective au NO° . Leur principe repose sur une séparation des espèces gazeuses à détecter par diffusion à travers une membrane perméable aux gaz. Ainsi la détection s'affranchit des interférents à la mesure du NO° , principalement les anions nitrites. En 1990, K. Shibuki a été le premier à proposer l'utilisation de ce type d'électrode pour détecter le monoxyde d'azote dans le cerveau [17]. L'autre option consiste à modifier la surface de l'électrode (par un complexe métallique de type porphyrine

par exemple) permettant l'oxydation catalytique du NO° . Ce type d'électrodes fait appel à des complexes métalliques immobilisés directement à leur surface et qui réalisent la complexation des substrats à détecter, ainsi que des réactions de médiation ou de catalyse électrochimique. Il est possible d'immobiliser ces complexes métalliques dans des matrices minérales comme des zéolithes ou des argiles, dans des films conducteurs comme les polypyrroles, ou enfin de les déposer sur la surface de l'électrode de par leur propre nature polymérisable. Un exemple de ce type de complexe permettant de réaliser ces réactions est donné par les métalloporphyrines. T. Malinski et Z. Taha ont ainsi présenté pour la première fois en 1992 une électrode fonctionnelle, fondée sur ce dernier modèle, permettant la détection électrochimique du NO sur cellule unique [18-19].

Dans le contexte du couplage neurovasculaire, l'électrochimie sur ultramicroélectrode peut donc apporter des précisions supplémentaires très importantes. En collaboration avec l'équipe du Pr. Jean Rossier de l'ESPCI à Paris, nous avons mesuré au moyen d'une microélectrode dans une coupe de tissu de cervelet *ex vivo* la production neuronale du NO° , et corrélié sa cinétique de production à la réactivité vasculaire des microvaisseaux de ce tissu par mesure vidéomicroscopique. La mesure électrochimique est effectuée grâce à une microélectrode de carbone platine de diamètre $5\ \mu\text{m}$. Il est à noter qu'au-delà de la localisation micrométrique de la mesure, cette faible taille minimise le caractère intrusif du capteur dans le tissu. La platination de la pointe de la fibre de carbone augmente la sensibilité de la microélectrode vis-à-vis du NO° . La microélectrode est insérée à quelques micromètres de profondeur, au contact d'un neurone, dans une tranche de cervelet de rat de $300\ \mu\text{m}$ d'épaisseur perfusée par un tampon qui mime le liquide céphalo-rachidien contenu dans le cerveau (pH 7,4, température ambiante).

La méthode électrochimique de mesure des variations de flux de NO° dans la tranche de cervelet est l'ampérométrie à potentiel constant par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl. Le courant recueilli reflète alors le flux de NO° émis par le neurone au cours du temps. Par ailleurs, la sécrétion peut être déclenchée par voie pharmacologique (perfusion de l'ensemble des neurones de la tranche placée dans la chambre d'enregistrement par une solution contenant un activateur comme le NMDA – acide *N*-méthyl-*D*-aspartique) ou électrophysiologique (stimulation électrique d'un neurone unique par patch-clamp). Ces différentes stimulations ont pour but de provoquer, entre autres, une entrée de calcium dans le neurone, et par conséquent de stimuler des enzymes synthétisant le NO° (les NO synthétases neuronales, dépendantes du calcium). Suite à la stimulation, le NO° est donc libéré par un ou plusieurs neurones, selon la méthode de stimulation, et diffuse vers la microélectrode où il est détecté par son oxydation monoélectronique.

Cette détection ampérométrique du NO° étant combinée à un suivi par vidéomicroscopie du diamètre des microvaisseaux de la tranche de cervelet, le lien entre production de NO° et dynamique vasculaire a pu en outre être établi. Les vaisseaux étudiés ici ont un diamètre de 8 à $30\ \mu\text{m}$ et sont localisés à une distance inférieure à $40\ \mu\text{m}$ de un ou plusieurs neurones pouvant être stimulés. Leur dilatation provoquée par le flux de NO° se limite à des zones où leur diamètre est restreint dans l'état au repos (voir *figure 5*).

Les signaux ampérométriques obtenus présentent la forme d'une « marche » de courant. La production de NO° est directement reliée cinétiquement à la durée de la stimulation, de l'ordre de quelques minutes, et ne

correspond donc pas à un appauvrissement énergétique de la cellule dans les conditions de travail. Les valeurs moyennes des flux de NO° mesurés par les microélectrodes de carbone platine et de l'analyse du comportement vasculaire des microvaisseaux figurent dans le *tableau* qui résume les résultats obtenus pour les différents types de stimulation. On observe ainsi que l'amplitude de la réponse de dilatation croît avec le flux de NO° mesuré mais ne lui est pas proportionnelle, ce qui établit le lien entre les deux mais indique vraisemblablement une saturation ou une cinétique vasculaire complexe.

L'étude du couplage neurovasculaire réalisée au cours de ce travail constituait d'une part un enjeu analytique majeur car il a offert, pour la première fois, une détection ampérométrique par microélectrode *in situ*, *i.e.* directement dans un tissu, du NO° produit par un neurone unique stimulé par électrophysiologie, ce qui était *a priori* difficile à réaliser en termes de sensibilité de la mesure et restait de ce fait uniquement une hypothèse vraisemblable avant ce travail. D'autre part, il a permis de mettre en lumière le phénomène

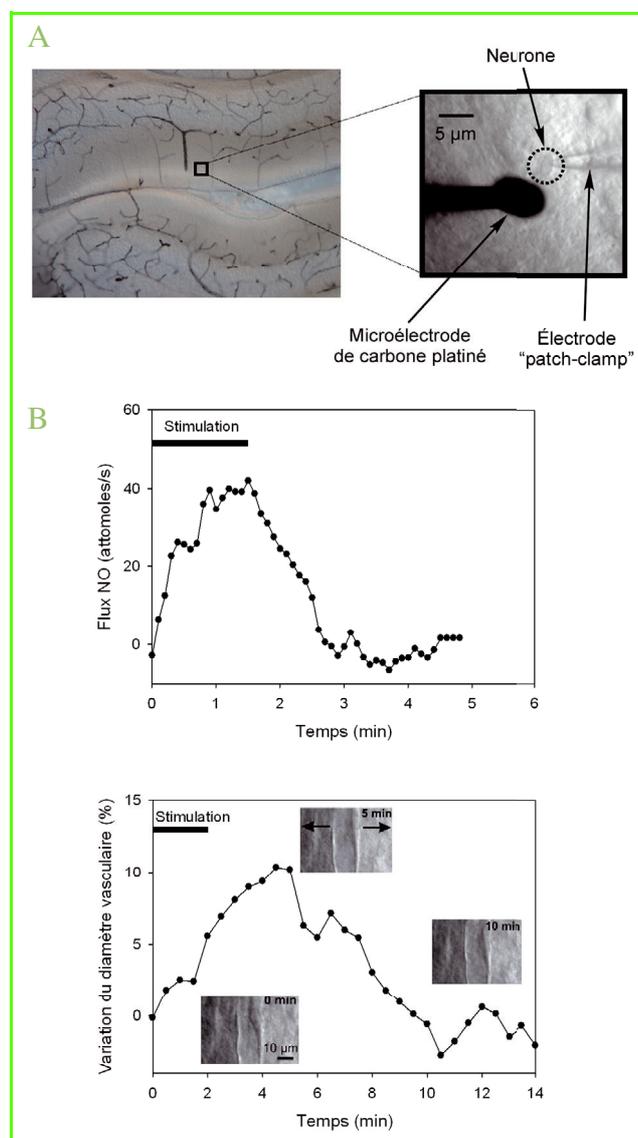


Figure 5 - Détection du NO dans un tissu cérébral.

A) Gauche : vue de dessus du tissu cérébral ; droite : configuration expérimentale de la mesure ampérométrique avec une stimulation neuronale électrophysiologique. B) Haut : production de NO par un neurone unique ; bas : dilatation concomitante d'un vaisseau.

Tableau - Récapitulatif des résultats obtenus lors de la mesure du NO° par microélectrode de carbone platiné dans une tranche de cervelet de rat.

Les différentes stimulations (trois types) ont donné lieu à un flux de NO° mesuré et à une dilatation de microvaisseaux de la tranche de cervelet.

Origine de la production de NO° dans la tranche	Types de stimulation		Flux de NO° (femtomo/s)	Dilatation de la zone restreinte des microvaisseaux (%)
Exogène	Donneur de NO°	DEA NONOate 100 μM	0,75	86
Endogène	Pharmacologique	NMDA 100 μM	0,15	45
Endogène	Électrophysiologique	Patch-clamp	0,04	10

biologique primordial qu'est le couplage neurovasculaire et le lien entre production de NO° et réactivité vasculaire.

Les travaux présentés dans cet article ont été réalisés au sein de l'UMR 8640, du CNRS et du département de Chimie de l'ENS ; S. Arbault a rejoint depuis l'UMR 5255 (Université de Bordeaux 1). Le travail présenté sur la vasodilatation a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Jean Rossier (UMR 7637, ESPCI).

Références

- [1] Amatore C., Arbault S., Guille M., Lemaître F., Electrochemical monitoring of single cell secretion: vesicular exocytosis and oxidative stress, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, p. 2585.
- [2] Stulik K., Amatore C., Holub K., Marecek V., Kutner W., Microelectrodes. Definitions, characterization and applications (Technical report), *Pure Appl. Chem.*, **2000**, *72*, p. 1483.
- [3] Amatore C., Maisonhaute E., When voltammetry reaches nanoseconds, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, p. 303A.
- [4] Amatore C., Maisonhaute E., Schollhorn B., Molecular electrochemistry pushed to its limits: from nanosecond kinetics to the dynamic study of nanometric objects, *L'Act. Chim.*, **2008**, *320-321*, p. 69.
- [5] Finkel T., Oxidant signals and oxidative stress, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2003**, *15*, p. 247.
- [6] Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, University Press, Oxford, **2007**.
- [7] Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S., Vascular endothelial-cells synthesize nitric-oxide from L-arginine, *Nature*, **1988**, *333*, p. 664.
- [8] Amatore C., Arbault S., Bruce D., de Oliveira P., Erard M., Vuillaume M., Analysis of individual biochemical events based on artificial synapses using ultramicroelectrodes: cellular oxidative burst, *Faraday Discuss.*, **2000**, *116*, p. 319.
- [9] Amatore C., Arbault S., Bouton C., Coffi K., Drapier J.C., Ghandour H., Tong Y.H., Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization, *ChemBioChem*, **2006**, *7*, p. 653.
- [10] Amatore C., Arbault S., Bouret Y., Cauli B., Guille M., Rancillac A., Rossier J., Nitric oxide release during evoked neuronal activity in cerebellum slices: detection with platinumized carbon-fiber microelectrodes, *ChemPhysChem*, **2006**, *7*, p. 181.
- [11] Rancillac A., Rossier J., Guille M., Tong X.K., Geoffroy H., Amatore C., Arbault S., Hamel E., Cauli B., Glutamatergic control of microvascular tone by distinct GABA neurons in the cerebellum, *J. Neurosci.*, **2006**, *26*, p. 6997.
- [12] Amatore C., Arbault S., Bruce D., de Oliveira P., Erard M., Vuillaume M., Characterization of the electrochemical oxidation of peroxytrinitrate: relevance to oxidative stress bursts measured at the single cell level, *Chemistry-A European Journal*, **2001**, *7*, p. 4171.
- [13] Kelm M., Dahmann R., Wink D., Feelisch M., The nitric oxide superoxide assay - Insights into the biological chemistry of the NO/O_2^- (center dot) interaction, *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, p. 9922.
- [14] Amatore C., Arbault S., Bouton C., Drapier J.C., Ghandour H., Koh A.C.W., Real-time amperometric analysis of reactive oxygen and nitrogen

species released by single immunostimulated macrophages, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, p. 1472.

- [15] Yang G., Huard J.M.T., Beitz A.J., Ross M.E., Iadecola C., Stellate neurons mediate functional hyperemia in the cerebellar molecular layer, *J. Neurosci.*, **2000**, *20*, p. 6968.
- [16] Garthwaite J., Charles S.L., Chesswilliams R., Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain, *Nature*, **1988**, *336*, p. 385.
- [17] Shibuki K., An electrochemical microprobe for detecting nitric-oxide release in brain-tissue, *Neuroscience Research*, **1990**, *9*, p. 69.
- [18] Malinski T., Taha Z., Nitric-oxide release from a single cell measured *in situ* by a porphyrinic-based microsensor, *Nature*, **1992**, *358*, p. 676.
- [19] Bedioui F., Villeneuve N., Electrochemical nitric oxide sensors for biological samples - Principle, selected examples and applications, *Electroanalysis*, **2003**, *15*, p. 5.



C. Amatore



S. Arbault



M. Guille

Christian Amatore

(auteur correspondant) est directeur de recherche de classe exceptionnelle au CNRS (École Normale Supérieure)* et membre de l'Académie des sciences.

Stéphane Arbault

est chargé de recherche au CNRS à l'Institut des Sciences moléculaires de Bordeaux**.

Manon Guille et Frédéric Lemaître

sont maîtres de conférences à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)*.



F. Lemaître

* Laboratoire Pasteur, École Normale Supérieure, CNRS UPMC, Département de Chimie, 24 rue Lhomond, F-75231 Paris Cedex 05.

Courriels : christian.amatore@ens.fr, manon.guille@ens.fr, frederic.lemaître@ens.fr

** Groupe Nanosystèmes Analytiques, Institut des Sciences Moléculaires, UMR 5255, ENSCBP, Université de Bordeaux 1, 16 avenue Pey Berland, F-33607 Pessac.

Courriel : stephane.arbault@enscbp.fr