

## Physiologie et physiopathologie

# Petites cellules excitables deviendront grandes : le rythme pour la raison\*

### Les canaux ioniques dans tous leurs états

« Les canaux ioniques ne sont pas de simples témoins du développement cellulaire, ils en sont les architectes. »  
(M. Villaz, Grenoble.)

Des courants ioniques très diversifiés sont engendrés par les canaux présents sur les membranes des cellules excitables chez les invertébrés comme chez les vertébrés [1-3]. Or, ces courants se regroupent selon quelques caractéristiques seulement: courants transitoires ou permanents, dépolarisants ou hyperpolarisants, dépendants ou indépendants du potentiel membranaire. Avec un nombre aussi réduit de caractéristiques, quel peut être l'avantage de la diversité des canaux ioniques? En quoi la particularité d'un canal donné conduit-elle à la spécificité fonctionnelle de la cellule excitable? La réponse s'élabore à mesure que s'accroît notre connaissance de cette diversité. L'identification de la structure et des acides aminés qui composent les canaux ioniques, la mise en évidence de la diversité spatiale et temporelle des assemblages de leurs sous-unités permettent d'en mieux comprendre le fonctionnement [4]. Ces assemblages varient selon les tissus ou au sein même d'un tissu ou bien encore en fonction du temps, par exemple au cours du développement jusqu'à l'âge adulte ([5-7], *Angulo et al., Paris\*\**). Outre ces caractéristiques propres liées à l'expression de certains canaux ioniques, une cellule excitable,

ou un réseau de cellules excitables, engendre différentes activités selon son environnement « pharmacologique ». Ainsi, la substance P ou la sérotonine augmentent la fréquence respiratoire alors que la somatostatine produit une apnée [8]. Les neurotransmetteurs agissent par l'intermédiaire de récepteurs très variés [9], conditionnant le type d'activité observé. Par exemple, la genèse des « fuseaux », qui sont des oscillations synchronisées de basse fréquence (6 à 12 Hz) se propageant dans le système thalamo-cortical au cours du sommeil, est liée à l'activation de récepteurs GABA<sub>A</sub> alors que l'absence dite « petit mal » est due à celle de récepteurs GABA<sub>B</sub> [10].

Ces caractéristiques biophysiques, structurales et pharmacologiques que l'on identifie peu à peu confèrent effectivement des propriétés particulières aux différents types de cellules excitables. C'est l'assemblage de telles cellules en réseaux qui donne à chacun d'entre eux sa spécificité fonctionnelle.

### Le blues du canal ionique dans la cellule excitable adulte

Une caractéristique biophysique d'un canal peut conférer à certaines cellules excitables une activité physiologique particulière; par exemple, dans les cellules cardiaques de mammifères, une modification du canal associé au courant dit de *pacemaker*, le courant If, permet de différencier les cellules qui ont une activité rythmique spontanée de celles qui en sont dépourvues (*I.S. Cohen, Stony Brook, USA* [11]). Le courant cationique If, courant entrant sélectif pour les ions sodium et potassium, est activé par l'hyperpolarisation membranaire et permet la dépolarisation de la cellule, relançant ainsi une

nouvelle phase du rythme cardiaque, la systole. Ce courant est présent non seulement au niveau des cellules du nœud sino-auriculaire et du faisceau auriculo-ventriculaire (tissus à partir desquels commence et se propage le phénomène d'excitation responsable de la contraction cardiaque), mais également au niveau des cellules ventriculaires. Dans les deux premiers types de cellules, il contribue à leur activité rythmique spontanée dans les conditions physiologiques. Au contraire, dans les cellules ventriculaires, le courant If ne s'active que pour des valeurs de potentiel nettement plus négatives que celles atteintes dans les conditions physiologiques. C'est pourquoi ces cellules ne présentent pas normalement d'activité rythmique spontanée. Ainsi, les cellules rythmiques et non rythmiques se différencient par la dépendance de l'activation du courant If vis-à-vis du potentiel de membrane. Dans tous les cas, cette dépendance peut être réglée par un système de phosphorylation. Dans le cas des cellules ventriculaires, une phosphatase empêche l'activation du courant If pour des valeurs de potentiel « physiologiques ». Une hypothèse est que l'inhibition de cette phosphatase, en permettant le déclenchement du courant If et donc l'activation rythmique et spontanée des cellules ventriculaires, produirait certaines arythmies ventriculaires observées, par exemple, en cas d'ischémie. D'un point de vue général, les canaux associés au courant If existeraient dans la plupart des cellules cardiaques qui, de ce fait, seraient potentiellement aptes à présenter une activité rythmique spontanée. Cependant, seules les cellules dont ces canaux peuvent être activés dans une gamme de potentiels « physiologiques » présenteraient cette propriété.

\* Compte rendu de la 7<sup>e</sup> édition du Colloque Canaux ioniques (La Londe-les-Maures, 18-21 septembre 1996).

\*\* Les références données en italique correspondent aux communications du colloque.

### Le *rock* des canaux ioniques dans la cellule excitable au cours de sa maturation

Si la modification d'une propriété d'un canal semble être suffisante pour attribuer à certaines cellules excitables une activité particulière, il n'en demeure pas moins que c'est l'apparition coordonnée de divers canaux au cours de la maturation qui confère à la cellule une activité électrique intrinsèque particulière, conditionnant le succès de son organisation anatomique et fonctionnelle future.

La maturation d'une cellule n'est réalisée que grâce à l'existence d'une activité rythmique intrinsèque, que leur fonction au stade adulte soit de produire une activité rythmique ou non. Il faut souligner ici qu'une activité rythmique est caractérisée par plusieurs facteurs tels que, notamment, la fréquence et l'amplitude des événements, la quantité globale d'ions entrant dans la cellule et leur localisation dans les divers compartiments intracellulaires. Parmi ces différents facteurs, il est clair que la fréquence des événements joue un rôle majeur pour produire un effet physiologique comme le montrent les différents exemples présentés ci-dessous. Dans les cellules musculaires de l'ascidie *Boltenia villosa* (W.J. Moody, Seattle, USA [12]), entre le moment de la fécondation et celui de la maturité, la modulation coordonnée de divers types de canaux permet, pendant une période transitoire, la genèse d'une activité rythmique spontanée cruciale pour déclencher les programmes du développement, c'est-à-dire la mise en place du couplage « excitation-contraction ». Après la fécondation, le potentiel de repos des cellules est contrôlé par un courant potassique dit « à rectification entrante », autrefois appelée « anormale », qui correspond à un déplacement des ions potassiques du compartiment à basse concentration vers le compartiment à haute concentration en potassium, à l'encontre de la loi de diffusion simple [13]. Il permet l'entrée d'ions potassiques dans la cellule quand celle-ci est hyperpolarisée et a donc tendance à la dépolariser. Au moment de la neurulation (16 heures après la fécondation), ce courant disparaît. Simultanément, deux

types de courants deviennent fonctionnels et sont mis en jeu lors de dépolarisations importantes de la cellule : un courant calcique, qui s'inactive progressivement au cours du temps et un courant potassique, qui s'active lentement au cours du temps. En conséquence, les cellules présentent une activité rythmique spontanée de type « calcique » et cela, pendant une période transitoire de 6 heures. Par la suite, les cellules ne présentent plus cette activité rythmique ; le courant potassique à rectification entrante réapparaît et deux autres types de courants apparaissent : un second type de courant calcique qui s'inactive au cours du temps de façon plus lente que le premier et un second type de courant potassique, dépendant cette fois du calcium, qui s'active rapidement au cours du temps. Les cellules deviennent alors contractiles et permettent la nage. L'inhibition de l'activité rythmique spontanée par du cadmium (qui bloque le courant calcique) pendant la phase de 6 heures, empêche l'apparition ultérieure du courant potassique dépendant du calcium. Dans ces conditions, les cellules à l'âge adulte ne sont pas contractiles. Il est donc clair qu'au cours du développement, la phase d'« activité rythmique spontanée calcique » est déterminante pour la mise en place des processus de la contraction et par conséquent de la nage.

Comme nous venons de le voir, les ions calcium du milieu extérieur traversent les canaux calciques de la membrane cytoplasmique et peuvent être impliqués dans les activités rythmiques intrinsèques. Mais, outre leur entrée dans la cellule, les ions calcium peuvent également être libérés à partir de divers compartiments intracellulaires (voir pour revue [14]). L'ensemble conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium libre ( $[Ca^{2+}]_i$ ) qui peut être directement mesurée par les techniques de fluorescence. Des oscillations périodiques de  $[Ca^{2+}]_i$  peuvent engendrer et moduler une riche diversité de signaux cellulaires tels que le développement des courants membranaires, la synthèse des neurotransmetteurs, la croissance des neurites et même la formation et la

stabilisation des connexions synaptiques [15]. Au repos, la  $[Ca^{2+}]_i$  est de l'ordre du nanomolaire. De ce fait, une faible quantité de calcium entrant dans la cellule est capable de produire une modification significative de  $[Ca^{2+}]_i$ , qui peut suffire pour produire un effet physiologique. En revanche, pour les autres ions dont les concentrations intracellulaires sont nettement plus élevées (de l'ordre du millimolaire), des mouvements ioniques très importants seraient nécessaires pour produire des variations de concentrations similaires. Il apparaît donc que, parmi les ions présents dans les cellules, le calcium est le plus apte à contrôler le développement cellulaire. De fait, des oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  interviennent dans la régulation du développement des cellules excitables. Là encore, c'est la fréquence des oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  qui joue un rôle déterminant. Le cas des neurones spinaux d'embryons de l'amphibien *Xenopus laevis* est exemplaire : au cours du développement précoce, ils présentent deux types d'augmentations spontanées, transitoires et répétitives de  $[Ca^{2+}]_i$ , des « pics » et des « vagues » calciques (N.C. Spitzer, La Jolla, USA [16]) (figure 1). Alors que les pics représentent des variations importantes de  $[Ca^{2+}]_i$  (de 50 à 500 nM) et se caractérisent par des phases ascendante et descendante rapides, les vagues résultent de variations de  $[Ca^{2+}]_i$  environ deux fois plus faibles mais ont des phases ascendante et descendante plus lentes. Des différences de fréquence entre les pics et les vagues calciques ont été mises en évidence. La fréquence des pics est de 3 événements/heure, au stade 5-10 heures du développement, mais elle diminue à 1 événement/heure au cours des stades ultérieurs. Quant à la fréquence des vagues, elle reste constante durant tout le développement, avec 8 événements/heure. La suppression du calcium externe pendant cette période du développement élimine les augmentations transitoires calciques et affecte la différenciation des neurones en supprimant la synthèse du GABA et en augmentant la croissance des neurites. Les rôles de ces augmentations transitoires calciques dans la différenciation neuro-

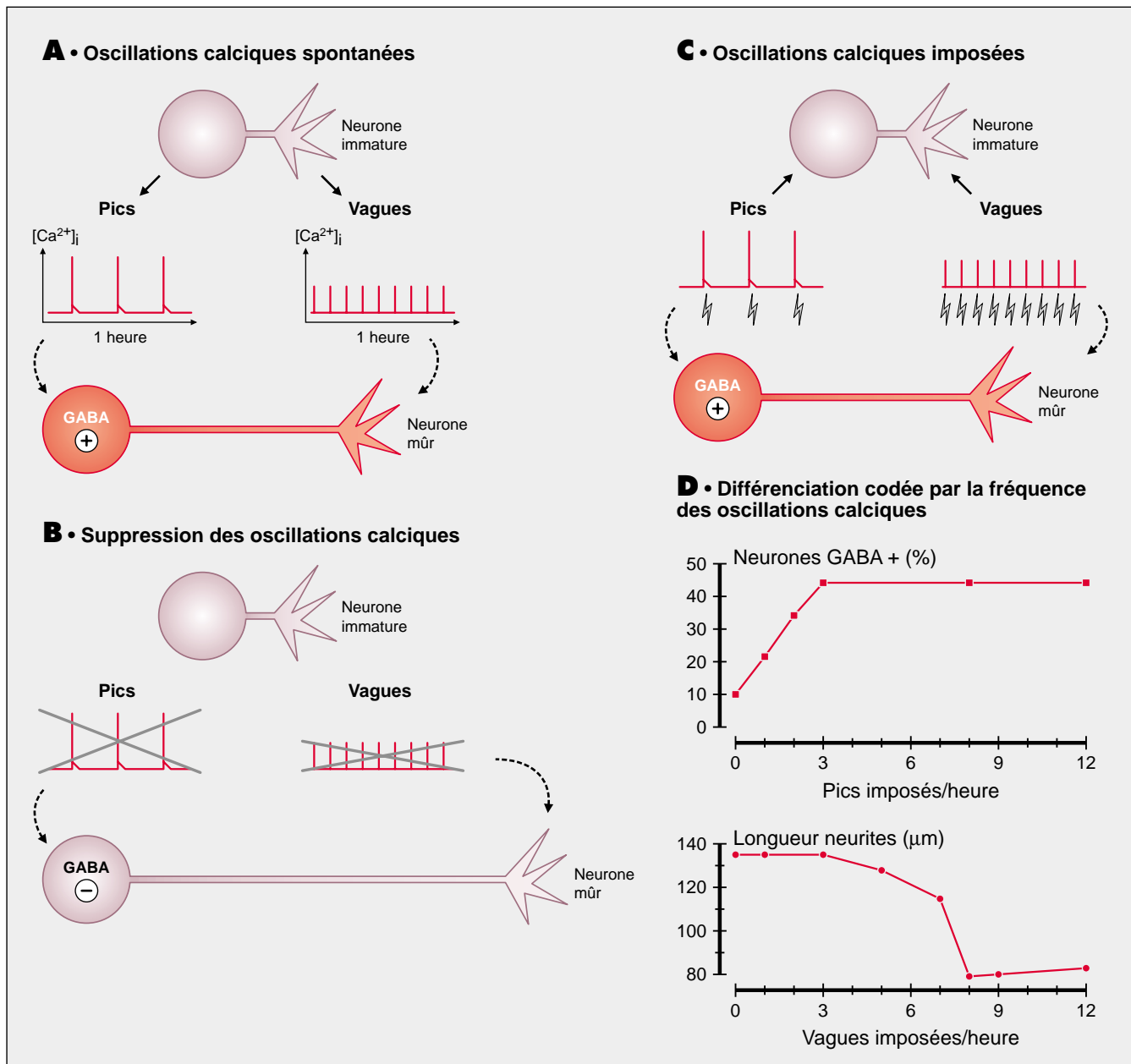


Figure 1. **Différenciation neuronale codée par la fréquence des augmentations transitoires de  $[Ca^{2+}]_i$ .** **A.** Deux types d'augmentations transitoires de  $[Ca^{2+}]_i$ , des pics et des vagues, apparaissent spontanément à différentes fréquences dans les corps cellulaires et les cônes de croissance des neurones embryonnaires de la moelle épinière. **B.** Les pics et les vagues sont nécessaires à la différenciation neuronale car, en les bloquant au stade embryonnaire, on supprime l'expression du GABA et on augmente la croissance des neurites. **C.** Les pics et les vagues sont suffisants pour la différenciation neuronale car en réimposant artificiellement des pics et des vagues calciques aux neurones embryonnaires, l'expression du GABA et l'allongement des neurites sont normaux. **D.** L'expression du GABA dépend de la fréquence des pics imposés artificiellement (partie supérieure) ainsi que de la maturation du courant potassique (non montré). La régulation de l'allongement neuritique dépend de la fréquence des vagues imposées artificiellement (partie inférieure).

nale ont pu être précisés en réimposant aux neurones des oscillations calciques artificielles, similaires aux augmentations naturelles. Ces oscillations

artificielles étaient réalisées en changeant de façon transitoire le bain de perfusion dépourvu de calcium pour un bain riche en calcium. C'est ainsi

que le rôle des pics calciques dans la maturation des canaux ioniques et dans l'expression des neurotransmetteurs a été identifié. Le courant potas-

sique rectifiant retardé, qui permet une repolarisation très rapide de la membrane à la suite d'un potentiel d'action, ne devient « mature » que si la fréquence des pics est supérieure à 1/heure et le GABA n'est synthétisé que si la fréquence des pics est supérieure à 3/heure. Il est à souligner que l'inversion de la fréquence des pics calciques au cours du développement, en imposant une fréquence de 1 puis de 3 événements par heure, ne permet pas la différenciation neuronale, bien que la quantité globale de calcium entrant dans les neurones ne soit pas modifiée dans ces conditions. Il semble que l'évolution dans le temps de la fréquence des pics calciques, plutôt que la quantité globale de calcium entrant dans la cellule, ait une signification fonctionnelle. Les vagues calciques, quant à elles, contrôlent la croissance des neurites, une faible fréquence facilitant leur allongement. Il existe donc, au cours du développement, une période de sensibilité aux oscillations calciques qui conditionne la différenciation des neurones. Deux types d'oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  codent, par leur fréquence, les informations relatives aux différents paramètres du développement neuronal. Il reste à étudier si d'autres caractéristiques que la fréquence, telles que la forme des pics et des vagues ou leur localisation préférentielle dans le neurone, peuvent également jouer un rôle dans la spécification de la différenciation neuronale. Par ailleurs, au cours du développement, on constate que le pourcentage de cellules qui présentent simultanément des augmentations transitoires calciques s'accroît. Une hypothèse est que cette activité simultanée pourrait permettre aux cellules de se différencier simultanément.

Une activité rythmique régulière de type *pacemaker* existe également dans les neurones de Purkinje du cervelet (A.J. Yool, Tucson, AZ, USA [17]), neurones qui constituent la seule voie de sortie du cortex cérébelleux. Ces neurones présentent une activité synchronisée au sein de différents groupes qui sont réorganisés en permanence sous le contrôle des fibres moussues et des fibres grimpanes, fibres qui constituent les deux seules voies d'accès au cervelet. L'activité des neurones de Purkinje est corrélée

à la réalisation de mouvements appris pouvant nécessiter une grande habilité et précision [18]. Leur activité de type *pacemaker* correspond à des oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  qui résultent de la mise en jeu séquentielle et rythmée de divers types de canaux ioniques. En particulier, la mise en jeu de canaux calciques activés par le potentiel, avec des seuils haut ou bas, permet l'entrée rapide de calcium dans les neurones et leur dépolarisation. Cette entrée de calcium s'effectue essentiellement au niveau des dendrites. La dépolarisation, associée à une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , active des canaux potassiques qui présentent une grande conductance (70 et 100 pS), dépendent à la fois du calcium et du potentiel et sont bloqués par une faible concentration de tétraéthylammonium (1 mM). Ces canaux contribuent à la repolarisation des neurones. De ce fait, les canaux potassiques constituent une boucle de contrôle rétroactif sur l'entrée de calcium dans les neurones et permettent, au moins en partie, une régulation très fine de la  $[Ca^{2+}]_i$ . De plus, en diminuant la durée des potentiels d'action, ils interviennent également dans le contrôle de la fréquence de l'activité répétitive des neurones. Bien que l'activité de type *pacemaker* soit essentielle dans les neurones de Purkinje différenciés, les neurones immatures n'engendrent pas cette activité rythmique et celle-ci n'apparaît que progressivement au cours du développement. Au stade immature, les neurones ne possèdent que des canaux calciques de type haut seuil, ainsi que des canaux potassiques ne dépendant que du potentiel qui persisteront pendant tout le développement. La transition vers une décharge rythmique caractéristique de la maturité, environ 8 jours après la différenciation neuronale, apparaît en même temps que l'expression de canaux potassiques de grande conductance, dépendant à la fois du potentiel et du calcium. Par ailleurs, rappelons que le calcium intracellulaire est un messager nécessaire au développement de nombreux mécanismes cellulaires dont l'activité électrique mais aussi, par exemple, la croissance des dendrites. Or, les den-

drites des neurones de Purkinje n'atteignent qu'au stade adulte leur arborisation caractéristique, particulièrement bien développée dans un seul plan. Les canaux potassiques, en contrôlant la  $[Ca^{2+}]_i$ , semblent moduler non seulement l'activité électrique mais aussi la croissance dendritique comme l'ont montré des expériences réalisées sur des cultures de neurones soumises à des facteurs dépolarisants mettant en jeu le potassium, tels que le traitement chronique par du tétraéthylammonium bloquant des canaux potassiques, ou encore l'augmentation de la concentration extracellulaire d'ions potassiques (figure 2). Outre ces modulations liées aux propriétés intrinsèques des neurones de Purkinje, apparaissent des caractéristiques liées aux connexions synaptiques du réseau. Les neurones excitateurs et inhibiteurs permettront de déterminer le type des potentiels d'action du neurone postsynaptique, « simple » ou « complexe », la fréquence de leur décharge en contrôlant le potentiel de membrane ou encore la durée des bouffées d'activité. Ainsi, la régulation des réserves intracellulaires de calcium par le contrôle de l'expression des canaux ioniques conditionne-t-elle la morphologie dendritique qui, elle-même, constitue le support de l'organisation des connexions synaptiques et la base de l'activité physiologique des différentes structures cérébelleuses.

### La « symphonie neuronale »

Les résultats exposés ci-dessus montrent que le développement normal de différents types cellulaires est conditionné par la mise en place de leurs caractéristiques membranaires. Qu'en est-il du développement concomitant de différents types cellulaires dont seule l'organisation en réseau leur permet d'assurer *in fine* leur fonction biologique ? Les études analysant le développement de tels réseaux montrent que c'est encore l'expression d'une activité rythmique qui conditionne le succès de leur organisation anatomique et fonctionnelle future, que le réseau ait ou non pour fonction finale d'engendrer une activité rythmique à l'âge adulte. Les modèles de réseaux en dévelop-

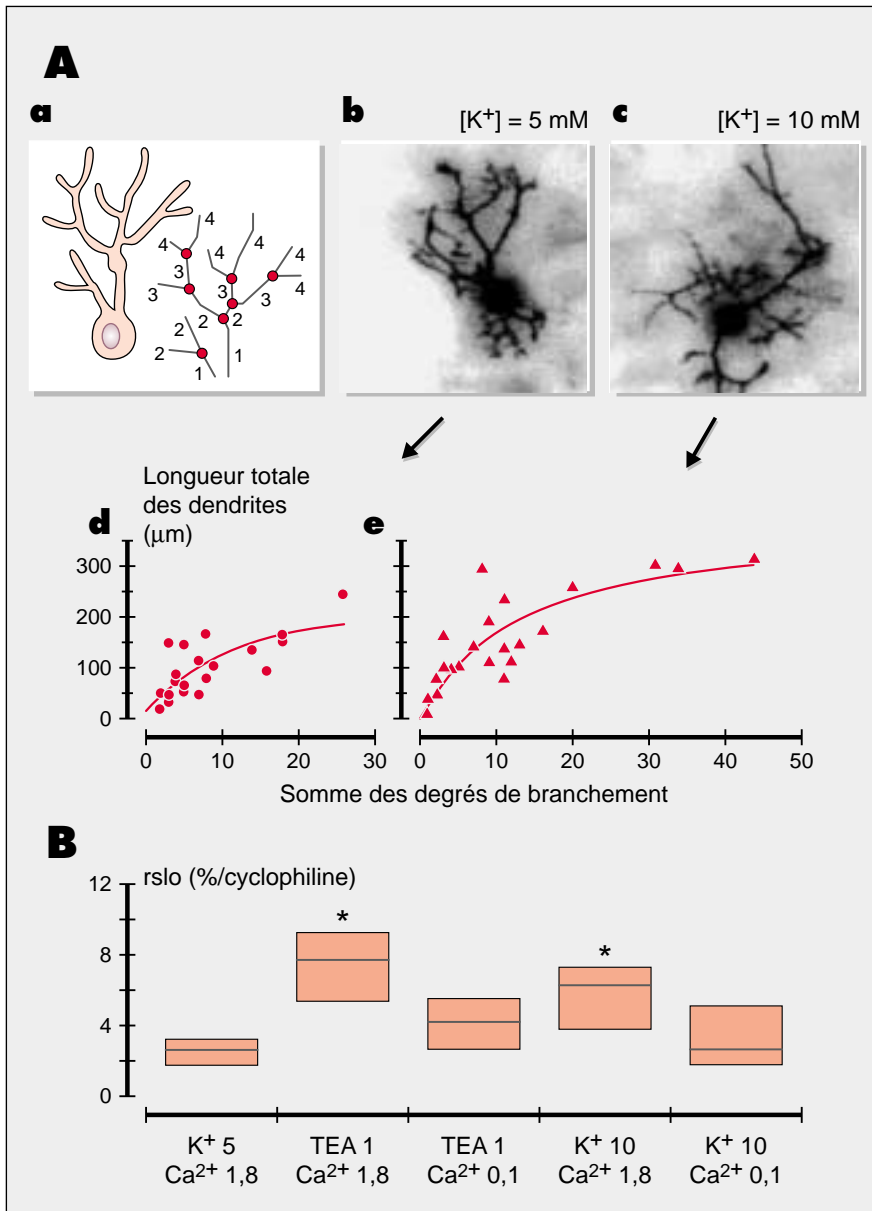


Figure 2. **Régulation de la croissance dendritique (A) et de l'expression des canaux potassiques dépendants du calcium (B) au niveau des neurones de Purkinje du cervelet de rat en culture primaire.** **Aa.** Schéma d'un neurone avec son arborisation dendritique. Chaque segment dendritique est représenté par (1) sa longueur et (2) son degré de branchement qui lui est attribué en fonction de sa position par rapport au soma: les degrés de branchement sont augmentés par pas de 1 à chaque embranchement de telle sorte que les segments adjacents au soma ont le degré 1 et les segments les plus éloignés le degré le plus élevé. **Ab et Ac.** Images numérisées de neurones mis en culture depuis 15 jours en présence d'une concentration d'ions potassiques extracellulaires ( $[K^+]_o$ ) de 5 mM (Ab) ou 10 mM (Ac). Les neurones sont identifiés par immuno-histochimie avec un anticorps reconnaissant la calbindine. **Ad et Ae.** Chaque point correspond à la longueur totale des segments dendritiques d'un neurone (ordonnée), représentée en fonction de la somme des degrés de branchement de tous ses segments dendritiques (abscisse). Chaque graphe représente l'ensemble des neurones d'une même culture développée pendant 15 jours en présence d'une  $[K^+]_o$  de 5 mM (Ad) ou 10 mM (Ae). Notez l'augmentation significative de la longueur et du nombre des segments dendritiques pour l'ensemble des neurones en présence d'une  $[K^+]_o$  de 10 mM (c, e) par rapport au témoin ( $[K^+]_o$  5 mM, b, d). **B. Le taux d'expression du gène rslo**, codant pour les canaux potassiques de grande conductance et dépendants du calcium, est estimé au 14<sup>e</sup> jour de culture pour différents milieux de

croissance utilisés. Par rapport au milieu de contrôle qui a une  $[K^+]_o$  de 5 mM et une concentration d'ions calciques libres extracellulaires ( $[Ca^{2+}]_o$ ) de 1,8 mM, l'expression de rslo est accrue de façon significative lorsque les cultures de neurones sont traitées avec du tétraéthylammonium (1 mM) ou lorsque la  $[K^+]_o$  est augmentée de 5 à 10 mM. En revanche, la présence de tétraéthylammonium ou l'augmentation de la  $[K^+]_o$  n'ont aucun effet sur l'expression de rslo en présence d'une faible  $[Ca^{2+}]_o$  (0,1 mM). Le taux d'expression du gène rslo est donné par la quantité de transcrits mesurée par PCR par rapport au taux d'expression constitutive du gène codant pour la cyclophiline. Chaque rectangle représente les valeurs extrêmes et la barre centrale, le mode de distribution du taux d'expression du gène rslo mesuré dans plusieurs cultures. Les quantités d'échantillons utilisées étaient de 50 ng pour le messager rslo et de 5 ng pour le messager cyclophiline.

pement présentés au cours de ce colloque sont des réseaux neuronaux. Il faut rappeler ici que, dès les premières études de physiologie animale, la compréhension de la genèse des activités rythmiques est apparue fondamentale. Au début du siècle,

Sherrington s'interrogeait sur l'origine de la rythmicité neuronale, si elle était produite au niveau du système nerveux central ou si elle résultait d'une chaîne de réflexes. On sait maintenant que les activités rythmiques impliquées dans diverses

fonctions sont engendrées par des réseaux (*rhythmic pattern generators*) constitués d'un ensemble de neurones reliés entre eux par des synapses et modulés par des afférences périphériques ou centrales. Pour comprendre le fonctionnement

de ces réseaux, la démarche est de les analyser selon des approches à la fois globales et réductionnistes, en fonction des techniques disponibles [19]. Les réseaux rythmiques font preuve de flexibilité pour réorganiser leur influx de sortie en fonction des modifications du milieu extérieur. En effet, ils opèrent des relations de phases précises entre divers groupes de neurones et s'adaptent en mettant en jeu ces mêmes neurones à des fréquences différentes et/ou à des intensités différentes, ou bien même en mettant en jeu d'autres neurones [20]. Ainsi, ces réseaux ne sont pas « figés » dans une organisation de câblage particulière mais peuvent être « reconfigurés » selon les conditions de l'environnement. Plus étonnant encore, un même réseau peut subir une complète réorganisation de ses circuits pour assurer une autre fonction. C'est le cas du système nerveux stomatogastrique du homard qui réassocie les réseaux responsables des fonctions pylorique, gastrique et œsophagienne pour former un nouveau réseau assurant la fonction de déglutition [21].

L'analyse des réseaux rythmiques a montré que ceux-ci sont constitués d'un nombre restreint de types neuronaux. Chez les invertébrés et dans les modèles de neurones artificiels, on trouve des exemples utilisant des neurones « stéréotypés » dans lesquels deux neurones seulement exercent des inhibitions mutuelles et présentent des dépolarisations spontanées. Dans le système respiratoire de mammifère, seuls six types différents de neurones interviennent [8].

### Les *putti* à l'œuvre

Pour décrire la mise en place d'un réseau dont la fonction ultérieure sera de produire une activité rythmique, prenons l'exemple du réseau à l'origine du rythme respiratoire (G. Fortin, Gif-sur-Yvette, France [22]). Pour comprendre la façon dont s'opère la spécification des propriétés rythmogènes, on étudie les types cellulaires et les systèmes neurochimiques qui permettent la première activité rythmique. Le réseau responsable du rythme respiratoire se trouve localisé dans le tronc cérébral, une région du cerveau dont la segmentation aboutit à des unités

**Calbindine** : protéine intracellulaire chélatrice du calcium et spécifique, dans le cervelet, des cellules de Purkinje.

**Cellules amacrines/ganglionnaires** : Au sein de la rétine, l'information en provenance des photorécepteurs est traitée par les cellules amacrines selon des relations transversales, avant d'être véhiculée par les cellules ganglionnaires qui constituent le nerf optique.

**Champ récepteur d'un neurone ganglionnaire de la rétine** : surface rétinienne sur laquelle sont localisés les photorécepteurs capables d'exercer des influences facilitatrices ou inhibitrices sur le neurone. Le champ récepteur est concentrique avec deux régions distinctes, le centre et la périphérie. Le champ récepteur est dit « à centre ON » quand le neurone est excité au début de l'illumination du centre et « à centre OFF », quand le neurone est moins excité au début de l'illumination du centre.

**Courant cationique If** : courant entrant sélectif pour les ions sodium et potassium qui est activé par des hyperpolarisations membranaires et permet la dépolarisation de la cellule.

**Courant potassique rectifiant retardé** : courant qui change la conductance membranaire avec un certain délai à la suite d'une modification du potentiel de membrane. Bien que plusieurs courants potassiques aient cette propriété, le terme est resté pour désigner les courants potassiques qui permettent une repolarisation très rapide de la membrane à la suite d'un potentiel d'action (par conséquent avec un délai très court). Ce sont les constituants essentiels des courants potassiques présents dans les axones.

**Courant potassique à rectification entrante** : courant autrefois appelé « à rectification anormale » car on avait observé que les ions potassiques se déplaçaient du compartiment à basse concentration vers le compartiment à haute concentration en potassium, à l'encontre de la loi de diffusion simple. Il permet l'entrée d'ions potassiques dans la cellule quand celle-ci est hyperpolarisée et a donc tendance à la dépolariser.

**Cyclophiline** : Le gène de la cyclophiline code pour une protéine cytosolique ubiquitaire. Son ARNm est utilisé comme référence pour effectuer une PCR quantitative des ARNm codant pour d'autres molécules. La cyclophiline est le récepteur de la ciclosporine A, elle-même produite par le champignon norvégien *Tolypocladium inflatum*.

**Fuseaux** : oscillations synchronisées de basse fréquence (6 à 12 Hz) se propageant dans le système thalamo-cortical au cours du sommeil.

**Loi Hebbienne** : Le renforcement des connexions appropriées entre neurones sensoriels et cibles résulte d'une décharge synchrone répétée des cellules, respectivement pré- et postsynaptiques, alors que les connexions entre neurones dont l'activité pré- et postsynaptique n'est pas synchronisée ne sont pas conservées.

**Rhombomère** : Une segmentation du tissu nerveux à un stade embryonnaire très précoce (autour du 8<sup>e</sup> jour chez le poulet) se produit dans le sens rostro-caudal et aboutit à la formation d'unités métamériques, les rhombomères. Ils se forment à la suite de différences régionales dans la prolifération cellulaire, le centre de chaque rhombomère correspondant à une prolifération maximale. Les rhombomères donneront naissance aux nerfs branchio-moteurs.

**rslo** : gène codant, chez le rat, pour les canaux potassiques de grande conductance, dépendants du voltage et du calcium. Il a été isolé à partir du gène *slowpoke* de la drosophile qui code pour des canaux similaires.

**Tétraéthylammonium (TEA)** : bloquant des courants potassiques, connu en particulier pour bloquer à une faible concentration (1 mM), les courants de grande conductance (de l'ordre de 90 pS), dépendants du voltage et du calcium.

métamériques, les rhombomères, qui s'établissent dans le sens rostro-caudal. Ces rhombomères sont sous le contrôle de gènes qui régissent le programme de développement et orches-

trient, en particulier, la destinée des lignées neuronales du tronc cérébral [23]. Les corps cellulaires des motoneurones des nerfs crâniens sont confinés dans des rhombomères spéci-

fiques. Chez l'embryon de poulet, ces neurones présentent très tôt au cours du développement, à la fin de la segmentation, une activité rythmique primordiale synchronisée. Cette activité est constituée d'épisodes successifs, dûs à des dépolarisations prolongées des neurones sous l'effet de rebonds postinhibiteurs, séparés par des périodes de silence. Chaque épisode est constitué d'une suite de bouffées successives à fréquence plus élevée. Seuls, trois types de neurones sont mis en jeu dans la genèse de cette activité rythmique primordiale: (1) des neurones GABAergiques intervenant dans la genèse des épisodes; (2) des neurones noradrénergiques intervenant dans le contrôle de la période de ces épisodes; et (3) des neurones glutamatergiques intervenant dans la genèse des bouffées. Une originalité de ce réseau constitué en rhombomères est que, chez le poulet, à ce stade embryonnaire, un rhombomère isolé des rhombomères voisins par des expériences de transections conserve une activité rythmique. Ces études pourront être complétées par une analyse des gènes qui permettent la spécification des propriétés anatomiques, membranaires et synaptiques des différents types cellulaires constituant ce réseau générateur d'activité rythmique; une telle démarche commence à être utilisée chez les rongeurs [24].

### La « marche militaire »

Un autre exemple de réseau dont le développement anatomique et fonctionnel est conditionné par l'existence d'une activité rythmique intrinsèque, est celui constitué par les voies rétino-fuges du système visuel de mammifère (R.O.L. Wong, St Louis, MO, USA [25]). Une particularité de ce réseau est que les connexions sont effectuées « point par point » entre les cellules ganglionnaires de la rétine (cellules RG), représentant l'espace environnant et leurs neurones cibles qui sont situés dans la partie dorsale du noyau géniculé latéral (neurones du dLGN). On sait que chez l'adulte, les neurones du dLGN sont regroupés en feuillets qui reçoivent, en alternance, des projections de l'œil ipsilatéral ou de l'œil controlatéral. De la sorte, les neurones

du dLGN reçoivent l'information en provenance des cellules RG d'un seul œil. En outre, les neurones du dLGN, comme les cellules ganglionnaires auxquelles ils sont connectés, possèdent un « champ récepteur », soit à « centre ON », soit à « centre OFF ». Le champ récepteur est dit à centre ON quand la cellule est plus active à l'apparition de la lumière et à centre OFF quand la cellule est plus active à la disparition de la lumière. Les neurones du dLGN, déjà séparés en feuillets asservis à chaque œil, forment une stratification en sous-couches adjacentes selon qu'ils possèdent un champ récepteur à centre ON ou à centre OFF. La formation des connexions synaptiques entre les cellules ganglionnaires et les neurones du dLGN, au cours de la maturation, résulte de l'activité électrique spontanée des cellules. Les expériences décrites ci-après ont été réalisées chez le furet nouveau-né car, à ce stade chez cet animal, la maturation de la rétine est en retard sur celle du chat ou du singe et il est possible d'observer des processus d'auto-organisation intrinsèques au réseau visuel, indépendants de l'activité évoquée par l'environnement visuel. Juste après la naissance, des oscillations spontanées de  $[Ca^{2+}]_i$  ont été observées dans les cellules amacrines, cellules qui permettent les relations transversales dans la rétine, et les cellules ganglionnaires. Les oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  apparaissent simultanément dans plusieurs cellules, mais ces cellules sont localisées dans une région restreinte appelée « zone active ». Ces oscillations peuvent se produire en l'absence de tout stimulus visuel et la zone active se déplace à la surface de la rétine de façon aléatoire parmi les autres cellules. Cependant, une partie seulement des cellules situées dans la zone active présente une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ . Lors des passages successifs de la zone active à un même endroit de la rétine, les cellules présentant une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  peuvent être différentes. Ainsi, toutes les cellules deviennent actives à un moment ou à un autre. On peut penser que les déplacements de la zone active ne sont pas superposables et que l'activité des cellules ganglionnaires serait corrélée dans un œil alors qu'elle ne

le serait pas pour chaque zone active des deux yeux. Dans ce mode de fonctionnement, comment la différenciation en couches spécifiques pour chaque œil dans le dLGN peut-elle se produire? Elle se ferait selon la loi Hebbienne: le renforcement des connexions appropriées résulterait d'une décharge synchrone répétée des cellules sensorielles et des cellules cibles, respectivement pré- et postsynaptiques, et des mécanismes de plasticité hétérosynaptique supprimeraient les connexions inappropriées. Une telle organisation de l'activité des cellules ganglionnaires pourrait produire les différentes couches dans le dLGN, chacune connectée alternativement à un œil. Effectivement, l'observation expérimentale indique que la ségrégation progressive des sous-couches de neurones à centre ON et des neurones à centre OFF dans le dLGN est liée à la fréquence relative des oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules ganglionnaires correspondantes. A partir du neuvième jour postnatal chez le furet, les neurones à centre ON seraient connectés à des cellules ganglionnaires qui deviennent de moins en moins actives alors que les neurones à centre OFF seraient connectés à des cellules ganglionnaires qui deviennent de plus en plus actives lors des passages successifs de la zone active. Ainsi, pendant l'élaboration des circuits de la vision, un réseau tangentiel de cellules amacrines et ganglionnaires engendre des oscillations spontanées de  $[Ca^{2+}]_i$  qui se propagent dans la rétine, ce qui permet au dLGN de se différencier en couches spécifiques pour chaque œil. La fréquence de ces oscillations détermine l'organisation en sous-couches de neurones à centre ON et de neurones à centre OFF du dLGN.

### « Création ou cacophonie » ?

Comme le commentait M. Villaz en introduction de la session « canaux et développement », « les canaux ioniques ne sont pas de simples témoins du développement cellulaire mais ils en sont les architectes » et on retrouve sur les cellules neuronales les observations réalisées sur les cellules musculaires. Toute modification des caractéristiques

Tableau I				
MALADIES RÉSULTANT DE L'ANOMALIE DE CANAUX IONIQUES				
Maladie	Tissu	Canal modifié	Manifestation clinique	Références
syndrome du QT long	cœur	sodique dépendant du potentiel et lié au gène <i>SCN5A</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>arythmie cardiaque</li> <li>perte de conscience</li> <li>épilepsie</li> <li>mort soudaine</li> </ul>	[26-29]
syndrome du QT long	cœur	potassique rectifiant retardé et lié au gène <i>Herg</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>arythmie cardiaque</li> <li>perte de conscience</li> <li>épilepsie</li> <li>mort soudaine</li> </ul>	[27-31]
		KVLQT		[32]
myotonie congénitale	muscle squelettique	sodique chlore	paralysie périodique	[33, 34]
<ul style="list-style-type: none"> <li>syndrome de Lambert-Eaton</li> <li>maladie auto-immune</li> </ul>	jonction neuromusculaire	calciques à bas seuil et à haut seuil des motoneurones	<ul style="list-style-type: none"> <li>diminution de la libération de neurotransmetteur</li> <li>faiblesse musculaire</li> </ul>	[35]
syndrome congénital myasthénique	jonction neuromusculaire	récepteur-canal de l'acétylcholine	<ul style="list-style-type: none"> <li>faiblesse musculaire</li> <li>fatigue</li> </ul>	[36]
mutation du gène <i>weaver</i> chez la souris	grains du cervelet substance noire hippocampe	potassique à rectification anormale <i>weaver-GIRK2</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>dégénérescence des neurones des noyaux atteints</li> <li>absences épileptiques</li> <li>stérilité du mâle</li> </ul>	[37]
hyperinsulinémie du nourrisson	cellules $\beta$ pancréatiques	potassique dépendant de l'ATP	hypoglycémie hyperinsulinémique	[38]

des courants membranaires qui traversent ces canaux peut entraîner des maladies (voir Tableau I et [39]), que ce soit une modification liée à la structure des canaux ou à leur distribution. Notons que ces anomalies touchent les cellules musculaires comme les cellules neuronales et tous les types de canaux.

### Final

La régulation synchronisée de l'activité des canaux calciques et potassiques permet d'engendrer une activité rythmique intrinsèque à la cellule conduisant à sa différenciation dont les principales caractéristiques sont la maturation des canaux, l'expression des neurotransmetteurs, le développement morphologique avec formation des connexions synaptiques appropriées. La fréquence de l'activité rythmique apparaît déterminante pour contrôler le développement adéquat de toutes ces caractéristiques de diffé-

renciation cellulaire. Un aspect particulier de la différenciation des cellules neuronales qui peut aussi être contrôlé par l'activité rythmique est leur agencement en réseau. Ce réseau en formation développe une activité rythmique et, une fois son élaboration achevée, il pourra assurer une activité physiologique, qu'elle soit rythmique ou non.

### Reprise

Si les canaux ioniques participent aux échanges entre les milieux extracellulaire et intracellulaire et contribuent ainsi à l'activité électrique des cellules excitables mûres, ils interviennent également de façon prépondérante pour contrôler le développement de ces cellules. Par leur diversité et leur apparition séquentielle au cours de l'embryogenèse, les canaux ioniques permettent la création d'activités rythmiques dont la fréquence, au moins, participe au codage du développement anatomique

et fonctionnel de ces cellules mais aussi de celui des réseaux qu'elles constituent, que ces réseaux soient ou non destinés à engendrer des activités rythmiques à l'âge adulte. Qu'une perturbation quelconque du fonctionnement d'un seul canal ionique apparaisse au cours du développement et tout un réseau peut perdre sa fonction, entraînant des troubles majeurs. Les exemples exposés dans cet article montrent ainsi la grande complexité des phénomènes ioniques liés au développement. En aidant la recherche à progresser dans ce domaine, de nouvelles actions thérapeutiques capables de traiter certaines maladies liées au développement pourront être engagées ■

### Remerciements

Les auteurs remercient particulièrement Yves Frégnac, Daniel Shultz et Robert Gardette pour leurs bouffées de conseils spontanés lors de la maturation de ce manuscrit.



## RÉFÉRENCES

1. Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Ass, Inc, 01375, 1992.
2. Llinas RR. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 1988; 242: 1654-64.
3. Rudy B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 1988; 25: 729-49.
4. Breitwieser GE. Mechanisms of K channel regulation. *J Membrane Biol* 1996; 152: 1-11.
5. Monyer H, Lambolez B. Molecular biology and physiology at the single-cell level. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 382-7.
6. Sheng M, Jan YN, Jan L. The molecular organization of voltage-dependent K channels *in vivo*. *Prog Brain Res* 1995; 105: 87-93.
7. Role LW, Berg DK. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 1996; 16: 1077-85.
8. Bianchi AL, Denavit-Saubié M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties and neurotransmitters. *Physiol Rev* 1995; 75: 1-45.
9. Vernier P, Cardinaud B, Valdenaire O, Philippe H, Vincent JD. An evolutionary view of drug-receptor interaction: the biogenic amine receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 375-81.
10. Bal T, McCormick A. What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron* 1996; 17: 297-308.
11. Yu H, Chang F, Cohen IS. Pacemaker current *I<sub>f</sub>* in adult canine cardiac ventricular myocytes. *J Physiol* 1995; 485: 469-83.
12. Greaves AA, Davis AK, Dallman JE, Moody WJ. Co-ordinated modulation of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents during ascidian muscle development. *J Physiol* 1996; 497: 39-52.
13. Katz B. Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 1949; 3: 285-99.
14. Verkhratsky A, Shmigol A. Calcium-induced calcium release in neurones (review). *Cell Calcium* 1996; 19: 1-14.
15. Simpson PB, Challiss RAJ, Nahorski SR. Neuronal Ca stores: activation and function. *Trends Neurosci* 1995; 18: 299-306.
16. Gu X, Spitzer NC. Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients. *Nature* 1995; 375: 784-7.
17. Gruol DL, Deal CR, Yool AJ. Developmental changes in calcium conductances contribute to the physiological maturation of cerebellar purkinje neurons in culture. *J Neurosci* 1992; 12: 2838-48.
18. Welsh JP, Lang EJ, Sugihara I, Llinas R. Dynamic organization of motor control within the olivocerebellar system. *Nature* 1995; 374: 453-7.
19. Borg-Graham L. Interpretations of data and mechanisms for hippocampal pyramidal cell models. In: Uliniski P, Jones E, eds. *Cerebral cortex, vol 13: Cortical Models*. New York: Plenum Press, 1997. In press.
20. Getting PA. Emerging principles governing the operation of neuronal networks. *Annu Rev Neurosci* 1989; 12: 185-204.
21. Meyrand P, Simmers J, Moulins M. Dynamic construction of a neural network from multiple pattern generators in the lobster stomatogastric nervous system. *J Neurosci* 1994; 14: 630-44.
22. Fortin G, Kato F, Lumsden A, Champagnat J. Rhythm generation in the segmented hindbrain of chick embryos. *J Physiol* 1995; 486: 735-44.
23. Lumsden A. The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends Neurosci* 1990; 13: 329-35.
24. Jacquin TD, Borday V, Schneider-Maunoury S, Topilko P, Ghilini G, Kato F, Charnay P, Champagnat J. Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. *Neuron* 1996; 17: 747-58.
25. Wong ROL, Oakley DM. Changing patterns of spontaneous bursting activity of On and Off retinal ganglion cells during development. *Neuron* 1996; 16: 1087-95.
26. El-Sherif N, Caref EB, Yin H, Restivo M. The electrophysiological mechanism of ventricular arrhythmias in the long QT syndrome. Tridimensional mapping of activation and recovery patterns. *Circ Res* 1996; 79: 474-92.
27. Russell MW, Dick M. The molecular genetics of the congenital long QT syndromes. *Curr Opin Cardiol* 1996; 11: 45-51.
28. Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Shalaby FY, Blamnar MA. KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4017-21.
29. Mercadier JJ, Hatem S, Coraboeuf E. Le syndrome du QT long congénital: c'est bien une affaire de canaux ioniques ! *Med Sci* 1995; 11: 1453-9.
30. Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT. Spectrum of HERG K<sup>+</sup> channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2208-12.
31. Chiesa N, Rosati B, Arcangeli A, Olivetto M, Wanke E. A novel role for Herg K channels: spike-frequency adaptation. *J Physiol* 1997; 501: 313-8.
32. Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, LeBoucq M, Donger C, Barhanin J, Fauré S, Gary F, Coumel P, Petit C, Schwartz K, Guicheney P. A novel mutation in the potassium channel gene *KVLQT1*, causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nature Genet* 1997; 15: 186-9.
33. George AL. Molecular genetics of ion channel diseases. *Kidney Int* 1995; 48: 1180-90.
34. Fahlke C, Beck CL, George AL Jr. A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2729-34.
35. Garcia KD, Beam KG. Reduction of calcium currents by Lambert-Eaton syndrome sera: motoneurons are preferentially affected, and L-type currents are spared. *J Neurosci* 1996; 16: 4903-13.
36. Vincent A, Newland C, Croxen R, Beeson D. Genes at the junction-candidates for congenital myasthenic syndromes. *Trends Neurosci* 1997; 20: 15-22.
37. Silverman SK, Kofuji P, Dougherty DA, Davidson N, Lester HA. A regenerative link in the ionic fluxes through the weaver potassium channel underlies the pathophysiology of the mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15429-34.
38. Nicolino M. Hyperinsulinisme du nourrisson: le rôle-clé des canaux K. *Med Sci* 1997; 13: 276-7.
39. Lehmann-Horn F, Rüdell R. Channelopathies: their contribution to our knowledge about voltage-gated ion channels. *News Physiol Sci* 1997; 12: 105-12.

## TIRÉS À PART

T.D. Jacquin.

### Thierry D. Jacquin

Chargé de recherche au Cnrs, Institut Alfred-Fessard, Cnrs, bâtiment 33, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

### Andrea Yool

Assistant professor, departments of physiology and pharmacology, University of Arizona, Tucson, AZ 85724, États-Unis.

### Évelyne Benoit

Chargée de recherche au Cnrs, Laboratoire de neurobiologie cellulaire et moléculaire, Cnrs, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

### Nicholas C. Spitzer

Professor, department of biology, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, États-Unis.

### William J. Moody

Professor, department of zoology, Box 351800, University of Washington, Seattle, WA 98195, États-Unis.