HAL
open science

Etude du rôle des canaux TRPC6 et de l'antidépresseur hyperforine dans l'homéostasie du zinc dans les neurones corticaux de souris

Julien Gibon

To cite this version:

Julien Gibon. Etude du rôle des canaux TRPC6 et de l'antidépresseur hyperforine dans l'homéostasie du zinc dans les neurones corticaux de souris. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV042 . tel-00634427

HAL Id: tel-00634427

https://theses.hal.science/tel-00634427v1

Submitted on 21 Oct 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Neuroscience - Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Julien GIBON

Thèse dirigée par **Alexandre Bouron**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
dans **l'École Doctorale de Chimie et Science du Vivant**

Etude du rôle des canaux TRPC6 et de l'antidépresseur hyperforine dans l'homéostasie du zinc dans les neurones corticaux de souris.

Thèse soutenue publiquement le **28 septembre 2011**
devant le jury composé de :

Dr Marc Savasta
Président, Grenoble

Dr Bruno Constantin
Rapporteur, Poitiers

Prof Peter Faller
Rapporteur, Toulouse

Prof Buisson Alain
Examinateur, Grenoble

Dr Muriel Bost
Examinatrice, Lyon

Dr Alexandre Bouron
Examinateur et directeur de thèse, Grenoble

Remerciements

Ce projet de thèse s'est effectué dans le Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (UMR5249 CNRS, CEA, UJF). Je remercie Marc Fontecave, directeur du laboratoire lors de mes deux premières années de thèse et Stéphane Ménage, directeur actuel du laboratoire, d'avoir permis à ce projet d'être élaboré dans le laboratoire. Ce projet s'est déroulé au sein de l'équipe CaFe, dirigée par Jean-Marc Moulis puis dans la toute récente équipe BioMet dirigée par Isabelle Michaud-Soret.

Je tiens à remercier Bruno Constantin et Peter Faller d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse ainsi que Marc Savasta, Alain Buisson et Muriel Bost pour leur participation à mon jury de thèse.

Un grand Merci à mon directeur de thèse Alexandre Bouron pour m'avoir permis de réaliser ce projet dans d'excellentes conditions. Merci de m'avoir fait confiance pour porter ce sujet de thèse, pourtant éloigné de mon parcours de Master. Merci pour la façon dont tu as géré les choses, tu es un encadrant de grande qualité, humaine et scientifique. J'ai eu de nombreuses fois l'occasion de vanter tes mérites en tant que directeur de thèse auprès d'étudiants qui postulaient à tes projets, je renouvelle ici ma position à ce sujet ! J'ai apprécié travailler à tes côtés pendant ces trois années, tu m'as appris beaucoup choses d'un point de vue scientifique aussi bien au niveau technique que théorique. Finalement merci de m'avoir ouvert les portes de la Neurobiologie, monde vaste et passionnant. Et merci pour tes conseils de lecture qui nous amenés à échanger sur divers sujets !

Peng, j'ai débuté ma thèse alors que tu entamais ta troisième année de thèse avec Alexandre, je tiens à te remercier pour tout ce que tu m'as appris et pour avoir résisté à toutes mes questions !! J'ai adoré discuté avec toi de nos visions de la vie, de la culture chinoise mais aussi de sciences !
J'ai tenté de continuer au mieux les expériences que tu avais initiées, j'espère que nous aurons d'autres occasions de partager des moments dans l'avenir. Je te souhaite une belle carrière dans le monde scientifique.

Je tiens à te remercier Jean-Marc pour tes conseils et tes réponses à mes questions ainsi que les membres de l'équipe BioMet : Isabelle, Elisabeth, Patrice, Mohamed, Martine, et Roger pour vos critiques lors des présentations de mes travaux. Merci à toi Peggy, tu m'as permis tellement de fois de trouver ce que je cherchais dans le labo et merci pour tes conseils au niveau de la culture cellulaire et pour tes petits « coup de gueule » qui font mine de rien avancer les choses ;).

Merci à toi Sylvain, aux surnoms multiples mais que je vais taire ici…, pour tes nombreux conseils concernant la réalisation des Western Blot. Je crois que tu maîtrises le sujet comme personne au labo ! J'ai apprécié partager tous ces moments autours de la table et pouvoir partager avec toi la découverte du monde de la paternité ! Encore toutes mes félicitations ! Je te souhaite une bonne fin de thèse et un bel avenir scientifique.

Je tiens à te remercier Séverine pour ton aide précieuse dans la gestion de la laverie et pour les coups de main en tant que préparatrice des lamelles pour les expériences d'imagerie et d'électrophysiologie. Mais aussi pour les divers moments de discussion autours du « casse-croute » et dans le labo de … Sylvain.

Merci aux différents collaborateurs avec qui nous avons travaillés :

Valerio Frazzini et Stefano L. Sensi du département de Neuroscience et d'Imagerie de l'université de Chieti (Italie) pour leurs expériences et leur expertise sur le zinc dans les mitochondries.

Pierre Richaud du Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues (CEA, Aix-Marseille) pour la rapidité d'obtention des dosages en métaux de nos échantillons biologiques.

Jean-Christophe Deloulme du GIN (Grenoble) pour les expériences que tu as réalisées au laboratoire et pour tes critiques très pertinentes qui ont fait avancer le projet.

Djoher Nora Abrous du Neurocentre Magendie (Bordeaux) pour m'avoir permis de découvrir le monde de la neurogenèse adulte dans des conditions de travail exceptionnelles, et merci d'avoir apporté ton expertise à ce projet. Merci à Elodie Ladevèze et Tiphaine Chevallier qui m'ont appris les bases expérimentales des techniques de découpe et marquage immunohistochimique pour la quantification de la neurogenèse adulte, et merci d'avoir effectué les divers comptages.

Je remercie l'équipe de l'animalerie du CEA de Grenoble pour leur travail et leur aide au moment des injections d'hyperforine, et toutes les souris qui ont contribuées à l'avancée de mes travaux durant ces 3 années de thèse.

Une dédicace toute spéciale aux différents stagiaires croisés pendant la thèse : Fiona, Flora, Maryline, Emma, Geoffrey, Fabien, Laure, Alexis avec qui j'ai passé d'agréables moments et bonne route à vous !

Pour la promo des thésards 2008 du LCBM : Delphine, Florence, Sylvain, Cheickna, Christophe et Simon, merci d'avoir partagé les différents moments plus ou moins stressant de la thèse et pour tous les petits conseils de chacun pour réussir au mieux. Je vous souhaite une belle suite dans vos carrières respectives et dans la vie en général !

Enfin, au laboratoire, merci aux différents membres avec qui j'ai échangé ou partagé des moments sympathiques autour d'un café ou d'une pâtisserie maison : Christelle, Carole, Babeth, Vincent, Gregory, Séverine, Laetitia, Sandra, Caroline, Sophie et Yohann.

Je remercie les membres de l'association 38Globule, association des Doctorants en Chimie et Biologie de Grenoble, pour laquelle j'ai été vice-trésorier puis secrétaire pendant les 3 années de thèse. Je me permets ici de faire de la pub pour cette asso, qui permet aux doctorants de voir autre chose pendant la thèse, de lever la tête du guidon et d'apprendre à organiser des événements régionaux tel que BIOTechno. Une pensée particulière pour Nicolas, notre président de l'asso en 2010 avec qui nous avons beaucoup partagé ainsi que Florence, Delphine, Louis, Anne-Claire (Présidente actuelle), Sophie, Sandy, Aurélie et la liste est encore longue ! Bonne continuation à l'association, avec tous ses membres qui ont plein d'idées pour la faire avancer, je me range maintenant du coté des anciens !

Je remercie mes parents et mes proches qui ont toujours été là pour me soutenir dans mes choix et pour leur vision extérieure du monde de la recherche ainsi que pour la possibilité de leur présenter mon sujet de thèse en réalisant l'exercice bien difficile de la vulgarisation scientifique « grand public » !

Merci à toi, Najmeh, pour être la femme que tu es, pour ta présence à chaque instant, ton soutien, tes critiques (positives et/ou négatives !) de mes travaux et du monde de la recherche. Et merci d'avoir mis au monde notre enfant, Nathan, qui a raccourci nos nuits et rempli notre cœur de bonheur.

Et finalement, merci aux nombreux écrivains qui sans le savoir m'ont accompagné le temps des trajets jusqu'au labo : G. Muso, B. Werber, M. Levy, A. Robillard, C. Paolini, H. Zinn etc….

à Nathan

Table des matières

TABLE DES FIGURES **4**

TABLE DES TABLEAUX **5**

LISTE DES ABREVIATIONS **6**

OBJECTIFS DE THESE **8**

INTRODUCTION **9**

1. LES CANAUX TRP **10**

1.1 DECOUVERTE DES CANAUX TRP 10
1.2 LES TRP 11
1.3 STRUCTURE DES CANAUX TRP 13
1.4 ACTIVATION DES CANAUX TRP 13
1.4.1 Activation par un ligand *14*
1.4.2 Activation par des stimulations thermiques et mécaniques. *14*
1.5 LES CANAUX TRP : DES SENSEURS CELLULAIRES 14
1.5.1 Des senseurs du goût et des odeurs *14*
1.5.2 Des thermo-senseurs et nocicepteurs *15*
1.5.3 Des mécano-senseurs *16*
1.5.4 Des photo-senseurs *16*
1.5.5 Des canaux sensibles aux stocks internes de calcium ? L'exemple des TRPC. *17*

2. LES CANAUX TRPC6 ..... **19**

2.1 PROPRIETES IONIQUES DU CANAL TRPC6 20
2.2 CONTROLE DE L'ACTIVITE DES CANAUX TRPC6 21
2.2.1 Activation par le diacylglycérol et les composés lipidiques *21*
2.2.2 Les TRPC6 sont-ils aussi des SOC ? *23*
2.2.3 Les canaux TRPC6 sont-ils mécano-sensibles ? *24*
2.2.4 Outils pharmacologiques pour activer les canaux TRPC6 : *25*
2.3 REGULATION DE L'ACTIVITE DES CANAUX TRPC6 26
2.3.1 Régulation par la Protéine Kinase C. *26*
2.3.2 Régulation par les protéines kinases A (PKA) et G (PKG) *28*
2.3.3 Régulation par les tyrosines kinase *29*
2.3.4 Régulation par le calcium et par la calmoduline *29*
2.3.5 Régulation redox des canaux TRPC6 ..... *30*
2.3.6 Régulation par la voie de signalisation Notch *31*
2.3.7 Inhiber spécifiquement les canaux TRPC6 : une impasse pharmacologique. *31*
2.4 ASSOCIATION DES CANAUX TRPC6 AVEC D'AUTRES VOIES D'ENTREE DU CALCIUM 31
2.5 EXPRESSION, FONCTIONS ET PHYSIOPATHOLOGIES DES CANAUX TRPC6 34
2.5.1 Les cellules vasculaires. *34*
2.5.2 Les cellules épithéliales pulmonaires. *35*
2.5.3 Les myocytes et fibroblastes cardiaques. *35*
2.5.4 Tissu sanguin *36*
2.5.5 Les kératinocytes *36*
2.5.6 Les cellules rénales *36*
2.5.7 Les cellules cancéreuses. *37*
2.5.8 Le tissu nerveux *38*
2.5.9 Les canaux TRPC6 dans les neurones corticaux embryonnaires de souris à E13. ..... *41*

3. LE ZINC 46

3.1 INTRODUCTION 46
3.2 HOMEOSTASIE DU ZINC DANS LE CERVEAU 48
3.2.1 Le ZnR, un récepteur sensible au Zinc 51
3.2.2 Les transporteurs membranaires du Zinc 51
3.2.2.1 Les ZnT 51
3.2.2.2 Les ZIP 54
3.2.2.3 Les canaux calciques dépendants du voltage. (VGCC) 56
3.2.2.4 Les canaux AMPA/Kainate. 57
3.2.2.5 Les récepteurs NMDA 58
3.2.2.6 L'échangeur Na^{+}/Zn^{2+} 58
3.2.3 Les pools de zinc intracellulaires 59
3.2.3.1 Le zinc dans les vésicules synaptiques glutamatergiques 59
3.2.3.2 Le pool de zinc mitochondrial 60
3.2.3.3 Les métallothionéines 62
3.2.3.4 Le zinc dans le noyau 65
3.2.3.5 Le zinc dans l'appareil de Golgi 65
3.2.3.6 Le zinc dans le réticulum endoplasmique. 65

4. ZINC, MALADIES NEUROLOGIQUES ET TROUBLES DE L'HUMEUR 68

4.1 LE ROLE DU ZINC DANS L'APOPTOSE ET LA NECROSE 68
4.2 LE ZINC DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER 69
4.3 LE ZINC DANS LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE (ALS) 70
4.4 ZINC ET ISCHEMIE 70
4.5 ZINC ET EPILEPSIE 70
4.6 LA DEPRESSION 71

5. L'HYPERFORINE 75

5.1 UNE MOLECULE AVEC DES ACTIONS ANTIDEPRESSIVES. 76
5.2 L'HYPERFORINE COMME TRAITEMENT CONTRE LA MALADIE D'ALZHEIMER. 78
5.3 PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES ET PRO-INFLAMMATOIRES 78
5.4 UN EFFET ANTIBACTERIEN 78
5.5 DES EFFETS ANTI-TUMORAUX 79

MATERIELS & METHODES 80

1. MATERIELS 81

1.1. ANIMAUX 81
1.2. CULTURE DE CELLULES HEK293 81
1.3. CULTURES PRIMAIRES 81
1.4. MITOCHONDRIES ISOLEES DE CERVEAU 81

2. METHODES 82

2.1. IMAGERIE DE FLUORESCENCE DU CALCIUM 82
2.2. IMAGERIE DE FLUORESCENCE DU ZINC 82
2.3. IMAGERIE SYNCHROTRON 82
2.4. MESURE DE L'EFFLUX DE CALCIUM ET DE ZINC DES MITOCHONDRIES 83
2.5. DOSAGE DES METAUX CELLULAIRES ET TISSULAIRES 83
2.6. ELECTROPHYSIOLOGIE 83
2.7. MESURE DE LA PRODUCTION D'ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE 83
2.8. TEST DE TOXICITE MTT 84

2.9. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial 84
2.10. Mesure de l'expression genique (RT-PCR et qPCR) 84
2.11. Mesure de l'expression proteique (Western blot) 85
2.12. Traitement chronique des souris a l'hyperforine 86
2.13. Neurogenese adulte 86

RESULTATS 89

Article 1 : Implication des canaux TRPC6 dans l'homeostasie du Zinc 90
Introduction 90
TRPC6 channels favour the intracellular accumulation of zinc and regulate the pools of mobile zinc..... 91
Conclusion et perspectives 110

Article 2 : Canaux TRPC6 et canaux capacitifs 117
Introduction 117
Store-depletion and hyperforin activate distinct types of Ca^{2+}-conducting channels in cortical neurons . 118
Conclusion et perspectives 125

Article 3 : Effet de l'hyperforine sur l'homeostasie du calcium et du Zinc 127
Introduction 127
The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria 128
Conclusion et perspectives 139

Article 4 : L'hyperforine modifie les capacites de sequestration du zinc dans les cellules neuronales. 141
Introduction 141
The antidepressant hyperforin changes the zinc-buffering capacities of brain cells 142
Conclusion et perspectives 149

Article 5 : L'hyperforine augmente la phosphorylation de CREB et l'expression de TrkB de façon tissu-specifique sans influencer la neurogenese hippocampique chez la souris adulte 151
Introduction 151
Hyperforin increases the phosphorylation of CREB and the expression of TrkB in a tissue-specific manner 153
Conclusion et perspectives 178

CONCLUSIONS GENERALES 182

ANNEXES 185

Annexe 1 186
The thiol-modifying agent N-ethylmaleimide elevates the cytosolic concentration of free Zn^{2+} but not of Ca^{2+} in murine cortical neurons 186
Annexe 2 194
Biological roles of trace elements in the brain with special focus on Zn and Fe 194

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 206

Table des figures

Figure 1 Decouverte des canaux TRP 10
Figure 2 Le signalplex chez la drosophile 11
Figure 3 Phylogenie des canaux TRP 12
Figure 4 Les differents TRP et leurs caracteristiques structurales 13
Figure 5 Diagramme des thermoTRP 15
Figure 6 L'entree capacitive du calcium 18
Figure 7 Structure et assemblage des TRPC6 20
Figure 8 Courbe (I-V) typique du courant I_{TRPC6} 20
Figure 9 Schema de fonctionnement du couplage GPCR/TRPC6 21
Figure 10 Voies impliquees dans la production du diacylglycerol 22
Figure 11 Implication des canaux TRPC6 dans deux voies d'entree CCE et NCCE 24
Figure 12 L'hyperforine active selectivement les canaux TRPC6 26
Figure 13 La PKC inhibe le courant I_{TRPC6} 27
Figure 14 Schema illustrant la voie de signalisation impliquant TRPC6 et NFAT 28
Figure 15 TRPC6 et couplage avec le NCX 33
Figure 16 Expression de l'ARNm de TRPC6 34
Figure 17 Expression de l'ARNm de TRPC6 dans le cerveau humain 38
Figure 18 Localisations et fonctions des canaux TRPC6 40
Figure 19 Expression des canaux TRPC dans le cerveau entier et dans le cortex des embryons de souris a E13 41
Figure 20 Expression des canaux TRPC6 41
Figure 21 Les canaux TRPC6 sont presents dans le cerveau des embryons murins a E13 42
Figure 22 Canaux TRPC6 fonctionnels dans les cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires 42
Figure 23 Regulation de la reponse OAG dans les neurones corticaux embryonnaires 43
Figure 24 Schema general de la regulation des canaux TRPC6 dans les neurones corticaux embryonnaires 44
Figure 25 Entree du Zn dans les cellules HEK, HEK-TRPC6 et dans les neurones corticaux 45
Figure 26 Differentes roches contenant du zinc 46
Figure 27 Distribution du zinc dans le cerveau chez le rat a differents ages 48
Figure 28 Coupe sagittale de cerveau de rat apres marquage auto metallographique 48
Figure 29 Roles associes a la liberation du Zn contenu dans les vesicules synaptiques 49
Figure 30 Representation schematique de l'effet du Zn dans les neurones 49
Figure 31 Les canaux calciques voltage-dependants sont une voie d'entree du Zn dans les neurones 56
Figure 32 Les canaux calciques AMPA/kainate sont une voie d'entree du Zn dans les neurones et provoquent la production de ROS 57
Figure 33 Images de neurones corticaux en presence de zinquin 60
Figure 34 Colocalisation de la sonde RhodZin-3 et du MitoTracker green 60
Figure 35 Representation schematique des acteurs cellulaires participant a l'homeostasie du Zn 67
Figure 36 Le zinc active diverses voies conduisant a la mort neuronale 68
Figure 37 Le zinc dans la maladie d'Alzheimer 69
Figure 38 Zn vs Antidepresseur dans le traitement de la depression 74
Figure 39 Fleur d'*Hypericum perforatum* 75
Figure 40 Formule chimique de l'hyperforine 76
Figure 41 Effets biologiques associes a l'hyperforine et voies biologiques potentiellement impliquees 79

Table des tableaux

TABLEAU 1 LISTE DES TRP CHEZ LA DROSOPHILE, LE VER, LA SOURIS ET L'HOMME 11
TABLEAU 2 GPCR ACTIVANT TRPC6 21
TABLEAU 3 RECEPTEURS TRK ACTIVANT TRPC6 22
TABLEAU 4 CONTENU EN ZN DANS L'ALIMENTATION. 47
TABLEAU 5 ROLE DU ZN DANS DIVERS FONCTIONS ET PROCESSUS BIOLOGIQUES 50
TABLEAU 6 TABLEAU RECAPITULATIF DE LA DISTRIBUTION TISSULAIRE ET SUBCELLULAIRE DES ZNT PRESENTS CHEZ LES MAMMIFERES AINSI QUE LEUR REGULATION PAR LE ZINC 53
TABLEAU 7 LES ZIP, LOCALISATIONS ET FONCTIONS 55

Liste des abréviations

20-HETE	Acide 20-hydroxyeicosatetraenoique
2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
ADP	Adenosine Diphosphate
AT1	Récepteur à l'angiotensine II
BDNF	Facteur Neurotrophique dérivé du cerveau
BIMPS	Sp-5,6-DCL-cBiMPS
CaM	calmoduline
CCH	Carbachol
CHO	Cellules ovarienne de hamster chinois
CIRB	Site de fixation Calmoduline/IP3
CRAC	Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} currents
DAG	Diacylglycerol
EET	Acide Epoxyeicosatrienoique
EGF	Facteur de Croissance de l'épiderme
FKBP12	FK506-Binding-Protein 12kDA
FSGS	Glomerulosclérose Focale et Segmentaire
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
HEK	Cellule embryonnaires de rein humain
IL-1R	Récepteur à l'interleukine1
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IP3R	Récepteur à l'inositol 1,4,5-trisphosphate
MCU	Uniporteur calcique mitochondrial
MRE	Elément de réponse aux métaux
MTF-1	Facteur de transcription 1 se fixant au MRE
MTs	Métallothioneines
NCX	Echangeur Na^{+}/Ca^{2+}
NMDG	N-methyl-D-glutamine
OAG	1-oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol
OX1 R	Récepteur à l'orexin 1
PAN	Puromycine aminonucleoside
PAR-1	Récepteur activé par les protéases 1
PC12	Cellule de phéochromocytome
PDD	Phorbol-12,13didecanoate
PDE5	Phosphodiesterase 5
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate
PIP_3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLC	Phospholipase C
PMA	phorbol-12-myristoyl-13-acetate
PTK	Protéine tyrosine Kinase
PUFA	Acides gras Polyinsaturés
ROC	Canaux calciques récepteurs dépendants
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAG	1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycerol
SERCA	ATPase Ca^{2+} du reticulum sarco/endoplasmic

siRNA	petits ARN interférents
SOC	Store Operated Channel
STIM1	Stromal Interaction Molecule 1
TGF-β1	Facteur de croissance transformant beta 1
TrkB	Récepteur tyrosine kinase B
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML	Transient Receptor Potential Mucolipin
TRPN	Transient Receptor Potential no mechanoreceptor potential C
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
V1 AVP R	Récepteur V1 Arginine Vasopressine
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
ZIP	Zrt-, Irt-like protein
βNAD^+	βNicotinamide Adénine Dinucléotide

Objectifs de thèse

Les canaux TRPC6 sont des canaux cationiques non sélectifs perméables au calcium, au sodium et au fer. Leur surexpression dans les cellules HEK293 provoque une accumulation de zinc et de soufre. Dans un premier temps, mon travail de thèse a consisté à comprendre ce résultat inattendu et à préciser les conséquences fonctionnelles d'une telle surcharge en zinc. Ce travail a été complété par l'étude des canaux TRPC6 du cortex de souris, regardant notamment leur capacité à faire entrer du zinc dans des neurones en culture.

Les canaux TRPC6 s'ouvrent en réponse à divers stimuli. Par exemple, dans certains types cellulaires, ils peuvent s'ouvrir en réponse à la déplétion des stocks internes calciques. Par ailleurs, l'hyperforine (un antidépresseur d'origine végétale) constitue un puissant activateur des TRPC6. Afin de mieux comprendre leurs propriétés dans les neurones corticaux, j'ai dans un deuxième temps tenté de déterminer si, dans le tissu nerveux, l'hyperforine et la vidange des stocks calciques internes contrôlaient des conductances identiques ou différentes.

L'hyperforine provoque une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. La réponse des neurones à cette molécule consiste en une phase d'entrée de calcium transitoire, précoce, sensible au gadolinium (Gd) (TRPC6 est inhibé par le Gd) et en une phase soutenue, plus tardive et se développant plus lentement, insensible au Gd. La troisième partie de ma thèse a consisté à caractériser cette réponse calcique tardive. Je me suis d'abord intéressé aux conséquences d'une application aigue d'hyperforine puis j'ai analysé, in vitro et in vivo, l'impact d'un traitement chronique avec cet antidépresseur. Les mécanismes cellulaires d'action de ces médicaments sont encore mal compris. Une hypothèse couramment rencontrée dans la littérature propose que l'efficacité thérapeutique des antidépresseurs serait sous-tendue par le facteur de croissance BDNF et une activité accrue de la neurogenèse hippocampique. Ces deux hypothèses ont été vérifiées à la fois in vitro et in vivo afin de mieux comprendre l'effet de l'hyperforine, un antidépresseur naturel couramment prescrit notamment en Allemagne ou aux Etats-Unis et dont l'efficacité dans le traitement des épisodes dépressifs légers à modérés est égale voire supérieure à celle des antidépresseurs synthétiques.

Introduction

1. Les canaux TRP

1.1 Découverte des canaux TRP

En 1969, un mutant spontané de Drosophile (*Drosophila melanogaster*) présentant une anomalie au niveau de l'électrorétinogramme (ERG) est isolé. Chez ce mutant, l'ERG est caractérisé par une réponse transitoire au lieu d'une réponse prolongée telle qu'observée chez les drosophiles sauvages lors d'une illumination (Figure 1).

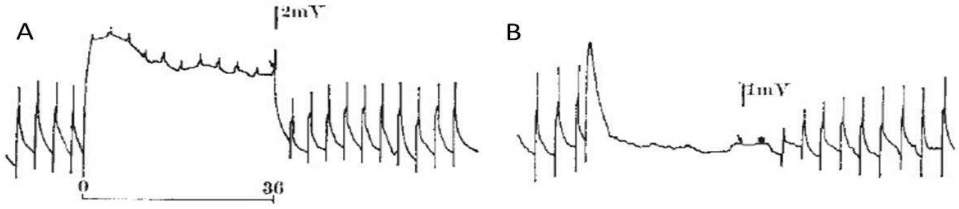


Figure 1 Découverte des canaux TRP
Illustration du rétablissement de l'amplitude maximale de la réponse de l'ERG à un test de flash de lumière de 240 ms suivi d'une période d'adaptation (en seconde) à la lumière chez la drosophile sauvage (A) et mutante (B). (D'après Cosens et Manning, **1969**, *Nature*)[1]

La première hypothèse posée fût que ce phénotype serait due à une anomalie dans la régénération des photopigments[1]. En 1975, une analyse réalisée par Minke montre que l'anomalie se situe à la fin de la cascade de transduction du signal et non au niveau des photopigments. Minke propose alors le terme de potentiel transitoire de récepteur (TRP) à ce mutant[2]. Quatorze ans plus tard, Montell et Rubin clonent la séquence du gène trp responsable du phénotype chez la Drosophile et les premières études décrivant la protéine TRP comme un canal calcique voient le jour[3]. En 1992, le groupe de Kelly découvre l'existence de TRPL, un homologue de TRP puis Zuker montre en 1996 qu'un double mutant *trpl;trp* est aveugle, prouvant que ces canaux sont ceux activés par la lumière dans les cellules photo-réceptrices[4,5]. Chez la drosophile, la photo-transduction utilise une cascade de signalisation impliquant la phospholipase C au sein d'un complexe appelé « signalpex » (Figure 2) composé notamment de la rhodopsine, des canaux TRP et TRPL, de la protéine kinase C et des protéines d'échafaudage INAD. Le résultat final de l'activation de cette cascade est la dépolarisation des cellules photo-réceptrices due à l'ouverture des canaux perméables au sodium et au calcium. Dans ce complexe, les canaux TRP et TRPL ont bien sûr le rôle de canaux cationique mais aussi un rôle d'ancrage du complexe entre les rhabdomères et la membrane plasmique[6].

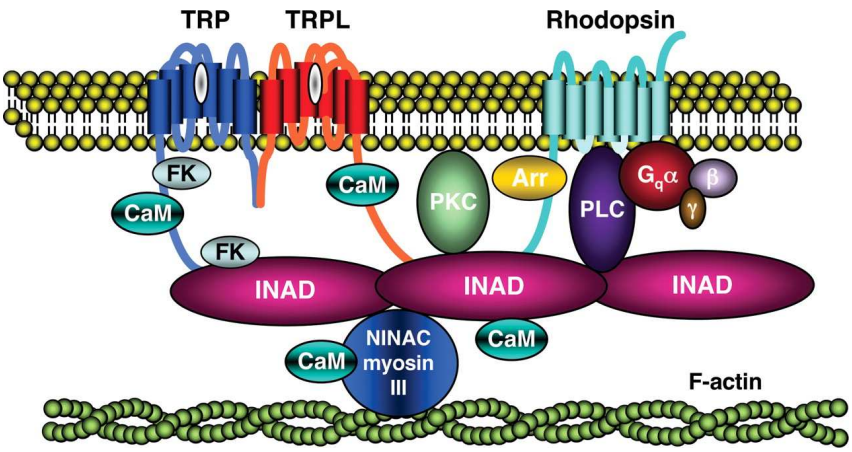


Figure 2 Le signalplex chez la drosophile
Le signalpex ou complexe de signalisation de la photo-transduction, chez la drosophile, est composé des canaux TRP, TRPL, de la rhodopsine, de la protéine kinase C (PKC), de la phospholipase C (PLC), des protéines INAD, calmoduline (CaM), FKBP59 (FK) et de l'arrestine 2 (Arr). (D'après Montell, **2005**, *Journal of Physiology*)[6]

1.2 Les TRP

La super famille des TRP est exprimée dans de nombreux organismes comprenant la levure, la drosophile, le ver, le poisson zèbre, la souris, le rat ou encore l'Homme (Tableau 1).

	Drosophile	Ver	Souris	Homme
TRPC	**3**	**3**	**7**	**6**
TRPV	**2**	**5**	**6**	**6**
TRPM	**1**	**4**	**8**	**8**
TRPA	**4**	**2**	**1**	**1**
TRPP	**4**	**1**	**3**	**3**
TRPML	**1**	**1**	**3**	**3**
TRPN	**1**	**1**	**0**	**0**
Total	**16**	**17**	**28**	**27**

Tableau 1 Nombre de représentants de chaque sous-famille de TRP chez la drosophile, le ver, la souris et l'Homme
(D'après Flockerzi, **2007**, *Handbook of Experimental Pharmacology*)[7].

Les canaux de type TRP jouent des rôles physiologiques divers notamment au niveau sensoriel, de la vision, de l'ouïe, du touché, de l'odorat, du goût ou encore de la thermo-sensation. Les TRP sont activables par une grande variété de stimuli et fonctionnent comme de véritables intégrateurs de signaux.

La superfamille des TRP comprend une trentaine de canaux et se divise en sept sous-familles : TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPA, TRPP et TRPML. Il est possible de diviser les TRP en deux groupes, le 1er présentant des homologies de séquence relativement fortes : TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (Ankyrin), TRPN (no

mechanoreceptor potential C, ou NOMPC). Le second comprend TRPP (polycystin) et TRPML (Mucolipin). A noter que les TRPN ne sont pas présents chez les mammifères.

Les TRP possèdent différents niveaux d'homologies mais tous sont composés de six domaines transmembranaires. Ils peuvent former des homo ou des hétéro-tétramères et leur perméabilité aux cations mono ou divalents varie suivant le canal considéré [8,9] (Figure 3).

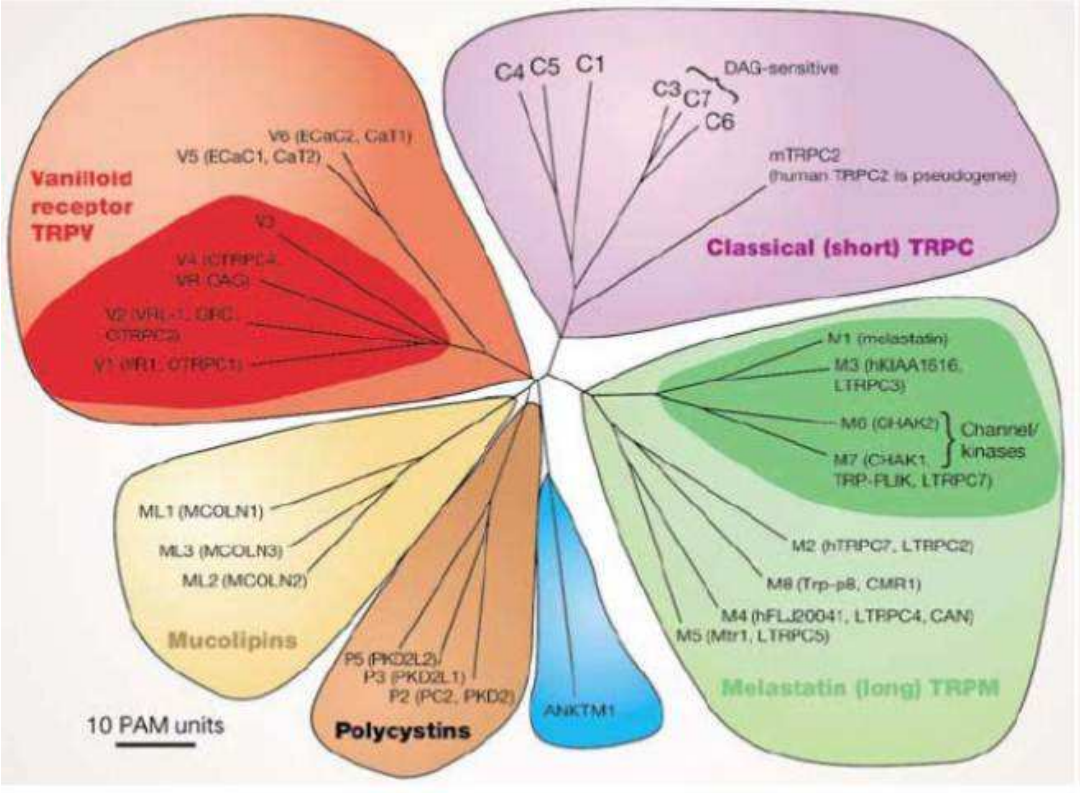


Figure 3 Phylogénie des canaux TRP

(D'après Clapham, **2003**, *Nature*)[10].

1.3 Structure des canaux TRP

Les canaux TRP du 1er groupe sont composés de six domaines transmembranaires avec une boucle participant au pore entre les domaines cinq et six. Les parties N-terminale (N-ter) et C-terminale (C-ter) sont cytoplasmiques et contiennent le domaine TRP pour TRPC, TRPM et TRPN. Les TRP du groupe 1 possèdent plusieurs répétitions du motif Ankyrin dans leur partie N-ter à l'exception des TRPM qui contiennent un domaine kinase en C-ter. Les canaux TRPP et TRPML (du second groupe) ont aussi six domaines transmembranaires mais possèdent une large boucle séparant les domaines 1 et 2. Les motifs TRP ou Ankyrin ne sont pas retrouvés chez les canaux TRP de ce groupe[8,9] (Figure 4).

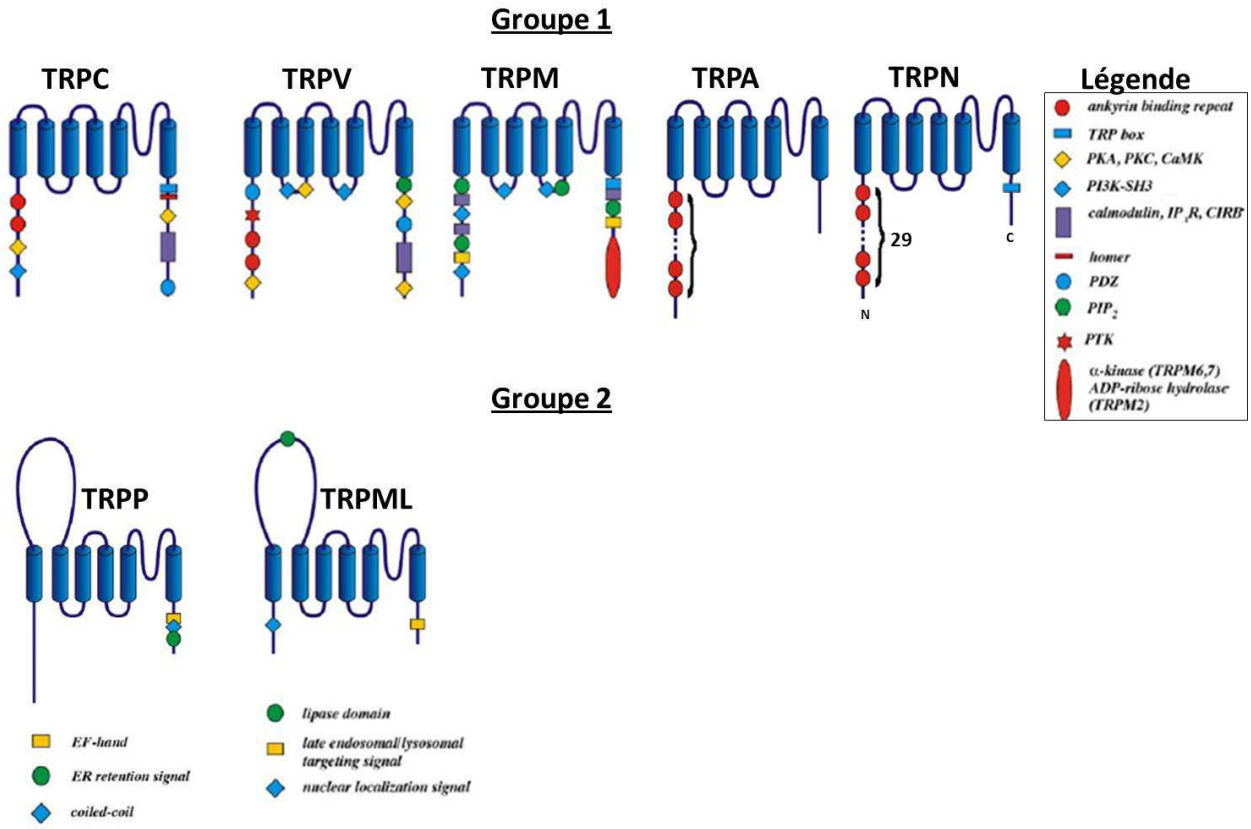


Figure 4 Les différents TRP et leurs caractéristiques structurales
(D'après Pedersen et al., **2005**, *cell calcium* et Venkatachalam et Montell, **2007**, *Annual Review of Biochemistry*)[8,9]

1.4 Activation des canaux TRP

De nombreuses molécules permettent l'activation des canaux TRP. Certains de ces activateurs ont des effets inhibiteurs sur d'autres TRP, par exemple le 2-APB qui est décrit comme agoniste de TRPV1, TRPV2 et TRPV3 alors qu'il bloque TRPV4, TRPV5 ou encore

TRPC3. De façon plus générale, l'activation des canaux TRP peut se faire par l'intermédiaire de divers effecteurs décrits dans les paragraphes suivants[11].

1.4.1 Activation par un ligand

Les ligands activant certains canaux TRP sont classables en quatre catégories :

1) Les molécules organiques exogènes de petites tailles, incluant aussi bien les composés synthétiques que naturels (capsaicine[12], l'iciline[13], le 2-APB[14] ou l'hyperforine[15]).
2) Les lipides ou produits du métabolisme des lipides dont le diacylglycérol[16]. Il est produit suite à l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) activant ainsi les phospholipase C (PLC) qui catalysent l'hydrolyse des phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et en d'inositol (1,4,5) triphosphate (IP3). Les phosphoinositides[17] et eicosanoides[18] activent aussi certains TRP.
3) Les nucléotides de type purine et leurs métabolites comme l'ADP-ribose ou le βNAD^{+}[19].
4) Le peroxyde d'hydrogène [20] et les ions inorganiques comme le lanthane[21], le zinc[22].

1.4.2 Activation par des stimulations thermiques et mécaniques.

Certains TRP dont TRPV1, TRPV3 ou TRPM8 sont activés par la température mais ce mécanisme est encore peu compris. Il existe d'autres mécanismes d'activation possibles comme les stimuli mécaniques ou encore le bourgeonnement cellulaire[23].

1.5 Les canaux TRP : Des senseurs cellulaires

Les canaux TRP ont des rôles divers dans le décodage et la transduction des stimuli sensoriels au niveau du touché, de la perception des températures, de la vision, de l'ouïe et de l'odorat. Au niveau cellulaire les TRP jouent un rôle fondamental dans la perception de l'environnement.

1.5.1 Des senseurs du goût et des odeurs

Décrit chez *Caenorhabditis elegans*, l'étude du gène *osm-9*, codant pour un archétype de TRPV est la première démonstration de l'implication des TRP dans l'odorat [24]. *ocr-2*, un autre gène chez *C.elegans* (codant aussi pour un TRPV) est lui aussi impliqué dans l'olfaction. Ces deux gènes sont exprimés dans les neurones olfactifs et participent probablement à la

transduction des signaux olfactifs. Ces deux gènes jouent aussi une rôle dans la nociception et dans la sensation de l'osmolalité[25,26].

TRPM5 est décrit chez la souris comme important pour la reconnaissance du goût et notamment en ce qui concerne le sucré, l'amer et les acides aminés[27]. TRPC2 (pseudogène chez l'Homme mais exprimé chez la souris) serait aussi impliqué dans la réponse aux phéromones. Par exemple, une souris mâle KO TRPC2 présente un phénotype de non-agression vis-à-vis de l'intrusion d'un autre mâle dans la cage[8,28].

1.5.2 Des thermo-senseurs et nocicepteurs

Il existe plusieurs canaux TRP sensibles aux températures, et certains sont essentiels à la perception de celles-ci, nous parlerons de thermoTRP.

Les canaux TRPV1, TRPV2 sont sensibles aux fortes températures (43°C à >52°C), TRPV3 et TRPV4 à des températures de 25°C à 39°C alors que les canaux TRPM8 et TRPA1 sont sensibles aux températures plus froides (<17°C) (Figure 5). L'implication de TRPM8 dans la perception des températures froides est clairement établie alors que celle de TRPA1 est plus sujette à controverse. D'un point de vue physiologique nous pouvons noter que ces canaux sont sensibles à l'éventail de températures qu'un individu est capable de discriminer[8,29,30].

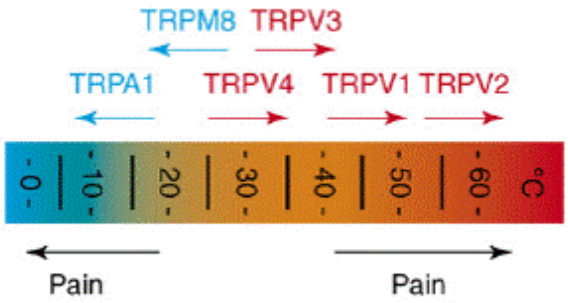


Figure 5 Diagramme des thermoTRP
Ce diagramme des thermoTRP représente les températures d'activation des TRP impliqués dans la perception des températures.
(D'après Talavera, **2008**, *Trends in Neurosciences*)[29].

Le mode d'activation de ces différents canaux par la température n'est pas totalement élucidé, plusieurs hypothèses sont avancées. Il y aurait : 1) Une action directe de la température sur la membrane lipidique induisant un changement d'environnement du canal ; 2) Une action directe de la température sur la conformation du canal ; ou 3) Une production de ligands activant le canal produit par un changement de température. L'activation des canaux par la

température est dépendante du voltage membranaire pour TRPM8 et TRPV1[31]. L'activation par la température provoquerait une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal[32].

1.5.3 Des mécano-senseurs

La stimulation mécanique des cellules peut intervenir dans divers processus tels que l'osmorégulation, l'ouïe ou encore le toucher. De nombreux TRP participent à la transduction de ces processus mécaniques. TRPC1, TRPC3, TRPC6 ainsi que TRPV2 et TRPM4 sont impliqués dans la constriction des vaisseaux sanguins suite à une augmentation de la pression. TRPM7 est aussi impliqué dans un mécanisme de mécano-sensation sensible aux fortes pressions[33,34]. TRPM3 est activé par un stimulus hyper-osmotique, TRPV4 est activé par un stimulus hypo-osmotique, TRPV1 joue un rôle dans la réponse de l'urothélium de la vessie aux tensions, TRPP1 et TRPP2 semblent impliqués dans la mécano-sensation au niveau des cils primaires des cellules épithéliales dans le néphron. Chez la levure, TRPY1 permet à la vacuole de répondre à un stimulus osmotique[35-39].

Chez les vertébrés, les organes de l'ouïe et de l'équilibre utilisent les cellules ciliées pour traduire les vibrations acoustiques (signaux mécaniques) en signaux nerveux. Quatre TRP semblent jouer un rôle dans la transduction de ce signal : TRPN1, TRPML3, TRPV4 et TRPA1. Différentes expériences notamment sur le poisson zèbre ou sur des souris knockout pour ces différents TRP ont montré leur importance dans la prise en charge des signaux auditifs[34,40]. En ce qui concerne le toucher, des souris knockout pour TRPA1 ou TRPV4 présentent une diminution de leur sensibilité aux stimuli mécaniques des voies de la douleur[41,42].

1.5.4 Des photo-senseurs

Les premières descriptions des canaux TRP ont révélé leur implication dans la phosphotransduction chez la drosophile[2]. La perception de la lumière chez les humains ne passe pas par le même mécanisme. En effet, en plus des cellules en cône et en bâtonnet, les mammifères possèdent des cellules ganglionnaires photosensibles. Ces cellules expriment des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) appelés mélanopsines. Les canaux TRPC3 et les mélanopsines sont impliqués dans la phosphotransduction[40,43,44]. TRPC6 et TRPC7 semblent aussi participer à ces processus de phototransduction[45].

1.5.5 Des canaux sensibles aux stocks internes de calcium ? L'exemple des TRPC.

Les canaux sensibles aux stocks internes de calcium sont les « store operated channels », ou « store operated calcium entry channels » (SOC). Ils sont activés suite à une diminution des stocks intracellulaires calciques (typiquement du réticulum endoplasmique). L'activation de GPCR ou de récepteurs à activité tyrosine kinase peut recruter les PLC et ainsi permettre l'hydrolyse du PIP2 en DAG et IP3. L'IP3 va se fixer à son récepteur IP3R sur le réticulum endoplasmique et induire la libération du calcium depuis ce compartiment. L'activation des SOC conduit alors à une entrée de calcium dans la cellule, on parle d'entrée capacitive du calcium. Les canaux CRAC (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} currents) font partie de cette famille de canaux activés en réponse à la déplétion des stocks internes de calcium. L'identification des acteurs composant les canaux SOC est un objet de débats depuis plusieurs années et récemment deux familles de protéines participant à ce processus ont été identifiées : STIM (STIM1 et STIM2) et Orai (Orai1, Orai2 et Orai3). STIM1 est considéré comme le senseur calcique du réticulum endoplasmique et Orai1 est la sous-unité qui forme le pore des canaux CRAC. Cependant, la contribution des canaux TRP dans ce processus pose question. Plusieurs études proposent une action de certains TRPC dans l'entrée capacitive du calcium (Figure 6). Le débat est très controversé quant au rôle de TRPC1 dans les SOC. Plusieurs publications penchent en faveur d'une implication de ces protéines dans les SOC dans différents types cellulaires[46-50] et récemment une interaction entre TRPC1-Orai1 et STIM1 a été mise en évidence[51]. Cependant, d'autres groupes utilisant des techniques proches et dans des lignées cellulaires identiques ne démontrent pas le rôle de TRPC1 dans les SOC[52,53]. Chez des souris $TRPC1^{-/-}$ l'entrée de calcium en réponse à la déplétion des stocks internes ne semble pas être affectée[54,55]. L'environnement de TRPC1 (surexpression, expression d'autres TRPs...) pourrait expliquer en partie la différence dans les résultats publiés à ce jour[56]. Chez la souris, l'expression de TRPC2 augmente l'entrée de calcium suite à un traitement à la thapsigargine, ce qui suggère un rôle probable de ces canaux dans les SOC (chez la souris uniquement car absent chez l'Homme)[57]. Comme pour TRPC1, l'implication de TRPC3 dans les SOC est débatue. Dans les cellules HEK293 ou dans les cellules A431, la suppression de TRPC3 diminue l'activité SOC de ces cellules [49,58]. Cependant une souris KO pour TRPC3 ne présente pas de défaut au niveau de son activité SOC[59]. Le rôle de TRPC4 et TRPC5 est aussi sujet à controverse. La suppression de ces canaux dans plusieurs types cellulaires tend à montrer leur implication dans les SOC[60,61]. De plus, les souris déficientes pour TRPC4 ne présentent plus d'activité SOC[62]. Cependant d'autres études ne démontrent pas ce rôle associé à TRPC4 et TRPC5[63,64]. Le débat existe aussi pour TRPC6 que nous aborderons dans la partie

2.2.2. En ce qui concerne TRPC7, son implication dans les SOC est discutée : L'expression stable de TRPC7 conduit à la formation de canaux à la fois sensibles au diacylglycerol[65] et à la formation de canaux de type SOC[66] tandis que l'expression transitoire de TRPC7 ne forme pas de SOC[67].

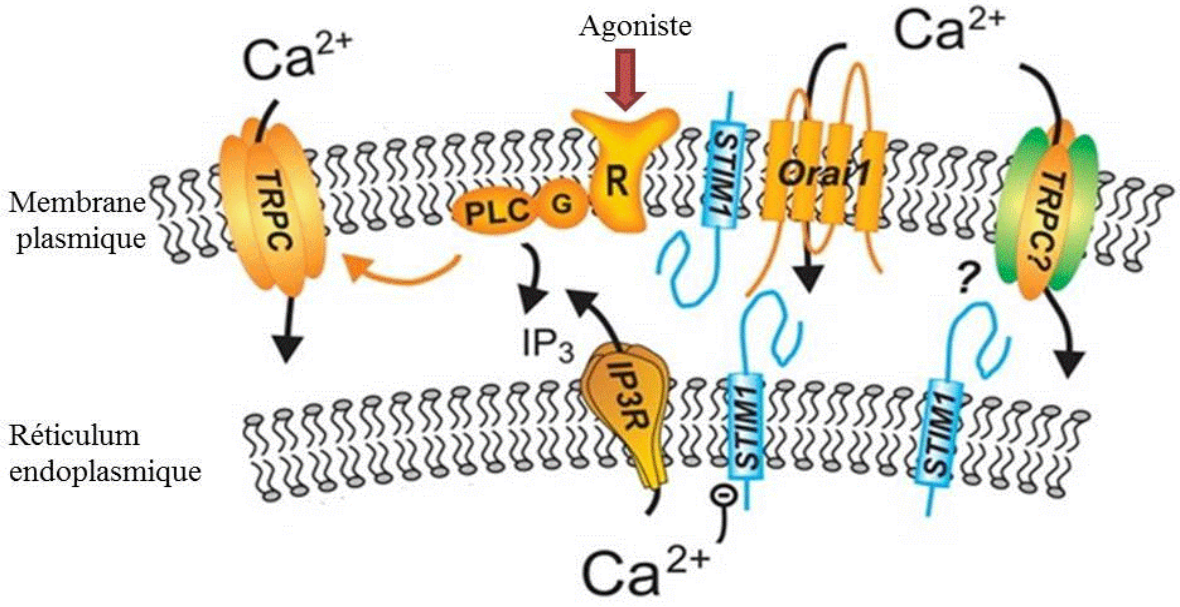


Figure 6 L'entrée capacitive du calcium
L'activation d'un récepteur (R) de la membrane plasmique par un agoniste entraine la production d'IP3 qui active le récepteur à l'IP3 (IP3R) provoquant une libération du calcium depuis le réticulum endoplasmique. Cette déplétion en calcium aurait pour conséquence une relocalisation de STIM1 vers une région proche d'Orai1 à la membrane plasmique provoquant l'activation d'Orai1 par un mécanisme inconnu. L'activation d'Orai1 conduit à une entrée de calcium dans la cellule. L'implication des canaux TRPC dans ce mécanisme est encore très largement débattue.
(D'après Putney, **2007**, *Journal of Cell Science*)[68]

Parmi l'ensemble des canaux TRPC, nous allons nous intéresser aux canaux TRPC6 et plus précisément au niveau du cortex de la souris. Les canaux TRPC6 sont impliqués dans plusieurs fonctions au niveau neuronal. Ils jouent un rôle dans la croissance et la densification du réseau dendritique, dans le guidage des cônes de croissance neuronaux ou encore dans la protection des neurones lors d'ischémie. TRPC6 est surexprimé dans les glioblastomes multiformes où ils contrôlent la croissance tumorale. Compte tenu des rôles physiopathologiques joués par ces canaux, il est essentiel de préciser leurs propriétés et les processus biologiques qu'ils contrôlent.

2. Les canaux TRPC6

Chez l'Homme, le gène codant pour TRPC6 est situé sur le chromosome 11q21-q22 et possède 13 exons, codant pour une protéine de 931 acides aminés (aa). Chez la souris, il est localisé sur le chromosome 9 et la protéine comprend 930 aa. Le clonage et l'expression de l'ADNc de TRPC6 ont été obtenus à partir de la séquence d'ARNm de TRPC6 de cerveau de souris. Ce clonage a été réalisé dans les cellules COS de façon transitoire et de façon stable dans les cellules HEK293[69].

La protéine est localisée à la membrane plasmique avec les extrémités N et C terminales en position intracellulaire. Elle est composée de 6 hélices transmembranaires (S1-S6) et possède une boucle participant à la formation du pore entre les domaines transmembranaires S5 et S6. Les canaux TRPC6 possèdent 2 sites de glycosylation : Asn ^{473} sur la première boucle extracellulaire et Asn ^{561} sur la seconde[70] ainsi que 4 sites de phosphorylation identifiés : sérine 768[71], sérine 448[72], thréonine 69[73] et sérine 814[74].

Dans sa partie N-terminale, TRPC6 possède 3 domaines ankyrine (Figure 7) pouvant interagir avec des partenaires intracellulaires, un domaine coiled coil et un site de fixation à la cavéoline. Le second domaine ankyrine interagit avec MxA, un membre de la superfamille des dynamines[75].

En C-ter, TRPC6 contient les deux TRP box caractéristiques : la box 1 EWKFAR conservée dans toute la famille des TRPC et la box 2 riche en proline[8]. TRPC6 possède 2 domaines de fixation à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) dont le second coïncide avec un domaine de fixation à la calmoduline : le CIRB (calmodulin/IP3 receptor binding)[70,76].

TRPC6 s'assemble en homo- ou hétérotétramères avec TRPC3/6/7. De nouvelles combinaisons avec TRPC1-TRPC4/5 ont été identifiées dans des cerveaux embryonnaires de rat[77]. Dans les cellules PC12, TRPC6 est associé à un complexe multi protéiques contenant notamment la protéine kinase C, la FK506-binding-protéin 12kDA (FKBP12) et la calcineurine/calmoduline[71]. Dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires, la PTEN (phosphatase and tensin homologue) s'associe à TRPC6 et lui sert de protéine d'échafaudage pour son expression à la surface de la cellule[78].

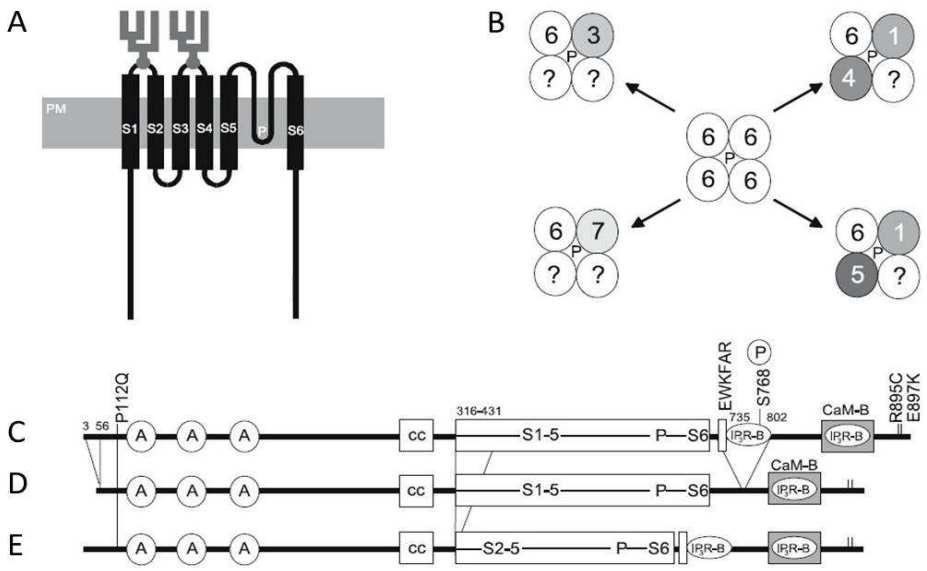


Figure 7 Structure et assemblage des TRPC6

A) Structure des TRPC6, les deux sites de glycosylation sont visibles en gris, les six domaines transmembranaires (S1-S6) et la boucle formant le pore (p).
B) Assemblage en hétérotétramères possibles avec les canaux TRPC1 (1), TRPC3 (3), TRPC4 (4), TRPC5 (5), TRPC6 (6), TRPC7 (7). **C**) Domaines structuraux de TRPC6 et variantes observées **D** (Zhang and Saffen ,**2001**) et **E** (Corteling *et al*, **2004**). P112Q, R895C et E897K sont des mutations « gain de fonction » retrouvées dans les cas de FSGS (chapitre *2.5.6*)[70].

2.1 Propriétés ioniques du canal TRPC6

TRPC6 est un canal calcique non sélectif aux cations possédant une conductance unitaire de 28-37pS. La perméabilité au calcium est 5 fois plus importante que la perméabilité au sodium[16]. Les courants passant à travers TRPC6 présentent une rectification double, à la fois entrante et sortante[79].

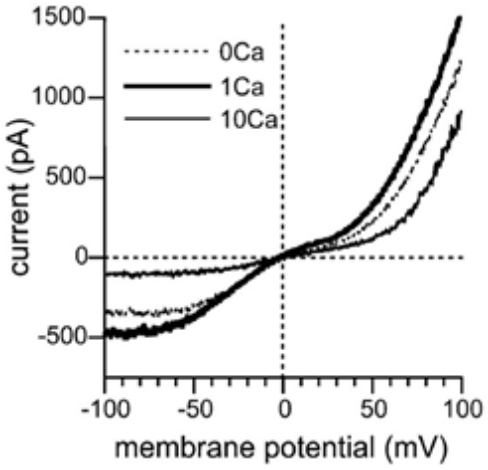


Figure 8 Courbe (I-V) typique du courant I_{TRPC6}

Courbe (*I*-V) typique du courant I_{TRPC6} à différentes concentrations en calcium externe en présence de CCh. (D'après Shi *et al*, **2004**, *The Journal of Physiology*)[79]

2.2 Contrôle de l'activité des canaux TRPC6

2.2.1 Activation par le diacylglycérol et les composés lipidiques

Les canaux TRPC6 sont classiquement décrits comme s'ouvrant suite à l'activation de certains récepteurs couplés aux protéines G (on parle alors de ROC). L'activation des GPCR conduit à l'activation de la PLC-β favorisant ainsi la production de DAG stimulant l'ouverture des canaux TRPC6 (Figure 9). De plus, l'activation des récepteurs muscariniques (GPCR) augmente l'insertion de TRPC6 à la membrane plasmique [80].

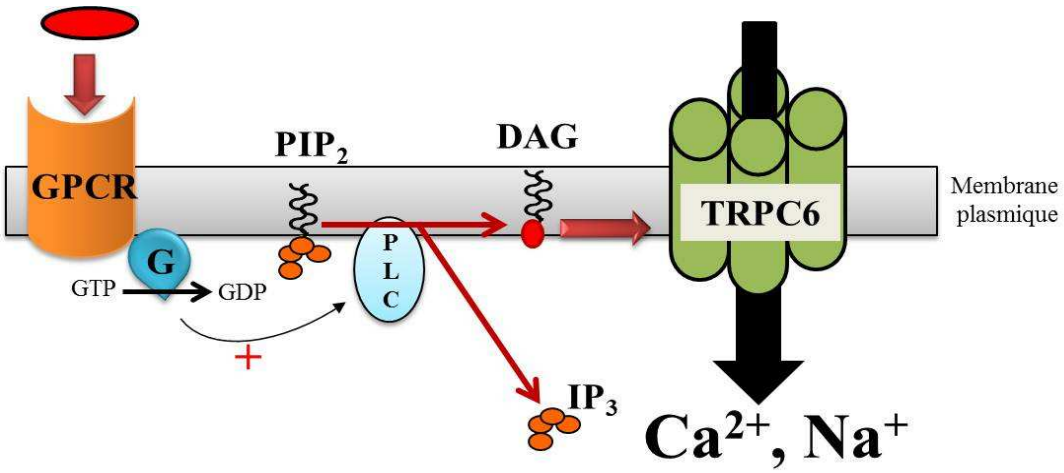


Figure 9 Schéma de fonctionnement du couplage GPCR/TRPC6
L'activation du GPCR par un agoniste entraine l'activation de la phospholipase C (PLC) induisant la production de DAG et d'IP3 à partir de PIP2. Le DAG peut ensuite activer l'ouverture des canaux TRPC6.

Les différents GPCR activant les canaux TRPC6 sont listés dans le tableau 2.

Récepteurs couplés aux protéines G activant TRPC6	Types cellulaires	références
Adrénocepteur α 1	Myocytes de veines portes	81
Angiotensine II (AT1)	Cardiomyocytes	82,83
Bradykinine B2	Neurones sympathiques	84
Histamine H1	Cellules CHO	16
Muscarinique M1	Neurones sympathiques	84
Muscarinique M3	Cellules HEK293	85
Muscarinique M5	Cellules COS	69
Orexine (OX1 R)	Neuroblastome IMR-32	86
Purinergique P2Y	Cellules de muscles lisses d'aorte	87
Sérotonine	Cellules A7r5 (muscles lisses vasculaires)	88
Trombine (PAR-1)	Cellules endothéliales	89
Vasopressine (V1 et V1a AVP R)	Cellules HEK293 et A7r5	88,90

Tableau 2 GPCR activant TRPC6

Certains récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (Tableau 3) sont aussi impliqués dans l'ouverture des canaux TRPC6 grâce à la phosphorylation de la PLC-γ qui entraine une production accrue de DAG. Les canaux TRPC6 seraient aussi activés par l'interleukine-1β via sa fixation sur son récepteur (l'IL-1R) dans les astrocytes[91].

Récepteurs tyrosine kinase activant TRPC6	Types cellulaires	références
PDGF	Cellules A7r5 (muscles lisses vasculaires)	88
EGF	Cellules COS	92
BDNF (TrkB)	Cellules granulaires cérébelleuses de rat	93
VEGF	Cellules HEK293	94

Tableau 3 Récepteurs TRK activant TRPC6

Le DAG va aussi servir dans la formation des acides gras polyinsaturés (PUFA) sous l'action de la DAG lipase ou être transformé en acide phosphatidique par l'intermédiaire de la DAG kinase (Figure 10).

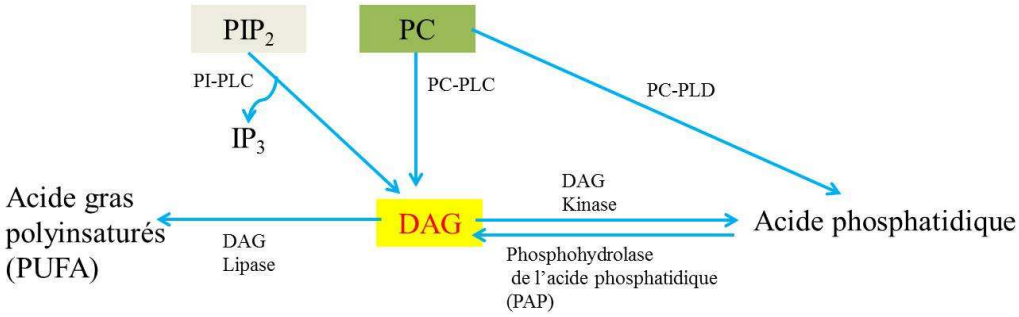


Figure 10 Voies impliquées dans la production du diacylglycérol
Production du diacylglycérol (DAG) à partir du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) et de la phosphatidylcholine (PC). Ce schéma présente aussi les voies métaboliques basées sur l'action de la DAG lipase et de la DAG kinase.

Les canaux TRPC6 sont régulés par un certain nombre de ces composés lipidiques. Tout comme pour les canaux TRPC3 et TRPC7, les canaux TRPC6 sont activables par le diacylglycérol ou ses analogues perméants comme le 1-oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG) et le 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycerol (SAG). Cette activation induit une entrée de calcium et de sodium indépendamment de l'activation de la protéine kinase C[16,95]. L'acide arachidonique et ses métabolites sont aussi des activateurs des canaux TRPC6 : l'acide 20-hydroxyeicosatetraenoique (20-HETE) active l'ouverture des canaux[96] tandis que l'acide epoxyeicosatrienoique (EET) stimule la translocation des canaux TRPC6 vers la membrane plasmique des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines[97]. Le EET augmente l'expression des canaux TRPC6 dans les cellules de muscles lisses d'artères pulmonaires chez

le rat[98]. L'IP_3, produit de l'hydrolyse du PIP_2, est aussi impliqué dans la régulation des canaux TRPC6 des myocytes de veines portes de lapin. L'IP_3 augmente la probabilité d'ouverture des canaux en réponse à l'OAG[99]. L'IP_3 aurait cette action en levant l'inhibition du PIP_2 sur les canaux TRPC7 qui forment des canaux hétérotétramériques avec les canaux TRPC6 dans les cellules de veines portes[100]. Mais l'action du PIP_2 sur les canaux TRPC6 est sujette à de nombreuses controverses. Le PIP_2 est premièrement décrit comme un régulateur positif des canaux TRPC6 dans un modèle de sur-expression[101] alors que dans les myocytes d'artères mésentériques, le PIP_2 exerce une forte inhibition de la réponse des canaux TRPC6 à l'angiotensine II et à l'OAG[102]. Le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP_3) est aussi un régulateur positif des canaux TRPC6, à la fois dans un modèle de sur-expression[103] et dans un modèle d'expression endogène dans lequel PIP_3 perturbe la liaison de la CaM avec TRPC6[104]. Enfin, la podocine, une protéine de la membrane plasmique impliquée dans la glomérulosclérose focale et segmentaire, augmente l'activité des canaux TRPC6 lorsqu'elle est liée au cholestérol[105].

L'ensemble de ces études démontre l'importance de la phospholipase C par le biais de divers récepteurs (couplés aux protéines G ou à activité tyrosine kinase) sur l'ouverture des canaux TRPC6 dans de nombreux modèles d'étude confortant ainsi l'hypothèse que les canaux TRPC6 sont des ROC.

Cette hypothèse est néanmoins contrebalancée par des études montrant l'activation des canaux TRPC6 suite à la déplétion des stocks internes de calcium.

2.2.2 Les TRPC6 sont-ils aussi des SOC ?

L'entrée du calcium dans les cellules en réponse à une déplétion des stocks internes se produit suite à l'activation des canaux SOC de la membrane plasmique. Des inhibiteurs des pompes SERCA du réticulum endoplasmique comme la thapsigargine ou l'acide cyclopiazonique sont couramment utilisés pour étudier une réponse de type SOC. Les protéines Orai1 et STIM1 ont récemment été décrites comme les actrices du courant I_{crac}. L'hypothèse de l'implication des canaux TRPC dans le complexe membranaire associé à Orai fait l'objet de nombreuses recherches et plusieurs études ont montré le rôle des canaux TRPC6 dans ce processus. Par exemple, dans les cellules HEK293 sur-exprimant TRPC6, l'expression d'Orai conduit à une augmentation de la réponse SOC[106]. Dans les cellules de muscles lisses vasculaires pulmonaires, le PDGF active la prolifération cellulaire via la voie c-jun/STAT3 augmentant l'expression de TRPC6 et l'entrée capacitive du calcium[107]. Dans

les cellules Huh-7 (hépatome), la sur-expression des canaux TRPC6 augmente l'entrée calcique par la voie SOC[108]. Dans les plaquettes humaines, TRPC6 est associé à la réponse SOC en coexistant au sein d'un complexe multi protéiques avec TRPC1, IP3R, SERCA3[109] et STIM1[110]. Des travaux tentent de réconcilier l'hypothèse de l'implication des canaux TRPC6 à la fois dans un processus d'entrée capacitive du calcium et dans un processus non capacitif dans les plaquettes. Les canaux TRPC6 seraient soit en interaction avec Orai1 et STIM1 (SOC) soit en interaction avec TRPC3 pour former des canaux non capacitifs. Ce phénomène serait régulé par la concentration calcique interne [111,112] (Figure 11).

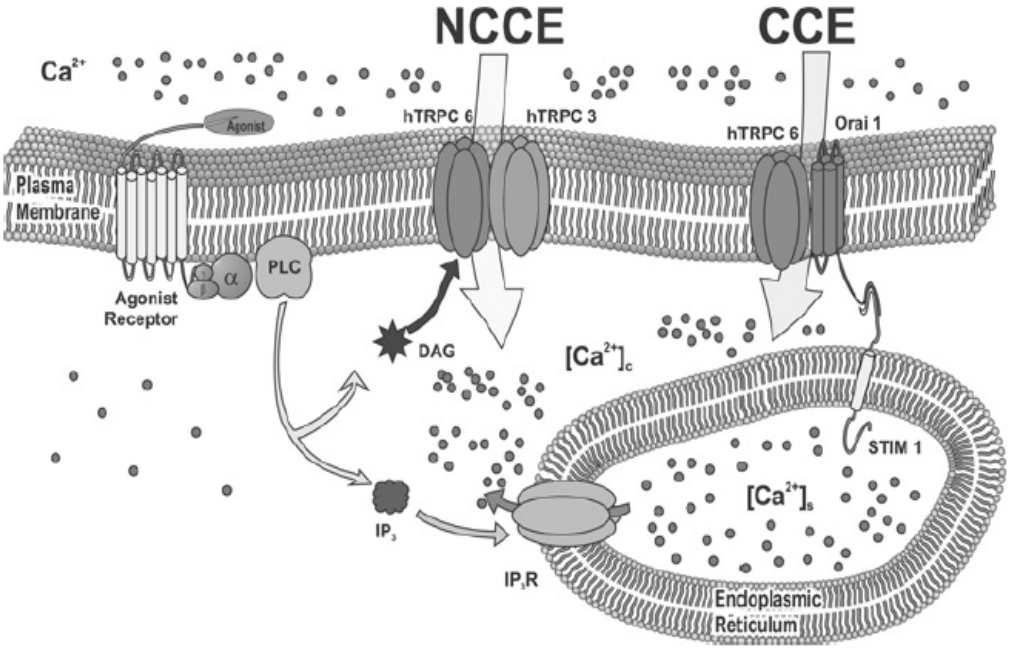


Figure 11 Implication des canaux TRPC6 dans deux voies d'entrée CCE et NCCE
NCCE : non capacitative calcium entry, CCE : capacitative calcium entry (ou SOC). Dans ce schéma, les auteurs tentent de réconcilier les deux hypothèses sur l'implication des canaux TRPC6 dans l'entrée de calcium. La NCCE mettant en jeu les canaux TRPC3 associés aux canaux TRPC6 et la CCE mettant en avant le rôle de STIM1 et Orai1.
(D'après Jardin *et al.*, **2009**, *Biochemical Journal*)[111].

2.2.3 Les canaux TRPC6 sont-ils mécano-sensibles ?

L'hypothèse d'une activation des canaux TRPC6 par des stimuli mécaniques est relativement controversée. Dans un premier temps, une étude a démontré le rôle direct des canaux TRPC6 en tant que senseur des tensions membranaires induites mécaniquement ou par des changements osmotiques. Le peptide de tarentule GsMTX-4 inhibe ce phénomène et l'activation des canaux par l'OAG ce qui suggère que les canaux TRPC6 sont sensibles à diverses modalités d'activation[113].

Dans les cellules de myocytes ventriculaires de souris, le courant ionique via les canaux TRPC6 est régulé de façon mécano-sensible. L'activation des canaux TRPC6 par une tension de la membrane peut influencer l'entrée de calcium soit via la dépolarisation membranaire soit en augmentant l'activité de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} [114]. Dans les ganglions de la racine dorsale, TRPC6 et TRPC1 agissent avec TRPV4 dans un mécanisme impliquant la sensibilisation des nocicepteurs provoquant une hyperalgésie mécanique[115]. Ces résultats diffèrent cependant de ceux obtenus lors d'une étude montrant que la tension membranaire ne semble pas influencer de façon aussi directe l'activité des canaux TRPC6. Dans les cellules de muscles lisses vasculaires, les récepteurs couplés aux protéines Gq/11 sont mécano-sensibles. Ils fonctionnent comme des senseurs de la tension membranaire et provoquent l'activation des canaux TRPC6 par l'intermédiaire des protéines G et de la PLC[116]. Cette observation a été confirmée par des travaux récents présentant l'activation des canaux TRPC6 par une stimulation mécanique comme secondaire à la production de 20-HETE (un métabolite de la PLA_2/ω-hydroxylase), et concluant que les canaux TRPC6 ne sont pas directement mécano-sensibles[117].

2.2.4 Outils pharmacologiques pour activer les canaux TRPC6 :

L'acide Flufénamique

L'acide flufénamique (FFA) est un bloqueur des canaux TRPC3 et TRPC7. Son action sur les canaux TRPC6 a été testée sur des cellules HEK et A7r5. Dans les deux cas, le FFA conduit à une augmentation de l'amplitude du courant à travers TRPC6[81,88]. L'utilisation de podocytes immortalisés transfectés par un dominant négatif de TRPC6 a permis d'observer que le FFA activait les canaux TRPC6, augmentant le calcium intracellulaire[118]. Cependant, des résultats différents ont été observés sur des neurones corticaux embryonnaires (qui expriment TRPC6) et sur des cellules HEK293 où la réponse FFA est la même en présence ou en absence de calcium extracellulaire. Les signaux calciques observés ne seraient donc pas produits par une entrée de calcium dans ces cellules mais plutôt par une libération de celui-ci depuis les stocks internes. L'utilisation de mitochondries isolées montre que ces organites libèrent du calcium en réponse au FFA. Par ailleurs, la réponse SOC en présence de FFA est considérablement réduite par rapport à celle observée dans les cellules non traitées (des résultats similaires sont trouvés avec le FCCP, un protonophore mitochondrial)[119]. Le FFA ne semble finalement pas être un agoniste sélectif des canaux TRPC6.

L'hyperforine

L'hyperforine est un des composants bioactifs du millepertuis perforé ; il active les canaux TRPC6 sans affecter les autres canaux TRPC[15,120] (Figure 12).

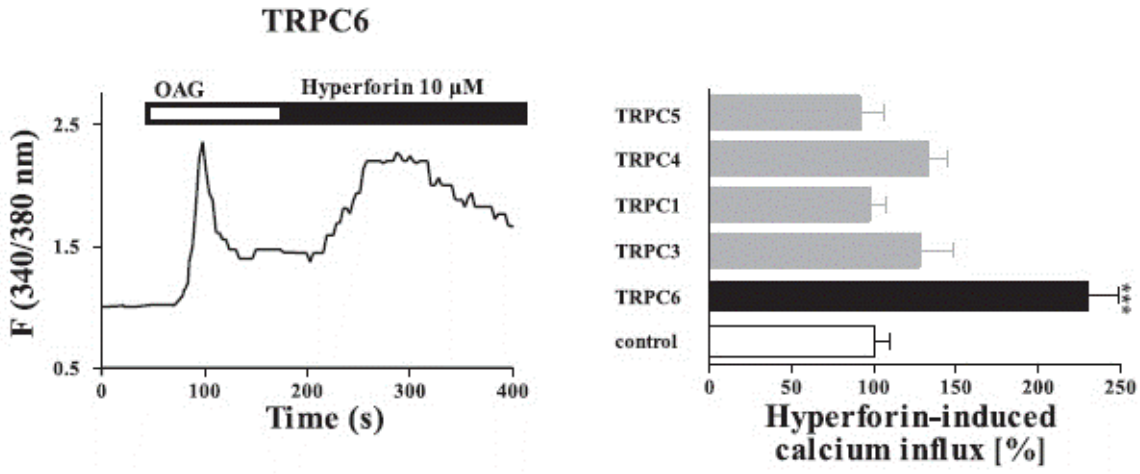


Figure 12 L'hyperforine active sélectivement les canaux TRPC6
A) Cellules HEK293 exprimant TRPC6 et stimulées par l'OAG (100 µM) puis application d'hyperforine 10 µM. Les deux traitements induisent une augmentation du calcium intracellulaire. **B**) Résumé de l'expérience (**A**) réalisée sur des HEK293 exprimant différents TRPC ou qui ne sur-expriment pas de TRPC (control). Les cellules exprimant les canaux TRPC6 ont une réponse significativement différente des cellules contrôles. ***p<0,001 *t-Test.* (D'après Leuner *et al.*, **2007**, *FASEB*)[15].

L'activation des canaux TRPC6 par l'hyperforine augmente la concentration intracellulaire en calcium. Appliquée de façon chronique, l'hyperforine stimule la croissance des neurites des cellules PC12[15] et favorise la différentiation des kératinocytes[120,121]. L'hyperforine provoque une perte du potentiel de la membrane mitochondriale[122,123], induisant aussi une libération de calcium et de zinc depuis ce compartiment[123].

2.3 Régulation de l'activité des canaux TRPC6

2.3.1 Régulation par la protéine kinase C

Les canaux TRPC6 sont activables par le diacylglycérol (chapitre *2.2.1*). Cependant le DAG est un activateur de certaines protéines kinases C (PKC). La question du rôle de la PKC sur la régulation des canaux TRPC6 a donc été posée. Une des premières descriptions des canaux TRPC6 a révélé que leur activation par le DAG se fait de façon indépendante de la PKC. En effet, l'ajout d'activateur ou de bloqueur de PKC comme le phorbol-12,13 didecanoate (PDD), le phorbol-12-myristoyl-13-acetate (PMA) ou encore la staurosporine ou le bisindolylmaleimide n'empêche pas l'influx de Mn^{2+} en réponse à l'OAG[16,85]. Le résultat

est identique avec d'autres molécules soit activatrices de la PKC comme le phorbol 12,13 dibutyrate soit inhibitrices comme la calphostine C[81]. Dans les neurones corticaux, l'ajout de PMA ou de GF109203X (un inhibiteur de PKC) ne modifie pas la réponse OAG[95]. Néanmoins, dans certains cas, la PKC exercerait une action régulatrice sur TRPC6. Dans le chapitre *2.2.1*, nous avons abordé la stimulation des canaux TRPC6 en réponse à l'activation de certains récepteurs. Le carbachol (CCh, activateur des récepteurs muscariniques) est couramment utilisé à cet effet pour produire une entrée de calcium via les canaux TRPC6. Par des techniques d'électrophysiologie sur des cellules HEK sur-exprimant TRPC6, le PMA (activateur de PKC) réduit le courant induit par le CCh (mais pas celui induit par l'OAG)[85]. L'utilisation de la calphostine C ou de peptides inhibiteurs de la PKC provoque une levée d'inhibition des canaux TRPC6 suite à l'activation par le CCh[79] (Figure 13).

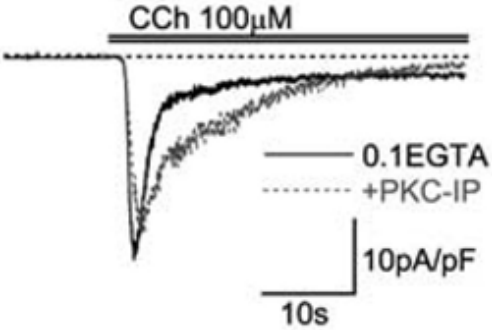


Figure 13 La PKC inhibe le courant I_{TRPC6}
La PKC inhibe le courant *I*TRPC6 produit par le CCh. L'ajout d'inhibiteur de PKC, ici le peptide IP_{19-36} 5 µM lève cette inhibition.
(D'après Shi et al, **2004**, *Journal of Physiology*)[79].

Dans les cellules PC12, l'activation des récepteurs muscariniques M1 conduit à la formation d'un complexe transitoire et réversible entre ces récepteurs, TRPC6 et la PKC. Dans ce complexe, la PKC phosphoryle TRPC6 sur la sérine 768. Le complexe est associé à l'immunophiline FKPB12, à la calcineurine et à la calmoduline. La phosphorylation des canaux TRPC6 est corrélée à une inhibition qui peut être levée par l'ajout de GF109203X (un inhibiteur de PKC)[71]. Dans les cellules de muscles lisses d'artères mésentériques de lapin, la chélérythine (inhibiteur de PKC) lève l'inhibition produite par le calcium (Chapitre *2.3.4*) et augmente l'activité des canaux TRPC6 en réponse à l'angiotensine II[124]. Enfin, la PKC est capable de phosphoryler les canaux TRPC6 sur la sérine 448. Cette phosphorylation conduit elle aussi à l'inhibition des canaux[72].

2.3.2 Régulation par les protéines kinases A (PKA) et G (PKG)

Les études traitant de la régulation des canaux TRPC6 par la PKA ou la PKG sont peu nombreuses comparées à celles traitant de la PKC. L'analyse de la séquence primaire de TRPC6 (humaine) montre la présence de séquences consensus pour la PKA et la PKG. Les canaux TRPC6 forment un substrat pour la PKA mais leur phosphorylation à l'aide d'activateur de PKA comme le Sp-5,6-DCL-cBiMPS (BIMPS) ne semble pas réguler l'entrée de calcium en réponse à l'OAG[125]. Dans les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC), l'inhibition de la PKA par le Rp-cAMP empêche la translocation des canaux TRPC6 vers la membrane plasmique en réponse aux EETs (chapitre *2.2.1*) diminuant notamment l'entrée de calcium induite par la bradykinine[97].

Dans les cellules HEK293 et A7r5, la PKG inhibe les canaux TRPC6. Un donneur d'oxyde nitrique (le SNAP) inhibe le courant TRPC6 induit par le carbachol (CCh). Le 8Br-cGMP (un analogue perméant du GMPc) supprime aussi le courant TRPC6 induit par le CCh. Il est proposé que les SNAP activent la PKG qui va phosphoryler les canaux TRPC6 sur la thréonine 69. Cette voie NO-cGMP-PKG régule de façon négative les courants cationiques à la fois dans les HEK293 et A7r5[73]. La phosphorylation des canaux TRPC6 par la PKG serait importante dans la prévention de l'hypertrophie des cardiomyocytes ventriculaires en impliquant la phosphodiesterase 5[126,127] (PDE5), un effet du NFAT (nuclear factor of activated T-cells)[126] et par l'intervention d'une voie utilisant les peptides natriurétiques atriaux et cérébraux (ANP et BNP)[128] (Figure 14).

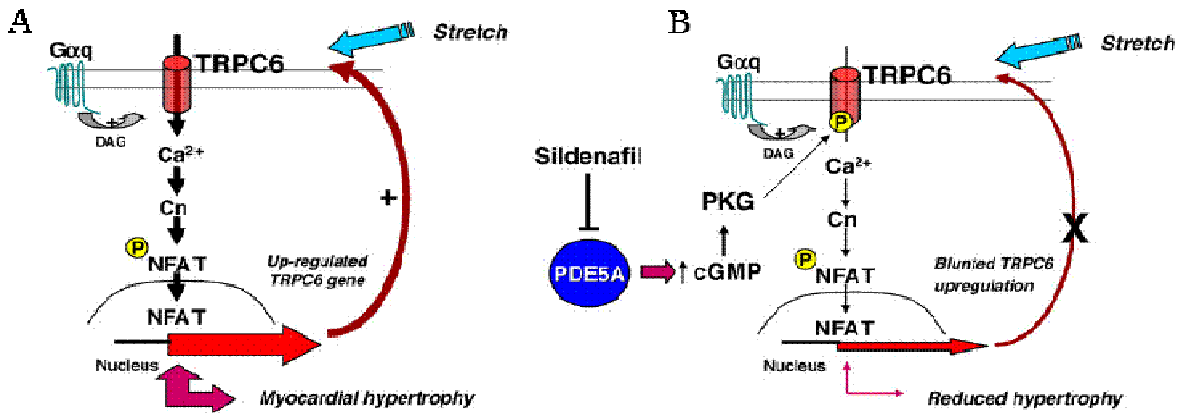


Figure 14 Schéma illustrant la voie de signalisation impliquant TRPC6 et NFAT
En présence (**A**) et en absence d'activateur de PKG (**B**) dans l'hypertrophie cardiaque**.**
(D'après Koitabashi *et al*.**, 2010,** *Journal Molecular of and Cellular Cardiology*)[126].

2.3.3 Régulation par les tyrosines kinase Src/Fyn

Fyn est un membre de la famille des protéines-tyrosines kinases (PTK) de type Src. Il existe une interaction directe entre Fyn et les canaux TRPC6. La stimulation des récepteurs du facteur de croissance de l'épiderme (EGF) induit une phosphorylation des canaux TRPC6 dépendante de Fyn. Cette phosphorylation augmente l'activité des canaux TRPC6 dans les cellules HEK293 exprimant de façon stable les canaux TRPC6[92]. Toutefois, la phosphorylation des canaux TRPC6 par Fyn ne semble pas être essentielle à leur fonctionnement car dans des cellules COS-7 déficientes pour *fyn* ou *src*, l'activité des canaux TRPC6 n'est pas affectée[90]. Dans un modèle de podocytes immortalisés, le knockdown de Fyn bloque la phosphorylation de TRPC6 et réduit l'apoptose causée par le TGF-β1 mais sans influencer l'expression des canaux TRPC6[129].

2.3.4 Régulation par le calcium et par la calmoduline

Calcium

Le calcium extracellulaire a des effets complexes (et controversés) sur l'activité des canaux TRPC6. L'ajout de calcium dans le milieu externe après l'application de carbachol augmente le courant induit par le CCh dans les cellules HEK[81]. Dans les cellules de muscles lisses A7r5, une concentration de 2 mM de calcium externe inhibe l'activité des canaux TRPC6 induite par la vasopressine alors qu'une concentration externe de 50 à 200 µM potentie l'amplitude des courants via TRPC6. Néanmoins, supprimer totalement le calcium externe diminue les courants via TRPC6[88]. Le calcium aurait un rôle double dans la régulation des canaux TRPC6 : A de faibles concentrations externes (IC_{50} ~0,4 mM) il augmenterait les courants TRPC6 et à de fortes concentrations externes (IC_{50}~4 mM) il serait un inhibiteur. Les processus d'activation des canaux TRPC6 semblent cependant être dépendants de la calmoduline [79].

Calmoduline

La calmoduline (CaM) est une petite protéine intracellulaire ubiquitaire liant le calcium et impliquée dans la régulation de plusieurs canaux ioniques comme les TRP et TRPL de drosophile[4]. La calmoduline après activation par le calcium et formation du complexe Ca^{2+}-CaM, active un certain nombre de kinases dont la CaM-kinase II ou la phosphatase calcineurine. L'utilisation d'inhibiteurs de CaM tels que le calmidazolium (CMZ)

ou le trifluoperazine (TFP) a permis de mettre en évidence dans les HEK293 sur-exprimant TRPC6 l'importance de cette protéine dans l'activation de la réponse de type ROC des TRPC6 mais seulement après vidange des stocks[130]. L'inhibition de la CaM ne semble pas influencer la réponse SOC de ces cellules. Des résultats semblables ont été obtenus en coexprimant un mutant de la CaM (insensible au calcium) provoquant une forte diminution des réponses CCh, GTPγS et OAG. Les mêmes résultats sont observés avec des concentrations intracellulaires en calcium très faibles ou en inhibant la CaM kinase II par le KN-62 ou par le peptide inhibiteur CAMK-IP$_{(281-309)}$. En revanche, l'inhibition de la calcineurine par le FK506 ne semble pas affecter le courant I_{TRPC6}[79]. Les canaux TRPC6 possèdent une région sur l'extrémité C-terminale pouvant lier l'IP3 et la CaM : le CIRB (CaM/IP3 Receptor Binding, chapitre *2 figure 7*)[131]. Le PIP_3 a la capacité de déplacer la CaM et des mutations augmentant l'affinité du PIP_3 pour TRPC6 augmentent les courants via TRPC6. Des mutations diminuant l'affinité de PIP_3 avec TRPC6 réduisent les courants via TRPC6. Contrairement aux études précédentes, celle-ci suggère donc un rôle inhibiteur de la CaM vis-à-vis des canaux TRPC6[104]. Dans le système nerveux central, la surexpression des canaux TRPC6 augmente la phosphorylation de la kinase IV Ca^{2+}/calmoduline dépendante (CaMKIV) et de CREB (cAMP-Response-Element Binding protein), stimulant la croissance dendritique et la formation des synapses via cette voie CaMKIV-CREB[132,133].

2.3.5 Régulation redox des canaux TRPC6

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires affectant l'expression des gènes, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore la migration cellulaire. Les ROS sont générées dans plusieurs compartiments intracellulaires (90% des ROS proviennent des mitochondries) par l'intervention d'enzymes dont la NADPH oxydase. Une étude sur des rats traités à la puromycine aminonucléoside (PAN) qui détériore les podocytes (pour mimer la FSGS, chapitre *2.5.6*) a montré une association entre la NADPH oxydase et l'expression des canaux TRPC6. En effet, le traitement PAN sur les rats augmente l'activité de la NADPH oxydase (donc probablement les ROS) et conduit à une augmentation de l'expression des canaux TRPC6[134]. De plus, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), active les canaux TRPC6 mais ne semble pas oxyder directement la protéine TRPC6. L'activation semble passer par l'intermédiaire d'un ou plusieurs composés cytoplasmiques non identifiés à ce jour[20].

2.3.6 Régulation par la voie de signalisation Notch

La voie Notch est nécessaire au développement embryonnaire et post-natal de nombreux organes en régulant notamment la différentiation, l'apoptose et la prolifération cellulaires[135]. Les Notch sont des récepteurs transmembranaires activés par les DSL (delta/Serrate/Lag2). L'activation des Notch conduit à leur clivage par les γ-secrétases libérant la partie intracellulaire du récepteur (NICD). Le NICD entre dans le noyau et s'associe avec le facteur de transcription CSL pour contrôler l'expression de certains gènes. Numb est un régulateur important des Notch, la perte d'expression de Numb est notamment à l'origine de tumeurs. Numb est aussi décrit pour moduler l'homéostasie calcique. L'expression de Numb dans les PC12 augmente l'expression des canaux TRPC6 ainsi que les réponses ROC et SOC. Ce processus est supprimé par des inhibiteurs de la voie Notch[136]. Dans les glioblastomes multiformes, l'inhibition de la voie Notch inhibe la réponse à l'hypoxie conduisant ainsi à une diminution de l'expression des canaux TRPC6 qui est forte dans les glioblastomes multiformes[137].

2.3.7 Inhiber spécifiquement les canaux TRPC6 : une impasse pharmacologique.

Il n'existe pas d'inhibiteur spécifique des canaux TRPC6. Cependant plusieurs inhibiteurs non-spécifiques sont couramment utilisés. Le Lanthane, le Gadolinium et le Cadmium inhibent l'entrée de calcium via les canaux TRPC6 mais inhibent aussi d'autres conductances calciques[81]. Des inhibiteurs non spécifiques comme le SKF-96365[95], l'amiloride[138], le 2-APB[139] et le GsMTx-4[113] sont aussi utilisés pour bloquer l'entrée calcique via les canaux TRPC6.

2.4 Association des canaux TRPC6 avec d'autres voies d'entrée du calcium

Dans certains types cellulaires, l'activation des canaux TRPC6 aurait un effet sur l'entrée calcique via d'autres canaux ou transporteurs. Dans les cellules A7r5 de muscles lisses qui expriment de façon endogène les canaux TRPC6, l'entrée de calcium induit par l'activation des TRPC6 par l'OAG (analogue du diacylglycérol) est réduite en présence de nimodipine ou de verapamil. Ces expériences suggèrent un lien entre les canaux calciques dépendants du voltage de type L et les canaux TRPC6. L'entrée de sodium via les canaux TRPC6 serait en effet à l'origine d'une dépolarisation de la membrane qui induirait l'ouverture des canaux calciques de type L [140]. Ce processus semble cependant dépendre du type cellulaire. En effet, dans les neurones corticaux embryonnaires, les réponses calciques

induites par l'OAG ne sont pas affectées par la nifédipine ou par l'ω-conotoxine (deux inhibiteurs des canaux calciques dépendants du voltage)[95].

Dans certaines conditions, une entrée de calcium via l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX) peut être associée à l'activité des canaux TRPC6, notamment dans les cellules de muscles lisses. Localisé dans la membrane plasmique, l'échangeur NCX est essentiel à l'entrée du sodium et à la sortie du calcium en échangeant 3 ions Na^+ contre un ion Ca^{2+}. Cependant, le transport de ces deux ions est conditionné par le gradient de sodium, de calcium et par le potentiel de membrane. L'échangeur NCX possède un potentiel d'inversion ($E_{NCX}=3E_{Na}-E_{Ca}$) pouvant conduire au transport d'un ion Ca^{2+} pour la sortie de trois ions Na^+[141]. L'entrée de sodium via les canaux TRPC6 serait responsable de l'inversion de NCX conduisant à une entrée de calcium dans les cellules de muscles lisses[87,142] (Figure 15) Ce processus est aussi présent dans les artérioles afférentes[143] et semble responsable d'une partie de l'entrée calcique dépendante de l'OAG dans les neurones corticaux embryonnaires[95]. Les canaux TRPC6 influenceraient la concentration calcique intracellulaire de multiples façons: via une entrée directe à travers les canaux ou, dans certaines cellules, via la dépolarisation induite par l'entrée de sodium, faisant entrer du calcium via les canaux calciques dépendants du voltage ou, via l'entrée de sodium par TRPC6 qui conduit à l'inversion de NCX. Ces réponses dépendent du type cellulaire[144].

L'ensemble de ces données traduisent l'existence de domaines membranaires regroupant ces différents acteurs de l'homéostasie du sodium et du calcium[145,146].

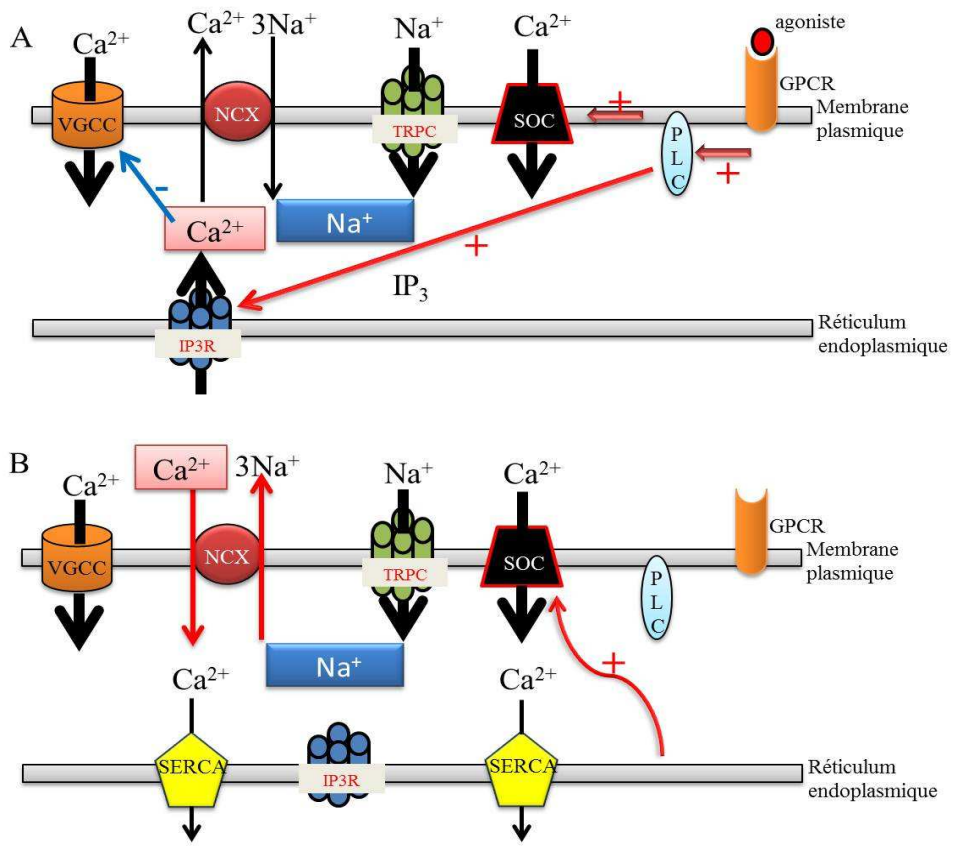


Figure 15 TRPC6 et couplage avec le NCX
A) L'activation des canaux TRPC6 permet l'entrée du sodium. **B**) La forte augmentation du sodium provoque le fonctionnement en mode inverse de NCX et donc une sortie de sodium pour une entrée de calcium. Il apparait alors que l'entrée de sodium par les canaux TRPC6 a un rôle majeur dans ce mécanisme dépendant de NCX. (D'après Eder *et al*., **2005**, *Pflügers Archiv*)[141]

2.5 Expression, fonctions et physiopathologies des canaux TRPC6

Les canaux TRPC6 sont exprimés dans de nombreux organes et tissus (Figure 16) tels que le cerveau, le cœur, les poumons, les reins, le foie, le placenta etc…

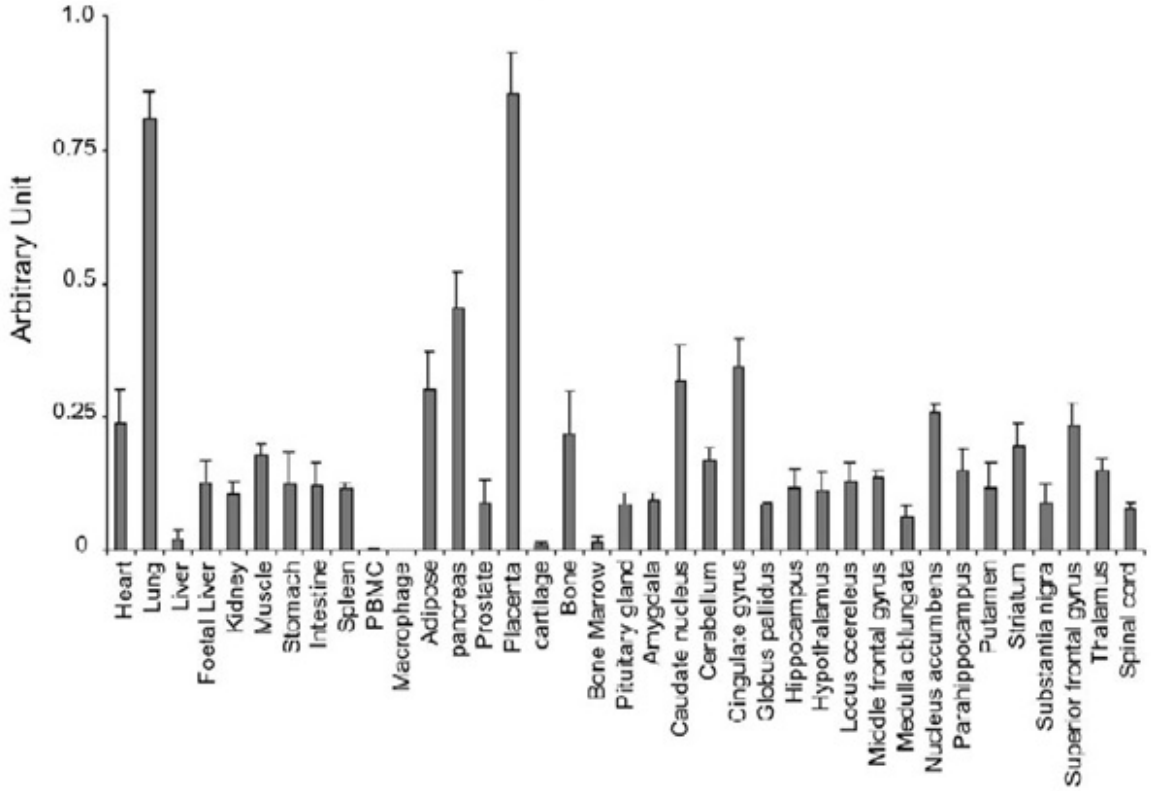


Figure 16 Expression de l'ARNm de TRPC6
Expression de l'ARNm de TRPC6 dans le cerveau et dans les tissus périphériques chez l'Homme. Les données sont exprimées en unité arbitraire et normalisées par rapport à l'expression de l'ARNm de la cyclophiline.
(D'après Riccio *et al.*, **2002**, *Molecular Brain Research*)[147]

Les canaux TRPC6 ont été identifiés dans un très grand nombre de cellules telles que les cellules sanguines, les cellules vasculaires de muscles lisses, les fibroblastes, les cellules endothéliales, différentes populations de neurones et dans certaines tumeurs[70,147-150].

2.5.1 Les cellules vasculaires.

Cellules de muscles lisses vasculaires.

TRPC6 est associé au récepteur α1 adrénergique dans les cellules de muscles lisses vasculaires[81]. De plus, TRPC6 a un rôle important dans la dépolarisation induite par la pression et dans la constriction des petites artères et artérioles, processus qui conduit à une entrée calcique via les canaux calciques dépendants du voltage[151]. L'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (IPAH) est une maladie vasculaire rare et grave, caractérisée par

l'augmentation des résistances artérielles pulmonaires, aboutissant à une insuffisance cardiaque droite. La prolifération excessive des cellules des muscles lisses des artères pulmonaires (PASMC) est la cause principale de l'augmentation de la résistance vasculaire. Chez les patients atteints de IPAH-PASMC l'expression de TRPC6 est augmentée[107,152].

Cellules de l'endothélium vasculaire.

Les canaux TRPC6 semblent jouer un rôle important dans la régulation de la perméabilité et la migration des cellules endothéliales[78,89,153]. L'inhibition de l'expression des TRPC6 par des siRNA réduit l'entrée calcique induite par la thrombine, cela réduit aussi l'activation de RhoA et la phosphorylation de la chaine légère de myosine[89]. Dans les cellules endothéliales d'aorte, l'entrée de calcium via les canaux TRPC5 et TRPC6 inhibe la migration des cellules. Par ailleurs, la lysophosphatidylcholine (lysoPC) inhibe la migration cellulaire de façon dépendante du calcium et indépendamment des canaux calciques dépendants du voltage. L'inhibition des canaux TRPC6 réduit considérablement l'effet de la lysoPC[153].

2.5.2 Les cellules épithéliales pulmonaires.

Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'activation des canaux TRPC6 par l'OAG dans des cellules épithéliales pulmonaires se traduit par des réponses calciques beaucoup plus grandes que dans les cellules saines. Il existerait un couplage entre les canaux CFTR et TRPC6 dans lequel CFTR réduit l'activité des canaux TRPC6 et TRPC6 augmente l'activité des canaux CFTR favorisant le transport du chlore. Ce couplage est perdu dans les cellules épithéliales pulmonaires modèles de mucoviscidose[154].

2.5.3 Les myocytes et fibroblastes cardiaques.

Les canaux TRPC6 sont exprimés dans les cardiomyocytes. L'hypertrophie cardiaque induite par l'angiotensine II est influencée par une voie de signalisation dépendante du calcium, de la calcineurine et du NFAT or cette voie est dépendante de l'activation des canaux TRPC6 et TRPC3[82]. Chez les souris sur-exprimant les canaux TRPC6 au niveau du cœur, une hypertrophie cardiaque ainsi qu'une plus grande sensibilité au stress cardiaque pouvant entrainer une mort prématurée de l'animal sont observées[82,127,128,155].

Les fibroblastes cardiaques expriment aussi les canaux TRPC6. Dans ces cellules, TRPC6 est sur-exprimé suite à un traitement à l'endothéline-1, étape cruciale pour l'activation de la NFAT qui régule négativement la formation des myofibroblastes.

2.5.4 Tissu sanguin

Erythrocytes

Les canaux TRPC6 sont exprimés dans les érythrocytes. Ils permettent une entrée de calcium dans ces cellules et semblent impliqués dans la survie cellulaire[138].

Plaquettes

TRPC6 est très exprimé dans les plaquettes. Dans ces cellules, les canaux TRPC6 ne sont pas régulés par les tyrosines kinases mais sont sensibles à la phosphorylation dépendante de l'AMP cyclique[125]. Les canaux TRPC6 semblent participer à un complexe impliquant la PI3 kinase et le PIP3 pour permettre l'entrée du calcium[103]. Malgré les études montrant que l'activation des plaquettes par la thrombine induit une entrée de calcium indépendamment de la voie SOC[125,156], certaines études montrent l'implication des canaux TRPC6 dans la voie SOC dans les plaquettes en coexistant au sein d'un complexe multi protéiques avec TRPC1, IP3R, SERCA3[109]et STIM1[157]. Les canaux TRPC6 ont donc un rôle double, à la fois dans l'entrée capacitive du calcium et dans l'entrée de calcium indépendante de la voie SOC[111,112].

2.5.5 Les kératinocytes

La découverte de l'hyperforine comme activateur spécifique des canaux TRPC6 a permis de mettre en évidence leur rôle dans la différentiation des kératinocytes. L'influx de calcium via les canaux TRPC6 induit la différentiation et inhibe la prolifération des kératinocytes en cultures primaires et des cellules HacaT (lignée cellulaire de kératinocytes)[121]. Chez les patients atteints de psoriasis, la réduction de l'expression de TRPC6 dans les kératinocytes conduirait à une diminution de la différentiation de ces cellules et une augmentation de leur prolifération. Des traitements basés sur l'activation des canaux TRPC6 pourraient voir le jour[158].

2.5.6 Les cellules rénales

Les canaux TRPC6 sont exprimés à la fois dans le glomérule, dans l'épithélium tubulaire et dans les podocytes glomérulaires. Les podocytes participent notamment à la perméabilité du glomérule.

La plus détaillée des physiopathologies dans laquelle TRPC6 est impliqué est la FSGS (glomérulosclérose focale et segmentaire). Cette maladie touche les reins et plus précisément

le glomérule. La FSGS peut provoquer des protéinuries, de l'hypertension, des insuffisances rénales et peut aller jusqu'à la détérioration complète du rein. Cette maladie est héréditaire. C'est le cas d'une famille de Nouvelle-Zélande qui présente un phénotype autosomal dominant pour la FSGS. Des études sur cette famille ont permis de déceler une mutation sur le chromosome q11, le gène muté est celui codant pour TRPC6. La protéine mutée est présente chez tous les individus atteints de la FSGS de cette famille. La mutation TRPC6 ^{P112Q} provoque une augmentation de l'activité des canaux TRPC6 conduisant à une augmentation intracellulaire de calcium[159]. Plusieurs autres mutations ont été mises en évidence chez les patients atteints de FSGS : P111Q, R895C, E897K, A270T, N134I et K874Ter. En plus d'une augmentation de l'activité des canaux TRPC6, la mutation P112Q induit une augmentation de l'expression des canaux TRPC6. Cet accroissement d'expression des canaux TRPC6 est aussi retrouvé chez d'autres patients atteints de dysfonctionnements rénaux[160]. Au niveau des diaphragmes de fente (jonction entre les interdigitations des pieds de podocytes), les canaux TRPC6 formeraient un complexe de signalisation impliquant la podocine, la néphrine et probablement les récepteurs AT1 à l'angiotensine II[161].

Contrairement à la régulation des canaux TRPC6 par le glucose dans les plaquettes, dans les cellules mésangiales glomérulaires une augmentation de la concentration en sucre dans le milieu de culture diminue l'expression des canaux TRPC6. Des résultats similaires sont trouvés chez les rats où un diabète est provoqué[162].

2.5.7 Les cellules cancéreuses.

La présence des canaux TRPC6 a été observée dans plusieurs types de cellules cancéreuses. Ils sont présents dans des biopsies de cancer de prostate malignes et bénignes ainsi que dans les lignées cellulaires de cancer de prostate 22Rv1, DU145 et PC3[163]. Dans les cellules épithéliales de cancer de prostate, les canaux TRPC6 sont impliqués dans la prolifération cellulaire via la phényléphrine et le récepteur α1-adrénergique. La phényléphrine stimule la prolifération des cellules cancéreuses en induisant un influx de calcium via TRPC6[164]. Dans les cellules d'hépatomes (provenant de tumeur du foie), les canaux TRPC6 sont associés à une voie d'entrée du calcium de type SOC. Il apparaît que l'entrée calcique via les canaux TRPC6 influence la prolifération des cellules hépatocytaires tumorales[108]. L'expression de TRPC6 est aussi accrue dans les cellules épithéliales de cancers gastriques humains par rapport à celle des cellules épithéliales de sujets sains. Dans ces cellules cancéreuses, il semble que le blocage des canaux TRPC6 provoque un arrêt dans la phase

G2/M et un arrêt de la croissance. Ces différentes données, sur plusieurs types de cellules cancéreuses, montrent toutes un rôle important des canaux TRPC6 dans la prolifération tumorale. Ces canaux sont aussi surexprimés dans les cellules épithéliales d'adénocarcinome dans les cancers du sein[165,166] et dans les glioblastomes multiformes (tumeurs agressives du cerveau) où ils semblent jouer un rôle important dans leur croissance[167]. Ces canaux pourraient constituer une nouvelle cible thérapeutique intéressante pour les traitements anticancéreux.

2.5.8 Le tissu nerveux

Localisation

La distribution des canaux TRPC6 dans le cerveau a été étudiée chez, le rat, la souris et l'Homme (Figure 17) où TRPC6 est présent dans de nombreuses régions dont le cortex (gyrus cingulaire et gyrus frontal supérieur), le cervelet, l'hippocampe, le noyau accumbens…

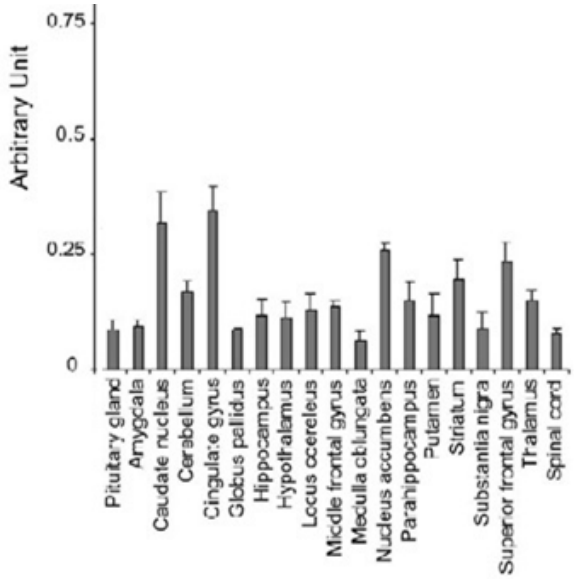


Figure 17 Expression de l'ARNm de TRPC6 dans le cerveau humain
Les données sont exprimées en unité arbitraire et normalisées par rapport à l'expression de l'ARNm de la cyclophiline.
(D'après Riccio *et al.*, **2002**, *Molecular Brain Research*)[147]

Les études chez le rat montrent la présence des canaux TRPC6 dans le cerveau embryonnaire[77] : dans le bulbe olfactif, le cervelet (où l'expression diminue à l'âge adulte[168]), l'hippocampe, le cortex, le tronc cérébral et dans le mésencéphale[169]. TRPC6 est localisé dans les dendrites des cellules du gyrus denté de l'hippocampe[133,170] et aussi dans les neurones dopaminergiques de la substance noire où les canaux sont en association avec mGluR1

(metabotropic glutamate Receptor 1)[171]. TRPC6 a de plus été localisé dans le neuropile (fibres gliales et neuronales) des ganglions de la base[172].

Les études chez la souris montrent aussi la présence des canaux TRPC6 dans le cerveau embryonnaire : dans les neurones[173] et astrocytes[91] du cortex et dans les neurones post-synaptiques de l'hippocampe[132].

Fonctions

Dans les cellules granulaires du cervelet, l'expression de la forme dominant-négative des canaux TRPC3 ou TRPC6 inhibe l'effet du BDNF sur le guidage des cônes de croissance neuronaux. Des résultats similaires sont obtenus avec la méthode d'ARN interférence[93]. Les canaux TRPC6 sont essentiels pour la protection des neurones par le BDNF via l'activation de CREB[174]. Une ischémie cérébrale diminue l'expression des canaux TRPC6 dans le cortex. L'utilisation de peptides protégeant TRPC6 de la protéolyse protège les neurones contre l'ischémie en favorisant l'activation de CREB[175]. Dans l'hippocampe de rat, TRPC6 est impliqué dans la croissance des dendrites. L'expression de TRPC6 est maximale entre les jours 7 à 14 post-natal, période importante dans la croissance des dendrites neuronales. L'action de TRPC6 dans ce mécanisme n'est pas directe mais TRPC6 favorise cette croissance via la voie dépendante de CaMKIV-CREB. La sur-expression de TRPC6 dans les neurones augmente et densifie le réseau dendritique dans les cellules transfectées par rapport aux cellules non transfectées. Il semblerait que l'influx de Ca^{2+} par TRPC6 soit important pour favoriser la croissance dendritique de ces cellules[133]. De plus, TRPC6 est impliqué dans le développement des synapses excitatrices[132].

Dans les astrocytes de cortex murins, les canaux TRPC6 sont impliqués dans la dérégulation de l'homéostasie calcique suite à l'activation des récepteurs à l'Interleukine1. En effet, un traitement à l'IL-1β augmente l'expression des canaux TRPC6 et leur suppression par KO réduit l'entrée calcique induite par l'IL-1β[91].

Dans les neurones des ganglions de la racine dorsale, TRPC6 et TRPC1 agissent avec TRPV4 dans un mécanisme impliquant la sensibilisation des nocicepteurs[115]. Les cellules PC12 traitées avec le facteur de croissance neuronal (NGF) expriment les canaux TRPC6. Ce modèle a été utilisé pour étudier leurs propriétés. Dans les PC12 différenciées au NGF, l'entrée de Fer est augmentée par rapport aux cellules non traitées. L'utilisation de la sonde fluorescente Calcéine a permis de montrer que cette entrée de Fer est augmentée par le DAG. Cette entrée de Fer qui se fait par une voie indépendante de la transferine (NTBI non-

transferin bound iron) est aussi accrue dans les cellules HEK293 sur exprimant TRPC6[176]. Dans les cellules PC12, l'expression de TRPC6 est stimulée par l'expression de Numb, un régulateur de la voie Notch (chapitre *2.3.6*).

Un lien entre les canaux TRPC6 et la maladie d'Alzheimer a été observé dans des cellules HEK293 sur-exprimant TRPC6 et des formes de la préséniline 2. Les mutations dans la préséniline 1 et 2 représentent la moitié des cas des formes familiales de la maladie d'Alzheimer. La co-expression des canaux TRPC6 et d'une forme mutée « perte de fonction » de la préséniline 2 conduit à une augmentation de l'activité des canaux en réponse à l'angiotensine II ou à l'OAG. La préséniline 2 semble donc influencer l'entrée calcique via les canaux TRPC6[177]. Il est intéressant de noter que l'incubation de ces cellules avec les peptides amyloïdes β_{1-40} et β_{1-42} ne modifie pas l'activité des canaux TRPC6.

Le schéma suivant résume les différentes localisations et fonctions associées à TRPC6 (Figure 18).

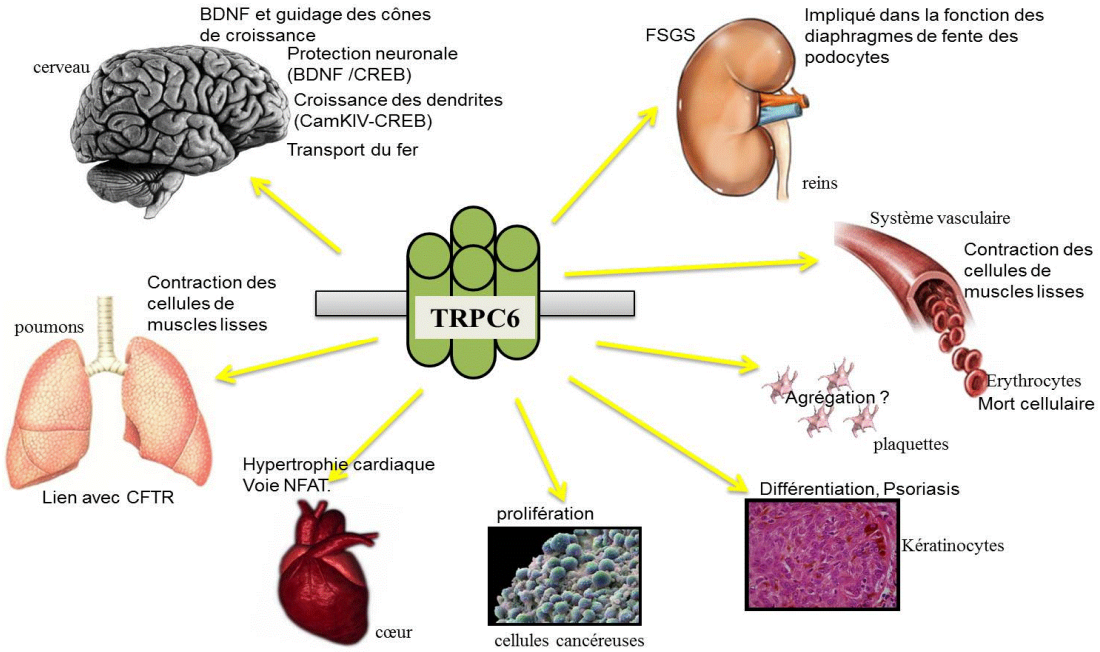


Figure 18 Localisations et fonctions des canaux TRPC6

2.5.9 Les canaux TRPC6 dans les neurones corticaux embryonnaires de souris à E13.

Expression :

Je me suis intéressé aux propriétés et aux fonctions des canaux TRPC6 dans le cortex de souris. Leur présence a été montrée par RT-PCR à la fois dans le cerveau entier et dans le cortex des embryons de souris au stade E13 (Figure 19).

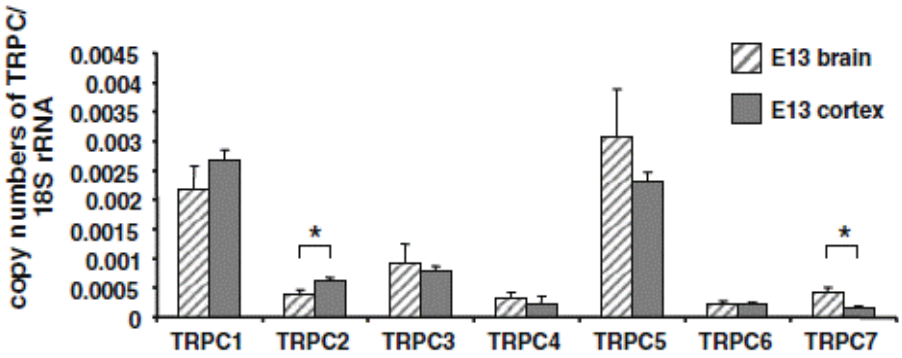


Figure 19 Expression des canaux TRPC dans le cerveau entier et dans le cortex des embryons de souris à E13
L'expression des TRPC est quantifiée par rapport à celle de l'ARNr18s.
(D'après Boisseau *et al.*, **2009**, *Histochemistry and cell Biology*)[173]

Ce résultat a été confirmé par des techniques d'immunohistochimie (Figure 20) et d'hybridation *in situ* (Figure 21).

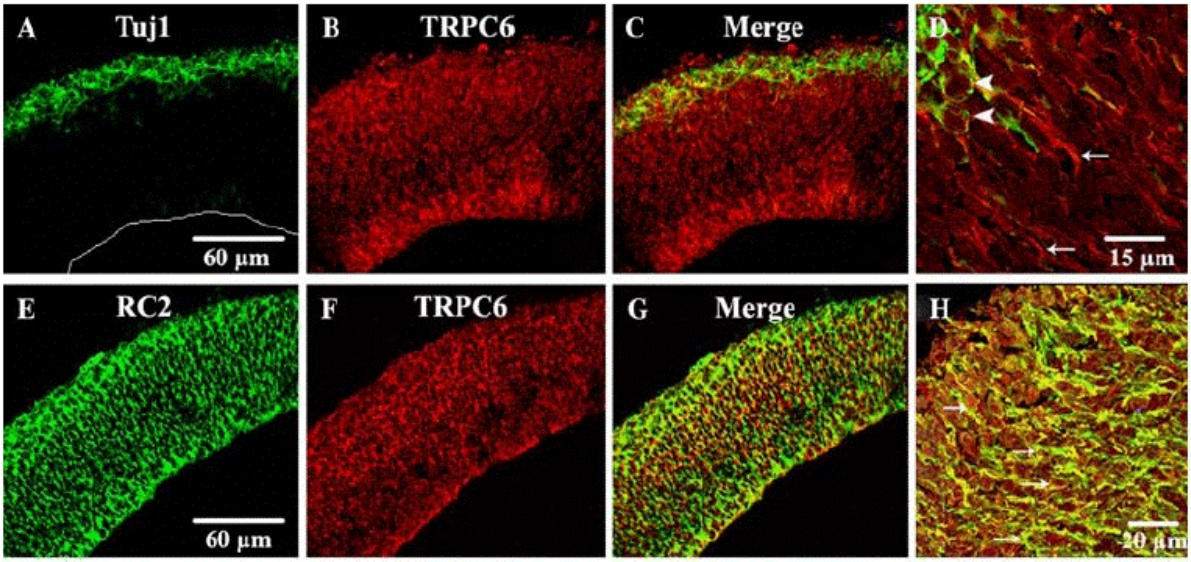


Figure 20 Expression des canaux TRPC6
A,B,C,D) Double immunohistomarquage avec les anticorps anti-tuj1 (vert, marqueur de neurones) et anti-TRPC6 (rouge). **E,F,G,H**) Double immunohistomarquage avec les anticorps anti-RC2 (vert, marqueur de cellules non neuronales) et anti-TRPC6 (rouge). (D'après Boisseau *et al.*, **2009**, *Histochemistry and cell Biology*)[173]

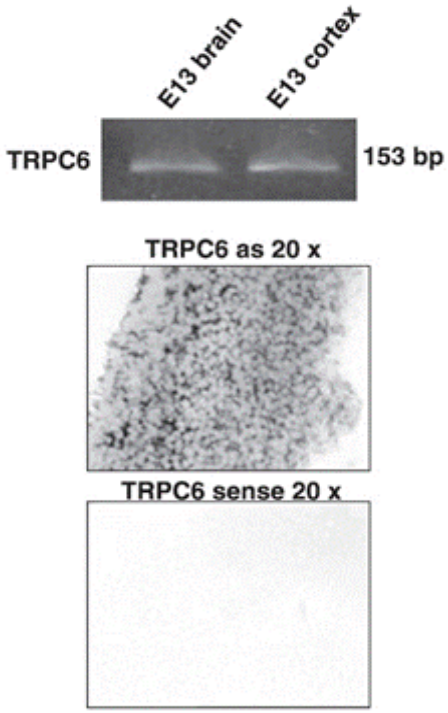


Figure 21 Les canaux TRPC6 sont présents dans le cerveau des embryons murins à E13
RT-PCR sur des ARN extraits de cerveau et de cortex d'embryon de souris à E13 puis déposés et séparés sur gel d'agarose. Hybridation *in situ* des canaux TRPC6 dans le cortex à E13.
(D'après Tu *et al.*, **2009**, *Journal of Neurochemistry*)[95]

Dans les neurones corticaux embryonnaires en culture primaire, l'application d'OAG, de SAG, de RHC80267 (inhibiteur de la DAG lipase) ou d'hyperforine induit une entrée de calcium (Figure 22). Des expériences de quench de fluorescence avec du manganèse confirment la présence de ces canaux fonctionnels perméables aux cations.

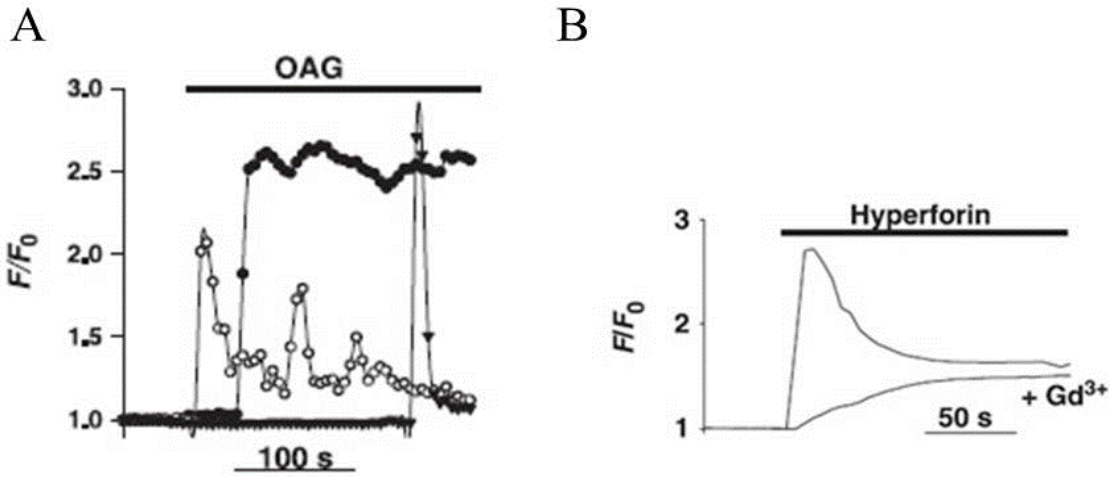


Figure 22 Canaux TRPC6 fonctionnels dans les cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires
Enregistrement de la fluorescence de la sonde calcique Fluo4. **A**) l'OAG (100 µM) induit une entrée de calcium, enregistrement sur 3 cellules montrant le décours des réponses. **B**) L'hyperforine (10 µM) induit une augmentation de fluorescence en deux phases, une transitoire et une phase plateau, la phase transitoire est supprimée en présence de 5 µM Gadolinium.
(D'après Tu *et al.*, **2009**, *Journal of Neurochemistry*)[95]

Propriétés et régulation de ces canaux activables par l'OAG et par l'hyperforine :

Comme décrit ci-dessus, l'OAG induit une entrée de calcium. Celle-ci est inhibée par le Gadolinium (5 µM) et le SKF96365 (20 µM). La réponse calcique est réduite après le remplacement du sodium externe par le N-methyl-D-glutamine (NMDG). L'acide flufénamique augmente l'amplitude du courant induit par l'hyperforine et la réponse OAG alors que le SKF96365 les réduit considérablement. Les inhibiteurs de canaux calciques dépendants du voltage (Nifédipine et ω-CTx) n'ont pas d'effet sur la réponse OAG. L'activation ou l'inhibition de la PKC par respectivement le PMA et le GF109203X n'a pas d'effet sur la réponse OAG. Les inhibiteurs de tyrosines kinases (PP2 et génistéine), la dérégulation des rafts lipidiques par le methyl-β-cyclodextrine, ou encore l'inhibition de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine D ne changent pas non plus l'amplitude des réponses OAG dans ces neurones (Figure 23).

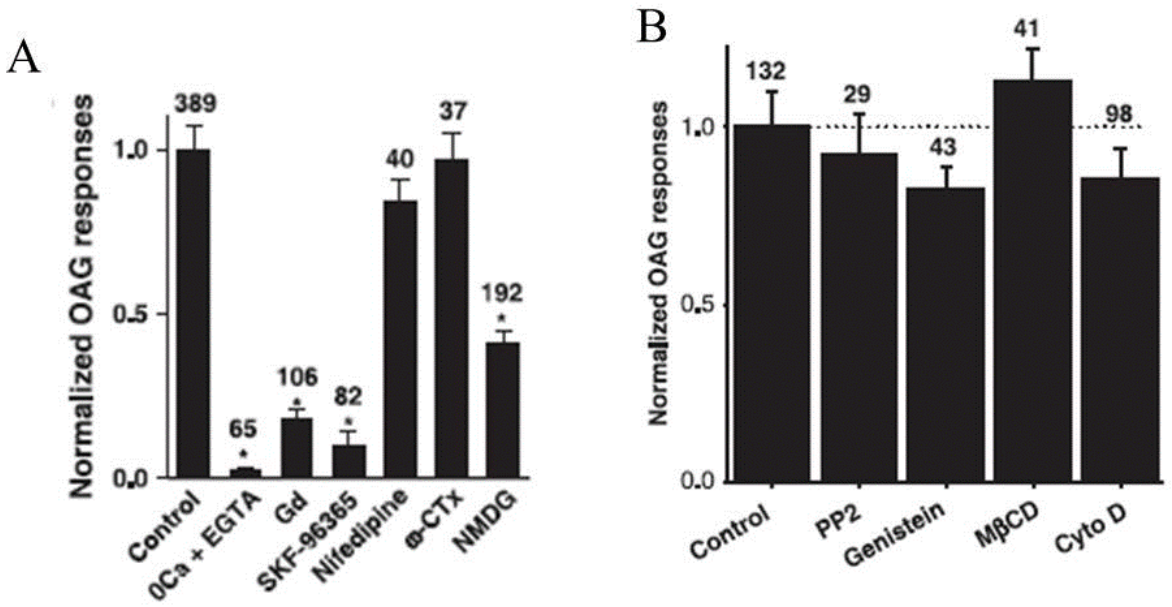


Figure 23 Régulation de la réponse OAG dans les neurones corticaux embryonnaires
A) Imagerie calcique en utilisant la sonde Fluo4. Réponse normalisée par rapport à la réponse OAG maximale (n=389 cellules). Les mêmes expériences ont été réalisées avec des cellules dans un milieu sans calcium et supplémenté avec 0,4 mM EGTA, ou en milieu normal (2 mM Ca^{2+}) et 5 µM Gd^{3+} ou 20 µM SKF-96365 ou 5 µM nifédipine ou 1 µM ω-conotoxine (ω-CTx) ou encore 140 mM NMDG pour remplacer le NaCl. *p < 0.001 versus controle (one-way ANOVA suivi d'un test de Tukey) **B**) La réponse OAG n'est pas affectée par les inhibiteurs de tyrosine kinase (PP2 et génistéine), ni par la dérégulation des rafts lipidiques (MβCD) ou encore par l'inhibition de la polymérisation de l'actine (Cyto D).
(D'après Tu *et al.*, **2009,** *Journal of Neurochemistry*)[95]

L'ensemble de ces données montre la présence de canaux TRPC6 fonctionnels dans les neurones de cortex d'embryon de souris au stade E13. Leurs caractéristiques pharmacologiques sont présentées Figure 24.

PMA (activateur de PKC)
GF 109203X (inhibiteur de PKC)
Nifedipine (inhibiteur de canaux calciques dépendants du voltage de type L)
Omega Ctx (inhibiteur de canaux calciques dépendants du voltage de type N)
PP2 (inhibiteur de tyrosine kinase)
Genisteine (inhibiteur de tyrosine kinase)
Méthyl-beta-cyclodextrine (dérégulateur de rafts lipidiques)
Cytochalasine D (inhibiteur de la polymérisation de l'actine)

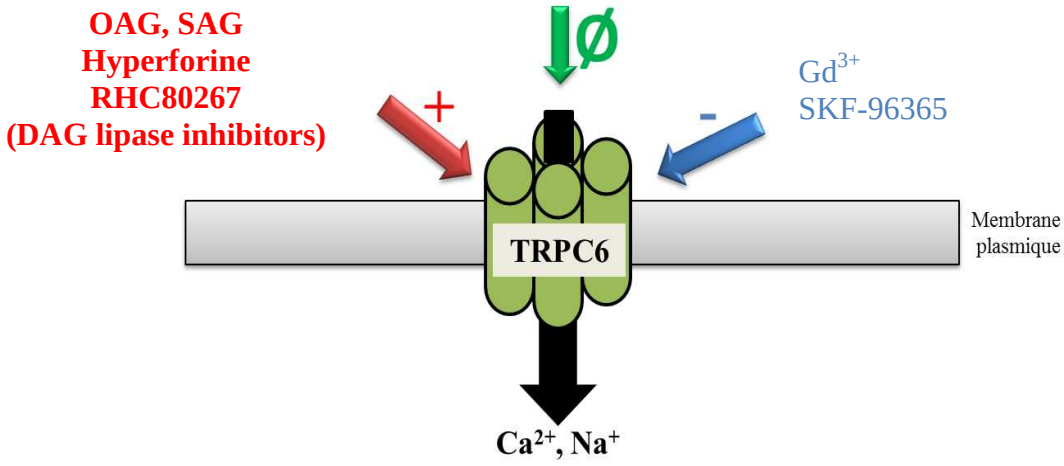


Figure 24 Schéma général de la régulation des canaux TRPC6 dans les neurones corticaux embryonnaires
+ : régulateurs positifs, - : bloqueurs, **Ø**: sans effet.

Les canaux TRPC6 sont les seuls TRPC décrits à ce jour comme étant perméables aux éléments traces. Dans les cellules PC12, l'activation des canaux TRPC6 induit une entrée de fer indépendante de la transferrine et de ses récepteurs. La sur-expression de TRPC6 dans les cellules HEK293 conduit à des résultats similaires[176].

Des expériences préliminaires d'imagerie de fluorescence avec la sonde Fura-2 ont permis de montrer l'existence d'une entrée de zinc dans les HEK-TRPC6 bien plus importante que dans les HEK en réponse à l'activation de ces canaux par le SAG. Des expériences semblables en utilisant la sonde FluoZin-3 spécifique au zinc montrent que l'activation de TRPC6 par le SAG conduit à une entrée de Zn dans les neurones corticaux (Figure 25). (Thèse Tu.P, **2009**).

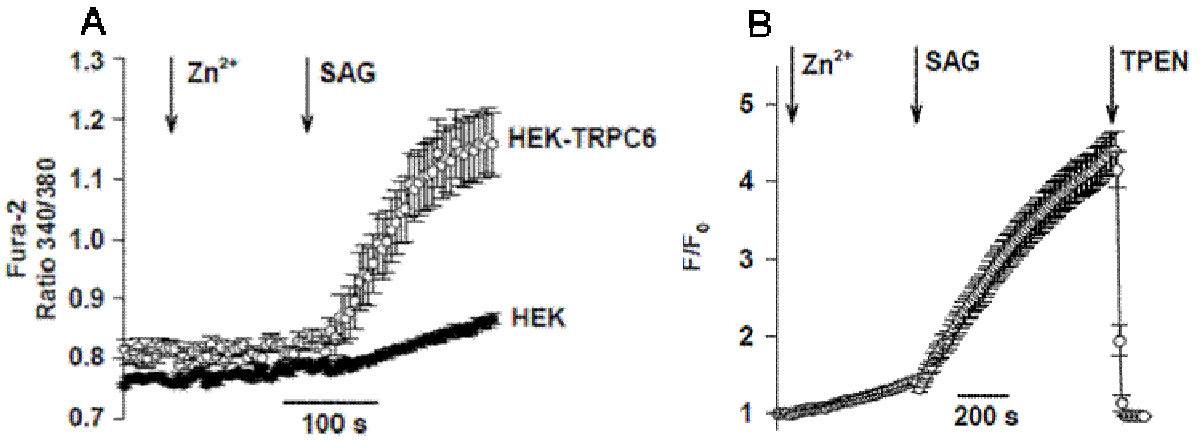


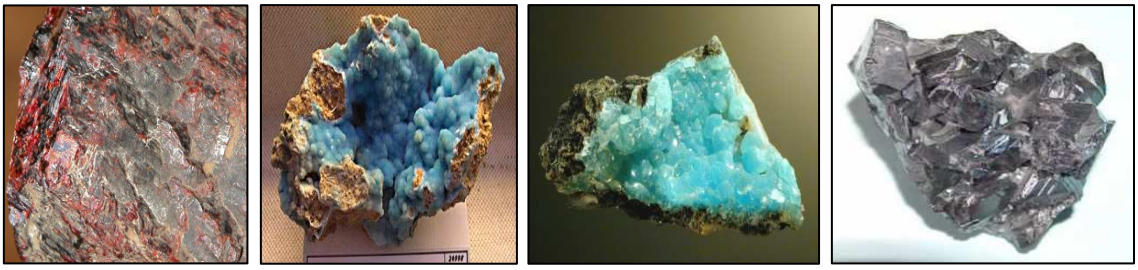
Figure 25 Entrée du Zn dans les cellules HEK, HEK-TRPC6 et dans les neurones corticaux
Entrée du Zn dans les cellules HEK, HEK-TRPC6 et dans les neurones corticaux embryonnaires en réponse à l'activation des canaux TRPC6. **A)** Les cellules HEK et HEK-TRPC6 sont chargées avec la sonde Fura-2 puis incubées en présence de Zn et en absence de Ca. L'ajout de SAG provoque une augmentation de fluorescence Fura-2 plus importante dans les cellules sur-exprimant les canaux TRPC6. **B)** Les neurones corticaux embryonnaires sont chargés avec la sonde FluoZin-3 et incubés en présence de Zn (50 µM) et en absence de Ca externe. L'ajout de SAG (50 µM) dans le milieu conduit à une augmentation de la fluorescence que le TPEN reverse. (Thèse P.Tu **2009**, *données non publiées*)

Ces expériences nous ont amené à nous intéresser à l'implication de TRPC6 dans le transport du zinc au niveau neuronal. Dans la suite du manuscrit, nous allons décrire l'importance du zinc dans l'organisme et plus particulièrement au niveau des cellules neuronales. Nous développerons notamment sa localisation tissulaire, ses fonctions, son homéostasie cellulaire et quelques pathologies associées à une dyshoméostasie de ce métal trace essentiel à l'organisme.

3. Le zinc

3.1 Introduction

Le zinc est un métal de transition, de numéro atomique 30 et de masse atomique 65,39 qui a été isolé pour la première fois en 1746 par le chimiste S. Margraaf. Le zinc est relativement stable lorsqu'il est couplé avec l'azote, l'oxygène ou le soufre. Le zinc est présent dans les minerais sous forme d'oxyde de zinc (ZnO), de silicate de zinc (Zn_2SIO_4), de carbonate de zinc ($ZnCO_3$) ou en encore de sulfure de zinc (ZnS)[178] (Figure 26).



Zincite : ZnO | **Hemimorphite: $Zn_4Si_2O_7$** | **Smithsonite : $ZnCO_3$** | **Sphalerite : ZnS**

Figure 26 Différentes roches contenant du zinc
Roches composées de Zn et état du Zn dans ces roches. L'oxyde de zinc (ZnO) est le plus couramment utilisé dans l'industrie. La sphalérite (ZnS) est cependant le minerai le plus courant dans la croute terrestre. (Frassinetti *et al.*, **2006g,** *JEPTO*)[178]

Le zinc est mobilisé et transporté dans l'environnement par l'érosion naturelle, les feux de forêt, les éruptions volcaniques ou encore les activités biologiques. Ces phénomènes naturels font que le zinc est retrouvé dans l'air, l'eau et le sol. Par exemple, la croûte terrestre renferme en moyenne 70 mg de zinc/kg de matière sèche, l'air contient de 0,01 à 0,2 µg zinc/m^3 et l'eau de 0,001 à 40 µg zinc/L selon le type d'environnement[178,179].

Le zinc est après le fer le deuxième oligo-élément le plus abondant de l'organisme. Pour les nutritionnistes, c'est un micronutriment essentiel dont l'apport journalier doit être de 7 à 15 mg selon l'âge et le sexe de l'individu[179]. La principale source de zinc pour l'organisme est l'alimentation, les apports via l'eau de boisson étant très faibles. Certains aliments sont riches en zinc, c'est le cas de la viande rouge, des œufs ou des produits laitiers (Tableau 4).

Aliments	[zinc] mg/kg
Viandes rouges	52
Abats	52
Noix	30
Produits laitiers	25
Volaille	15
Œufs	13
Céréales	9,9
Pain	9,8
Poisson	8
Sucres	5,5
Légumes en boîtes	4,2
Légumes verts	3,9
Lait	3,9
Pomme de terre	3,3
Fruits	0,63
Graisse	0,5

Tableau 4 Contenu en Zn dans l'alimentation.
(D'après Frassinetti *et al*., **2006**, *JEPTO*)[178]

Le zinc joue un rôle essentiel dans l'activité de nombreuses enzymes. Chez les microorganismes, les plantes et les animaux, plus de 300 enzymes ont besoin du zinc pour exercer leurs fonctions. Le Zn participe à des fonctions catalytiques, structurales ou comme co-activateur. Ces enzymes incluent des phosphatases alcalines, des alcools dehydrogénases, la superoxide dismutase Cu-Zn, des anydrases carboniques... Les métalloenzymes à zinc catalysent un très grand nombre de réactions biochimiques et sont retrouvées dans toutes les classes d'enzymes dont les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les isomérases ou encore les ligases. Ainsi, le zinc est impliqué dans de très nombreux processus biologiques.

Outre les rôles cités ci-dessus, le Zn présent dans le tissu nerveux participe à des processus essentiels comme la modulation de la transmission synaptique.
De façon plus générale, le zinc semble avoir une fonction de second messager très importante pour la cellule :"*The number of biological functions, health implications and pharmacological targets that are emerging for* ***zinc*** *indicate that it might turn out to be* ***'the calcium of the twenty-first century'****.*"[180]

3.2 Homéostasie du zinc dans le cerveau

La concentration en zinc dans le cerveau augmente jusqu'à l'âge adulte puis reste constante[181]. Ceci est illustré sur la figure 27 ci-dessous.

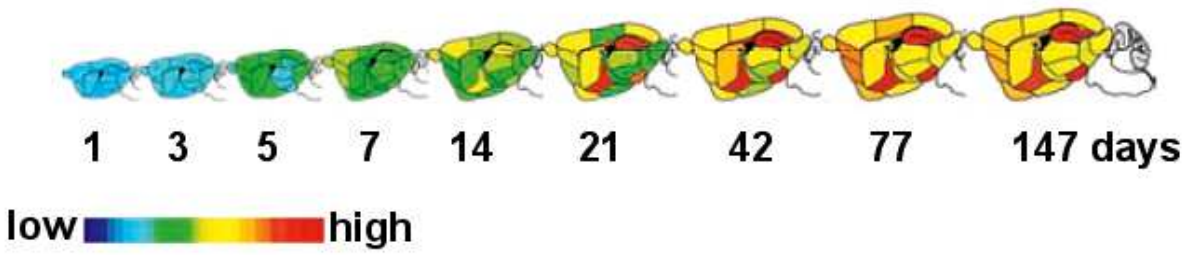


Figure 27 Distribution du zinc dans le cerveau chez le rat à différents âges
Ages exprimés en jours. Echelle en fausses couleurs allant du bleu (faible concentration) au rouge (forte concentration). (D'après Tarohda *et al*., **2004,** *Anal Bioanal Chem*)[181]

Le zinc est présent dans le cerveau mais certaines structures comme l'hippocampe, le néocortex et l'amygdale sont particulièrement riches en Zn (Figure 28).

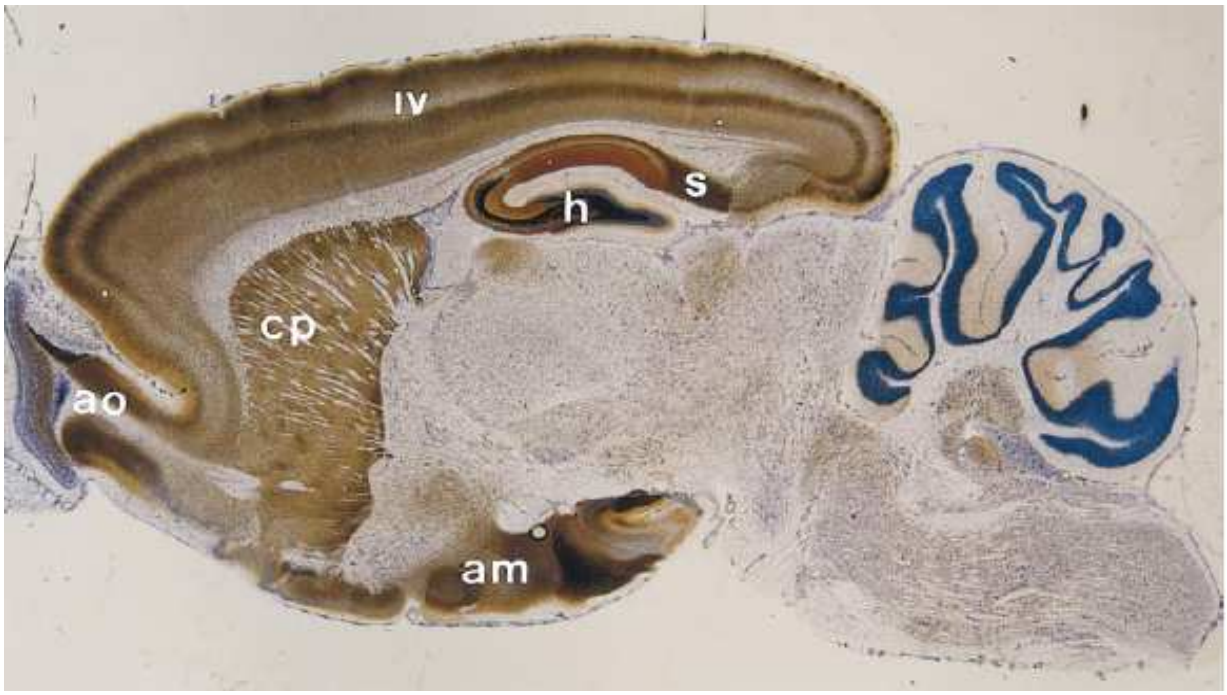


Figure 28 Coupe sagittale de cerveau de rat après marquage auto métallographique
La méthode de Timm-Danscher est utilisée pour observer les zones contenant du Zn (noires) qui marque les vésicules présynaptiques possédant du zinc. (s) subiculum, (h) hippocampe, (ao) bulbe olfactif, (cp) putamen caudal, (am) amygdale.
(D'après Frederickson et al., **2000**, *The journal of Nutrition*)[182]

Une partie du Zn (5 à 15%) est retrouvée au niveau des vésicules synaptiques (chapitre *3.2.3.1*) de certains neurones glutamatergiques (Figure 29). Ces neurones aussi appelés « gluzinergiques » sont localisés dans le cervelet, le cortex cérébral, le bulbe olfactif, l'amygdale et l'hippocampe. La libération du Zn contenu dans les vésicules synaptiques va

notamment moduler la réponse post-synaptique en agissant sur les récepteurs NMDA (chapitre *3.2.2.5*) et sur les récepteurs GABAergiques. Le Zn semble avoir pour principal effet de réduire l'excitabilité cellulaire lors de la transmission synaptique et donc de moduler la plasticité des synapses[183].

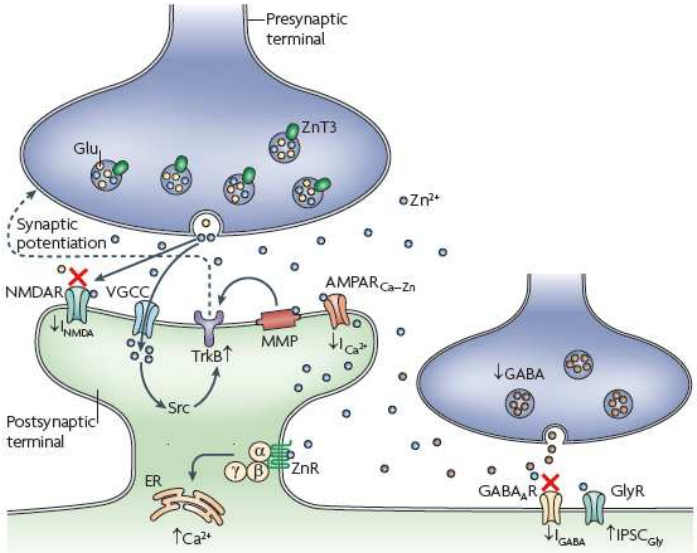


Figure 29 Rôles associés à la libération du Zn contenu dans les vésicules synaptiques
Les récepteurs NMDA et GABA sont inhibés par le zinc. Celui-ci peut entrer dans la terminaison post-synaptique par les canaux calciques dépendants du voltage (chapitre *3.2.2.3*) et par certains récepteurs AMPA (chapitre *3.2.2.4*). Dans les neurones post-synaptiques, le zinc intracellulaire peut activer les récepteurs TrkB. Le zinc extracellulaire peut activer le ZnR et induire une libération de calcium depuis le réticulum endoplasmique (chapitre *3.2.1*).
(D'après Sensi *et al.*, **2009**, *Nature reviews neuroscience*)[184]

L'importance du Zn dans la structure et l'activité de nombreuses enzymes cellulaires mais aussi sa toxicité impliquent que sa concentration intracellulaire soit finement régulée (Figure 30). Cette régulation résulte d'un équilibre entre influx (transporteurs, canaux), séquestration (pools de Zn intracellulaire et protéines liant le Zn) et extrusion (transporteurs).

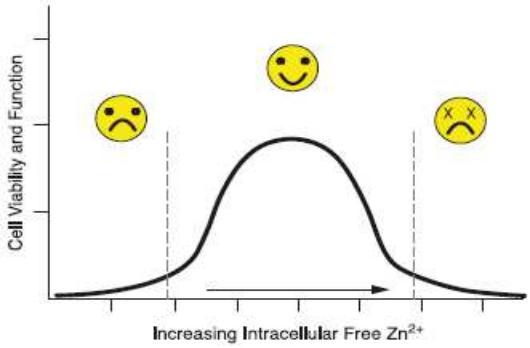


Figure 30 Représentation schématique de l'effet du Zn dans les neurones
Une déficience intracellulaire en Zn est néfaste pour la cellule et une concentration intracellulaire trop élevée est toxique. (D'après Colvin *et al.*, **2003**, *European Journal of Pharmacology*)[185]

Les rôles du Zn au niveau cellulaire mais aussi au niveau de l'organisme sont nombreux (Tableau 5), toute modification de l'homéostasie du Zn peut altérer la croissance et la survie cellulaires, notamment dans le tissu nerveux (Chapitre 4).

Exemples de l'implication du zinc dans certaines fonctions et processus biologiques	Références
Activité hormonale	186,187
Antioxydant	188,189
Apoptose, nécrose	190-193
Apprentissage	194,195
Audition	196
Coordination motrice	197,198
Dépression	199,200
Douleur	201,202
Réponse immunitaire	203,204
Goût	205
Liaison de facteurs de transcription à l'ADN	206
Mémoire (spatiale, émotionnelle)	194,195,207
Migration neuronale	182
Neurogenèse	182
Neuromodulation	185,208
Nociception	197
Odorat	205,209
Plasticité synaptique	194,210
Structure protéique	183,185,211
Synaptogénése	212
Vision	213,214

Tableau 5 Rôle du Zn dans divers fonctions et processus biologiques

Dans la suite de ce chapitre nous allons nous intéresser aux composants de la cellule impliqués dans l'homéostasie du Zn, les voies d'influx et d'efflux, le senseur ZnR et les pools intracellulaires.

3.2.1 Le ZnR, un récepteur sensible au Zinc

L'existence d'un récepteur membranaire, sensible au Zn extracellulaire (ZnR) a été montrée dans les colonocytes, les kératinocytes, les cellules de glandes salivaires et dans les neurones de la région CA3 de l'hippocampe[215-217]. L'application de zinc dans le milieu extracellulaire conduit à une libération de calcium depuis un stock sensible à la thapsigargine. Des inhibiteurs de protéines Gαq et de PLC atténuent ce processus alors que des inhibiteurs de tyrosine kinase n'ont aucun effet. De plus, les autres métaux testés (Mn^{2+}, Cu^{2+} ou Fe^{2+}) n'ont pas d'effet sur cette activité. L'augmentation du Ca par le Zn extracellulaire est indépendante de l'activité du senseur de Ca (CaR). L'ensemble de ces données font donc état d'un récepteur couplé aux protéines Gq, sensible au zinc et qui est associé à une voie de signalisation impliquant les MAP kinases, les PI3 kinases et ERK1/2[218]. Au niveau des synapses hippocampiques, la libération de zinc par les vésicules synaptiques induit une modulation des récepteurs métabotropiques (mGluRs) qui passe par le ZnR[217]. Le récepteur orphelin couplé aux protéines G GPR39 est impliqué dans l'activité de ZnR. L'activation du ZnR par le Zn provoque une augmentation de l'activité de l'échangeur sodium/proton NHE1 et pourrait participer au processus de réparation de l'épithélium[219].

3.2.2 Les transporteurs membranaires du Zinc

3.2.2.1 Les ZnT

Les ZnT, aussi nommés SLC30 (solute-link carrier 30), regroupent plus d'une centaine de membres à travers toutes les espèces vivantes. Chez les mammifères, dix ZnT ont été mis en évidence (ZnT1-10 ou SLC30A1-A10). Le rôle des ZnT est de diminuer la concentration en zinc libre du cytoplasme. Pour cela, deux mécanismes sont possibles : 1) L'efflux du zinc vers le milieu extracellulaire. 2) La séquestration du zinc dans les compartiments internes.

Parmi les dix ZnT identifiés, seul ZnT1 est décrit comme impliqué dans l'efflux du zinc vers le milieu extracellulaire[220]. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer le rôle de ZnT1 : 1) Il inhibe l'influx du zinc via des canaux calcique de type L. 2) ZnT1 provoque directement l'efflux du zinc [221-223].

Les autres ZnT sont impliqués dans l'apport du zinc dans les compartiments intracellulaires comme les mitochondries (ZnT2)[224], les lysosomes (ZnT2/4/5)[221,222,225], les endosomes (ZnT2/4)[221,222,225], les vésicules sécrétoires (ZnT2/5/8)[226], les vésicules synaptiques (ZnT3)[227] et l'appareil de Golgi (ZnT4/5/6/7)[228-230] (Tableau 6).

Le rôle principal de l'ensemble de ces ZnT est de maintenir une faible concentration cytosolique en Zn. Ces transporteurs sont pour la plupart régulés par la quantité de zinc ingéré. Des régimes riches en zinc vont avoir tendance à augmenter l'expression des ZnT alors que des carences vont diminuer leur expression.

ZnT	Localisation tissulaire	Localisation intracellulaire	Rôle	Régulation par le zinc	Maladies associées	Références
ZnT1	Ubiquitaire	Membrane plasmique, vésiculaire	Efflux du zinc vers le milieu extracellulaire	Supplémentation en zinc induit l'expression de ZnT1 et une carence en zinc réduit son expression	Non identifiée	220-223
ZnT2	Petit intestin, reins, placenta, testicules, prostate, foie, pancréas	Endosomes, lysosomes, vésicules, mitochondries	Influx du zinc dans les compartiments internes	Supplémentation en zinc induit l'expression de ZnT2 dans le petit intestin, le foie et les reins. Une carence en zinc réduit son expression dans le petit intestin et le pancréas.	Diminution ZnT2 augmente la production de ROS→ cible contre cellules cancéreuses ?	221,222,224,225,231
ZnT3	Cerveau, testicules	Vésicules synaptiques	Influx du zinc dans les vésicules synaptiques	L'expression de ZnT3 ne semble pas être influencée par une carence en zinc.	Maladie d'Alzheimer ?	221,222,225,227,232 183,184,233
ZnT4	Ubiquitaire	Réseau trans-golgiens, vésicules, endosomes	Influx du zinc dans les compartiments internes	Son expression est augmentée dans les glandes mammaires lors d'une carence en zinc	Trouble du lait létal	221,222,225
ZnT5	Ubiquitaire	Granules sécrétoires des cellules ß du pancréas, appareil de golgi, membrane plasmique	Influx du zinc dans les compartiments internes	Différentes selon les types cellulaires étudiés	Le KO ZnT5 provoque des anomalies de développement. (maturation des ostéoblastes)	221,222,225 228,229
ZnT6	Foie, cerveau, petit intestin, rein, poumons	Réseau trans-golgiens, vésicules	Influx du zinc dans le réseau trans-Golgien	Une carence en zinc tend à diminuer l'expression de ZnT6	Non identifiée	221,222,225,229
ZnT7	Foie, cerveau, petit intestin, rein, rate, cœur, poumons	Appareil de Golgi, vésicules	Influx du zinc dans le Golgi	Supplémentation en zinc induit l'expression de ZnT7 et une carence en zinc réduit son expression selon les types cellulaires.	Non identifiée	221,222,225,230 .
ZnT8	Cellules ß du pancréas, foie	Vésicules	Influx du zinc dans les vésicules sécrétrices d'insuline	Inconnue	Cible des anticorps auto-immuns dans le diabète de type 1.	221,222,226
ZnT9	Ubiquitaire	Vésicules	Inconnu	Inconnue	Non identifiée	221
ZnT10	Cerveau et foie (probable)	Inconnue	Inconnu	Inconnue	Non identifiée	220,234

Tableau 6 Tableau récapitulatif de la distribution tissulaire et subcellulaire des ZnT présents chez les mammifères ainsi que leur régulation par le zinc

Les ZnT sont donc nécessaires pour diminuer la concentration cytoplasmique en Zn (efflux ou influx dans les compartiments internes). A l'inverse, il existe des transporteurs qui permettent une augmentation de la concentration cytosolique en Zn. Celle-ci peut se produire par deux principaux mécanismes :1) L'entrée de zinc depuis le milieu extracellulaire. 2) La libération du zinc à partir des compartiments intracellulaires. Les ZIP sont les transporteurs impliqués dans ces deux mécanismes.

3.2.2.2 Les ZIP

La famille des ZIP (ou SLC39) pour Zrt-Irt-like protein regroupe plus de 100 membres à travers l'ensemble des espèces vivantes. Elle est divisée en deux sous-familles : La sous-famille I qui comprend les gènes Zip des fongiques et des plantes et la sous-famille II composée des gènes Zip des insectes, des nématodes et des mammifères. Cette sous-famille II regroupe deux sous-familles, gufA et LIV-1 (incluant HKE4). Dans les cellules humaines, quatorze Zip ont été identifiés (ZIP1-14) (Tableau 7), certains n'ayant pas de fonction connue à ce jour. Certains ZIP sont exprimés de façon ubiquitaire alors que d'autres présentent des localisations tissulaires bien définies comme ZIP4 retrouvé uniquement dans le petit intestin, l'estomac, le colon et les reins (Tableau 7).

Plusieurs ZIP (1/2/3/4/5/6/10/12 et 14) sont exprimés à la membrane plasmique et participent à l'entrée de zinc depuis le milieu extracellulaire vers le cytosol. Ces différents ZIP n'ont pas tous la même localisation tissulaire et leur régulation par la concentration (intracellulaire ou extracellulaire) en zinc est peu décrite.

Les autres ZIP (ZIP7/8/9/13) forment des voies de sortie du zinc depuis les compartiments internes dont les lysosomes, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique.

D'un point de vue pathologique, les ZIP semblent avoir plusieurs rôles et notamment dans certains cancers du sein et de la prostate (ZIP2/3/6/7/8/10) (Tableau 7), dans les acrodermatites entéropathiques (ZIP4) ou encore dans le trouble de malabsorption du zinc chez l'embryon (ZIP4).

ZIP	Localisation tissulaire	Localisation cellulaire	Rôle	Régulation par le zinc	Maladies associées	Références
hZIP1	Ubiquitaire	Membrane plasmique, vésicules intracellulaires	Influx de zinc	Expression augmentée dans les cas de carence en zinc et diminuée si forte concentration en Zn dans le milieu extracellulaire	Non identifiée	221,235,236
hZIP2	Prostate, épithélium utérin, nerf optique et monocytes	Membrane plasmique	Influx de zinc Suppresseur de tumeurs ?	Surexprimé lors de carence en Zn	Cancer de la prostate	221,237
hZIP3	Ubiquitaire	Membrane plasmique	Influx de zinc Suppresseur de tumeurs ?	Non influencé par une carence en Zn	Cancer de la prostate	221,237
hZIP4	Petit intestin, estomac, colon, reins	Membrane plasmique	Influx de zinc	Expression augmentée en cas de carence en Zn, diminuée dans le cas de forte concentration en Zn dans le milieu extracellulaire	Troubles de la malabsorption du zinc Acrodermatites Entéropathiques Carcinomes hépatiques et pancréatiques	221,238-240
ZIP5	Reins, foie, rate, colon, estomac, pancréas	Membrane basolatérale des cellules polarisées	Influx de zinc	Dégradation des protéines dans le cas de carence en Zn	Non identifiée	241,242
ZIP6 / LIV-1	Ubiquitaire	Membrane plasmique	Influx de zinc	Inconnue	Cancer du sein	235,240,243,244
ZIP7 / HKE4	Ubiquitaire	Réticulum endoplasmique, Golgi	Libération du zinc depuis le RE et Golgi	Inconnue	Résistance au tamoxifen dans le cancer du sein	243,245-247
ZIP8 / BIGM103	Ubiquitaire	Surface apicale et lysosomes	Symport (Cd, Mn, Zn) /HCO_3^-	Inconnue	Résistance au faslodex dans le cancer du sein	248-250
ZIP9	Ubiquitaire	Réseau trans-golgien	Libération de Zn depuis les vésicules Golgiennes ?	Inconnue	Non identifiée	251
ZIP10	Ubiquitaire	Membrane plasmique	Influx de zinc	Inconnue	Cancer du sein	252,253
ZIP11	Ubiquitaire	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Non identifiée	
ZIP12	Poumons, cerveau, testicules, rétine	Inconnue	Influx de zinc	Inconnue	Schizophrénie, asthme	254,255
ZIP13	Ubiquitaire	Golgi	Libération de Zn depuis le Golgi	Inconnue	Syndrome d'Ehlers-Danlos	256
ZIP14	Ubiquitaire	Membrane plasmique	Influx de Zn, Cd, Mn, Fe. Impliqué dans la croissance.	Inconnue	Asthme, inflammation par l'IL-6	257-260

Tableau 7 Les ZIP, localisations et fonctions

Les ZIP ne constituent pas à eux seuls toutes les voies d'entrées du Zn, il en existe d'autres et notamment via certains canaux calciques ou récepteurs glutamatergiques.

3.2.2.3 Les canaux calciques dépendants du voltage. (VGCC)

Les VGCC constituent une voie d'entrée du Zn dans plusieurs types cellulaires[261,262], dont les neurones corticaux embryonnaires de souris au stade E15-E16[261]. L'utilisation des sondes fluorescentes Newport Green[263], mag-fura-5[261], TSQ (N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p–toluenesulfonamide)[264] ou FluoZin-3[262] a permis d'observer une entrée de Zn dans les cellules suite à une dépolarisation de la membrane plasmique par le KCl (en présence de Zinc extracellulaire). Ces signaux sont sensibles au TPEN, il s'agit donc bien d'une réponse Zn et non d'une réponse aspécifique des sondes fluorescentes (Figure 31A). L'utilisation de bloqueurs tels que le vérapamil, l'ω-conotoxine GVIA ou la nimodipine bloque complétement (ou partiellement) les réponses des cellules au KCl (Figure 31B). Des expériences d'électrophysiologie sur des neurones corticaux de souris (E15) ont montré l'implication des canaux calciques dépendants du voltage de type L et N dans l'entrée de Zn suite à une dépolarisation membranaire[263].

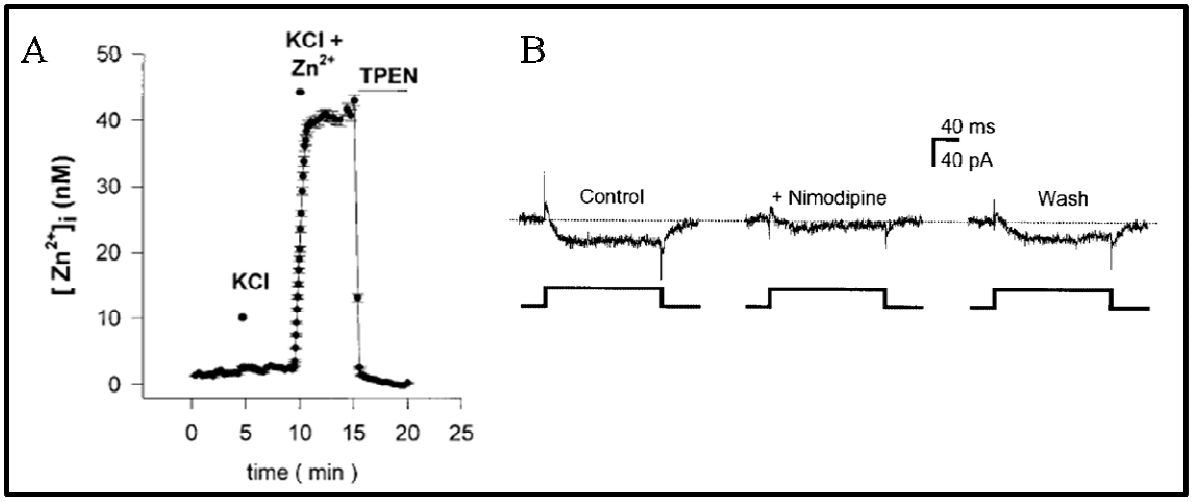


Figure 31 Les canaux calciques dépendants du voltage sont une voie d'entrée du Zn dans les neurones
A) Neurones corticaux embryonnaires chargés avec la sonde fluorescente mag-fura-5. L'application seule de 90 mM KCl ne provoque pas de signaux alors que l'application de 90 mM KCl + 300 µM Zn provoque une forte augmentation de la concentration de Zn intracellulare. Ce processus est totalement reversé par 50 µM de TPEN. (D'après Sensi *et al.*, **1997**, *The Journal of Neuroscience*)[261]. **B)** Expériences d'électrophysiologie sur des neurones corticaux embryonnaires. Les courants se produisent en présence de 2 mM Zn (et en absence d'autres cations divalents) suite à un saut de voltage à +10 mV. Ce courant est inhibé par 1 µM de Nimodipine. (D'après Kerchner *et al.*, **2000**, *Journal of Physiology*)[263]

3.2.2.4 Les canaux AMPA/Kainate.

Les récepteurs AMPA sont des récepteurs glutamatergiques (GluA) qui dans le système nerveux central sont composés des sous unités GluA1, 2, 3 ou 4. La sous-unité GluA2 dicte la perméabilité du canal au calcium. Les canaux exprimant la forme GluA2 sont imperméables au calcium[265]. Les autres canaux perméables au calcium de type α-amino3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid (AMPA)/kainate (Ca-A/K), forment une voie d'entrée du Zn dans les neurones[261,266-269]. L'activation de ces canaux par le kainate, en présence de Zn extracellulaire, induit une entrée massive de Zn dans la cellule (Figure 32A). Elle est responsable d'une augmentation importante de la production d'espèces réactives de l'oxygène pouvant être neurotoxiques (Figure 32B)[269,270]. Ce processus passerait par une perte du potentiel de membrane mitochondriale. Les neurones exprimant des canaux AMPA/kainate perméables au Zn semblent plus sensibles lors d'un stress induit par le kainate en présence de Zn[267]. Ces flux de Zn sont abolis en présence de NBQX, un antagoniste des récepteurs AMPA/kainate[261].

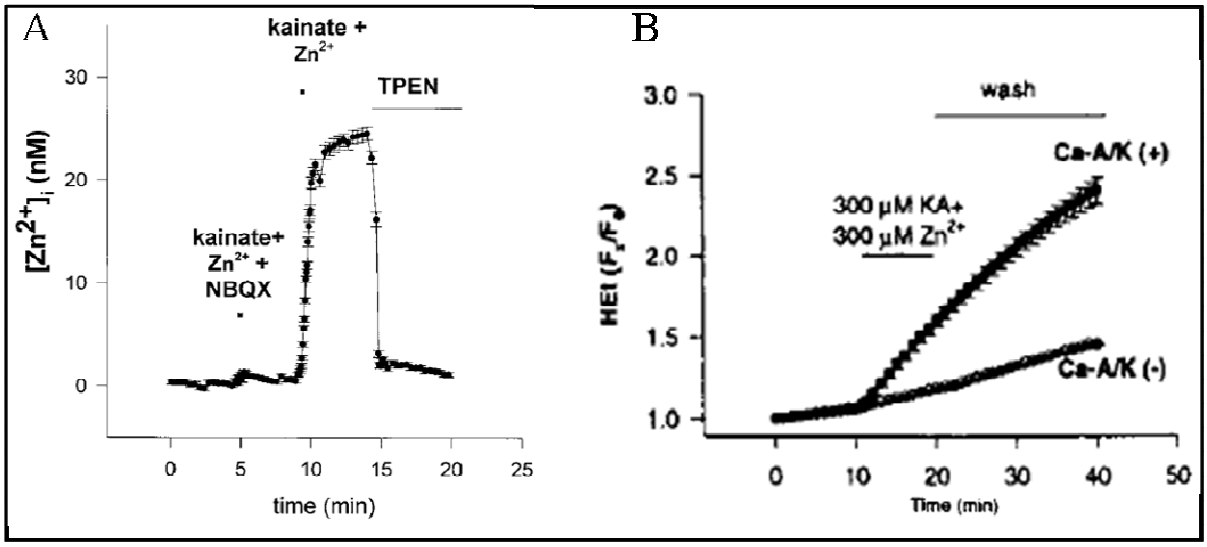


Figure 32 Les canaux calciques AMPA/kainate sont une voie d'entrée du Zn dans les neurones et provoquent la production de ROS

A) Neurones corticaux embryonnaires chargés avec la sonde fluorescente mag-fura-5. L'application seule de 100 µM Kainate + 300 µM Zn + 10 µM NBQX ne provoque pas de signaux alors que l'application de 100 µM Kainate + 300 µM Zn provoque une forte augmentation de la concentration en Zn intracellulaire, ce processus est totalement reversé par 50 µM de TPEN. (D'après Sensi *et al.*, **1997**, *The Journal of Neuroscience*)[261]. **B)** Production de ROS suivie avec la sonde fluorescente HEt dans des neurones corticaux. Ca-A/K(+) : Neurones possédant des canaux AMPA/kainate perméables au calcium. Ca-A/K(-) : Neurones ne possédant pas de canaux AMPA/kainate perméables au calcium. Les neurones qui possèdent les canaux Ca-A/K produisent beaucoup plus de ROS lors d'une exposition au Zn et au Kainate que les neurones Ca-A/K(-). (D'après Sensi *et al.*, **1999**, *PNAS*)[266]

3.2.2.5 Les récepteurs NMDA

Les récepteurs N-methyl-D-aspartate (NMDA-R) sont des récepteurs tétramériques de la famille des récepteurs glutamatergiques résultant d'un assemblage de sous-unités de type N1, N2A-D, N3A et N3B. Les NMDA-R majoritaires sont composés de deux sous unités N1 (qui fixent la glycine) et de deux sous unités N2 (qui fixent le glutamate). Les NMDA-R composés de deux sous unités N1 et deux sous unités N3 sont insensibles au glutamate. Les NMDA-R forment une voie d'entrée du Zn dans les neurones[261,271]. Ils semblent surtout impliqués dans un processus de neurotoxicité passant par le Zn[271]. La perméabilité des NMDA-R au Zn est cependant remise en question par des études révélant une inhibition des NMDA-R par le Zn[272,273]. Les NMDA-R sont bloqués par le zinc : 1) De façon dépendante du voltage ([Zn]>20 µM). 2) Indépendamment du voltage membranaire ([Zn]< µM)[272]. Cette inhibition indépendante du voltage membranaire est différente selon la composition des NMDA-R et selon la concentration en zinc : Le zinc inhibe les NMDA-R (IC_{50} de l'ordre du nanomolaire) composés des sous-unités N1/N2A. Des concentrations en zinc de l'ordre du micromolaire inhibent ceux de sous-unités N1/N2B et des concentrations supérieures à 10 µM inhibent les NMDA-R de sous-unités N1/N2C et N1/N2D.

Les NMDA-R composés des sous-unités N2A sont donc très sensibles au zinc extracellulaire (nM). Cette faible concentration en Zn est présente à l'état de trace dans le milieu extracellulaire donc en condition basale ces récepteurs sont partiellement inhibés par ce zinc contaminant. Le site de haute affinité du zinc se situe sur le domaine N-terminal de la sous unité N2A. La sous-unité N2B possède quant à elle un site de fixation au zinc de faible affinité, ce qui explique les différences de concentrations de zinc inhibitrices des NMDA-R. Ils constituent donc une cible importante pour le zinc libéré des vésicules synaptiques glutamatergiques et pourrait limiter les processus d'excitotoxicité induits par la sur-activation des récepteurs glutamatergiques.

3.2.2.6 L'échangeur Na^+/Zn^{2+}

Dans les cellules HEK293, la présence d'un échangeur Na^+/Zn^{2+} a été mis en évidence par des techniques d'imagerie de fluorescence avec la sonde Fura-2 et l'emploi du TPEN. En présence de sodium dans le milieu extracellulaire, l'échangeur permet un efflux de Zn et lorsque ces expériences sont reproduites en absence de sodium extracellulaire (donc gradient de sodium inverse), l'échangeur permet un influx de Zn dans la cellule[274]. Des résultats similaires sont obtenus sur des neurones corticaux en culture en utilisant la ouabaïne dans un

milieu extracellulaire sans sodium, ces conditions provoquent une entrée de Zn visible en imagerie avec la sonde FluoZin-3[275]. A noter que l'entrée de Zn observée ne passe pas par l'échangeur Na^+/Ca^{2+} [274,275].

Les acteurs impliqués dans l'efflux et dans l'influx de Zn permettent à la fois d'augmenter le Zn cytoplasmique mais aussi, comme nous avons pu le décrire sommairement facilitent le remplissage de certains compartiments (pools) qui stockent du Zn.

Dans le chapitre suivant nous allons décrire ces différents compartiments qui stockent du Zn et quels sont leurs rôles dans l'activité cellulaire.

3.2.3 Les pools de zinc intracellulaires

La concentration intracellulaire de zinc libre est de l'ordre du picomolaire[233,276,277] pour une quantité cellulaire totale d'environ 100 à 150 µM. Nous allons voir dans ce chapitre que la majeure partie du Zn est donc fixée à des protéines notamment dans le cytoplasme. Décrit dans le chapitre *4.1*, une augmentation du Zn libre dans la cellule peut constituer un signal proapoptotique. Ce pool de zinc libre est donc très finement régulé.

3.2.3.1 Le zinc dans les vésicules synaptiques glutamatergiques

Entre 5 et 15% de la quantité totale du Zn du cerveau est séquestrée dans les vésicules synaptiques[278]. La concentration en Zn dans les vésicules serait de l'ordre du µM et le transporteur ZnT3 est à l'origine de l'accumulation du Zn dans ce compartiment[227]. Les vésicules synaptiques contenant du Zn sont retrouvées dans les neurones glutamatergiques que l'on appelle aussi gluzinergiques. Le Zn stocké dans les vésicules synaptiques est relargué suite à la fusion vésiculaire lors de la transmission synaptique. La concentration en Zn dans la fente synaptique peut alors augmenter et atteindre des concentrations de l'ordre du micromolaire[279]. La libération de ce Zn influence l'activité des récepteurs et canaux de la membrane post-synaptique (chapitre *3.2.2*). Ce pool de Zn ne semble cependant pas interagir avec les autres pools de zinc mobilisables de la cellule. L'existence de ces pools de zinc hors des vésicules synaptiques dans les neurones a été mise en évidence par l'utilisation de la sonde fluorescente Zinquin. La présence de zones ponctiformes fluorescentes de petites tailles dans les neurones en culture en condition basale est observée grâce à cette sonde (Figure 33). L'entrée massive de zinc grâce au pyrithione conduit à une augmentation importante de la

fluorescence. Ce phénomène est absent en présence du TPEN (chélateur spécifique du Zinc) et dépend du pH extracellulaire[280].

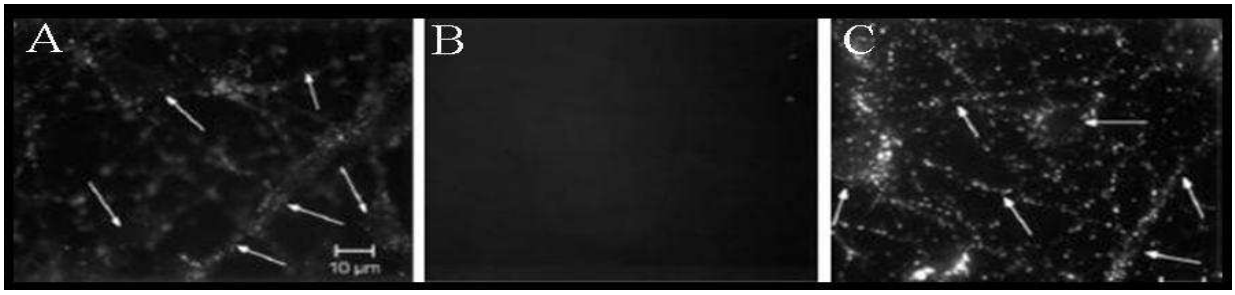


Figure 33 Images de neurones corticaux en présence de zinquin
A) Fluorescence en présence de 25 µM zinquin après un pré-traitement de 20 minutes avec 25 µM TPEN puis ajout de 30 µM Zn à pH 6,0. **B)** même conditions que **(A)** à pH 7,4. **C)** même conditions que **(B)** mais ajout de pyrithione pendant 5 minutes. Par cette expérience, les auteurs montrent l'existence de pool de zinc hors des vésicules synaptiques mais aussi l'importance du pH extracellulaire dans le transport du zinc.
(D'après Colvin, **2002**, *Am J Physiol Cell Physiol*)[280]

Ces signaux Zn ne sont pas d'origine mitochondriale mais seraient plutôt associés à des structures de type endosomale, des zincosomes[281].

3.2.3.2 Le pool de zinc mitochondrial

La présence de zinc dans les mitochondries a été démontrée par l'utilisation de la sonde fluorescente RhodZin-3 dans les neurones (Figure 34). Cette sonde s'accumule dans la mitochondrie et permet d'observer spécifiquement les variations de zinc de ce compartiment[282,283].

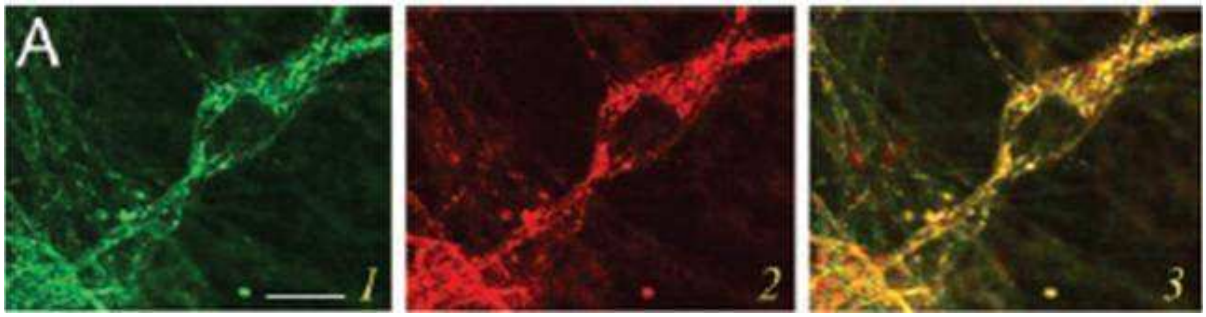


Figure 34 Colocalisation de la sonde RhodZin-3 et du MitoTracker green
Microscopie confocale sur une culture de neurones corticaux **1.A)** marqués avec le MitoTracker Green (fluorescence verte) ou **2)** incubés avec la sonde fluorescente RhodZin-3 (fluorescence rouge). **3)** Superposition de **(1)** et **(2)**, la couleur jaune signifiant une colocalisation de la sonde RhodZin-3 et du MitoTracker.
(D'après Sensi *et al*., **2003**, *PNAS*)[283]

Les signaux mesurés sont sensibles au TPEN, résultat confirmé dans une étude plus récente employant la sonde ratiométrique-pericam-mt (RPmt)[284]. Les mitochondries semblent donc former un pool de zinc dans les neurones corticaux embryonnaires. Le mécanisme de

remplissage de ce pool de zinc serait dépendant de l'uniporteur calcique et d'un mécanisme indépendant qui impliquerait le transporteur ZnT2. Le rouge de ruthénium est un inhibiteur de l'uniporteur calcique (MCU) et a permis de mettre en évidence l'importance de celui-ci dans le transport du Zn vers la mitochondrie[285,286]. L'entrée du zinc via ZnT2 dans les mitochondries a fait l'objet d'une étude dans des cellules d'épithélium mammaire mais pas encore dans les neurones. ZnT2 est exprimé dans la membrane interne de la mitochondrie où il serait impliqué dans l'import de Zn dans cette organelle. Ce travail présente pour la première fois l'implication d'un transporteur à Zn de la famille des ZnT dans la mitochondrie[224]. Il serait à présent très intéressant de savoir si ce processus existe dans les cellules neuronales.

L'accumulation de Zn dans les mitochondries peut cependant avoir des conséquences pouvant être très néfastes pour la cellule. En effet, cette accumulation peut conduire à une perte du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), une inhibition de la consommation de l'O_2, une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par l'inhibition de l'activité du complexe III de la chaine de transport des électrons[287] ou encore une déformation des mitochondries[288]. Le Zn peut aussi induire l'ouverture du « pore de transition mitochondrial » (MPT), un pore très large pouvant laisser passer des molécules jusqu'à 1,5 kDa et pouvant induire les signaux de mort cellulaire. Les conséquences de l'activation de ce pore sont la libération de calcium, de glutathion, de cytochrome *c* ou encore du facteur induisant l'apoptose (AIF)[288-290].

La mitochondrie constitue un pool de Zn mobilisable, labile, dans les neurones. Ce concept a été proposé suite à des expériences employant la sonde FluoZin-3 hautement spécifique du Zn (Kd = 15 nM). Le Zn présent dans les mitochondries peut facilement être déplacé vers le cytoplasme sous l'effet du FCCP[283]. Le FCCP est un protonophore qui induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale et provoque une libération de Ca, de Zn ou encore de cytochrome *c*[119,291]. La mitochondrie semble se charger en zinc suite à une entrée massive de ce métal dans les neurones via les récepteurs AMPA/Kainate[269]. La mitochondrie serait donc un compartiment de stockage du Zn intracellulaire[283]. Ce pool mitochondrial semble insensible aux agents oxydants comme le DTDP (2-2' Dithiodipyridine) ou l'H_20_2[286]. Ce stock de zinc mobilisable est capable d'interagir avec un autre pool de zinc dans les neurones (celui-ci sensible aux agents oxydants) présent dans le cytoplasme[283].

3.2.3.3 Les métallothionéines

Structure des métallothionéines (MTs)

Les MTs de mammifères sont des petites protéines de 6 à 7kDa, sans activité enzymatique et qui comptent entre 61 et 68 acides aminés. Leur composition en acides aminés est très singulière car elles contiennent un tiers de cystéines (donc sont très riches en soufre). Elles ne contiennent pas d'acides aminés aromatiques ou d'histidine. Des motifs particuliers sont présents dans leur séquence d'acides aminés : les motifs Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys et Cys-Cys où X et Y sont des acides aminés autres que des cystéines. Chez les mammifères, 4 isoformes distinctes ont été identifiées, MT-I, MT-II, MT-III et MT-IV[185,292-295]. L'isoforme MT-I a des sous types, nommés MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT1-H et MT1-X[296]. *In vivo*, ces protéines riches en résidus cystéine ont la propriété de fixer les métaux comme le zinc, le cuivre, le cadmium et le mercure (7 ions Zn ou Cd, 8 à 12 ions Cu et jusqu'à 18 ions Hg). Les MT-I et MT-II sont exprimées dans tous les tissus alors que les MT-III sont principalement exprimées dans le cerveau et notamment dans les régions riches en Zn vésiculaire comme l'hippocampe, le cortex ou l'amygdale[297,298]. MT-IV est exprimée dans les cellules d'épithéliums stratifiés de la langue et de la peau[299].

Régulation de l'expression des métallothionéines par les métaux.

L'expression des MT-I et MT-II est régulée par une variété de stimuli dont les métaux, les cytokines, les agents oxydants et l'inflammation.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'induction de l'expression des MTs par les métaux. Les gènes codant pour MT-I et MT-II sont hautement inductibles par le Zn, le Cd et, plus faiblement par le Hg, et par le Cu alors que les gènes codant pour MT-3 et MT-4 ne semblent pas être induits par ces différents métaux[300]. La régulation transcriptionnelle des MTs par les métaux est possible grâce à la présence de la séquence MRE (Metal Responsive Element) « CTN**TGC(G/A)CNC**GGCCC » au niveau du promoteur de tous les gènes codant pour les MTs[301]. La régulation de l'expression des MTs par le Zn passe par le senseur de Zn cytoplasmique MTF-1 (Metal responsive elements binding transcription factor 1). MTF-1 est une protéine qui se fixe au MRE mais qui a besoin d'un niveau élevé de Zn dans le cytoplasme pour fonctionner[206]. Ce senseur du Zn est exprimé de façon ubiquitaire et constitutive, le KO du gène codant pour MTF-1 est létal. Seul le Zn permet à MTF-1 de se fixer à l'ADN et de jouer son rôle de facteur de transcription des gènes codant pour les MTs. Cependant, le Cd induit aussi une augmentation de l'expression des MTs sans augmenter la

liaison de MTF-1 à l'ADN, ce qui suggère une activation indépendante du couple MRE/MTF-1[302]. Les mécanismes participant à la régulation de l'expression de MT-III et MT-IV sont moins connus. MT-III semble être surtout régulée par des dommages tissulaires (réponses inflammatoires et stress oxydant)[303-305].

Localisation subcellulaire des MTs.

Les MTs ont été principalement décrites au niveau du cytoplasme mais elles sont aussi présentes dans certains compartiments intracellulaires comme les mitochondries, le noyau et les lysosomes.

Mitochondrie

Une étude sur des mitochondries isolées de foie (organe où l'expression des MTs est la plus forte) a permis de préciser leur présence dans ce compartiment où les MTs se retrouvent au niveau de l'espace inter membranaire mitochondrial[306].

Noyau

Les MT-I et MT-II peuvent rapidement transiter vers le noyau et notamment au moment de la phase précoce S de différentiation[307] ou lors d'un stress oxydant[308]. La petite taille des métallothionéines leur permet de passer à travers les pores nucléaires et l'expression d'ARNm des MTs en périphérie du noyau contribuerait aussi à faciliter l'import des MTs vers ce compartiment[308]. Sur des fibroblastes traités avec des métaux tels que le Zn, le Cu ou le Fe, les MTs sont retrouvées à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Les MTs dans le noyau pourraient avoir un rôle de protection de l'ADN et donc de protection de la cellule contre l'apoptose (chapitre *4.1*). Les MTs du noyau constituerait un pool de Zn pour les métalloprotéines ou les facteurs de transcription[294].

Lysosomes / Endosomes

Dans les lysosomes, les MTs semblent couplées soit avec du Cu soit avec du Cd suite à leur internalisation par endocytose. Dans ce compartiment acide, le métal serait libéré de la MT et la forme Apo-MT serait libérée du lysosome vers le cytoplasme. Il n'y a pas d'autres rôles connus associés à la présence des MTs dans ces compartiments acides[309,310].

Fonctions des métallothionéines.

Les MTs sont impliquées dans de nombreuses fonctions intracellulaires telles que le stockage et le transport des métaux (Cu et Zn), la transmission de ces métaux aux autres métalloprotéines ou facteurs de transcription, la protection des cellules face à la toxicité des métaux, la protection des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS), la réparation cellulaire ou encore la protection des cellules dans le cas de maladies neurodégénératives.

1) Rôle des métallothionéines dans la protection contre la toxicité des métaux.

L'importance des MTs dans la détoxification a été très étudiée. Les modèles de souris transgéniques ou les lignées cellulaires ont été utilisés pour démontrer le rôle des MTs dans la protection contre la toxicité induite par le Cd ou l'Hg[311,312]. En premier lieu, la protection des cellules contre la toxicité des métaux a été attribuée aux MT-I et MT-II puis MT-III a été aussi proposée pour jouer un rôle dans ce processus[313]. Les MTs sont impliquées dans la protection des cellules contre des stress Zn, Cu, Fe, Pb, Hg et As[314]. Plusieurs mécanismes sont proposés comme la réduction du métal lors de son entrée dans la cellule, la séquestration et l'augmentation de son export. Ces propriétés semblent surtout être obtenues grâce aux nombreux résidus soufrés qui composent les MTs et qui induisent une stabilité des liaisons avec les métaux[315].

2) Les métallothionéines sont des antioxydants

Les MTs sont des anti-oxydants non enzymatiques. Elles sont capables de réagir avec les anions superoxydes, les radicaux hydroxyles, les radicaux phénoxyles et les oxydes nitriques[294,316]. Ces propriétés sont permises grâce aux nombreuses cystéines qui forment des clusters de thiolates de métaux assurant un passage rapide entre la MT (souvent du Zn) et les radicaux libres[315,317].

3) Les métallothionéines, réservoir et transporteurs du Zn dans la cellule.

La mobilisation du zinc depuis les métallothionéines lors d'un stress oxydant peut constituer un processus au cours duquel du Zn pourrait être relocalisé dans la cellule ou utilisé pour les défenses antioxydantes de la cellule[315,318]. Par exemple, sur des fibroblastes pulmonaires, l'application de *S*-nitrocystéine provoque une augmentation de Zn intracellulaire (détectée par la Zinquin) dans les cellules contrôles et ne provoque pas de réponse dans les fibroblastes KO pour les MTs[319]. La migration du Zn depuis les MTs vers les enzymes impliquées dans la protection des cellules contre le stress oxydant et vers les facteurs de

transcription nucléaires (cf paragraphes précédents) montre aussi l'importance de ce pool de Zn dans l'activité générale de la cellule. Cependant, les souris KO pour MT-I ou MT-II n'ont pas de phénotypes anormaux au niveau de leur croissance et de leur développement[301]. En revanche ce pool de Zn est impliqué dans la protection des cellules dans des conditions de stress (*in vitro*) mais n'est pas la première ligne de défense de l'organisme face à un stress métallique. Les mécanismes d'efflux des métaux semblent former cette première ligne de protection.

3.2.3.4 Le zinc dans le noyau

L'injection de ^{65}Zn par voie intra péritonéale provoque une augmentation du Zn nucléaire dans les hépatocytes de rats[320]. Cependant aucun transporteur de Zn n'a été décrit pour ce compartiment, le Zn semblant entrer dans le noyau suite à une translocation des MTs depuis le cytoplasme[321,322].

3.2.3.5 Le zinc dans l'appareil de Golgi.

L'utilisation de la sonde fluorescente Zirpyr-3 sur des neurones a permis de mettre en évidence la présence de Zn dans l'appareil de Golgi. La fluorescence mesurée est sensible au TPEN[323]. Plusieurs transporteurs ZIP (7 et 9) et ZnT (5 et 7) ont été identifiés dans le Golgi et dans les compartiments vésiculaires. L'importance de ces transporteurs sur l'homéostasie du Zn a été caractérisée dans les cellules rénales de rat[229], dans plusieurs tissus et cellules chez la souris[230] ou encore dans des lignées cellulaires[324].

3.2.3.6 Le zinc dans le réticulum endoplasmique.

Peu de travaux ont montré la présence de Zn dans le réticulum endoplasmique. Dans les mastocytes, une libération de Zn est enregistrée grâce à la sonde Newport Green DCF depuis une zone péri-nucléaire qui inclut le réticulum endoplasmique. Les signaux enregistrés sont sensibles au TPEN et insensibles aux chélateurs de fer, cuivre ou manganèse[325]. Dans une étude récente sur des cultures primaires de neurones de rat, du zinc est directement observé dans le réticulum endoplasmique de ces cellules en utilisant de l'IP_3 ou de la thapsigargine[326]. Cependant ce résultat semble dépendre du modèle animal ou de la sonde utilisée puisque sur des cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires de souris, l'application de thapsigargine ne provoque pas d'augmentation de fluorescence de la sonde FluoZin-3 (hautement spécifique au Zn)[123].

Le schéma suivant (Figure 35) résume l'ensemble des acteurs qui régulent l'homéostasie du zinc dans les cellules.

Diverses pathologies dont des neuropathologies se caractérisent par une altération des processus homéostatiques du Zn. Nous allons aborder quelques exemples de neuropathologies dans lesquelles le Zn serait impliqué.

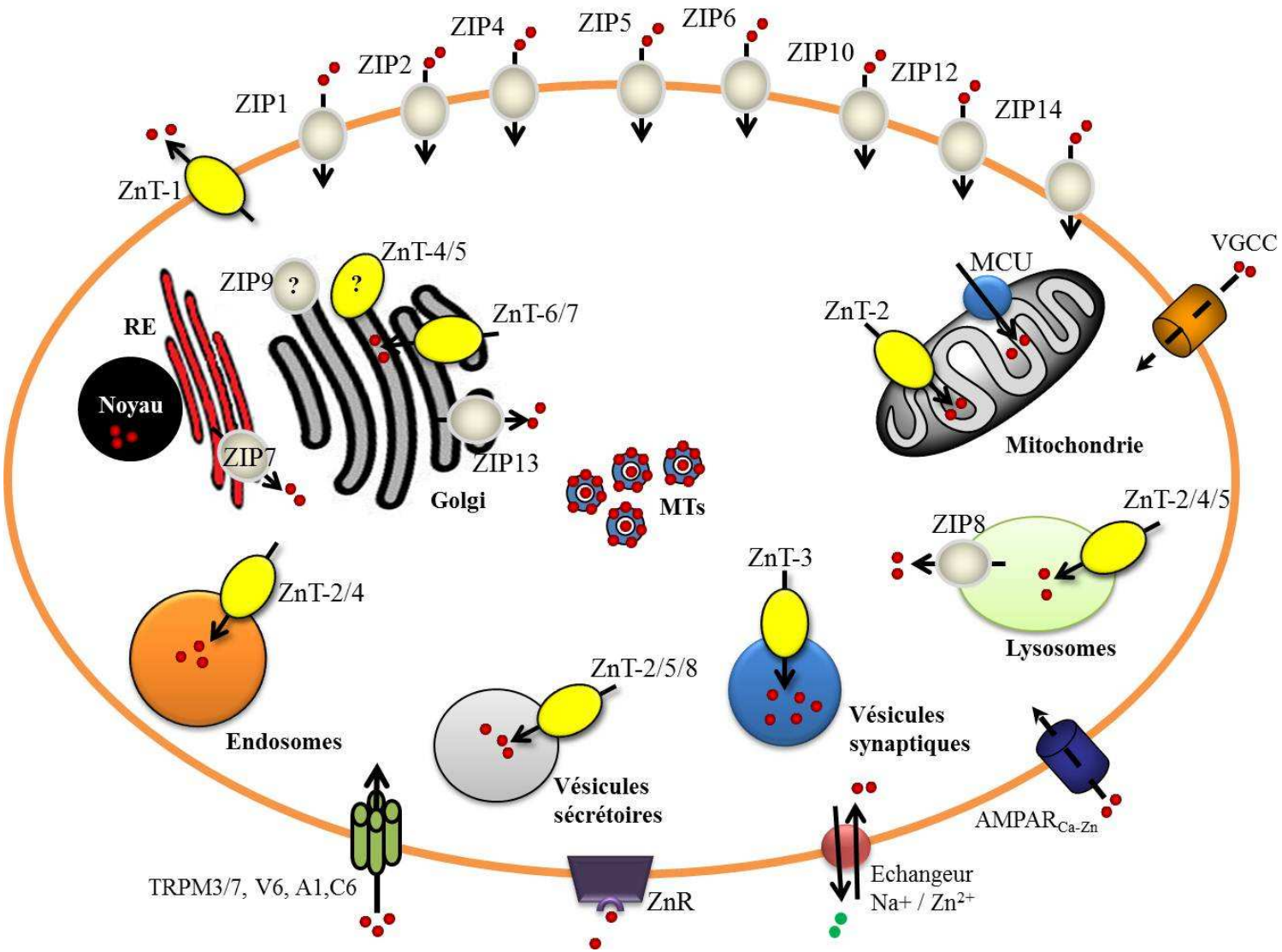


Figure 35 Représentation schématique des acteurs cellulaires participant à l'homéostasie du Zn (●)

4. Zinc, maladies neurologiques et troubles de l'humeur

Avant de décrire quelques neuropathologies dans lesquelles le Zn pourrait être impliqué, nous allons aborder le rôle du zinc dans la mort cellulaire.

4.1 Le rôle du zinc dans l'apoptose et la nécrose

De nombreux processus cellulaires participent à la toxicité du Zn (Figure 36). Une augmentation de la concentration intracellulaire en Zn va accroître la production d'espèces réactives de l'oxygène, inhiber le métabolisme énergétique en modulant le potentiel mitochondrial, induire l'autophagie ou encore inhiber les canaux chlore KCC2. Une déficience en Zn va aussi avoir des conséquences délétères pour la cellule en induisant un stress oxydant, en altérant la dynamique du cytosquelette et en modulant l'expression de facteurs de transcription[190,327]. Le Zn intracellulaire est maintenant décrit comme un second messager capable de réguler un grand nombre de voies de signalisation et notamment celles impliquées dans la mort cellulaire.

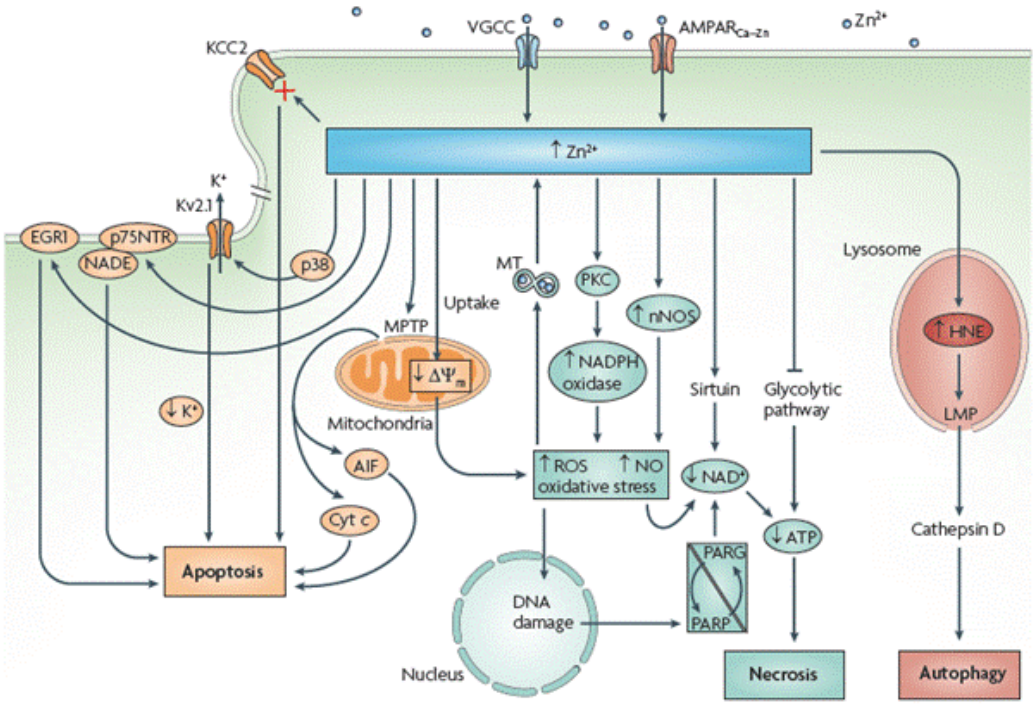


Figure 36 Le zinc active diverses voies conduisant à la mort neuronale
Le Zn est impliqué dans de nombreux processus conduisant à la mort de la cellule, soit par apoptose, soit par nécrose soit par autophagie. L'apoptose peut être induite suite à la perte du potentiel de membrane mitochondrial et la libération du facteur d'induction de l'apoptose et du cytochrome *c* (chapitre *3.2.3.2*). L'inhibition des canaux chlore KCC2 ou l'activation des récepteurs p75NTR par le zinc confère aussi un signal proapoptotique. La nécrose des cellules neuronales par le zinc implique la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote notamment par la mitochondrie mais aussi en activant les NADPH oxydases et l'oxyde nitrique synthétase neuronale (nNOS). L'autophagie serait induite par l'ouverture des membranes lysosomales en réponse à l'augmentation du 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). (D'après Sensi *et al.*, **2009**, *Nature reviews neuroscience*)[184].

4.2 Le zinc dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'accumulation extracellulaire de peptides β-amyloïdes et par l'accumulation intracellulaire de la protéine tau hyperphosphorylée. Les dépôts de peptides β-amyloïdes se situent principalement au niveau de la synapse. Etant donné la libération importante de Zn au niveau des synapses lors de la transmission synaptique dans certaines structures cérébrales, la question de la relation entre le Zn et la maladie d'Alzheimer se pose (Figure 37). *In vitro* et *in vivo*, le Zn facilite l'agrégation des peptides β-amyloïdes. Les souris tg2576 (modèle de souris Alzheimer) $ZnT3^{-/-}$, donc déficientes en Zn dans les vésicules synaptiques, présentent une amélioration de leur fonctions cognitives par rapport aux souris ZnT3 sauvages. D'autres effets sont associés au Zn dans la maladie d'Alzheimer comme la fixation du Zn sur la sous-unité N2B du récepteur NMDA et une perturbation de la LTP (Long term potentiation) par une action sur ZnR (GPR39) et sur TrkB. Au niveau cellulaire, le Zn induit l'hyper phosphorylation de tau et provoque une augmentation des enchevêtrements neurofibrillaires. Des traitements basés sur la chélation du Zn (avec des chélateurs comme le clioquinol, ou le PBT2) sont en cours d'essais cliniques avec notamment des effets visibles sur les fonctions cognitives des patients (revues[183,184,233]).

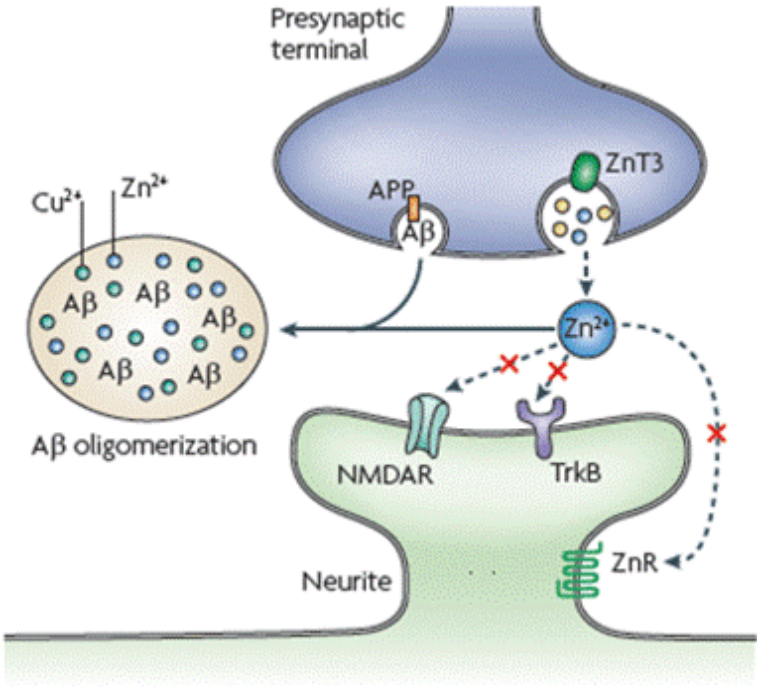


Figure 37 Le zinc dans la maladie d'Alzheimer
Représentation schématique de l'action du Zn dans la maladie d'Alzheimer au niveau de la synapse. Le Zn libéré depuis les vésicules synaptiques pourrait inhiber les récepteurs NMDA, TrkB et ZnR. Le Zn facilite l'agrégation des peptides β-amyloïdes. (D'après Sensi *et al.*, **2009**, *Nature reviews neuroscience*)[184]

4.3 Le zinc dans la sclérose latérale amyotrophique (ALS)

L'ALS est une maladie neurodégénérative qui affecte les neurones moteurs de la moelle épinière, du tronc cérébral et du cortex cérébral moteur. Dans les formes familiales de l'ALS, des mutations « gain de fonction » au niveau de la superoxyde dismutase SOD1 ont été identifiées. SOD1 est une enzyme antioxydante présente dans le cytosol et qui catalyse la dismutation de l'O_2^- en H_2O_2 et O_2. Cette enzyme constitue la première ligne de défense de l'organisme face au stress oxydant[328]. La SOD1 fixe du Zn nécessaire à sa structure et les formes mutées ont un défaut dans cette fixation du Zn. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer en quoi ces mutations confèrent des lésions dans les neurones moteurs : 1) Les neurones présentent des anomalies de gestion des radicaux libres. 2) Il y aurait une agrégation anormale des protéines ou 3) Une augmentation de la sensibilité à l'excitotoxicité. Une déficience en Zn tend à accélérer la maladie qui peut être stoppée par une supplémentation en Zn[183,233]. Toutefois, chez les modèles animaux et chez les patients atteints d'ALS aucune différence de concentration en Zn n'a été décelée[329]. En revanche, l'expression des MTs du cerveau et du foie de ces patients est considérablement élevée. Ces données indiquent qu'une altération de l'homéostasie du Zn pourrait expliquer (au moins en partie) les dommages observés chez les patients atteints d'ALS.

4.4 Zinc et ischémie

L'ischémie cérébrale intervient suite à un accident vasculaire cérébral. Cette diminution de l'apport sanguin au niveau du cerveau peut avoir des effets irréversibles. Au niveau cellulaire, l'ischémie provoque une diminution de l'expression de la sous unité GluA2 qui compose les canaux calciques A/K (AMPA/Kainate chapitre *3.2.2.4*) facilitant donc l'entrée du calcium et du zinc notamment au niveau des neurones de CA1. Dans les modèles animaux, l'inhibition des canaux calciques A/K ou la chélation du Zn (Ca-EDTA) protègent de l'action du Zn lors d'ischémie[183]. Il est probable que l'action néfaste du Zn lors d'ischémie se traduise aussi par une dérégulation de l'activité mitochondriale[266,269,330].

4.5 Zinc et épilepsie

Le zinc est décrit comme un pro-convulsivant. L'importance du zinc synaptique lors de crises d'épilepsies a été montrée dans les modèles animaux murins[331]. La concentration en zinc de l'hippocampe de ces animaux épileptiques est nettement diminuée par rapport aux animaux sains[332]. Le traitement de ces animaux par du zinc réduit les crises épileptiques

tandis qu'une alimentation déficiente en zinc augmente la susceptibilité de ces animaux aux crises[333]. Chez les patients atteints d'épilepsie, deux principaux changements sont observés au niveau de la structure et de la distribution de certains récepteurs au niveau de l'hippocampe : 1) La composition des récepteurs $GABA_A$ (GABAR) des cellules granulaires du gyrus denté est modifiée et présente un niveau faible d'expression de sous-unité α1 de GABAR associé aux sous-unités γ2 et donc une sensibilité accrue au zinc qui se traduit par un blocage des GABAR. 2) Les fibres moussues terminales sont réorganisées et viennent innerver le gyrus denté. Ces deux observations indiquent qu'une activité intense des fibres moussues conduit à une large libération du glutamate et de zinc, ce zinc en bloquant les GABAR diminue les effets inhibiteurs du GABA, facilitant la génération de crises au niveau du gyrus denté[183,334,335].

4.6 La dépression

La dépression se traduit par une variété de symptômes dont des perturbations du sommeil et de l'appétit, une perte d'intérêt et de plaisir, des pensées négatives, une sensation de fatigue et des difficultés à se concentrer. La dépression serait responsable de 50 à 70 % des suicides. Aux Etats-Unis, environ 9 millions de personnes sont diagnostiquées chaque année comme ayant un état dépressif, ce qui représente un coup estimé d'environ 43 milliards de dollars de perte de productivité et de dépenses en traitement[336]. Celui-ci implique principalement l'utilisation d'antidépresseurs ; la thérapie comportementale et cognitive ou l'emploi de chocs électroconvulsifs (ECS) sont également utilisés.

Les antidépresseurs :

Les processus neurobiologiques responsables de la maladie dépressive sont encore débattus. L'hypothèse la plus couramment rencontrée dans la littérature considère que les troubles de l'humeur seraient associés à une perturbation de la neurotransmission. Les premiers médicaments antidépresseurs synthétiques étaient des inhibiteurs de la monoamine oxydase et des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine. Ceci a contribué à forger la théorie monoaminergique de la dépression ; théorie selon laquelle les médicaments antidépresseurs agiraient en augmentant les taux de sérotonine et noradrénaline.

Il existe plusieurs classes d'antidépresseurs :

- Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine
- Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la noradrénaline

- Les inhibiteurs non sélectifs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline
- Les inhibiteurs des monoamines oxydases
- Les antidépresseurs tricycliques

Cependant, leur simple action sur les monoamines ne suffit pas à expliquer leur efficacité car d'autres drogues comme la cocaïne ou les amphétamines (agissant sur les monoamines) sont sans effets chez les patients dépressifs[337-339]. Depuis les années 1950 et la mise sur le marché de ces médicaments, de nouvelles familles d'antidépresseurs ont vu le jour et certains exercent leur action via le système glutamatergique ou GABAergique, mettant à mal l'hypothèse monoaminergique de la dépression[338].

Neurobiologie de la dépression

De nombreuses hypothèses et observations ont été faites pour identifier les bases cellulaires et moléculaires de la dépression : la neurodégénération, la diminution de taux de monoamines, la diminution du taux de BDNF et de la neurogenèse, ou encore la diminution de la concentration en zinc.

Il semblerait que les patients dépressifs présentent des altérations dans la plasticité et la structure de leurs synapses. Ces patients ont une réduction du nombre, de la densité et de la taille des cellules neuronales et gliales dans le cortex frontal et dans l'hippocampe ainsi qu'une diminution de l'épaisseur du cortex parahippocampique[340-343]. Ces défauts morphologiques s'accompagnent de changements dans les circuits synaptiques : il y aurait une diminution de l'activité et de la connectivité entre le lobe frontal et les autres régions du cerveau ou encore une altération de la morphologie des dendrites des neurones de l'hippocampe[344,345]. La dépression a un impact négatif sur les capacités d'apprentissage et de mémoire. Le stress (principal facteur dans la dépression et le suicide) retarde les performances mnésiques dépendantes de l'hippocampe et diminue la potentiation à long terme (LTP) de l'hippocampe[346]. Ces travaux montrent clairement les détériorations structurales et fonctionnelles mais finalement la nature cellulaire et moléculaire de la dépression reste à déterminer.

Certains signaux extracellulaires peuvent moduler l'activité du système nerveux central. Parmi ces signaux, les neurotrophines jouent des rôles essentiels dans la survie, la prolifération, la migration et la différentiation des cellules neuronales lors du développement[347]. A l'âge adulte, ces neurotrophines sont nécessaires aux fonctions cellulaires, à l'intégrité structurale des neurones, à la plasticité synaptique et à la neurogenèse[348]. Il existe plusieurs neurotrophines : le facteur de croissance du nerf (NGF), le

facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et les neurotrophines 3, 4 et 5. La plupart de leurs actions sont réalisées grâce aux récepteurs tropomycine kinases (Trk) de la famille des récepteurs tyrosine kinase. Le NGF se fixe sur TrkA, le BDNF et NT4 se fixent sur TrkB et NT3 se fixe sur TrkA, B et C. Toutes les neurotrophines peuvent aussi activer $p75^{NTR}$ [349]. La fixation des neurotrophines sur leurs récepteurs va conduire à la dimérisation et la transphosphorylation des résidus tyrosines des domaines intracellulaires des Trk et conduire à l'activation de voie de signalisation cytoplasmique[349].

Le BDNF semble être impliqué dans la dépression. Cette constatation vient du fait que les traitements avec des antidépresseurs augmentent l'expression du BDNF dans le cerveau et diminue l'effet délétère du stress sur le taux de BDNF[339]. Dans la plupart des cas, cette augmentation d'expression du BDNF se produit plutôt lors de traitements chroniques que lors de traitements aigus, bien que quelques études montrent une augmentation du BDNF dans le cortex et une diminution dans l'hippocampe lors de traitements aigus[350]. L'injection de BDNF chez le rongeur conduit à des effets identiques aux antidépresseurs dans les tests de dépression (test de nage forcée)[351]. De plus, des analyses post-mortem chez l'Homme ont montré que les patients dépressifs traités aux antidépresseurs avaient un taux de BDNF supérieur aux patients dépressifs non traités[352]. Plus d'une centaine d'études a traité de l'action de traitement contre la dépression sur le taux de BDNF et l'expression de son récepteur TrkB chez le rat[339].

L'action des antidépresseurs (inhibiteurs de monoamines oxydase, antidépresseurs tricycliques ou les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine) sur le taux de BDNF semble multifactorielle (type d'espèces, temps de traitement, dose) alors que les données sur les traitements électroconvulsifs sont plus homogènes et vont dans le sens d'une augmentation de l'expression du BDNF dans quasiment toutes les études[339].

Zinc et dépression

Plusieurs données expérimentales démontrent que des traitements chroniques avec des antidépresseurs comme les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine ou les tricycliques augmentent la concentration sérique en zinc. Ces molécules entrainent aussi une augmentation de la concentration en Zn dans l'hippocampe. Les ECS augmentent aussi le Zn vésiculaire dans l'hippocampe[353]. Le Zn semble avoir des effets antidépresseurs dans les modèles animaux testés (test de nage forcée ou test de suspension par la queue) et dans le cas de stress chronique modéré chez le rat. Chez l'Homme, des analyses post-mortem ont montré que les patients dépressifs ont un taux sérique de Zn très inférieur à la normale[199]. Toutefois,

la sévérité de la maladie ne semble pas être corrélée avec le taux de Zn sérique. Toujours chez l'Homme, une supplémentation en Zn augmente l'efficacité thérapeutique des antidépresseurs classiques.

Les mécanismes d'action du zinc pour expliquer son rôle bénéfique dans le traitement de la dépression sont multiples :

1) Le Zn agit sur les récepteurs glutamatergiques et module la plasticité synaptique: le Zn est un antagoniste des récepteurs NMDA et des récepteurs métabotropiques du groupe I et II (mGlu). A de faibles concentrations, le Zn potentie l'activité du récepteur AMPA dans certains types cellulaires[354].
2) Le Zn inhibe la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3)[355]. Cette enzyme désactive la glycogène synthase (GS) en la phosphorylant, or la GS inhibe CREB. Une inhibition de GSK-3 a donc pour conséquence une augmentation de l'activité de CREB et une augmentation de l'activité du BDNF.
3) Le Zn augmente l'activité du BDNF. Une diminution de la concentration en BDNF a été observée chez les patients dépressifs. Des traitements chroniques avec du Zn augmentent le taux de BDNF dans le cortex et l'hippocampe. Le Zn augmente aussi la phosphorylation de TrkB en induisant la phosphorylation des kinases de la famille Src (Src et Fyn)[194]. Les récepteurs TrkB sont notamment impliqués dans la sensibilité aux antidépresseurs au niveau des cellules neuronales progénitrices de l'hippocampe. L'ablation de TrkB dans ces cellules a permis de montrer leur implication dans la prolifération et la neurogénèse[356], deux processus qui sous-tendraient l'action thérapeutique des antidépresseur, toutefois ceci est discuté (cf Article 5).

La figure 38 résume les effets du Zn pouvant intervenir dans le traitement de la dépression (revues[183,199,200]).

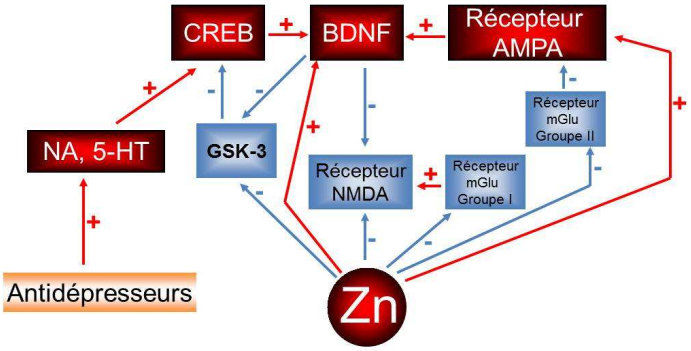


Figure 38 Zn vs Antidépresseur dans le traitement de la dépression
Représentation schématique des mécanismes moléculaires du Zn dans le traitement de la dépression. Le signe + signifie excitation / augmentation de l'activité. Le signe – signifie inhibition.

Le BDNF et TrkB seraient donc deux acteurs importants pour expliquer la dépression au niveau cellulaire. Cependant, des souris qui expriment un dominant négatif de TrkB (TrkB.T1) ne présentent pas de symptômes de type dépressif et ont les mêmes résultats aux tests de nage forcée que les souris sauvages[357]. Des souris hétérozygotes pour BDNF ($BDNF^{+/-}$) ne présentent aucune différence au niveau des tests d'anxiété ou de stress par rapport aux souris $BDNF^{+/+}$[358]. De plus, la suppression de l'expression du BDNF dans les neurones de l'aire tegmentaire ventrale (neurones dopaminergiques) exerce une action antidépressive chez des souris subissant des agressions répétées[359]. Ces données montrent qu'à eux seuls l'expression du BDNF et de TrkB ne suffisent pas à expliquer les processus complexes mis en jeu dans la dépression au niveau cellulaire.

5. L'Hyperforine

L'hyperforine est un des composants bioactifs des feuilles et des fleurs du millepertuis (St john's Wort ou *Hypericum perforatum*, Figure 39). Les extraits de millepertuis sont composés de plusieurs éléments naturels comme des flavonoides, des proanthocyanidines, des naphtodianthrones (hypericine) et des acylphloroglucinols (hyperforine, Figure 40). C'est principalement dans les parties supérieures de la plante que ces composés sont retrouvés en plus fortes proportions[360].

Figure 39 Fleur d'*Hypericum perforatum*

Les extraits de millepertuis sont utilisés depuis des siècles dans le traitement de divers troubles et maladies comme l'anxiété, la dépression et autres troubles de l'humeur[361]. En 2001, la vente de produits issus du millepertuis perforé s'estimait à 210 millions de dollars[362].

L'intérêt a premièrement été porté sur l'hypéricine qui, contrairement à l'hyperforine, n'est pas sensible à l'air et à la lumière[360,363]. L'hypéricine a en effet été décrite comme une molécule ayant des propriétés de type antidépresseur chez le rat[364]. Sur la base d'études

expérimentales, on considère maintenant que l'hyperforine a des effets antidépresseurs plus puissants que l'hypéricine. Nous allons nous intéresser aux différentes propriétés associées à l'hyperforine.

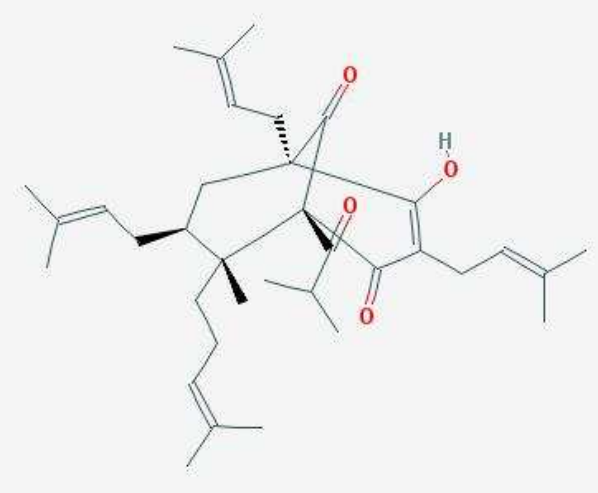


Figure 40 Formule chimique de l'hyperforine

5.1 Une molécule avec des actions antidépressives.

Il a été démontré que des extraits de millepertuis possédant 5% d'hyperforine sont plus efficaces pour traiter la dépression que des extraits en contenant 0,5%[365]. L'hyperforine semble donc avoir un rôle non négligeable dans la réponse antidépressive des extraits de millepertuis. Nous allons décrire à présent les actions *in vitro* et *in vivo* de l'hyperforine qui pourraient expliquer ses propriétés antidépressives.

In vitro

L'hyperforine agit sur de nombreuses cibles, affectant la recapture de sérotonine, de dopamine, de noradrénaline, de GABA et de glutamate[361,366,367]. L'hyperforine est donc une molécule qui inhibe de façon non-spécifique la recapture des neurotransmetteurs, ce qui suppose une action différente de celle des inhibiteurs de monoamine oxydase. Plusieurs explications ont été proposées pour expliquer ce processus d'inhibition non-spécifique de la recapture des neurotransmetteurs : 1) L'hyperforine conduit à une augmentation de la concentration sodique intracellulaire qui a pour effet de réduire le gradient de sodium entre la cellule et le milieu extracellulaire[368]. La recapture des neurotransmetteurs implique un transport dépendant du gradient sodique[369]. Une diminution de ce gradient a donc comme effet une diminution de la recapture des neurotransmetteurs et ce de façon aspécifique. 2) Il a été montré que l'hyperforine diminue le pH cytosolique et donc modifie le gradient pH au niveau vésiculaire. Cette modification de pH induit une libération des neurotransmetteurs (vers le cytoplasme) [370-372]. 3) L'hyperforine inhibe les récepteurs GABA, NMDA et AMPA

et favorise l'ouverture des canaux calciques pré-synaptiques favorisant la libération des neurotransmetteurs[373].

In vivo

Les données sur l'action de l'hyperforine en traitement aigu sur le taux de monoamines du cerveau sont controversées. Il a été montré dans un premier temps qu'une injection intra péritonéale de 9,3 mg d'hyperforine/kg n'a pas d'effet sur les taux de monoamines[374]. L'injection intra péritonéale de 10 mg d'hyperforine/kg chez le rat semble cependant augmenter le taux de dopamine, de noradrénaline et de sérotonine dans le locus coeruleus[375].

Les données d'essais cliniques concernent généralement des patients traités avec des extraits de millepertuis contenant une quantité plus ou moins importante d'hypéricine et d'hyperforine. Plusieurs études ont montré un effet bénéfique de l'hyperforine en traitement chronique (versus placebo) chez des individus dépressifs légers[376]. En revanche, ces extraits sont inefficaces contre les dépressions sévères[377]. L'hyperforine est toutefois décrite comme ayant de nombreuses interactions avec d'autres médicaments rendant son utilisation limitée dans certains cas. L'hyperforine est notamment un inducteur des enzymes du cytochrome P450 (CYP3A4)[378] et affecte les P-glycoprotéines[379]. L'activation de ces protéines a pour conséquence de réduire l'absorption de divers médicaments (antiviraux, anticoagulants, contraceptifs, antiepileptiques etc…) lors d'une administration par voie orale[378].

Lors d'un épisode dépressif, le taux de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) sérique des patients diminue. Une récente étude clinique sur 962 personnes montre que les patients dépressifs sous traitement avec des inhibiteurs de recapture de sérotonine (selective serotonine reuptake inhibitors et *Hypericum perforatum*) ont un taux de BDNF plus élevé que celui des patients non traités. Les patients traités avec des extraits de millepertuis sont ceux qui possèdent le plus fort taux de BDNF sérique en comparaison avec les autres patients traités. Cependant, les patients avec le plus fort taux de BDNF sérique sont aussi les patients avec les formes de dépressions les plus sévères[380]. Chez le rat âgé, un traitement de 21 jours avec des extraits de millepertuis augmente l'expression de CREB et de P-CREB. Ces augmentations sont corrélées avec une amélioration des capacités cognitives de ces rats[381,382]. Les extraits de millepertuis semblent agir sur la plasticité synaptique notamment en empêchant la sous-expression de la neuromoduline et de la synaptophysine lors d'un stress. Un prétraitement par ces extraits améliore la mémoire spatiale des animaux[382]. Des expériences de neurogénèse adulte chez des souris traitées 3 semaines avec un extrait de millepertuis suite à un stress à la corticostérone montrent une augmentation du nombre de

cellules BrdU positives et double cortine (DCX) positives dans la couche granulaire du gyrus denté. Ce résultat suggère donc un effet de cet extrait sur la prolifération et la maturation des neurones de l'hippocampe[383]. L'hyperforine semble donc avoir un rôle bénéfique au niveau de l'apprentissage et de la mémoire[384] et semble utile dans le traitement de maladies affectant ces fonctions comme dans la maladie d'Alzheimer.

5.2 L'hyperforine comme traitement contre la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par le dépôt en plaque de peptides β amyloïde (Aβ) et par l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée conduisant à une atrophie corticale et un déclin des fonctions cognitives. *In vitro*, l'hyperforine diminue l'agrégation des peptides $A\beta_{1-42}$[367]. De plus, l'hyperforine agit sur l'APP (beta amyloïde precursor protein). Il semble que l'hyperforine diminue la concentration intracellulaire en APP en augmentant son taux de sécrétion[385]. Ces résultats sont à confirmer et à étayer pour estimer si l'hyperforine pourrait avoir un rôle thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer.

5.3 Propriétés anti-inflammatoires et pro-inflammatoires

L'hyperforine a un effet inhibiteur sur les réponses et la prolifération des lymphocytes T. Il a été montré que l'hyperforine pouvait être un bon traitement contre les dermatites[386]. De plus, l'hyperforine est un inhibiteur de la cyclooxygenase-1 et de la 5-lipoxygenase[387]. L'hyperforine interfère avec d'autres réponses pro-inflammatoires des leucocytes dont l'inhibition de la production de ROS et la libération des élastases[388].

L'hyperforine induit aussi la sécrétion d'interleukine 8 par les cellules épithéliales intestinales et d'induit l'expression d'ICAM-1 impliquée dans l'inflammation. Cette induction est dépendante de l'activation d'AP-1 (facteur de transcription) et de l'activation des kinases 1 et 2 (ERK1/2)[362].

5.4 Un effet antibactérien

L'hyperforine présente une activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* et sur d'autres bactéries à Gram positif. Elle n'a cependant pas d'action contre la croissance des bactéries à Gram négatif ou sur *Candida albicans*[389].

5.5 Des effets anti-tumoraux

L'hyperforine a de nombreux effets anti-tumoraux en agissant à la fois par des effets anti-carcinogènes, antiprolifératifs, pro-apoptotiques, anti-invasifs, anti-métastatiques et anti-angiogéniques[122,390-392]. Des précautions sont néanmoins à prendre quant à son utilisation car récemment des travaux ont montré que l'hyperforine augmente l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (essentiel à l'angiogenèse) dans des cellules cancéreuses du système nerveux central (médulloblastomes et glioblastomes)[393].

L'ensemble de ces données (Figure 41) montrent toute la complexité dans la compréhension des modes d'action des extraits de millepertuis.

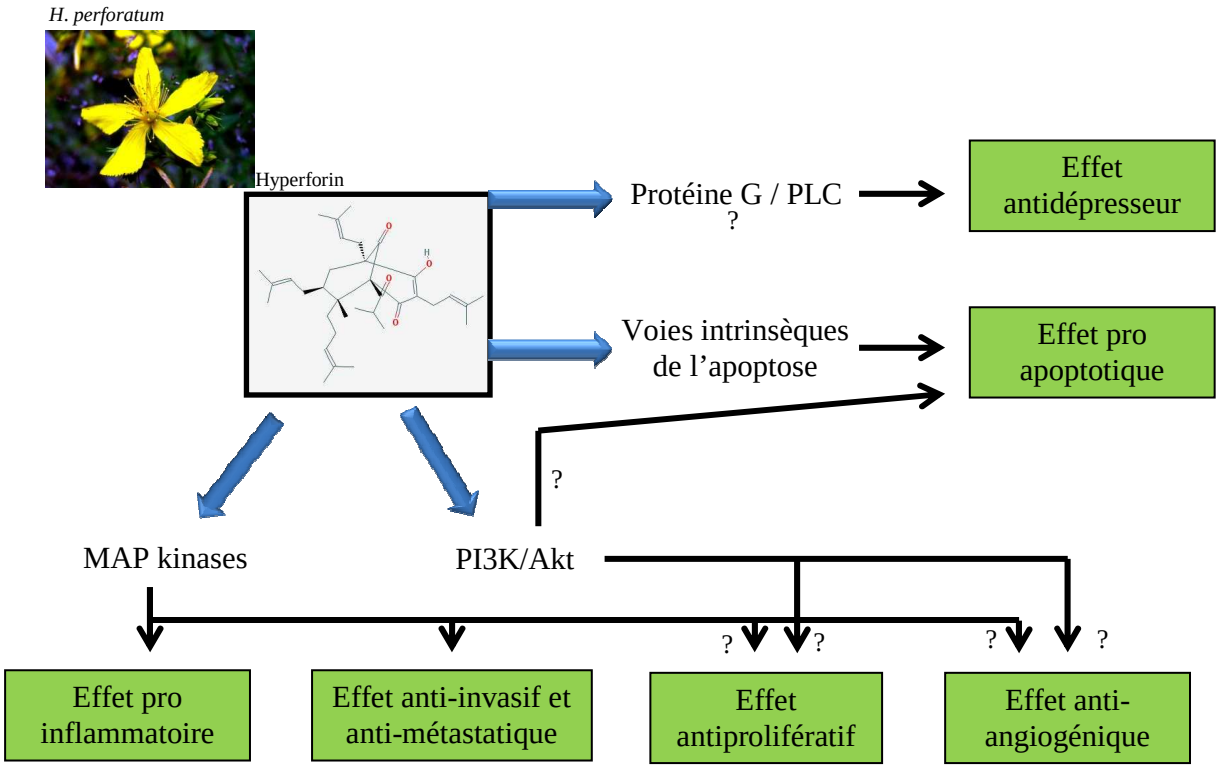


Figure 41 Effets biologiques associés à l'hyperforine et voies biologiques potentiellement impliquées
(D'après Medina *et al.*, **2006**, *Life* Sciences)[361]

Matériels & Méthodes

1. Matériels

1.1. Animaux

Les souris utilisées sont des C57BL6/J (Charles River, France). Ces souris ont été gardées dans des conditions standards avec un cycle jour/nuit de 12 heures et un accès libre à l'eau et à la nourriture. Toutes les expériences nécessitant l'emploi de ces animaux ont été approuvées par le comité d'éthique de Grenoble (ComEth, France) et par le comité d'éthique de la région Rhône-Alpes.

1.2. Culture de cellules HEK293

Les cellules HEK293 proviennent d'ATCC (LGC Promochem, France), les cellules HEK293 exprimant de façon stable les canaux TRPC6 ont été fournies par G. Boulay (Université de Sherbrooke, Canada)[69] et les HEK293 exprimant TRPC3 ont été données par M. Zhu (Université de Columbus, Ohio, USA)[394]. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (GIBCO) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal et 1 % de pénicilline/streptomycine. Du G418 (Euromedex) (50 µg/ml) a été ajouté pour les cultures de HEK293-TRPC6 et HEK293-TRPC3. Ces conditions de culture sont détaillées dans l'article 1.

1.3. Cultures primaires

Nous avons utilisé des cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires de souris au stade E13. Ces neurones ont été conservés *in vitro* dans du milieu Neurobasal (GIBCO) contenant 2 % de B27 (GIBCO), 1 % de pénicilline/streptomycine et 500 µM de glutamine (GIBCO). La procédure d'obtention de ces cultures primaires est décrite dans l'article 1.

1.4. Mitochondries isolées de cerveau

Les mitochondries ont été isolées à partir de cerveaux de souris nouveau-nés âgés de 1 à 5 jours. Toute la méthode d'isolement se déroule à 4°C. Brièvement, après homogénéisation des cerveaux de souris, des centrifugations successives ont été réalisées jusqu'à l'obtention d'un culot contenant les organelles. Ce culot a ensuite été repris et conservé à 4°C. La méthode d'obtention de ces mitochondries est détaillée dans l'article 3.

2. Méthodes

2.1. Imagerie de fluorescence du calcium

Les sondes Fura-2/acétoxyméthyl ester (AM) (Molecular Probes) et Fluo4/AM (Molecular Probes) ont été utilisées pour mesurer les variations de la concentration en calcium libre dans le cytoplasme des cellules. Ces sondes pénètrent dans les cellules où le groupement AM subit une dé-estérification qui piège la sonde dans le milieu intracellulaire. Les temps d'incubation et la composition des milieux dans lesquels les sondes ont été utilisées sont décrits dans les articles 1, 2, 3 et 4. Les lamelles de verre sur lesquelles sont cultivées les cellules ont été placées dans une chambre de perfusion (RC-25F, Warner Instruments, Phymep, France) sur un microscope inversé Axio Observer A1 (Carl Zeiss, France) équipé d'un objectif à immersion à l'huile 40x de type Fluar et d'ouverture numérique 1.3 (Carl Zeiss, France). Le dispositif expérimental est composé d'une source de lumière de type DG-4 (Princeton Instruments, Roper scientific, France), d'une caméra CCD à refroidissement rapide (CoolSnap HQ2 Princeton Instruments, Roper scientific, France) et d'un ordinateur équipé du logiciel METAFLUOR (Universal Imaging, Roper scientific, France) pour analyser les enregistrements. L'ensemble des caractéristiques concernant l'acquisition des données et des filtres utilisés est détaillé dans les articles 1, 2, 3 et 4.

2.2. Imagerie de fluorescence du zinc

La sonde FluoZin-3/AM (Molecular Probes), spécifique du zinc (Kd de 15 nM[395]), a été utilisée pour enregistrer les variations de la concentration en zinc libre dans le cytoplasme des cellules. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe ci-dessus et sont présentées dans les articles 1, 3 et 4.

2.3. Imagerie synchrotron

Brièvement, les cellules ont été cultivées sur un support spécial composé de Si_3N_4 puis cryo-fixées à -160°C dans de l'isopentane refroidi à l'azote. Le protocole utilisé permet de conserver la morphologie et la distribution des éléments chimiques de la cellule. L'imagerie au rayon X a été réalisée sur la ligne ID22NI de l'installation européenne de rayonnement synchrotron (ESRF, Grenoble, France). La méthode est détaillée dans l'article 1.

2.4. Mesure de l'efflux de calcium et de zinc des mitochondries

Les mitochondries ont été préparées selon le protocole décrit précédemment (partie 1.3) et conservées dans un milieu contenant (en mM) : 5 L-acide glutamique, 270 sucrose, 10 Tris et 1 Pi (KH_2PO_4/K_2HPO_4), pH 7,35 (KOH). Les flux de calcium et de zinc sont mesurés respectivement avec les formes non-perméantes du Fluo4 (0,25 µM) et du FluoZin-3 (0,25 µM) (Molecular Probes) à 25°C avec un spectrophotomètre Fluoromax (Spex). Ce protocole est décrit dans l'article 3.

2.5. Dosage des métaux cellulaires et tissulaires

La détermination des contenus en zinc et en soufre des cellules HEK, HEK-TRPC6, HEK-TRPC3 et des tissus a été réalisée par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry) avec un appareil Varian Vista MPX. Les valeurs mesurées ont été normalisées en fonction de la concentration protéique des échantillons ou en fonction du poids sec des tissus. Les détails concernant cette technique sont abordés dans l'article 1.

La détermination du contenu en cuivre et en fer a été réalisée par spectrométrie d'absorption atomique après homogénéisation des culots cellulaires dans de l'hydroxyde de tétraméthylammonium. Les teneurs en métaux ont été normalisées en fonction de la concentration protéique de chaque échantillon. Les détails concernant cette technique sont présentés dans les articles 1 et 4.

2.6. Electrophysiologie

Les courants ioniques ont été enregistrés avec la technique du patch-clamp en configuration cellule entière[396]. Les pipettes de patch ont été réalisées à partir de capillaires en verre borosilicaté (Harvard Apparatus). Le milieu intra-pipette contient (en mM) : 140 CsCl, 10 HEPES, 4 ATP, 0.1 GTP (pH 7,2 CsOH). Ces pipettes ont une résistance de 3 à 5 MΩ. Les cellules ont été placées dans un milieu contenant (en mM) : 140 N-methyl D-glucamine, 10 HEPES, 5 glucose, 10 $CaCl_2$ ou 10 $ZnCl_2$ (pH 7,15). Le potentiel de membrane a été fixé à -60 mV avec un amplificateur Axoclamp 200B. Les courants mesurés sont filtrés à 1-2 kHz et analysés avec le logiciel pClamp (Version 9.0, Axon Instruments). Cette approche est décrite dans l'article 1.

2.7. Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène

La sonde fluorescente 5-(et 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H_2DCFDA) (Molecular Probes) a été utilisée pour mesurer la

production d'espèces réactives de l'oxygène. Les cellules HEK, HEK-TRPC6 et HEK-TRPC3 ont été cultivées dans des plaques 96 puits et chargées 20 minutes avec 5 µM de sonde pendant 20 minutes. Les cellules ont été ensuite excitées à 495 nm et la fluorescence émise a été collectée à 527 nm avec un lecteur multi-plaque Tecan Infinite M200. (article 1)

2.8. Test de toxicité MTT

L'activité mitochondriale a été utilisée comme indicateur de la viabilité cellulaire[397]. Les cellules ont été cultivées dans des plaques 96 puits puis incubées en présence de l'agent à tester. Celui-ci a ensuite été lavé et 24 heures après les cellules ont été incubées en présence de 0,5 mg/ml de MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma) à l'abri de la lumière pendant 3 h à 37°C. Le milieu a ensuite été lavé et les cristaux formés ont été dissous dans du DMSO. La densité optique a été mesurée à 570 nm avec un lecteur multi-plaque Tecan Infinite M200. Les résultats sont présentés en pourcentage de mort cellulaire avec les cellules traitées au Triton X-100 comme valeur de 100% de mort cellulaire (article 1).

2.9. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial

Les mitochondries ont été préparées selon le protocole décrit dans la partie 1.3. Les changements de potentiel de membrane ont été mesurés avec la sonde fluorescente cyanine 3,3'-dipropylthiodicarbocyanine [diS-C3-(5)] (Molecular Probes) à 10 µM. Les expériences ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Fluoromax (Spex) (excitation à 622 nm, émission à 670 nm). (article 3)

2.10. Mesure de l'expression génique (RT-PCR et qPCR)

Les ARN totaux ont été isolés à partir de cultures primaires de neurones avec le kit Quick RNA cells and tissues (Talent, Trieste, Italie). Les ARN totaux des tissus ont été isolés avec le kit Nucleospin RNA/protein (Macherey-Nagel, France). La concentration des ARN a été mesurée au spectrophotomètre NanoDrop ND1000. Un échantillon de 100 ng d'ARN totaux a été rétro-transcrit en utilisant des amorces DT18 et la M-MulV Reverse transcriptase (Euromedex, France). Les niveaux d'expression des ADNc ont été déterminés par PCR quantitative en temps réel par la méthode du SYBR en utilisant le MESA Blue qPCR Mastermix plus for SYBR assay (Eurogentec) et un appareil BioRad CFX 96. Les données ont été analysées avec le logiciel BioRad CFX Manager (Version 2.0). Toutes les amorces

PCR ont été dessinées avec le logiciel en ligne NCBI Primer3/BLAST. Les amorces utilisées sont détaillées dans l'article 4. Deux gènes de référence ont été utilisés pour normaliser les expressions : l'actine et la GAPDH.

2.11. Mesure de l'expression protéique (Western blot)

Les cellules en culture ont été récoltées et centrifugées à 3000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant a été jeté et le culot a été resuspendu dans un tampon de lyse contenant (en mM) : 10 HEPES, 3 $MgCl_2$, 40 KCl, glycerol 2,5 %, Triton-X-100 1 %, cocktail d'inhibiteur de protéases 1% (Sigma), pH 7,5 (KOH). Les échantillons ont ensuite été placés dans la glace pendant 30 minutes puis centrifugés à 15000 rpm, 30 minutes à 4°C. Le surnageant contient les protéines, il a été conservé à -80°C. Les protéines ont été extraites des tissus à partir du kit Nucleospin RNA/protein (Macherey-Nagel, France) puis par une phase de précipitation à l'éthanol 100%. Les échantillons ont ensuite été placés dans la glace pendant 30 minutes puis centrifugés à 15000 rpm, 30 minutes à 4°C. Le culot contient les protéines, il a été resuspendu dans un tampon RIPA contenant 150 mM NaCl, 1 % Triton-X-100, 0,1 % SDS, 0,24 % Tris-HCl et 0,5 % Déoxycholate. La suspension de protéines a été conservée à -80°C.

Les concentrations protéiques ont été dosées avec le Bio-Rad DC protein Assay. La gamme étalon a été réalisée à partir d'un échantillon de BSA (Bovin Serum Albumine) concentré à 1,5 µg/µl. Des échantillons de 50 µg de protéines ont été utilisés pour réaliser les expériences de Western Blot. Les échantillons ont été dénaturés dans du milieu Lämmli contenant 5 % de β-*mercaptoéthanol* pendant 10 minutes à 95°C puis refroidi dans la glace. Les protéines dénaturées ont été placées dans un gel d'acrylamide composé d'une partie dite de concentration (gel à 4 % d'acrylamide) et d'une partie dite de séparation (gel à 8 % d'acrylamide). La migration a été réalisée dans un tampon Tris-Glycine-SDS pH 8,5 (Euromedex, France). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF préalablement imbibée dans de l'éthanol 100 % et dans du tampon de transfert Tris-Glycine pH 8,5 + 20 % méthanol pendant 15 minutes. Le transfert a été réalisé dans un système semi-sec V10-SDB (Fisher Bioblock Scientific). Après deux lavages au PBS, la membrane a été bloquée avec une solution de PBS contenant 5 % de lait pendant 2 heures à température ambiante. Elle a ensuite été incubée une nuit à 4°C avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt. Les anticorps ont été utilisés aux dilutions suivantes : Anti-TrkB 1/500 (Millipore), anti-P-TrkB 1/200 (tebu-bio), anti-CREB 1/1000 (Millipore), anti-P-CREB 1/1000 (Milipore), anti-Actine 1/250 (Sigma). La membrane a ensuite été lavée 4 fois au

PBS-lait 5 % puis incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (horseradish peroxydase) 1 h à température ambiante. La révélation de la membrane a été effectuée par le kit ECL (Pierce) en utilisant un appareil Fusion Fx7 (Vilbert Lourmat). Les quantifications des Western Blot ont été effectuées avec le logiciel de traitement d'image ImageJ (article 5).

2.12. Traitement chronique des souris à l'hyperforine

L'hyperforine provient de l'entreprise pharmaceutique Willmar Schwabe GmbH & Co (Karlsruhe, Allemagne). Le produit est un mélange d'hyperforine et de son homologue l'adhyperforine (ratio 8:2) préparé sous forme de sel de sodium.

Des souris mâles C57BL6/J (Charles River, France) ont été utilisées pour les expériences de traitement chronique à l'hyperforine. Ces animaux âgés de 5 mois ont été gardés dans des conditions standard avec un cycle jour/nuit de 12 heures et un accès libre à l'eau et à la nourriture. Huit animaux ont reçu une injection intra-péritonéale journalière de 4 mg d'hyperforine/kg pendant 4 semaines. La solution d'hyperforine a été préparée quotidiennement dans du NaCl 0,9 % stérile juste avant l'injection. Sept animaux ont reçu une injection intra-péritonéale journalière de NaCl stérile pour le groupe contrôle. Après ces 4 semaines de traitement, le cerveau a été rapidement prélevé et placé dans une solution saline à 4°C. Les tissus ont ensuite été utilisés pour l'extraction d'ARN, de protéines et pour la quantification des métaux par ICP-OES. (articles 4 et 5)

2.13. Neurogénèse adulte

Perfusion intracardiaque

Après anesthésie au pentobarbital (75 µl/animal), les souris ont été perfusés par voie intracardiaque avec un fixateur (paraformaldéhyde à 4 % dans du tampon phosphate à 0,1 M, pH=7,3 ; 50 mL par souris). Les cerveaux ont ensuite été post-fixés pendant deux semaines.

Préparation des tissus

Les cerveaux ont été coupés au moyen d'un vibratome (Leica). Des coupes frontales sériées de 40 µm d'épaisseur ont ainsi été obtenues. Les coupes flottantes ont été récupérées dans du tampon phosphate (PB) (0,1 M pH=7,4).

Immunohistochimie

Les coupes flottantes ont été lavées (4x10 minutes) dans du tampon (PBS à pH=7,4) puis traitées pendant 30 minutes dans une solution de méthanol contenant 0,5 % de H_2O_2 afin de bloquer l'activité des péroxydases endogènes. Elles ont ensuite été lavées pendant 4x10 minutes. Pour révéler la BrdU, une étape supplémentaire est nécessaire pour démasquer les sites antigéniques. Dans ce but, les coupes ont été traitées avec de l'acide chlorhydrique (2 N) pendant 30 minutes à 37°C afin de dissocier les brins d'ADN. Elles ont ensuite été lavées avec du tampon PBS (4x10 minutes). Puis, pour tous les immunomarquages, les coupes ont été incubées pendant 45 minutes à température ambiante avec du tampon PBS contenant 0,3 % de triton X-100 et du sérum normal de l'espèce produisant l'anticorps secondaire afin de saturer les sites non spécifiques (3 % pour BrdU et HH3 et 5 % pour DCX). Après élimination de la solution dite de « blocage », les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon contenant 0,3 % de triton X-100 et du sérum normal pendant 72 h à 4°C sous agitation constante (1 % pour BrdU, 3 % HH3 et 5 % pour DCX). Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : anticorps monoclonaux de rat anti-BrdU (1/1000) dans du PBS contenant 1 % de sérum normal de chèvre (Accurate), anticorps polyclonaux de lapin anti-HH3 (1/1000) dans du PBS contenant 3 % de sérum normal de chèvre (Upstate) et anticorps polyclonaux de lapin anti-DCX (1/7000) dans du PBS contenant 5 % de sérum normal de chèvre (Sigma)

A l'issue de cette incubation et après lavage dans du tampon PBS (4x10 minutes), les coupes ont été incubées 1 h 30 avec l'anticorps secondaire biotinylé de chèvre dirigé contre les anticorps primaires de rat (1/1000 dans du PBS contenant 1 % de sérum normal de chèvre) ou contre les anticorps primaires de lapin (1/1000 dans du PBS contenant 3 % de sérum normal de chèvre et 1/7000 dans du PBS contenant 5 % de sérum normal de chèvre). Les coupes ont ensuite été lavées (4x10 minutes) et incubées avec une solution de streptavidine/biotine à 0,5 % pendant 1 h 30. Après lavages successifs dans du tampon PBS (2x10 minutes) puis du tampon Tris (pH=7,4), l'activité péroxydasique a été révélée en employant la 3,3-diaminobenzidine (DAB ; 50 mg/100 mL) comme chromogène. Les coupes ont été incubées avec la DAB et 1,2 % de H_2O_2 sous contrôle visuel. Les coupes ont enfin été lavées dans du tampon Tris (2x10 minutes) puis du tampon Tris-NaCl (2x10 minutes) avant d'être montées sur lames gélatinées (5 g/L). Elles ont ensuite été déshydratées par plusieurs bains successifs de concentrations croissantes d'éthanol et un bain d'histosol. Enfin, elles ont été recouvertes d'une lamelle recouverte de Shandon. Les cellules immunoréactives pour l'antigène X seront notées X-IR.

Etude quantitative du nombre cellules immunoréactives

Le nombre total de cellules immunoréactives dans le gyrus denté (GD) a été évalué par analyse stéréologique. Brièvement, le nombre total de cellules X-IR dans le GD gauche a été estimé en utilisant une version modifiée de *l'optical fractionator* sur un échantillonnage randomisé systématique d'une coupe de cerveau sur dix le long de l'axe septo-temporal de l'hippocampe. Sur chaque coupe, toutes les cellules X-IR ont été comptées dans les couches subgranulaires et granulaires du GD en utilisant un objectif x100. Le nombre total de cellules X-IR a été multiplié par l'inverse de la probabilité d'échantillonnage (1/ssf=20). Dans le cas de marqueurs peu fréquents (BrdU et HH_3), le nombre de cellules immunoréactives a été compté bilatéralement. Dans ce cas, la probabilité d'échantillonnage (ssf) est donc égale à 1/10 (Article 5).

Résultats

Article 1 : Implication des canaux TRPC6 dans l'homéostasie du Zinc

Introduction

Les canaux TRPC6 sur-exprimés dans des cellules HEK (HEK-TRPC6) et dans des cellules PC12 différenciées au NGF forment une voie d'entrée du fer indépendante de la transferrine[176]. Les auteurs n'ont pas étudié si le Fer s'accumulait dans leur modèles cellulaires suite à la sur-expression des canaux TRPC6 (modèle HEK) ou à l'induction de son expression dans les cellules PC12. Au laboratoire, Peng Tu a étudié ce point et a observé que les cellules HEK-TRPC6 ne contenaient pas plus de fer que les HEK sauvages (Cf thèse Peng Tu, 2009). En revanche, les données d'ICP-OES (Inductively Coupled-Optical Emission Spectrometry) montrent que la sur-expression des canaux TRPC6 conduit à une augmentation du contenu en zinc et en soufre ainsi qu'à une diminution du contenu en cuivre de ces cellules.

Dans ce premier chapitre, nous tenterons de préciser les liens entre les canaux TRPC6 et le contenu en zinc des HEK. Nous comparerons les données obtenues avec celles des cellules sauvages et des cellules qui sur-expriment les canaux TRPC3. La régulation fine de la concentration intracellulaire en zinc est primordiale pour la cellule car une augmentation importante en zinc libre peut conduire à la mort cellulaire (Chapitre *4.1*). Nous étudierons si la sur-expression des canaux TRPC6 dans les HEK293 modifie la sensibilité des cellules à un stress oxydant. Pour répondre à cette question nous utiliserons des tests de quantification de la mort cellulaire (MTT et Bleu Trypan) ainsi qu'un test de quantification de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Dans un second temps, nous tenterons d'observer, par des techniques d'imagerie de fluorescence du zinc, la perméabilité des canaux TRPC6 à ce métal car ceci pourrait en partie expliquer la plus grande quantité de zinc observée dans ces cellules.

Des résultats antérieurs obtenus au laboratoire ont montré que les canaux TRPC6 sont exprimés de façon endogènes dans les neurones corticaux embryonnaires de souris à E13[95]. Nous tenterons de préciser le rôle de ces canaux dans l'homéostasie du zinc au niveau neuronal. Nous étudierons aussi les autres voies d'entrée du zinc décrites dans les neurones dont les canaux calciques dépendants du voltage, les récepteurs AMPA et les récepteurs NMDA. Pour cela, nous utiliserons principalement des méthodes d'imagerie de fluorescence et d'électrophysiologie.

TRPC6 channels favour the intracellular accumulation of zinc and regulate the pools of mobile zinc

Biochimica et Biophysica Acta xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc

Q1 Julien Gibon [a,b,l], Peng Tu [a,b,l,1], Sylvain Bohic [c,d,l], Pierre Richaud [e,f,g], Josiane Arnaud [h,i], Mike Zhu [j], Guylain Boulay [k], Alexandre Bouron [a,b,l,*]

[a] UMR CNRS 5249, Grenoble, France
Q3 [b] CEA, DSV, IRTSV, Grenoble, France
Q4 [c] Inserm U 836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France
Q5 [d] ESRF, Grenoble, France
[e] CEA, DSV, iBEB, Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation, F-13108 St Paul les Durance, France
[f] CNRS, UMR 6191, F-13108 St Paul les Durance, France
[g] Université Aix-Marseille, F-13108 St Paul les Durance, France
Q6 [h] Département de Biologie Intégrée, CHU, Grenoble, France
Q7 [i] Inserm U884, LBFA, Grenoble, France
[j] Center for Molecular Neurobiology, Ohio State University, Columbus, OH, USA
[k] Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada
Q8 [l] Université Joseph Fourier, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 May 2011
Received in revised form 8 August 2011
Accepted 9 August 2011
Available online xxxx

Keywords:
Brain
Oxidative stress
TRPC channel
Zinc
TRPC6

ABSTRACT

TRPC6 are plasma membrane cation channels. By means of live-cell imaging and spectroscopic methods, we found that HEK cells expressing TRPC6 channels (HEK-TRPC6) are enriched in zinc and sulphur and have a reduced copper content when compared to HEK cells and HEK cells expressing TRPC3 channels (HEK-TRPC3). Hence, HEK-TRPC6 cells have larger pools of mobilizable Zn^{2+} and are more sensitive to an oxidative stress. Synchrotron X-ray fluorescence experiments showed a higher zinc content in the nuclear region indicating that the intracellular distribution of this metal was influenced by the over-expression of TRPC6 channels. Their properties were investigated with the diacylglycerol analogue SAG and the plant extract hyperforin. Electrophysiological recordings and imaging experiments with the fluorescent Zn^{2+} probe FluoZin-3 demonstrated that TRPC6 channels form Zn^{2+}-conducting channels. In cortical neurons, hyperforin-sensitive channels co-exist with voltage-gated channels, AMPA and NMDA receptors, which are known to transport Zn^{2+}. The ability of these channels to regulate the size of the mobilizable pools of Zn^{2+} was compared. The data collected indicate that the entry of Zn^{2+} through TRPC6 channels can up-regulate the size of the DTDP-sensitive pool of Zn^{2+}. By showing that TRPC6 channels constitute a Zn^{2+} entry pathway, our study suggests that they could play a role in zinc homeostasis.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Transient receptor potential channels of C type (TRPC) form Ca^{2+}-conducting non selective cation channels. Seven isoforms (TRPC1–TRPC7) have been characterized so far. Although a detailed molecular understanding of their mode of activation is still lacking, some TRPC, like TRPC6, can be activated by the second messenger diacylglycerol (DAG) or its analogues 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) and 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol (SAG) [1,2]. TRPC6 is widely expressed including in the brain [3]. In the hippocampus, they are predominantly found in post-synaptic densities and participate in the formation of excitatory synapses [4]. In the cortex, TRPC6 channels are found in astrocytes [5], neurons and progenitor cells [6,7]. In cortical astrocytes, pro-inflammatory cytokines up-regulate the entry of Ca^{2+} by enhancing the expression of TRPC6 channels [5]. In cell lines (HEK-293 and PC12 cells), TRPC6 channels promote the entry of iron via a mechanism independent of the transferrin receptor [8]. Besides these reports, only a few studies have addressed the question of their physiopathological importance in brain cells.

The goal of the present work was to determine whether the heterologous expression of TRPC6 channels into HEK-293 cells confers new properties upon these host cells. The data shown in the present report indicate that the stable over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells (HEK-TRPC6) is associated with an intracellular accumulation of zinc and sulphur, and a reduction of the copper

* Corresponding author at: Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS 5249, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France. Tel.: +33 4 38 78 44 23; fax: +33 4 38 78 54 87.
E-mail address: alexandre.bouron@cea.fr (A. Bouron).
[1] Present address: Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, CNRS UMR 8197, Paris, France.

0005-2736/$ – see front matter © 2011 Published by Elsevier B.V.
doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.013

UNCORRECTED PROOF

content. Furthermore, HEK-TRPC6 cells are more sensitive to an oxidative insult than wild-type HEK cells. This seems specific to TRPC6 channels because HEK-293 cells stably over-expressing TRPC3 channels (HEK-TRPC3) behave like wild-type HEK-293 cells. Live-cell imaging experiments conducted with the fluorescent Zn^{2+} probe FluoZin-3 show that TRPC6 channels allow the entry of Zn^{2+} even in the presence of a physiological concentration of Ca^{2+}. This finding is confirmed by electrophysiological recordings showing that TRPC6 channels can give rise to Zn^{2+} currents. This property is also shared by native TRPC6 channels of cortical neurons where the entry of Zn^{2+} through these channels influences the size of the internal pools of mobilizable Zn^{2+}. Several types of Ca^{2+}-conducting channels like voltage-gated Ca^{2+} channels and glutamatergic receptors of NMDA and AMPA/kainate types can allow the transport of Zn^{2+} through the plasma membrane [9–11]. It is proposed that TRPC6 channels could constitute another Zn^{2+} entry pathway in neurons. In this cell type, Zn^{2+} ions can be buffered by mitochondria and metallothioneins, and in some neuronal populations, in synaptic vesicles. Although not known with certainty, the cellular concentration of Zn^{2+} is in the order of 150–250 μM.

2. Materials and methods

2.1. Culture of HEK-293 cells

HEK-293 cells (purchased from ATCC, LGC Promochem, France) and HEK-293 cells stably expressing the cation channels TRPC6 (HEK-TRPC6) [3] and TRPC3 (HEK-TRPC3) [12] were platted at a density of 30,000 cells/mL and grown in a DMEM medium supplemented with 10% foetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. G418 (50 μg/mL) was added to the culture medium for the HEK-TRPC6 and HEK-TRPC3 cells [3,12].

2.2. Primary cell cultures

Cortical cells were dissociated from cerebral cortices isolated from E13 embryos from (vaginal plug was designated E0) C57BL6/J mice according to [13]. Briefly, brains of E13 C57BL6/J embryonic mice were placed in an ice-cold Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free Hank's solution containing 33 mM glucose, 4.2 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 1% penicillin/streptomycin. For each culture, 8 to 10 E13 cortices (isolated from 4 to 5 E13 mice) were mechanically minced by repetitive aspirations though a sterile and fire-polished Pasteur pipette. The cell suspension was filtered through a 40 μm cell strainer (BD Falcon). Glass cover-slips (Marienfield, Germany) were treated with poly-L-ornithine (2 h at 37 °C) and washed twice with sterile water before plating the cells. Cells were grown in a Neurobasal medium containing 2% B27, 1% penicillin/streptomycin and 500 μM glutamine. Three days after the plating of the cells, half of this culture medium was removed and replaced with a fresh medium. The procedures used were approved by the Ethical Committee of Rhône-Alpes Region (France) and the Ethical Committee of Grenoble (ComEth) (protocol 7_IRTSV-LCBM-AB-01).

2.3. Zinc imaging experiments with FluoZin-3

Changes in the intracellular concentration of free Zn^{2+} were recorded with the fluorescent Zn^{2+} indicator FluoZin-3 [14]. The experimental conditions were as follows: after removal of the culture medium, cells were washed twice with a saline solution containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 10 glucose, pH 7.4 (NaOH) and incubated for 20 min (at room temperature in the dark) in the above solution supplemented with 5 μM FluoZin-3/AM. Afterwards, cells were washed twice with a FluoZin-3/AM-free solution and kept at room temperature ≥20 min to allow the de-esterification of the dye. When the experiments were conducted on HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells, 1 mM probenicid was added to the saline solution. Glass cover-slips, inserted into a perfusion chamber (RC-25F, Warner Instruments, Phymep, France), were placed on the stage of an Axio Observer A1 microscope (Carl Zeiss, France) equipped with a Fluar 40× oil immersion objective lens (1.3 NA) (Carl Zeiss, France). Light was provided by the DG-4 wavelength switcher (Princeton Instruments, Roper Scientific, France). The excitation light for FluoZin-3 was filtered through a 470–495 nm excitation filter and the emitted light was collected through a 525 nm filter. The images were acquired with a CCD CoolSnap HQ2 camera (Princeton Instruments, Roper Scientific, France) and analyzed with the MetaFluor software (Universal Imaging, Roper Scientific, France). Images were captured at a frequency of 0.2 Hz. The baseline FluoZin-3 fluorescence was recorded for ≥1 min before the addition of any agent (e.g. Zn acetate, SAG, or hyperforin) and averaged (F0). Unless otherwise indicated, the changes in FluoZin-3 fluorescence as a function of time were expressed as F/F0, with F being the FluoZin-3 fluorescence.

2.4. Calcium imaging experiments with Fura-2

The experiments were conducted according to protocols previously described [7]. Cells grown on glass cover-slips were incubated in a saline solution (see above) containing 2.5 μM Fura-2/AM for 15 min at room temperature in the dark. Cells were washed twice and bathed in a Fura-2-free saline solution. The experimental setup was the same as described above except a dual excitation at 340 and 380 nm was used, and emission was collected at 515 nm. Images were collected at a frequency 0.5 Hz and Fura-2 signals (F340 nm/F380 nm) were analyzed off-line using the software MetaFluor (Universal Imaging, Roper Scientific, France). All the Ca^{2+} and Zn^{2+} imaging experiments were conducted at room temperature. FluoZin-3 values are reported as means ± SEM, with n indicating the number of cell bodies analyzed. The depolarising medium used to activate voltage-gated Ca^{2+} channels contained (in mM): 91 NaCl, 50 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 10 glucose, pH 7.4 (NaOH).

2.5. Electrophysiological recordings

Hyperforin-activated currents were recorded at room temperature using the standard tight-seal whole-cell configuration of the patch clamp technique [15]. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries. They were filled with a solution containing (in mM) 140 CsCl, 10 HEPES, 4 ATP, 0.1 GTP (pH 7.2, CsOH) and had a resistance of 3–5 MΩ. Unless otherwise indicated, the bath recording medium had the following composition (in mM): 140 N-methyl D-glucamine, 10 HEPES, 5 glucose, 10 $CaCl_2$ or $ZnCl_2$. The pH of this recording solution was adjusted at 7.15 in order to obtain a non-precipitating Zn^{2+} solution. The membrane potential was held at −60 mV by means of an Axoclamp 200B amplifier. Currents recorded in response to the bath application of 10 μM hyperforin were filtered at 1–2 kHz and analysed off-line with the pClamp software (version 9.0, Axon Instruments) [7]. Whole-cell currents, recorded at room temperature 1 to 3 days after the plating of the cells, were triggered from a holding potential of 0 mV at a frequency of 0.2 Hz by 200 ms voltage ramps from −100 to +100 mV. Capacitive transients were cancelled and the cell capacitance value was read from the Axoclamp 200B amplifier dials. The hyperforin-induced currents shown in the present study are smaller than the ones reported before [7]. We previously noticed that the size of the hyperforin-induced Ca^{2+} responses differed from one batch of hyperforin to the other [16].

2.6. Determination of the metal content of HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells

HEK-293 cells, HEK-TRPC3 or HEK-TRPC6 cells were harvested by gentle pipetting and washed twice with PBS and once with PBS supplemented with 5 mM EDTA to remove metals non-specifically bound to membranes. The total protein concentration of each sample

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article as: J. Gibon, et al., The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc, Biochim. Biophys. Acta (2011), doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.013

ARTICLE IN PRESS

was measured according to the Bio-Rad DC Protein Assay. Pellets were dried by heating and vacuum and mineralized by incubation overnight in 70% nitric acid at 50 °C, before analysis with Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) with a Varian, Vista MPX instrument [17]. The zinc and sulphur contents were normalised to the amount of protein in each pellet. The intracellular contents of copper and iron were determined by atomic absorption spectroscopy. Dried pellets were homogenized by incubation overnight in tetramethylammonium hydroxide before analysis by electrothermal atomic absorption spectroscopy using external calibration curve and Zeeman background correction (Hitachi model 8270, Tokyo, Japan). The copper and iron contents were normalised to the amount of protein in each pellet.

2.7. Colorimeric MTT assay

Mitochondrial activity was measured as an indicator of cell viability [18]. HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells were plated in 96-wells culture plates. After 1 day in vitro cells were incubated with 50 μM DTDP for 1 hr at 37 °C. The oxidant was washed away and 24 h later 0.5 mg/mL MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] was added for 3 h at 37 °C in the dark. The medium was removed and the dark blue crystals formed were dissolved by adding 100 μl DMSO/well. The optical density was measured at 570 nm with a Tecan Infinite M200 microplate reader (Tecan, France). Results are presented as the percentage of survival with DTDP-untreated (control) cells as 100% and Triton-X100-treated cells as 0%.

2.8. Measurement of the production of reactive oxygen (ROS) species

The ROS-sensitive fluorescent probe 5-(and-6)-chloromethyl-2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H_2DCFDA) was used to detect ROS production in HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells. Cells, plated in 96-well plates, were loaded with 5 μM CM-H_2DCFDA for 20 min at room temperature. Cells were excited at 495 nm and the emitted fluorescence was collected at 527 nm using a Tecan Infinite M200 microplate reader (Tecan, France).

2.9. Synchrotron microbeam X-ray fluorescence

HEK and HEK-TRPC6 cells were grown on Si_3N_4 membranes (3×3 mm^2, thickness 500 nm, Silson Ltd., England). They were first coated with poly-L-lysine (0.0025% in H_2O, 90 min at 37 °C), following by poly-L-ornithine (0.0033% in H_2O, 90 min at 37 °C). Si_3N_4 membranes were washed twice with sterile deionized water. The cell suspension was added to the membrane and incubated under 95% O_2/5% CO_2 at 37 °C for 48 h. Cells were then rinsed with PBS, cryofixed at −160 °C by plunge-freezing into isopentane chilled with liquid nitrogen, further freeze dried at −65 °C in vacuum, and stored at room temperature in a desiccator prior to synchrotron nanoanalysis. The protocol applied preserved the cellular morphology and the chemical element distribution integrity [19]. X-ray fluorescence nanoanalyses were performed at the nanoimaging end station ID22NI of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). Dynamically bent graded multilayers set in the Kirkpatrick–Baez geometry were used to focus the X-ray beam from an undulator source to a spot size of approximately 100 (H)×130 (V) nm^2 on the specimen. Incident photon energy of 17.5 keV was used, with a monochromaticity of 2% and a flux of 5×10^{11} photons/s. The sample, mounted in air at room temperature on a nanopositioner stage, was raster-scanned with a step size of 100 nm through the focal plane while the spectrum of the emitted fluorescence was recorded with an energy dispersive silicon drift diode collimated detector (SII Nanotechnology Vortex 50 mm^2) placed in the horizontal plane at 75° from the incident beam. The integration time per scan point was 0.3 s. Elemental maps were created by PyMCA software [20] by fitting the recorded spectrum in every scan point to determine the fluorescence signal for each element. The quantitative evaluation provided elemental area concentration (μg/cm^2) [21]. The standardisation to convert the fluorescence signal to an elemental area concentration was achieved by fitting spectra against the signal derived from thin-film standards SRM-1832a, SRM-1833a (National Bureau of Standards, Gaithersburg, MD, USA). The data shown were collected from 4 to 5 independent cultures.

2.10. Materials

Fura-2/AM, FluoZin-3/AM and 5-(and-6)-chloromethyl-2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester were from Molecular Probes (Invitrogen, France). Tissue culture media were obtained from Invitrogen (France). All other reagents were from Sigma-Aldrich (France). Hyperforin was a kind gift from Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co (Karlsruhe, Germany). The extract is a mixture of hyperforin with its homologue adhyperforin (ratio 8:2), prepared as sodium salts [7].

3. Results

3.1. Expression of TRPC6 channels increases the intracellular content of Zn and S

The effect of the expression of TRPC6 channels on the total cellular content of various elements was determined. When compared to HEK cells and HEK-TRPC3 cells, HEK-TRPC6 cells were enriched in zinc and sulphur, whereas their copper content was reduced (Table 1). No significant differences were seen with the other elements tested (iron, sodium, potassium, magnesium, phosphorus) (supplementary data, Table 1). Similarly to TRPC6, TRPC3 can form DAG-sensitive cation channels. However, HEK-TRPC3 cells had the same zinc, copper and sulphur content as HEK cells (Table 1) (supplementary data, Table 1). Thus, the expression of TRPC6 (but not TRPC3) channels gives rise to specific changes in the cellular content of biologically relevant elements.

3.2. Expression of TRPC6 channels increases the size of the mobilizable pool of Zn^{2+}

An oxidative stress increases the intracellular concentration of free Zn^{2+} ([Zn^{2+}]i) [22]. Since HEK-TRPC6 cells have a large zinc content, when compared to HEK (and HEK-TRPC3) cells, we checked whether oxidative conditions could give rise to larger changes in [Zn^{2+}]i in HEK-TRPC6 cells. This hypothesis was tested by using the fluorescent indicator FluoZin-3. It is a highly specific Zn^{2+} probe having a Kd of 15 nM [14]. The oxidant 2,2′-dithyodipyridine (DTDP) which can mobilise Zn^{2+} from internal pools [22] was used to assess the size of the mobilizable pool of Zn^{2+}. DTDP elicited larger FluoZin-3 signals in HEK-TRPC6 cells when compared to HEK and HEK-TRPC3 cells (Fig. 1A). The addition of the Zn^{2+} chelator TPEN completely abolished the DTDP-induced FluoZin-3 signals, confirming that DTDP affected [Zn^{2+}]i (Fig. 1A).

3.3. HEK-TRPC6 cells are more sensitive to an oxidative stress

Zinc ions are known to influence the cellular redox state and can thus alter cell survival [23]. In the following set of experiments it was

Table 1 Q2

	HEK-293 cells	HEK-TRPC6 cells	HEK-TRPC3 cells
Zn	302 ± 23	429 ± 25 **	218 ± 5
S	7081 ± 477	13,215 ± 701 **	8155 ± 206
Cu	11.9 ± 1.8	7.8 ± 0.2 *	10.3 ± 0.1

The results are expressed as μg of metal/g of proteins. Means ± sem are given for n = 3 to 11 independent measures. Differences between groups were determined using an ANOVA followed by a Tukey's test (for S and Zn) and a Dunn's test (for Cu), with * $p<0.05$ and ** $p<0.001$, when compared to HEK cells.

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article as: J. Gibon, et al., The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc, Biochim. Biophys. Acta (2011), doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.013

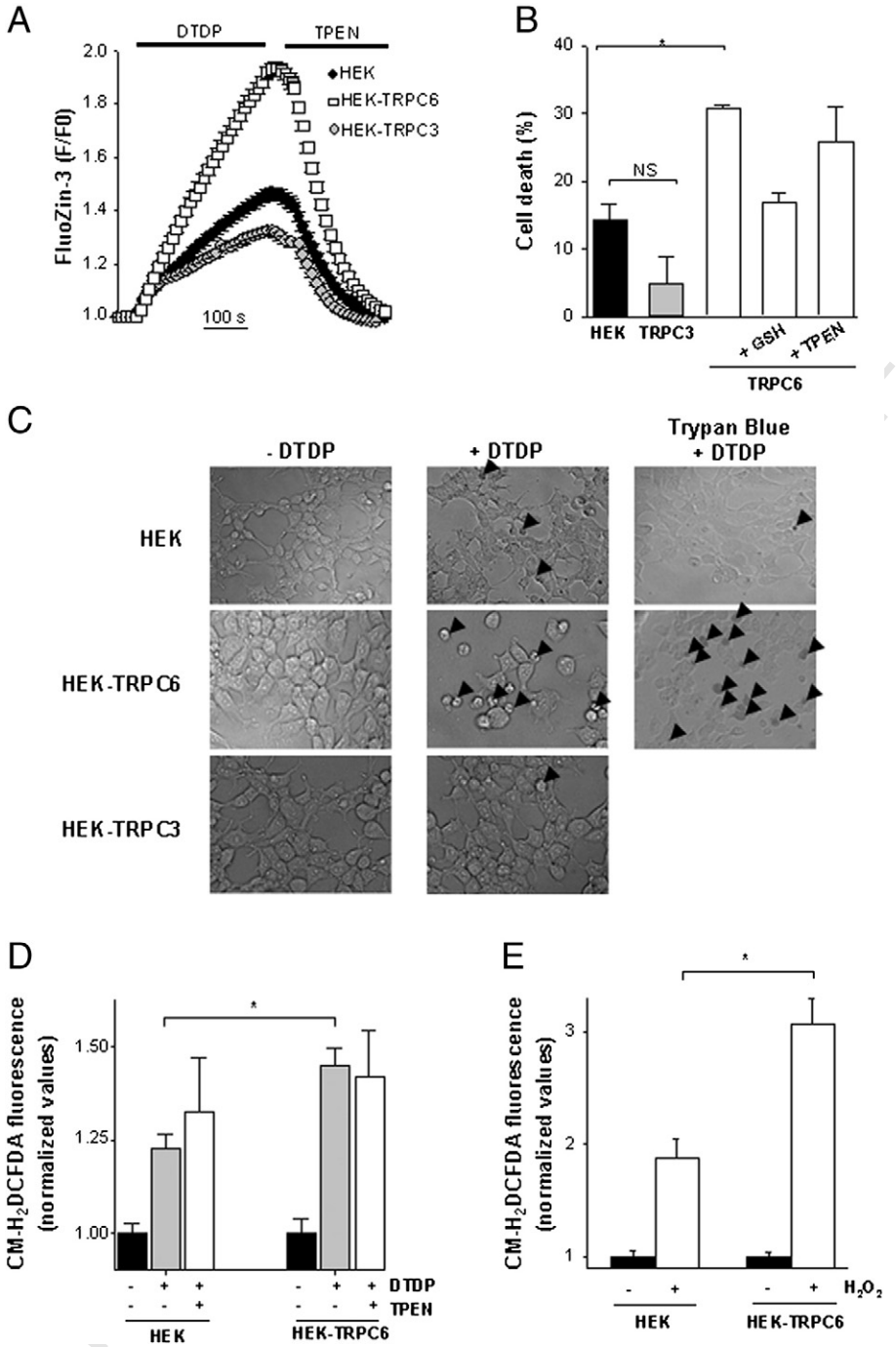


Fig. 1. HEK-TRPC6 cells have a large pool of mobilizable Zn^{2+}. HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells were loaded with FluoZin-3/AM. Panel A shows the increase of the FluoZin-3 fluorescence (F/F0) in response to the application of DTDP (50 μM). TPEN (5 μM) reversed the DTDP-induced FluoZin-3 signals. DTDP and TPEN were added when indicated by the horizontal bars. The number of cells and dishes used was: 166/4 (HEK cells), 207/5 (HEK-TRPC3 cells) and 109/4 (HEK-TRPC6 cells). Mean ± sem. When not visible, error bars are smaller than symbols. For the sake of clarity only every two points is shown. Panel B the mitochondrial activity of HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells was measured as an index of cell viability. Cells were grown in 96-wells culture plates and incubated with 50 μM DTDP for 1 hr at 37 °C. Twenty four hours later 0.5 mg/ml MTT was added for 3 hours at 37 °C. In some experiments, the culture medium of HEK-TRPC6 cells was supplemented with 2 mM GSH, added 2 h before DTDP (and still present during the DTDP challenge). The effect of the Zn^{2+} chelator TPEN (0.2 μM) was tested on HEK-TRPC6 cells. It was added 10 min before DTDP and remained present during the DTDP treatment. However, TPEN did not protect HEK-TRPC6 cells. Results are presented as the percentage of cell death with DTDP-untreated (control) cells as 0% and Triton-X-100 treated cells as 100%. Mean ± sem from 3 to 6 independent experiments. NS: the difference was not statistically significant ($p > 0.05$); * $p < 0.05$, one way ANOVA followed by a Holm-Sidak test. Panel C: A DTDP treatment alters the morphology of HEK-TRPC6 cells. HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells were maintained without or transiently treated with 50 μM DTDP for 1 h at 37 °C (same protocol as in Fig. 1B). Microphotographs were obtained 24 h after the washout of DTDP. The treatment altered the morphology of the cells, particularly HEK-TRPC6 cells (arrowheads). The fluorescent probe CM-H_2DCFDA was used to monitor the production of ROS. CM-H_2DCFDA-loaded cells were kept for 30 min at room temperature without or with 50 μM DTDP (D) or without or with 1 mM H_2O_2 (E). The ability of TPEN (0.2 μM) to reverse the DTDP-induced production of ROS was also tested. The chelator was added 10 min before DTDP and remained present during the DTDP treatment. The presence of TPEN did not prevent the production of ROS in HEK-TRPC6 cells. Mean ± sem from three independent experiments. * $p < 0.05$, Student's t test.

determined whether HEK-TRPC6 cells are more sensitive to an oxidative insult than HEK cells. To this aim, HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells were incubated with 50 μM DTDP for 1 h at 37 °C. The oxidant was washed away and the colorimetric MTT test was employed. Reduction of MTT is an index of mitochondrial activity and an indicator of cell viability. In these experiments, the concentration

of DTDP used (50 μM) induced the death of 15%, 5% and 30% of the HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells, respectively (Fig. 1B). Pre-incubating HEK-TRPC6 cells with 2 mM GSH attenuated the DTDP-induced cell death whereas TPEN (0.2 μM) failed to prevent the DTDP response (Fig. 1B). Larger concentrations of this chelator could not be used because at concentrations ≥0.4 μM TPEN alone could provoke a cell loss (not shown). In contrast to HEK and HEK-TRPC3 cells where only a few cells were affected, DTDP profoundly modified the morphology of HEK-TRPC6 cells (Fig. 1C). The effect of a DTDP challenge on the viability of the cells was assayed by means of the vital dye trypan blue (Fig. 1C). Without DTDP treatment, the number of trypan blue-positive cells was ~1% in all group of cells, namely HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells (n = 3 measurements). However, the DTDP treatment increased the number of trypan blue-positive HEK-TRPC6 cells to 19 ± 3% (n = 6) whereas the number of dead HEK and HEK-TRPC3 cells was 8 ± 1% and 7 ± 1% (n = 6), respectively (Fig. 1C). The production of reactive oxygen species (ROS) induced in response to the application of the oxidants DTDP and H_2O_2 was monitored with the ROS-fluorescent probe CM-H_2DCFDA. The production of ROS evoked by 50 μM DTDP (Fig. 1D) or 1 mM H_2O_2 (Fig. 1E) was larger in HEK-TRPC6 cells when compared to HEK cells. This DTDP-dependent production of ROS was not prevented by TPEN (Fig. 1D). Altogether, it seems that HEK cells expressing TRPC6 channels are more sensitive to an oxidative stress than HEK cells or cells expressing TRPC3.

3.4. Analysis of the sub-cellular distribution of zinc by X-ray fluorescence

Synchrotron X-ray fluorescence nanoprobe was applied for the topographic and quantitative analyses of zinc in HEK and HEK-TRPC6 cells. When determined by this approach, the total average zinc content of HEK-TRPC6 cells was larger than in HEK cells (0.56 ± 0.045 μg/cm^2, n = 5, vs 0.38 ± 0.06 μg/cm^2, n = 4, $p<0.05$, Student's t test). These results are thus in line with our previous measurements with ICP-OES (Table 1). The cellular calcium content was quantified using this technique. The values found for HEK and HEK-TRPC6 cells (1.18 ± 0.2 μg/cm^2, n = 4, vs 0.95 ± 0.13 μg/cm^2, n = 5, $p>0.05$, Student's t test) indicate that the over-expression of the channel did not influence the cellular Ca load. Fig. 2 shows representative two-dimensional mappings of the intracellular distribution of zinc in HEK (Fig. 2A) and HEK-TRPC6 cells (Fig. 2B). The metal was found rather homogenously distributed all over the cell with a stronger density in the thickest part of the cells, probably the nucleus. The data gained with a spatial resolution of 100 nm indicate that the expression of TRPC6 channels influences the intracellular distribution of Zn^{2+} and favours its enrichment in the nuclear region.

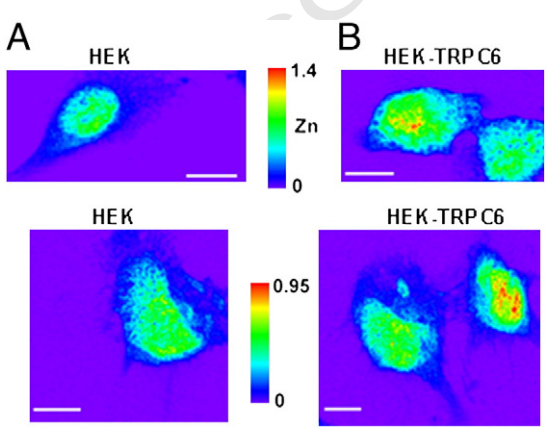


Fig. 2. Intracellular distribution of zinc in HEK and HEK-TRPC6 cells. Representative 2D maps of zinc in HEK cells (A) and in HEK-TRPC6 cells (B) were obtained with synchrotron X-ray fluorescence nanoprobe. The rainbow colour scales on the right show the range of concentration of zinc in the samples (elemental concentrations are given in micrograms per cm^2). Scale bars: 5 μm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.5. TRPC6 channels permit the entry of Zn^{2+} in HEK cells

Since TRPC6 channels are non-selective cation channels [1], and their over-expression in HEK cells affects their zinc status, experiments were carried out to determine whether TRPC6 channels could permit the uptake of Zn^{2+}. For this purpose, 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol (SAG), a DAG analogue known to activate TRPC6 channels [7,24] was used. HEK, HEK-TRPC3 or HEK-TRPC6 cells were first loaded with FluoZin-3 and kept in a Ca^{2+} (2 mM)-containing saline. The bath addition of Zn^{2+} (50 μM) was accompanied by an elevation of the FluoZin-3 fluorescence, indicating the existence of a basal entry of Zn^{2+} into these cells (Fig. 3A). A subsequent addition of SAG (100 μM), still in the presence of Zn^{2+}, gave rise to larger FluoZin-3 signals. When compared to HEK cells, the SAG-dependent entry of Zn^{2+} was more important in HEK-TRPC6 cells (Fig. 3A). Fig. 3B summarises these experiments and shows the maximal FluoZin-3 signals measured at the end of the recording in each condition. The FluoZin-3 signals of HEK-TRPC3 cells were not different from the ones recorded on HEK cells, further showing that the expression of TRPC3 and TRPC6 channels does not elicit the same cellular responses. Electrophysiological experiments were conducted to further examine the ability of TRPC6 channels to transport Zn^{2+} ions. Cells were placed in a medium containing 10 mM $CaCl_2$ and no added K^+ and Na^+ ions (replaced by the impermeant organic cation N-methyl-D-glucamine). The bath application of hyperforin provokes a Ca^{2+} entry in HEK-TRPC6 cells but not in HEK or HEK-TRPC3 cells (see Supplementary data, Fig. 1). This confirms that hyperforin can trigger the opening of TRPC6 channels without activating the other TRPC isoforms [25]. When voltage-clamped at a membrane potential of −60 mV, HEK-TRPC6 cells developed a transient Ca^{2+} current in response to the application of hyperforin (Fig. 3C) as already demonstrated [25]. Its mean peak amplitude was 161 ± 30 pA (n = 12). In the presence of 10 mM $ZnCl_2$ (instead of 10 mM $CaCl_2$), hyperforin was still able to induce a transient inward current but of smaller amplitude (89 ± 14 pA, n = 12) ($p = 0.035$ when compared to Ca^{2+} currents, Student's t test). Representative I-V plots from distinct cells are shown in Fig. 3D. In both instances (Ca or Zn), hyperforin gave rise to inward and outward currents having a reversal potential of ~0 mV (Fig. 3D). Similar experiments were conducted with 1 mM $ZnCl_2$. Reducing the external concentration of Zn^{2+} diminished the amplitude of the hyperforin-activated currents (trace c, grey line, Fig. 3E and F). Complexing Zn^{2+} with the impermeant chelator tricine (*N*-tris(hydroxymethyl)methylglycine) [26] markedly reduced the amplitude of the hyperforin-induced inward currents (Fig. 3E–F). These electrophysiological recordings show that, at −60 mV, a membrane potential close to the resting membrane potential, TRPC6 channels of HEK-293 cells allow the permeation of cations like Ca^{2+} and Zn^{2+}.

3.6. DAG-sensitive channels of cortical neurons permit the entry of Zn^{2+}

TRPC6 channels are found in many organs including the brain [1]. For instance, in the embryonic murine cortex, astrocytes and neurons express functional DAG-sensitive TRPC6 channels [5–7]. Experiments were conducted on cortical neurons in culture to determine whether endogenous DAG-sensitive channels of brain cells could permit the uptake of Zn^{2+}. FluoZin-3-loaded cortical neurons were exposed to Zn^{2+} (100 μM) alone or to Zn^{2+} (100 μM) + the channel activator SAG. In the absence of SAG, a weak FluoZin-3 signal was observed, reflecting a modest basal uptake of Zn^{2+} (Fig. 4A). Activating channels with SAG elicited a clear FluoZin-3 response that was suppressed by the cation channel blocker Gd^{3+} (Fig. 4A). Thus, cortical neurons express DAG-sensitive channels [7] allowing the entry of Zn^{2+}. Several concentrations of Zn^{2+} were tested (2, 50 and 100 μM). Fig. 4B shows that the amplitude of the FluoZin-3 signal was dependent of

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article as: J. Gibon, et al., The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc, Biochim. Biophys. Acta (2011), doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.013

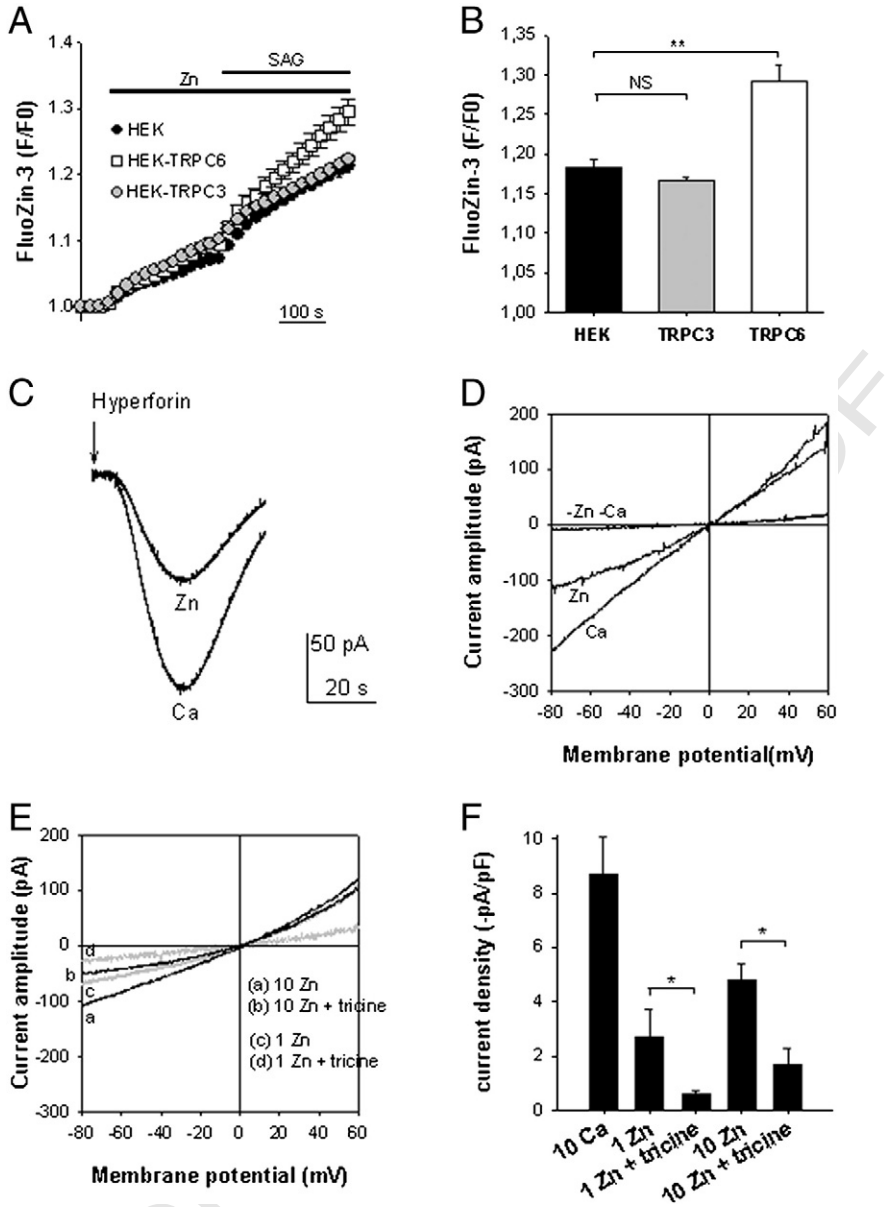


Fig. 3. TRPC6 channels of HEK cells allow the entry of Zn^{2+}. A HEK, HEK-TRPC3 and HEK-TRPC6 cells were loaded with FluoZin-3. When bath applied, 50 μM Zn acetate elicited a weak increase of the FluoZin-3 fluorescence in the three cell types. A subsequent addition of 100 μM SAG (still in the presence of Zn^{2+}) augmented the uptake of Zn^{2+} in HEK-TRPC6 cells whereas HEK and HEK-TRPC3 cells poorly responded to SAG. Number of cells and dishes used: 265/5 (HEK), 151/4 (HEK-TRPC3) and 125/4 (HEK-TRPC6). Mean ± sem. For the sake of clarity only one point out of four is shown. The recording medium contained 2 mM $CaCl_2$. Panel B is a bar graph representing the amplitude of the FluoZin-3 (F/F0) signals (Mean ± sem). Isochronal measurements were made 580 s after the beginning of the recording with ** $p<0.01$ (one way ANOVA followed by a Dunns' test); NS: not significant ($p>0.05$). In panel C are shown superimposed whole-cell patch recordings from 2 different HEK-TRPC6 cells. The holding membrane potential was set at −60 mV and 10 μM hyperforin was added when indicated (arrow). The bath recording medium contained either 10 mM $CaCl_2$ or 10 mM $ZnCl_2$. D representative current-voltage relationships from 3 distinct cells in response to the application of voltage ramps elicited from a holding potential of 0 mV. The external medium contained either 10 mM $CaCl_2$, 10 mM $ZnCl_2$ or consisted of a Ca^{2+}- and Zn^{2+}-free solution. Panel E shows I-V plots from different cells obtained with or without tricine (10 mM). The external medium contained 1 mM $ZnCl_2$ (grey lines) or 10 mM $ZnCl_2$ (black lines). F is a summary plot showing the mean (± sem) peak current density (−pA/pF) measured at −60 mV. The number of cells used in each condition was 12 (10 mM Ca), 9 (1 mM Zn), 4 (1 mM Zn + 10 mM tricine), 12 (10 mM Zn) and 4 (10 mM Zn + 10 mM tricine). * $p<0.05$, Student's t-test.

the external concentration of Zn^{2+}. It is important to mention that these experiments were conducted with a saline solution containing 2 mM $CaCl_2$. Some experiments were performed with a nominally Ca^{2+}-free solution and the channels were activated with either SAG (Fig. 4C) or hyperforin (Fig. 4D). Hyperforin elicited much robust FluoZin-3 signals than SAG. Whatever the channel agonist used (SAG or hyperforin), the FluoZin-3 signals were larger with a Ca^{2+}-free solution when compared to the 2 mM Ca^{2+} saline solution (Fig. 4E). Control experiments were conducted during which hyperforin or SAG was added alone (without Zn^{2+}). As already shown [27], hyperforin increases $[Zn^{2+}]i$. This response was however not influenced by the external concentration of Ca^{2+} (Fig. 4E). If SAG was added without Zn^{2+}, it did not elicit any FluoZin-3 response indicating that SAG alone does influence the homeostasis of Zn^{2+}. Thus, the hyperforin-dependent FluoZin-3 signals recorded when cells were bathed in a Zn^{2+}-containing solution have a dual origin: they reflected the entry of Zn^{2+} via hyperforin-sensitive channels and the release of Zn^{2+} from mitochondria [27].

Next, electrophysiological experiments were conducted on cultured cortical neurons to see whether the hyperforin-sensitive channels of brain cells could transport Zn^{2+}. In neurons, the hyperforin-induced inward currents were of smaller amplitude than in HEK-293 cells over-expressing TRPC6 channels. However, the permeation of Ca^{2+} (or Zn^{2+}) yields a clear inward current through

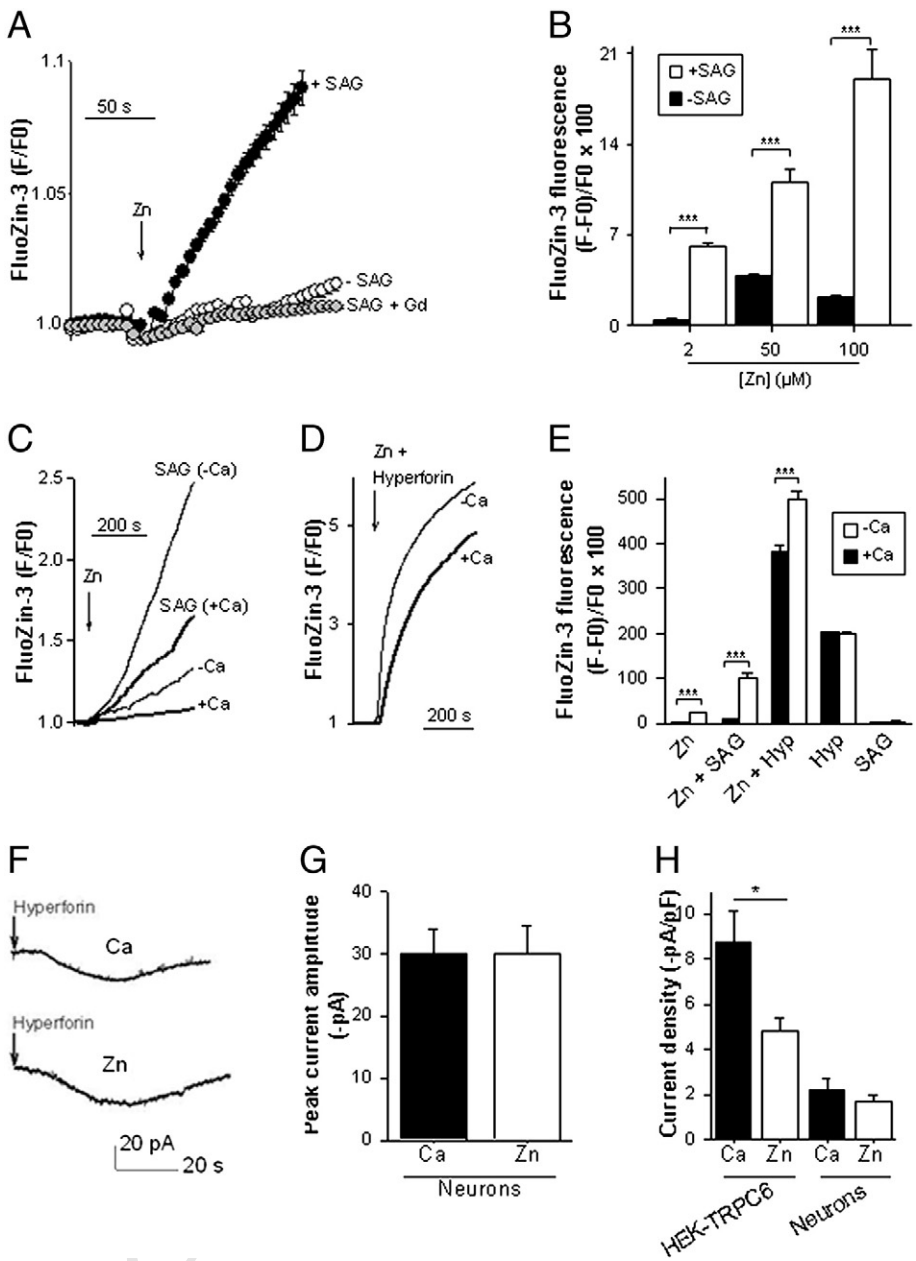


Fig. 4. TRPC6 channels of neurons cells allow the entry of Zn^{2+}. A. Cortical neurons in culture were loaded with FluoZin-3. The graph shows FluoZin-3 responses obtained in the presence of Zn^{2+} (50 μM) added (arrow) without or with 50 μM SAG, or with 50 μM SAG + 5 μM Gd^{3+}. Number of cells and dishes used: 120/5 (Zn^{2+} without SAG), 264/10 (Zn^{2+} + SAG), and 250/10 (Zn^{2+} + SAG + Gd^{3+}). Mean ± sem. When not visible, error bars are smaller than symbols. Panel B is a summary graph of the experiments depicted in A. FluoZin-3 loaded cortical neurons were exposed to either 2, 50 or 100 μM Zn^{2+} (Zn acetate) without or with SAG (50 μM). For each cell, the FluoZin-3 fluorescence was measured 250 s after the addition of SAG (either alone or together with Zn acetate). For each condition, the number of cells used was 73–264 cells from 3 to 10 independent experiments. Mean ± sem. Of note, the recording medium contained 2 mM Ca^{2+}. *** $p<0.001$, Mann–Whitney test. Panel C shows FluoZin-3 loaded cortical neurons kept in a Ca^{2+}-free (thin lines) or in normal (2 mM Ca^{2+}) saline solution (thick lines). When indicated (arrow) either 100 μM Zn^{2+} alone or 100 μM Zn^{2+} + 50 μM SAG was added (and remained present throughout the recording). Shown are representative FluoZin-3 responses. D, same experiments as in C except native channels of cortical neurons were activated with 10 μM hyperforin. Cells were maintained in a Ca^{2+}-free or in a normal (2 mM Ca^{2+}) recording solution. Panel E is a summary graph of the experiments illustrated in panels C and D. The number of cells and dishes used was 120/5 (Zn^{2+} − Ca^{2+}), 103/3 (Zn^{2+} + Ca^{2+}), 264/10 (Zn^{2+} + SAG, −Ca^{2+}), 101/3 (Zn^{2+} + SAG, + Ca^{2+}), 84/3 (Zn^{2+} + hyperforin, −Ca^{2+}), 73/4 (Zn^{2+} + hyperforin, + Ca^{2+}). The bar graph also shows the FluoZin-3 signals observed in the presence of hyperforin and SAG added alone, without Zn^{2+}. For each cell, the FluoZin-3 fluorescence was measured 250 s after the addition of Zn^{2+}, Zn^{2+} + SAG, Zn^{2+} + hyperforin, hyperforin or SAG. Mean ± sem. *** $p<0.001$ (Student's t test). Hyperforin-activated currents from cortical neurons are shown in F. Cells were bathed in a recording medium containing 140 mM NMDG plus either 10 mM $CaCl_2$ or $ZnCl_2$. Hyperforin (10 μM) was added when indicated (arrows). G is a bar graph of the mean (± sem) of the maximal peak inward currents elicited by hyperforin. The number of cells used was 10 in each condition. Panel H is a summary graph reporting the density of the hyperforin-activated current. This graph was obtained by dividing, for each cell, its peak current amplitude (pA) by its cell capacitance (pF). Mean ± sem. * $p<0.02$, Student's *t* test. HEK-TRPC6 cells: same data as in Fig. 3F.

the hyperforin-sensitive channels (Fig. 4F). In contrast to HEK-TRPC6 cells, substituting Ca^{2+} by Zn^{2+} ions did not affect the size of the hyperforin-sensitive currents (30 ± 4 pA, n = 10, in 10 mM $CaCl_2$, and 30 ± 5 pA, n = 10, in 10 mM $ZnCl_2$) (Fig. 4G). HEK-TRPC6 cells and cortical neurons had comparable values of cell capacitance (19.8 ± 1.4 pF, n = 41, for HEK-TRC6 cells, and 18.4 ± 1.4 pF, n = 20, for the neurons, $p>0.05$, Student's t test) (Fig. 4G). Consequently, HEK-TRPC6 cells had hyperforin-sensitive currents of larger density than neurons (Fig. 4H). In both types of cells (HEK-TRPC6 cells and neurons), the application of hyperforin can give rise to an influx of Zn^{2+} ions. This finding further adds support to the idea that TRPC6 channels could transport Zn^{2+}.

Please cite this article as: J. Gibon, et al., The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc, Biochim. Biophys. Acta (2011), doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.013

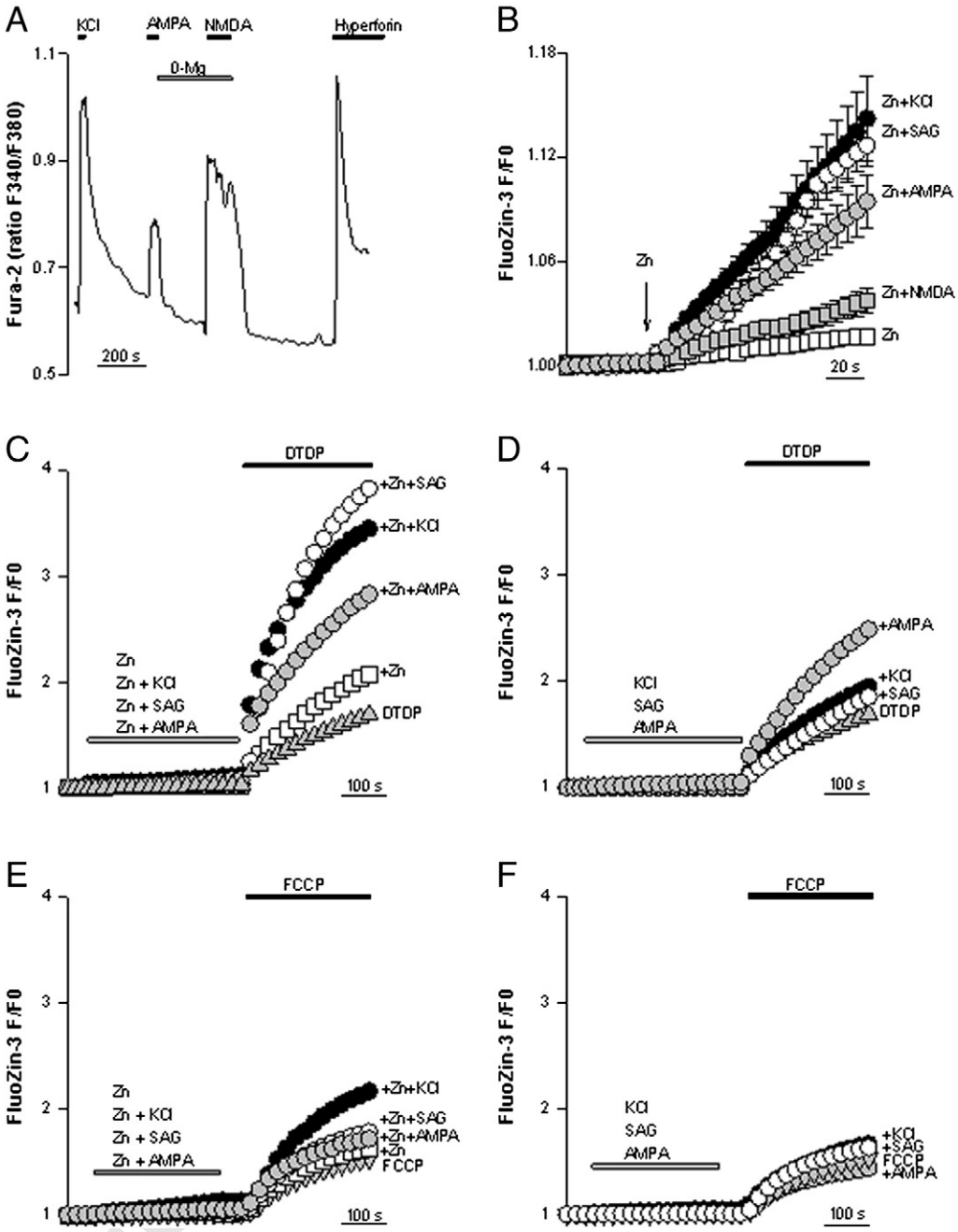


Fig. 5. Zn^{2+} entry through TRPC6 channels and pools of mobilizable Zn^{2+}. A is a representative Fura-2 recording showing the coexistence of various types of Ca^{2+}-conducting channels in a E13 cortical neuron grown 3 days in culture. The cell was sequentially challenged with a depolarising medium containing 50 mM KCl (instead of 5 mM KCl), 50 μM AMPA, 300 μM NMDA + 100 μM glycine. In the latter case, the cortical neuron was transiently bathed in a nominally Mg^{2+}-free medium. Hyperforin (10 μM) was added at the end of the recording to activate TRPC6 channels. The horizontal black bars indicate when KCl, AMPA, NMDA (+ glycine) and hyperforin were added. In panels B to F are shown FluoZin-3 recordings (F/F0) from cortical neurons kept in a bathing saline solution contained 2 mM $CaCl_2$. B When indicated (arrow), 100 μM Zn acetate was added either alone (n = 89 cells, from 4 dishes) or together with 50 mM KCl (n = 102 cells from 4 dishes), 300 μM NMDA (+ 100 μM glycine in a Mg^{2+}-free medium) (n = 101 cells from 4 dishes), 50 μM AMPA (n = 81 cells from 4 dishes), or with 50 μM SAG (n = 119 cells from 4 dishes). In panel C, DTDP (100 μM) was applied (horizontal black bar) to mobilise Zn^{2+} from internal pools (grey triangles, n = 451 cells from 16 dishes). In some instances, prior to the DTDP challenge, cells were transiently treated (horizontal grey bar) either with 15 μM Zn^{2+} (open squares, n = 358 cells from 10 dishes), 15 μM Zn^{2+} + KCl (50 mM) (filled circles, n = 231 cells from 7 dishes), 15 μM Zn^{2+} + AMPA (50 μM) (grey circles, n = 190 cells from 6 dishes), or 15 μM Zn^{2+} + SAG (50 μM) (open circles, n = 72 cells from 6 dishes). KCl, AMPA, SAG and Zn^{2+} were washed away before the application of DTDP. D, same experiments as in C, except Zn^{2+} was omitted. This graph shows the FluoZin-3 responses (F/F0) induced by DTDP (100 μM) alone (grey triangles, n = 451 cells from 16 dishes, same data as in C), and after a prepulse during which 50 μM AMPA (grey circles, n = 283 cells from 10 dishes), or 50 mM KCl (filled circles, n = 261 cells from 9 dishes), or 50 SAG (open circles, n = 153 cells from 5 dishes) was applied (and washed away). In E and F, the size of the mitochondrial pool of mobilizable Zn^{2+} was assessed by means of the protonophore FCCP (2 μM, horizontal black bar). E and F, same experimental procedures as in C and D, respectively. E: FCCP (grey triangles, n = 332 cells from 10 dishes), 15 μM Zn^{2+} (open squares, n = 329 cells from 9 dishes), 15 μM Zn^{2+} + KCl (50 mM) (filled circles, n = 151 cells from 4 dishes), 15 μM Zn^{2+} + AMPA (50 μM) (grey circles, n = 131 cells from 4 dishes), 15 μM Zn^{2+} + SAG (50 μM) (open circles, n = 232 cells from 6 dishes). KCl, AMPA, SAG and Zn^{2+} were washed away before the application of FCCP. Note that the FCCP-dependent FluoZin-3 signals are much smaller than the DTDP-sensitive signals and they are poorly affected by the entry of Zn^{2+} through plasma membrane Ca^{2+}-conducting channels, except voltage-gated Ca^{2+} channels: the entry of Zn^{2+} via these channels up-regulates the size of the FCCP-sensitive pool of Zn^{2+}. F: FCCP (2 μM) alone (grey triangles, n = 332 cells from 10 dishes, same data as in E), and after a preceding prepulse during which 50 μM AMPA (grey circles, n = 114 cells from 4 dishes), or 50 mM KCl (filled circles, n = 155 cells from 5 dishes), or 50 μM SAG (open circles, n = 134 cells from 5 dishes) was applied. Mean ± sem, error bars are smaller than symbols. B–F: for the sake of clarity only one point out of 4 is shown. Throughout these experiments (A–F) cells were bathed in a Ca^{2+} (2 mM)-containing solution.

Please cite this article as: J. Gibon, et al., The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc, Biochim. Biophys. Acta (2011), doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.013

3.7. Cortical neurons express several types of Ca^{2+}-conducting channels

Fig. 5A is a Fura-2 recording during which a cultured cortical neuron was activated by the sequential application of a potassium rich (50 mM) solution (to depolarise the membrane potential and activate voltage-gated Ca^{2+} channels), AMPA, NMDA (two agonists of distinct glutamatergic receptors), and finally hyperforin (to activate TRPC6 channels). In each instance, these manoeuvres elicited a Fura-2 response. This shows the co-existence, even at E13, of several types of functional Ca^{2+}-conducting channels within the plasma membrane of cortical neurons. At the embryonic age of E13, cortical neurons also possess store-operated Ca^{2+} channels (SOC) (supplementary data, Fig. 2) [13,16], a family of plasma membrane Ca^{2+} channels activated in response to the emptying of the Ca^{2+} stores of the endoplasmic reticulum. Of interest, voltage-gated Ca^{2+} channels and glutamatergic receptors of NMDA and AMPA/kainate types are known to permit the transport of Zn^{2+} through the plasma membrane [9,10]. On the other hand, depleting Ca^{2+} stores of cortical neurons with thapsigargin did not elicit the entry of Zn^{2+} through SOC (supplementary data, Fig. 3). Of note, Zn^{2+} ions are known to strongly block SOC [28] (see also supplementary data Fig. 2). Thus, beside SOC all the other Ca^{2+}-conducting channels of E13 cortical neurons tested (namely voltage-gated Ca^{2+} channels, AMPA, NMDA, and SAG-sensitive channels) allowed the uptake of Zn^{2+} (Fig. 5B). When comparing the various agents used, SAG and KCl were the ones that gave rise to the most potent FluoZin-3 signals.

3.8. Zn^{2+} entry through Ca^{2+}-conducting channels and size of the mobilizable pool of DTDP-sensitive Zn^{2+}

E13 cortical neurons possess pools of mobilizable Zn^{2+} [27] from where this metal can be recruited. For instance, oxidants like DTDP can mobilise Zn^{2+} from internal pools [22] as illustrated in Fig. 1A. In the following set of experiments we compared the consequence of an entry of Zn^{2+} through the Ca^{2+}-conducting channels depicted in Fig. 5A on the size of the DTDP-sensitive pool of Zn^{2+}. Since the NMDA-dependent FluoZin-3 signals were much smaller than the responses evoked by AMPA, KCl and SAG, only the 3 latter types of channels (AMPA receptors, voltage-gated Ca^{2+} channels and TRPC6 channels) were considered. Fig. 5C shows the FluoZin-3 signals induced in response to the application of DTDP. It produced a time-dependent elevation of the FluoZin-3 fluorescence (Fig. 5C, filled triangles). In some instances, cells were transiently pre-treated with either 15 μM Zn^{2+} alone or 15 μM Zn^{2+} + one of the following agent: AMPA, KCl, or SAG, prior to the application of DTDP. As illustrated, maintaining cells for a few minutes in a zinc-rich medium enhances the size of the DTDP-sensitive pool of Zn^{2+} (Fig. 5C). However, the size of this pool can be even more up-regulated after the entry of Zn^{2+} through KCl-, AMPA- and SAG-sensitive channels, with the largest FluoZin-3 signals seen in response to the activation of voltage-gated Ca^{2+} channels and SAG-sensitive channels (Fig. 5C). As a control, similar experiments were repeated but in the absence of added Zn^{2+} (Fig. 5D). In this latter case, the DTDP-dependent FluoZin-3 responses were larger when cells were transiently stimulated with AMPA (and no added Zn^{2+}) and almost not influenced if pre-stimulated with KCl or SAG (Fig. 5D). Previous data showed that the entry of Ca^{2+} triggered after glutamate receptor activation mobilises Zn^{2+} from internal pools [29]. Of note, stimulating hippocampal neurons with glutamate causes the release a Zn^{2+} from mitochondria [30]. Such mechanisms could explain the AMPA- and, to a lesser extent, the modest KCl- and SAG-dependent up-regulation of the DTDP-sensitive responses seen in Fig. 5D. To check whether the entry of Ca^{2+} through Ca^{2+}-conducting channels of E13 cortical neurons influenced the size of the DTDP-sensitive pool of Zn^{2+}, additional experiments were performed. Chelating extracellular Zn^{2+} with CaEDTA and removing extracellular Ca^{2+} abolished the AMPA-dependent potentiation of the DTDP-sensitive response (supplementary data, Fig. 4). The determination of the zinc content in our solutions by means of ICP-OES shows that the concentration of Zn in the external saline solution and the neurobasal medium was, respectively, in the order of 15 nM and 1–2 μM, illustrating that this metal is present as a contaminant in saline solutions [31]. From these experiments, we propose that stimulating AMPA receptors permits the entry of Ca^{2+} (and Zn^{2+}), this, in turn, via a glutamatergic-dependent release of Zn^{2+} from mitochondria [30], could change the Zn^{2+} load [29].

3.9. Zn^{2+} entry through Ca^{2+}-conducting channels and size of the mitochondrial pool of FCCP-sensitive Zn^{2+}

Mitochondria of cortical neurons have a pool of mobilizable Zn^{2+}. For instance, it can be recruited in response to the application of the protonophore FCCP [27,32,33]. This agent was used to assess the size of the mitochondrial pool of mobilizable Zn^{2+} in E13 cortical neurons. FCCP elicited FluoZin-3 signals but of much smaller amplitude than DTDP (Fig. 5E). When the FCCP challenge was preceded by a short treatment with Zn^{2+} alone, or Zn^{2+} + either AMPA or SAG, this weakly influenced the amplitude of the FCCP-dependent FluoZin-3 signals (Fig. 5E). However, the entry of Zn^{2+} through voltage-gated Ca^{2+} channels had a positive effect on the FCCP-dependent FluoZin-3 signals (Fig. 5E). This indicates that the entry of Zn^{2+} through voltage-gated Ca^{2+} channels augments the size of the mitochondrial pool of mobilizable Zn^{2+} in contrast to Zn^{2+} fluxes through AMPA receptors and SAG-sensitive channels. As above, control experiments were conducted on cells not pre-treated with Zn^{2+}. Under these conditions, a transient application of KCl, AMPA or SAG did not affect the FCCP-dependent FluoZin-3 responses (Fig. 5F).

4. Discussion

Zinc is a vital cation participating in many biological processes. Depending on the cell type, its cellular concentration in Eukaryotic cells is in the order of 150–250 μM [34,35]. Wild-type HEK-293 cells have a total zinc content of ~300 μg/g protein. However, the stable over-expression of TRPC6 channels enhances this total zinc load by ~40% (when expressed in μg/g protein and measured by ICP-OES) (Table 1) and by 47% (when quantified with synchrotron X-ray fluorescence). In comparison, HeLa cells have a zinc content of 174 μg/g protein and the zinc-resistant subclone HZR have a total quantity of zinc of >3500 μg/g protein [36]. The zinc overload of HEK-293 cells stably over-expressing TRPC6 channels observed by two independent experimental approaches, namely spectroscopic methods and cellular imaging with synchrotron X-ray fluorescence, is accompanied by an increased sulphur content. This latter finding probably reflects an enhanced expression of thiol-containing proteins. Besides zinc, copper was also affected since HEK-TRPC6 cells have less copper than wild-type HEK-293 cells. Clarifying the mechanism(s) by which the zinc status of HEK-293 cells influences their cellular copper content was beyond the scope of the present study and this aspect was thus not investigated further. It is however of interest to note that, in humans, the competition between zinc and copper is well documented. Zinc overload may provoke copper deficiency by decreasing copper absorption [37]. This can lead to neurologic abnormalities as cases of central nervous system demyelination associated with high zinc and low copper have been described [38]. The results reported above, namely the alteration of the cellular content of some elements (Zn, S, Cu), could be unrelated to TRPC6 channels but could instead be a consequence of the transfection procedure. However, HEK-293 cells stably expressing TRPC3 channels, another member of the TRPC family which are DAG (or DAG analogues)-sensitive [2] and hyperforin-insensitive [25] (Supplementary data, Fig. 1), do not have the same phenotype as HEK-TRPC6 cells. Based on the analysis of microarray data, it was recently shown that

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article as: J. Gibon, et al., The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc, Biochim. Biophys. Acta (2011), doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.013

the over-expression of TRPM7 channels in HEK cells altered the transcription of 951 genes [39]. This up- or down regulates the expression of various proteins playing roles in cellular growth and proliferation, cell death, cellular morphology and movement [39]. Based on this finding we cannot exclude the possibility that, similarly to TRPM7 channels, the over-expression of TRPC6 influences the expression of proteins such as proteins participating in the cellular homeostasis of Zn. For instance, TRPC6 over-expression in HEK cells could alter the expression of metallothioneins (MTs). This is of interest because previous studies showed that MTs can have a dual action: they can function as an important zinc buffering system but they can also be a source of toxic zinc [40]. Whatever the molecular mechanisms involved, HEK-293 cells stably expressing TRPC6 channels have distinct properties as wild-type HEK-293 cells (and HEK-TRPC3 cells). This observation is reminiscent to a previous study showing that the expression of TRPC3 channels in HEK-293 cells reduces the size of the mobilizable pool of Ca^{2+} [41]. Therefore, our results as well as data from another laboratory [41] show that over-expressing TRPC channels changes the cellular content of biologically relevant cations which, in turn, can profoundly modify the properties of the cells. For instance, the over-expression of TRPC6 channels influences the intracellular distribution of zinc, enhances the size of the mobilizable pool of Zn^{2+} and thus affects the sensitivity of cells to an oxidative insult. Although the colorimetric MTT test cannot clearly distinguish injured from dead cells, it is a convenient method used to check for the cytotoxicity of a drug [42]. The data presented in Fig. 1B-E reveals that the expression of TRPC6 channels (but not TRPC3 channels) modifies the ability of cells to respond to an oxidative stress: the application of DTDP perturbs the mitochondrial activity, as illustrated by the MTT test and, in addition, alters the morphology of TRPC6-expressing cells. The production of ROS and Zn^{2+} homeostasis seem interdependent [29]. In neurons, oxidative conditions can release Zn^{2+} from intracellular stores which, in turn, can cause neuronal apoptosis [22]. Zn^{2+} indirectly influences the production of ROS via its ability to inhibit the mitochondrial activity [43].

Throughout this study, the activity of TRPC6 channels was controlled by means of two pharmacological tools: SAG and hyperforin. TRPC6 channels can indeed open in response to DAG or DAG analogues like SAG or OAG [1,2]. Cortical neurons express SAG-sensitive channels. The entry of Ca^{2+} through these SAG-sensitive channels is enhanced by flufenamic acid [7]. To our knowledge, TRPC6 is the only TRPC positively regulated by flufenamic acid, an agent known to block the other TRPC channels [44,45]. Like DAG and DAG analogues, the plant extract hyperforin is able to trigger the opening of TRPC6 channels, leaving the other TRPC isoforms unaffected [25,46]. The results shown in Supplementary data Fig. 1 confirm that this antidepressant gives rise to a Ca^{2+} entry only in cells expressing TRPC6 channels whereas wild type HEK-293 and HEK-TRPC3 cells do not generate an influx of Ca^{2+} in response to the application of hyperforin. This observation is perfectly in line with previous data [25]. Although hyperforin has several cellular targets, it is important to mention that TRPC6 channels are the only known plasma membrane channels activated by this agent. The application of hyperforin could depolarize cells and thus promote the entry of Zn^{2+} via voltage-gated Ca^{2+} channels. However, in cortical neurons, the entry of Ca^{2+} through SAG- or hyperforin-sensitive channels is not inhibited by nifedipine and ω-conotoxin [7], two blockers of voltage-gated Ca^{2+} channels. Furthermore, in FluoZin-3-loaded cells, the entry of Zn^{2+} triggered by SAG is not affected by nifedipine (not shown). Altogether, these data indicate that voltage-gated Ca^{2+} channels are not involved in the entry of Zn^{2+} observed in response to the application of hyperforin. As an alternative possibility, it could be envisaged that hyperforin triggers the entry of Zn^{2+} via glutamatergic receptors but we are not aware of any report showing that hyperforin opens AMPA/kainate or NMDA channels. On the contrary, hyperforin (10 μM) inhibits NMDA-induced calcium influx into cortical neurons [47]. We thus propose that the entry of Zn^{2+} occurring after the application of hyperforin (or SAG) is attributable to TRPC6 channels. This entry regulates the size of the DTDP-sensitive pool of Zn^{2+}. The activity of the serine/threonine protein kinase (PKC), another cellular target of DAG and DAG analogues, can influence Zn^{2+} signals [48]. Therefore, the SAG-dependent stimulation of PKC could modulate the size of the pools of mobilizable Zn^{2+}. However, clarifying the role played by PKC is complicated by the fact that this kinase regulates TRPC6 activity and thus influences the movements of cations through these channels [49].

The data obtained with the live-cell imaging experiments indicate that TRPC6 channels whether heterogeneously expressed (in HEK cells) or endogenous (in cultured cortical neurons) can form a Zn^{2+} entry pathway. In the presence of micro-molar concentrations of Zn^{2+} (e.g. 2 μM), DAG-sensitive channels of cortical neurons permit the uptake of this metal, even when cells are maintained in a Ca^{2+} (2 mM)-containing recording medium. There is however a competition between Ca^{2+} and Zn^{2+} as evidenced by the larger uptake of Zn^{2+} when Ca^{2+} is omitted. The electrophysiological recordings confirm that TRPC6 channels expressed in HEK-293 cells can transport Zn^{2+} ions. An equimolar substitution of Ca^{2+} by Zn^{2+} reduces the amplitude of the hyperforin-sensitive currents by 44% in HEK-TRPC6 cells but this manoeuvre has no effect in cortical neurons where the amplitude of the current is the same regardless of the cation present, Zn^{2+} or Ca^{2+}. This difference between HEK-TRPC6 cells and neurons indicates that over-expressed TRPC6 channels and native TRPC6 channels of cortical neurons have distinct properties or distinct heteromeric compositions. Whatever the origin of this difference, the electrophysiological recordings and the live-cell imaging experiments carried out with FluoZin-3 support the hypothesis that TRPC6 channels can favour the uptake of Zn^{2+}.

Certain neurons of the central nervous system accumulate Zn^{2+} into their synaptic vesicles via a process involving the vesicular transporter ZnT-3 [50]. Although this point is still debated [51], many experimental data show that zinc is co-released during exocytosis of the neurotransmitter [52,53]. Its concentration in the synaptic cleft, not known with certainty, may reach up to 100 μM [54]. When present in the external medium, Zn^{2+} modulates the activity of various ion channels [55]. In the hippocampus, a brain structure particularly rich in Zn^{2+}, TRPC6 channels are present in post-synaptic densities of excitatory synapses [4]. Once released in the synaptic cleft, Zn^{2+} could enter post-synaptic hippocampal neurons via TRPC6 channels. It is important to mention that, in neural tissue, the extracellular concentration of Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]o$) is not constant but exhibits dynamic changes. For instance, a repetitive electrical activity, application of amino acids, or pathological insults like periods of anoxia or epileptic seizures reduce $[Ca^{2+}]o$ [56–59]. Any of these conditions could thus facilitate the entry of Zn^{2+} through activated TRPC6 channels.

Several members of the TRP super-family are able to transport Zn^{2+} like TRPA1 [60], TRPM3 [61], TRPM7 [62], TRPML1, TRPML2 [63] and TRPV6 [64]. Based on the data shown in the present report, TRPC6 appears as another TRP member participating in the transport of Zn^{2+}. By regulating the intracellular distribution and content of zinc, TRPC6 channels could alter the sensitivity of cells to oxidative insults and influence cell fate and survival.

Acknowledgments

The European Synchrotron radiation Facility is acknowledged for granting synchrotron radiation beamtime and we thank the ID22 beamlime staff for their assistance. We also wish to thank Dr W. Schwabe (Karlsruhe, Germany) for the kind gift of hyperforine and S. Bousquainaud for her help with the cell cultures. This study was supported by grants from l'Agence Nationale de la Recherche (06-SEST-038), the Centre National de la Recherche Scientifique

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article as: J. Gibon, et al., The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc, Biochim. Biophys. Acta (2011), doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.013

(programme Longévité Vieillissement), and Rhône-Alpes Region (Cluster 11).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.013.

References

[1] A. Dietrich, T. Gudermann, Trpc6, Handb. Exp. Pharmacol. (2007) 125–141.
[2] T. Hofmann, A.G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, G. Schultz, Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol, Nature 397 (1999) 259–263.
[3] G. Boulay, X. Zhu, M. Peyton, M. Jiang, R. Hurst, E. Stefani, L. Birnbaumer, Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein, J. Biol. Chem. 272 (1997) 29672–29680.
[4] J. Zhou, W. Du, K. Zhou, Y. Tai, H. Yao, Y. Jia, Y. Ding, Y. Wang, Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses, Nat. Neurosci. (2008). Q9
[5] O. Beskina, A. Miller, A. Mazzocco-Spezzia, M.V. Pulina, V.A. Golovina, Mechanisms of interleukin-1beta-induced Ca2+ signals in mouse cortical astrocytes: roles of store- and receptor-operated Ca2+ entry, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 293 (2007) C1103–C1111.
[6] S. Boisseau, C. Kunert-Keil, S. Lucke, A. Bouron, Heterogeneous distribution of TRPC proteins in the embryonic cortex, Histochem. Cell Biol. 131 (2009) 355–363.
[7] P. Tu, C. Kunert-Keil, S. Lucke, H. Brinkmeier, A. Bouron, Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons, J. Neurochem. 108 (2009) 126–138.
[8] J. Mwanjewe, A.K. Grover, Role of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) in non-transferrin-bound iron uptake in neuronal phenotype PC12 cells, Biochem. J. 378 (2004) 975–982.
[9] S.L. Sensi, P. Paoletti, A.I. Bush, I. Sekler, Zinc in the physiology and pathology of the CNS, Nat. Rev. Neurosci. 10 (2009) 780–791.
[10] R.A. Colvin, C.P. Fontaine, M. Laskowski, D. Thomas, Zn2+ transporters and Zn2+ homeostasis in neurons, Eur. J. Pharmacol. 479 (2003) 171–185.
[11] R.M. Dietz, J.H. Weiss, C.W. Shuttleworth, Zn2+ influx is critical for some forms of spreading depression in brain slices, J. Neurosci. 28 (2008) 8014–8024.
[12] X. Zhu, M. Jiang, L. Birnbaumer, Receptor-activated Ca2+ influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca2+ entry, J. Biol. Chem. 273 (1998) 133–142.
[13] A. Bouron, X. Altafaj, S. Boisseau, M. De Waard, A store-operated Ca2+ influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca2+ stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice, Brain Res. Dev. Brain Res. 159 (2005) 64–71.
[14] K.R. Gee, Z.L. Zhou, D. Ton-That, S.L. Sensi, J.H. Weiss, Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes, Cell Calcium 31 (2002) 245–251.
[15] O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F.J. Sigworth, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, Pflugers Arch. 391 (1981) 85–100.
[16] J. Gibon, P. Tu, A. Bouron, Store-depletion and hyperforin activate distinct types of Ca(2+)-conducting channels in cortical neurons, Cell Calcium 47 (2010) 538–543.
[17] E. Rousselet, P. Richaud, T. Douki, J.G. Chantegrel, A. Favier, A. Bouron, J.M. Moulis, A zinc-resistant human epithelial cell line is impaired in cadmium and manganese import, Toxicol. Appl. Pharmacol. 230 (2008) 312–319.
[18] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55–63.
[19] S. Bohic, A. Simionovici, A. Snigirev, R. Ortega, G. Deves, D. Heymann, C.G. Schroer, Synchrotron hard X-ray microprobe: fluorescence imaging of single cells, Appl. Phys. Lett. 78 (2001) 3544–3546.
[20] V.A. Sole, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter, J. Susini, A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra, Spectrochim. Acta, Part B 62 (2007) 63–68.
[21] J.A. Chandler, M.S. Morton, Determination of elemental area concentration in ultrathin specimens by X-ray microanalysis and atomic absorption spectrophotometry, Anal. Chem. 48 (1976) 1316–1318.
[22] E. Aizenman, A.K. Stout, K.A. Hartnett, K.E. Dineley, B. McLaughlin, I.J. Reynolds, Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release, J. Neurochem. 75 (2000) 1878–1888.
[23] W. Maret, Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals, Biometals 22 (2009) 149–157.
[24] V. Aires, A. Hichami, G. Boulay, N.A. Khan, Activation of TRPC6 calcium channels by diacylglycerol (DAG)-containing arachidonic acid: a comparative study with DAG-containing docosahexaenoic acid, Biochimie (2006). Q10
[25] K. Leuner, V. Kazanski, M. Muller, K. Essin, B. Henke, M. Gollasch, C. Harteneck, W.E. Muller, Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels, FASEB J. 21 (2007) 4101–4111.
[26] P. Paoletti, P. Ascher, J. Neyton, High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors, J. Neurosci. 17 (1997) 5711–5725.
[27] P. Tu, J. Gibon, A. Bouron, The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria, J. Neurochem. 112 (2010) 204–213.
[28] W. Kresse, I. Sekler, A. Hoffmann, O. Peters, C. Nolte, A. Moran, H. Kettenmann, Zinc ions are endogenous modulators of neurotransmitter-stimulated capacitative Ca2+ entry in both cultured and in situ mouse astrocytes, Eur. J. Neurosci. 21 (2005) 1626–1634.
[29] K.E. Dineley, M.J. Devinney II, J.A. Zeak, G.L. Rintoul, I.J. Reynolds, Glutamate mobilizes [Zn2+] through Ca2+-dependent reactive oxygen species accumulation, J. Neurochem. 106 (2008) 2184–2193.
[30] P.J. Dittmer, J.G. Miranda, J.A. Gorski, A.E. Palmer, Genetically encoded sensors to elucidate spatial distribution of cellular zinc, J. Biol. Chem. 284 (2009) 16289–16297.
[31] A.R. Kay, Detecting and minimizing zinc contamination in physiological solutions, BMC Physiol. 4 (2004) 4.
[32] S.L. Sensi, D. Ton-That, J.H. Weiss, Mitochondrial sequestration and Ca(2+)-dependent release of cytosolic Zn(2+) loads in cortical neurons, Neurobiol. Dis. 10 (2002) 100–108.
[33] L.M. Malaiyandi, O. Vergun, K.E. Dineley, I.J. Reynolds, Direct visualization of mitochondrial zinc accumulation reveals uniporter-dependent and -independent transport mechanisms, J. Neurochem. 93 (2005) 1242–1250.
[34] A. Takeda, Movement of zinc and its functional significance in the brain, Brain Res. Brain Res. Rev. 34 (2000) 137–148.
[35] R.A. Colvin, A.I. Bush, I. Volitakis, C.P. Fontaine, D. Thomas, K. Kikuchi, W.R. Holmes, Insights into Zn2+ homeostasis in neurons from experimental and modeling studies, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 294 (2008) C726–C742.
[36] F. Chimienti, E. Jourdan, A. Favier, M. Seve, Zinc resistance impairs sensitivity to oxidative stress in HeLa cells: protection through metallothioneins expression, Free Radic. Biol. Med. 31 (2001) 1179–1190.
[37] M.S. Willis, S.A. Monaghan, M.L. Miller, R.W. McKenna, W.D. Perkins, B.S. Levinson, V. Bhushan, S.H. Kroft, Zinc-induced copper deficiency: a report of three cases initially recognized on bone marrow examination, Am. J. Clin. Pathol. 123 (2005) 125–131.
[38] C.I. Prodan, N.R. Holland, P.J. Wisdom, S.A. Burstein, S.S. Bottomley, CNS demyelination associated with copper deficiency and hyperzincemia, Neurology 59 (2002) 1453–1456.
[39] B.C. Lee, S.E. Hong, H.H. Lim, H. Kim do, C.S. Park, Alteration of the transcriptional profile of human embryonic kidney cells by transient overexpression of mouse TRPM7 channels, Cell. Physiol. Biochem. 27 (2011) 313–326.
[40] L.M. Malaiyandi, K.E. Dineley, I.J. Reynolds, Divergent consequences arise from metallothionein overexpression in astrocytes: zinc buffering and oxidant-induced zinc release, Glia 45 (2004) 346–353.
[41] C. Lof, T. Blom, K. Tornquist, Overexpression of TRPC3 reduces the content of intracellular calcium stores in HEK-293 cells, J. Cell. Physiol. 216 (2008) 245–252.
[42] M.A. Aras, K.A. Hartnett, E. Aizenman, Assessment of cell viability in primary neuronal cultures, Curr. Protoc. Neurosci. (2008) 18 (Chapter 7, Unit 7).
[43] K.E. Dineley, L.L. Richards, T.V. Votyakova, I.J. Reynolds, Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria, Mitochondrion 5 (2005) 55–65.
[44] R. Inoue, T. Okada, H. Onoue, Y. Hara, S. Shimizu, S. Naitoh, Y. Ito, Y. Mori, The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular {{alpha}}1-adrenoceptor-activated Ca2+-permeable cation channel, Circ. Res. 88 (2001) 325–332.
[45] S. Jung, R. Strotmann, G. Schultz, T.D. Plant, TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 282 (2002) C347–C359.
[46] K. Leuner, J.H. Heiser, S. Derksen, M.I. Mladenov, C.J. Fehske, R. Schubert, M. Gollasch, G. Schneider, C. Harteneck, S.S. Chatterjee, W.E. Muller, Simple 2,4-diacylphloroglucinols as classic transient receptor potential-6 activators—identification of a novel pharmacophore, Mol. Pharmacol. 77 (2010) 368–377.
[47] V. Kumar, A. Mdzinarishvili, C. Kiewert, T. Abbruscato, U. Bickel, C.J. van der Schyf, J. Klein, NMDA receptor-antagonistic properties of hyperforin, a constituent of St. John's Wort, J. Pharmacol. Sci. 102 (2006) 47–54.
[48] M.A. Aras, H. Hara, K.A. Hartnett, K. Kandler, E. Aizenman, Protein kinase C regulation of neuronal zinc signaling mediates survival during preconditioning, J. Neurochem. 110 (2009) 106–117.
[49] S.M. Bousquet, M. Monet, G. Boulay, Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition, J. Biol. Chem. (2010). Q11
[50] R.D. Palmiter, T.B. Cole, C.J. Quaife, S.D. Findley, ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (1996) 14934–14939.
[51] A.R. Kay, K. Toth, Is zinc a neuromodulator? Sci. Signal. 1 (2008) re3.
[52] K. Vogt, J. Mellor, G. Tong, R. Nicoll, The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses, Neuron 26 (2000) 187–196.
[53] J. Qian, J.L. Noebels, Visualization of transmitter release with zinc fluorescence detection at the mouse hippocampal mossy fibre synapse, J. Physiol. 566 (2005) 747–758.
[54] P. Paoletti, A.M. Vergnano, B. Barbour, M. Casado, Zinc at glutamatergic synapses, Neuroscience 158 (2009) 126–136.
[55] A. Mathie, G.L. Sutton, C.E. Clarke, E.L. Veale, Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability, Pharmacol. Ther. 111 (2006) 567–583.
[56] C. Nicholson, Modulation of extracellular calcium and its functional implications, Fed. Proc. 39 (1980) 1519–1523.
[57] I.A. Silver, M. Erecinska, Intracellular and extracellular changes of [Ca2+] in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo, J. Gen. Physiol. 95 (1990) 837–866.
[58] D.A. Rusakov, A. Fine, Extracellular Ca2+ depletion contributes to fast activity-dependent modulation of synaptic transmission in the brain, Neuron 37 (2003) 287–297.

UNCORRECTED PROOF

ARTICLE IN PRESS

[59] U. Heinemann, R. Pumain, Extracellular calcium activity changes in cat sensorimotor cortex induced by iontophoretic application of aminoacids, Exp. Brain Res. 40 (1980) 247–250.
[60] H. Hu, M. Bandell, M.J. Petrus, M.X. Zhu, A. Patapoutian, Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels, Nat. Chem. Biol. 5 (2009) 183–190.
[61] T.F. Wagner, A. Drews, S. Loch, F. Mohr, S.E. Philipp, S. Lambert, J. Oberwinkler, TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells, Pflugers Arch. (2010). Q12
[62] M.K. Monteilh-Zoller, M.C. Hermosura, M.J. Nadler, A.M. Scharenberg, R. Penner, A. Fleig, TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions, J. Gen. Physiol. 121 (2003) 49–60.
[63] X.P. Dong, X. Cheng, E. Mills, M. Delling, F. Wang, T. Kurz, H. Xu, The type IV mucolipidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel, Nature 455 (2008) 992–996.
[64] G. Kovacs, T. Danko, M.J. Bergeron, B. Balazs, Y. Suzuki, A. Zsembery, M.A. Hediger, Heavy metal cations permeate the TRPV6 epithelial cation channel, Cell Calcium (2011). Q13

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article as: J. Gibon, et al., The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc, Biochim. Biophys. Acta (2011), doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.013

Supplementary Table 1

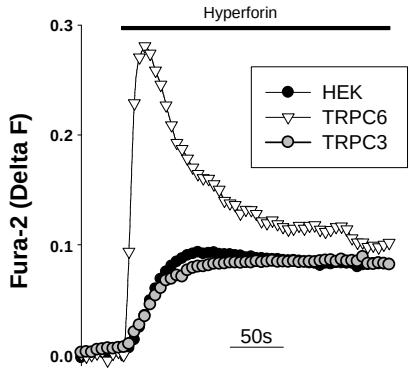
	HEK-293 cells	HEK-TRPC6 cells	HEK-TRPC3 cells
Fe	127 +/- 5	101 +/- 15	96.6 – 106.6
Na	2,860,373 +/- 377,735	2,533,162 +/- 116,020	2,121,073 +/- 246,808
K	390,316 +/- 74,181	329,236 +/- 31,841	289,920 +/- 47,612
Mg	3,003 +/- 298	2,856 +/- 310	2,056 +/- 30
P	442,645 +/- 76,518	397,600 +/- 39,885	346,906 +/- 60,587

The results are expressed as µg of metal/g of proteins. Means ±- sem are given for n= 5 to 14 independent measures, except for the determination of the iron content of HEK-TRPC3 cells where n=2.

.

Supplementary data

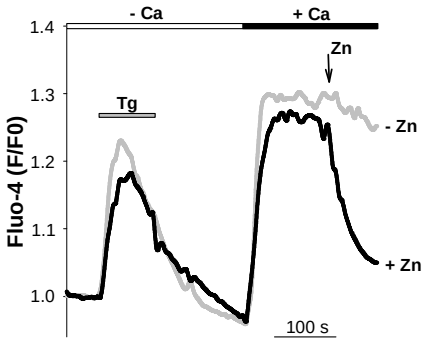
Figure 1



Supplementary Figure 1: Hyperforin promotes the entry of Ca^{2+} in HEK-TRPC6 cells but not in HEK cells and HEK-TRPC3 cells.

Cells were loaded with Fura-2 and 10 µM hyperforin was added when indicated (black bar). The graph shows the changes (ΔF) of the ratio (F340/F380 nm) of the Fura-2 fluorescence as a function of time. Hyperforin elicited a transient Ca^{2+} response in HEK-TRPC6 cells as already illustrated (Tu et al. 2009). However, in HEK cells and HEK-TRPC3 cells, the application of hyperforin gives rise to a weaker and sustained signal. This latter type of response reflects the hyperforin-dependent release of Ca^{2+} and Zn^{2+} from mitochondria (Tu et al. 2010). In any case HEK cells and HEK-TRPC3 cells exhibited the same phenotype as HEK-TRPC6 cells, an observation which is perfectly in agreement with a previous report demonstrating that hyperforin activates TRPC6 channels without activating the other TRPC isoforms (Leuner et al. 2007).

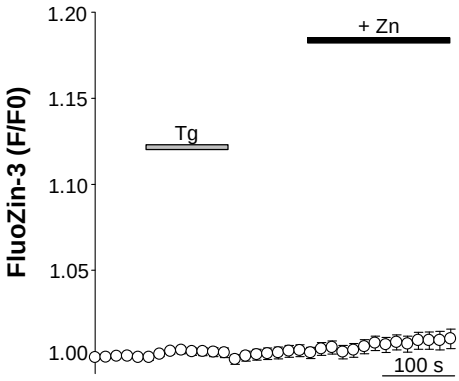
Figure 2



Supplementary Figure 2: The depletion of the stores stimulates the uptake of Ca^{2+}.

A: Cortical neurons were loaded with 1.25 µM of the fluorescent Ca^{2+} probe Fluo-4 to monitor cytosolic Ca^{2+} changes (Tu et al. 2010). Cells were bathed in a nominally Ca^{2+}-free medium and the Ca^{2+} pools of the endoplasmic reticulum were then depleted with thapsigargin (Tg, 1 µM, grey bar). This caused a transient Fluo-4 signal reflecting the release Ca^{2+} out of these stores and their extrusion. Tg was washed away before perfusing cells with a Ca^{2+} (2 mM)-containing recording medium (black bar). This manoeuvre permits the entry of Ca through the store deletion-activated channels. The figure shows two representative recordings from 2 different cortical neurons. In one case (arrow), 50 µM Zn^{2+} (Zn acetate) was added. It caused a potent inhibition of the Tg-dependent Ca^{2+} entry (black line). Similar data were obtained with: Tg alone, n=31 cells ; Tg + Zn acetate, n= 30 cells.

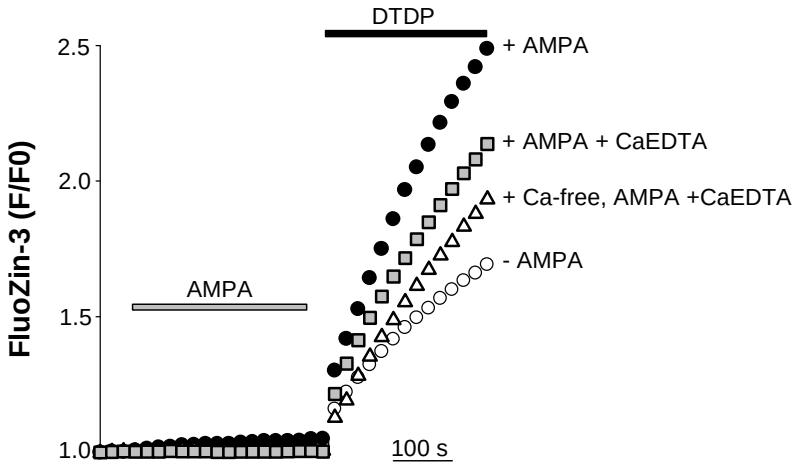
Figure 3



Supplementary Figure 3: The depletion of the stores does not stimulate the uptake of Zn^{2+}.

B: Cortical neurons were loaded with the fluorescent Zn^{2+} probe FluoZin-3 (see Methods section). The graph shows FluoZin-3 signals (F/F0) as a function of time. Cells were maintained in a nominally Ca^{2+}-free solution. When indicated by the horizontal grey bar thapsigargin (Tg, 1 µM) was added to empty the Ca^{2+} pools of the endoplasmic reticulum (ER). This procedure did not elevate the FluoZin-3 fluorescence (Tu et al. 2010). Tg was washed away and the cells were superfused with the Ca^{2+}-free medium supplemented with 50 µM Zn^{2+} (Zn acetate) (horizontal black bar). Depleting the Ca^{2+} pools of the ER activates store-operated Ca^{2+} channels. The entry of Zn^{2+} through these channels should be accompanied by an elevation of the FluoZin-3 fluorescence. Mean +/- sem, n= 66 cells. This experiment was repeated two other times on two different cultured cells (total number of cells tested, n=109). In each instance, the Tg-dependent depletion of the stores failed to activate a FluoZin-3 response. When not visible, error bars are smaller than the symbols. For the sake of clarity only one point out of two is shown.

Figure 4



Supplementary Figure 4: The entry of cations through AMPA receptors modulates the size of the DTDP-sensitive mobilizable pool of Zn^{2+}

In this set of experiments cortical neurons were loaded with FluoZin-3. DTDP (100 µM) was added when indicated by the horizontal black bar. This produced a time-dependent elevation of the FluoZin-3 fluorescence (F/F0) (open circles, n=451 cells from 16 dishes). In some experiments, AMPA (100 µM, horizontal grey bar) was added (and washed away) prior to the DTDP challenge (filled circles, 283 cells from 10 dishes). This latter protocol was repeated but with a recording medium (2 mM Ca^{2+}) supplemented with 1 mM CaEDTA (grey squares, n=116 from 4 dishes), or with a nominally Ca^{2+}-free medium containing 1 mM CaEDTA (open triangles, n=111 cells from 4 dishes). Mean +/- sem. The error bars are smaller than the symbols. One point out of 4 is shown.

Reference cited:

Leuner K., Kazanski V., Muller M., Essin K., Henke B., Gollasch M., Harteneck C. and Muller W. E. (2007) Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *Faseb J* **21,** 4101-4111.

Tu P., Gibon J. and Bouron A. (2010) The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria. *J Neurochem* **112,** 204-213.

Tu P., Kunert-Keil C., Lucke S., Brinkmeier H. and Bouron A. (2009) Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. *J. Neurochem* **108,** 126-138.

Conclusion et perspectives

Les analyses en ICP-OES et les expériences d'imagerie synchrotron mettent en évidence que les cellules HEK sur-exprimant les canaux TRPC6 (HEK-TRPC6) sont enrichies en zinc et en soufre tandis que leur contenu en cuivre est diminué. Les cellules HEK-TRPC3 ne présentant pas ce phénotype, cela suggère que la méthode de transfection stable n'est probablement pas à l'origine des résultats obtenus. Le zinc et le cuivre sont après le fer, respectivement, les deuxième et troisième plus abondants métaux traces de l'organisme. Comme le zinc, le cuivre est impliqué dans la structure et les propriétés catalytiques de plusieurs enzymes dont la superoxyde dismutase cuivre/zinc (SOD1)[335]. Les causes possibles d'un appauvrissement en cuivre de l'organisme sont diverses mais l'ingestion d'une quantité élevée de zinc ou des traitements médicaux basés sur une supplémentation en zinc peuvent conduire à des carences en cuivre et à des cas d'anémies et de neutropénies[398]. La diminution de la concentration en cuivre dans les cellules HEK-TRPC6 peut traduire une augmentation de l'efflux ou une diminution de l'influx de ce métal. Il serait donc intéressant de mesurer l'expression des protéines impliquées dans l'import et l'export du cuivre dans les HEK et HEK-TRPC6, nous pensons notamment aux protéines ATP7A, ATP7B ou encore CTR1[399]. La compréhension des processus conduisant à un appauvrissement en cuivre des HEK-TRPC6 n'a pas été abordée et demeure à préciser.

Les expériences d'imagerie de fluorescence FluoZin-3 montrent que le pool de zinc sensible au 2-2'dithiodipyridine (DTDP) est de taille plus grande dans les HEK-TRPC6 que dans les HEK ou HEK-TRPC3. Les métallothionéines (MTs) permettent de tamponner le zinc cellulaire mais fixent aussi le cuivre. Elles possèdent de nombreux groupement thiols et sont donc des cibles potentielles d'agents tels que le DTDP. La régulation de la taille du pool sensible au DTDP (observé en imagerie du FluoZin-3) peut donc s'expliquer soit par à une augmentation du nombre de protéines possédant des acides aminés soufrés (dont MTs) soit par un déplacement du cuivre (qui est aussi fixé au MTs) par le zinc[188]. Compte tenu des résultats sur la teneur en soufre des cellules HEK-TRPC6 (augmentée de plus de 40 %), nous postulons que le pool de métallothionéines dans les HEK-TRPC6 est augmenté mais ceci devra être vérifié en mesurant leur expression par qRT-PCR ou par Western Blot.

Nous avons donc démontré par trois méthodes différentes que les cellules HEK-TRPC6 sont enrichies en zinc (ICP-OES, imagerie synchrotron et imagerie FluoZin-3) et notamment au niveau du noyau (imagerie synchrotron).

Le zinc étant un second messager pouvant conduire à l'apoptose ou à la nécrose (Chapitre *4.1*), une augmentation de sa concentration cellulaire pourrait donc augmenter la

sensibilité des cellules à un stress oxydant. Le DTDP est un agent oxydant qui libère du zinc à partir de groupements thiols. Les cellules HEK-TRPC6 sont plus sensibles à cet agent oxydant que les cellules HEK ou HEK-TRPC3. Toutefois, l'ajout d'un chélateur spécifique de zinc ne protège pas les HEK-TRPC6 contrairement à l'ajout de GSH. Le fait que le TPEN ne protège pas les cellules suggère que la libération du zinc induite par le DTDP n'est pas impliquée dans l'augmentation de la sensibilité des cellules au stress oxydant. L'utilisation d'un stress au péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) permet d'observer que les cellules HEK-TRPC6 produisent plus d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) que les HEK face à ce stress. Une augmentation de la production de ROS peut expliquer la plus forte sensibilité des cellules au stress oxydant. De la même manière, le TPEN n'influe pas sur la production de ROS lors du stress de ces cellules, il semble donc que nous soyons face à un mécanisme indépendant du zinc intracellulaire. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'accroissement de la sensibilité des HEK-TRPC6 au stress oxydant reste à élucider. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées dont une diminution de l'activité des enzymes protégeant la cellule comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase ou encore la glutathion peroxydase. Des mesures d'expressions (ARNm ou Western Blot) ainsi que des mesures d'activité de ces enzymes permettraient de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu dans le phénotype des HEK-TRPC6 face au stress oxydant.

Nous proposons que les canaux TRPC6 surexprimés de façon stable dans les HEK favorisent l'entrée de zinc. Nous avons vérifié cette hypothèse par deux techniques : l'imagerie de fluorescence et l'électrophysiologie. En imagerie de fluorescence (sonde FluoZin-3), l'entrée de zinc dans les cellules HEK-TRPC6, en présence d'activateur des canaux, est plus importante que dans les HEK et HEK-TRPC3. En électrophysiologie, activer les canaux TRPC6 par l'hyperforine en présence de zinc induit un courant entrant sensible à la tricine (chélateur extracellulaire de zinc). Le fait de ne pas totalement abolir le courant induit par l'hyperforine en présence de 1 µM Zn et 10 mM tricine peut s'expliquer par la présence de NMDG dans les solutions. Le NMDG est utilisé pour remplacer le NaCl car il est imperméant. Il a cependant été montré que l'hyperforine affecte la fluidité membranaire[372]. Le NMDG peut passer à travers certains canaux[400] dont TRPV1 et TRPA1[401]. Toutefois, nos résultats expérimentaux montrent une diminution conséquente du courant mesuré en présence de tricine dans le milieu extracellulaire, cela indique donc qu'une grande partie du courant mesuré provient de l'entrée de zinc dans les cellules

L'activation des canaux TRPC6 endogènes par le SAG ou l'hyperforine dans les neurones corticaux embryonnaires provoque une entrée de zinc qui dépend de la

concentration extracellulaire en zinc. Cette entrée, sensible au gadolinium, se fait en compétition avec l'entrée de calcium. Dans les neurones, la substitution équimolaire du calcium par le zinc n'influence pas l'amplitude des courants mesurés. En revanche dans les HEK-TRPC6, le courant calcique est plus grand que le courant zinc. Ceci suggère que les canaux natifs et surexprimés ont des propriétés différentes qui peuvent traduire des compositions tétramériques distinctes. Dans les HEK-TRPC6, la présence d'homotétramères de TRPC6 est certainement majoritaire. Dans les neurones corticaux embryonnaires, les canaux TRPC1 et TRPC5 sont les plus exprimés (au niveau ARN). La composition tétramériques des canaux TRPC6 dans ces cellules est probablement à l'origine des différences observées entre ces deux types cellulaires. La caractérisation moléculaire des canaux TRPC6 dans les neurones corticaux embryonnaires à E13 reste à déterminer. L'expression des TRPC6 dans ces cellules étant faible, la caractérisation des interactions par immunoprécipitation semble promise à des difficultés importantes et notamment en matière de quantité de matériel biologique. Des études de co-localisation par imagerie confocale pourraient apporter des éléments de réponse. L'utilisation de siRNA dirigé contre les différents TRPC aiderait à mieux appréhender leur composition. L'effet bloquant d'anticorps dirigés contre des TRPC spécifiques pourrait être vérifié en électrophysiologie et aider à déterminer la composition moléculaire des canaux natifs. L'emploi de souris KO pour différents TRPC pourrait être intéressant. Cependant les souris KO pour TRPC6 ne présentent pas de dysfonctionnements majeurs (hormis une augmentation du tonus vasculaire[402]) ce qui suppose une compensation de l'action de TRPC6 par d'autres canaux et probablement des canaux TRPC3 et TRPC7 qui sont surexprimés dans les souris KO pour TRPC6[402].

Au niveau neuronal, l'entrée de zinc en réponse à l'activation des canaux TRPC6 augmente la taille du pool de zinc sensible au DTDP sans modifier la taille du pool de zinc mitochondrial (sensible au FCCP). Ces pools de zinc ont été identifiés par des techniques d'imagerie de fluorescence avec du FluoZin-3[123] et du RhodZin3[403]. Par ces expériences, nous montrons que le zinc est rapidement pris en charge par la cellule et que différentes voies d'entrée de ce métal sont déjà présentes dès les premiers stades de la neurogenèse corticale chez la souris. En effet, les canaux calciques sensibles au voltage, les récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA, les canaux SOC et TRPC6 coexistent à E13.

A la lumière des résultats obtenus, il serait très intéressant d'aborder les liens entre canaux TRPC6 et le zinc au niveau des cellules rénales affectées de FSGS (chapitre *2.5.6*). En effet dans ces cellules, les mutations sur le gène de TRPC6 provoquent un « gain de fonction » des canaux TRPC6 et augmentent l'entrée calcique. Ceci est perçu par la cellule

comme un signal pro-apoptotique. Il est possible qu'une augmentation de l'entrée de zinc dans ces cellules soit aussi à l'origine d'un signal de mort cellulaire programmée au niveau rénal.

Au niveau cérébral, les canaux TRPC6 sont exprimés dans les neurones post-synaptiques hippocampiques. Lors de la neurotransmission synaptique, des vésicules glutamatargiques libèrent une quantité importante de zinc dans la fente synaptique[279]. Les canaux TRPC6 pourraient former une voie d'entrée de ce zinc dans les neurones post-synaptiques.

Les études *in vitro* réalisées à ce jour montrent que les canaux TRPC6 sont des canaux cationiques non sélectifs perméables à de nombreux cations, dont le Ca, Na, Mn, Ba, Fer et le Zn. D'autres TRP sont aussi perméables à des métaux traces et à des métaux toxiques tels que le zinc, le nickel, le cobalt, le cadmium, le manganèse ou le fer. Ces TRP se situent soit au niveau de compartiments intracellulaires soit au niveau de la membrane plasmique.

Canaux dans les compartiments intracellulaires

Les seuls canaux de la famille des TRP connus pour être impliqués dans l'homéostasie des métaux au niveau intracellulaire sont les canaux TRPML1 et TRPML2[404]. Ils sont exprimés de façon ubiquitaire hormis dans le colon et dans le thymus. TRPML1 est une glycoprotéine de la membrane des lysosomes et des endosomes. Il est impliqué dans la biogénèse des lysosomes et dans les trafics membranaires lors de l'endocytose[405]. Des expériences d'électrophysiologie et des mesures d'entrée de fer marqué ($^{55}Fe^{2+}$) ont montré le rôle de TRPML1 et TRPML2 dans l'export du fer depuis les endosomes et les lysosomes. Ces canaux sont aussi perméables au zinc, au manganèse, au calcium, au magnésium, au cobalt, au cadmium et au baryum mais imperméables au fer^{3+} et au cuivre. Les patients atteints de mucolipidose de type IV (MLIV), une maladie autosomale récessive causée par une mutation génétique de TRPML1[406,407], ont des complications au niveau visuel, moteur et cognitif. Les fibroblastes de ces patients possèdent plus de fer lysosomal que des patients sains. Les modifications dans la perméabilité de TRPML1 au fer chez les patients atteints de MLIV est peut-être à l'origine des complications associées à cette maladie[404].

Canaux de la membrane plasmique, la famille s'agrandit…

Ces dernières années, un nombre sans cesse croissant de travaux a révélé l'implication de certains TRP dans le transport d'éléments traces à travers la membrane plasmique, parmi

ceux-ci TRPM7[408], TRPM6[409], TRPM3[410], TRPV6[411], TRPA1[22] et les canaux TRPC6[176]. Leur implication est décrite ci-dessous:

TRPM7

Les canaux TRPM7 sont exprimés dans presque tous les tissus ou types cellulaires. Des expériences d'électrophysiologie sur des cellules HEK transfectées avec les canaux TRPM7 de souris ont démontré la perméabilité de ces canaux à différents métaux. La séquence de perméabilité aux cations est la suivante : $Zn^{2+} = Ni^{2+} >> Ba^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} > Mn^{2+} > Sr^{2+} > Cd^{2+} > Ca^{2+}$ [408]. L'activation des canaux TRPM7 est sous contrôle du Mg^{2+} et de l'ATP, et ils s'activent en absence de calcium et de magnésium dans le milieu externe. Cependant la perméation de ces canaux par le zinc, le cobalt, le nickel se produit aussi en présence de calcium et de magnésium. TRPM7 semble donc être une voie d'entrée non-négligeable des ions divalents dans les cellules. Ces canaux ne sont perméables ni au gadolinium ni au lanthane[408]. Des expériences d'imagerie de fluorescence sur des cultures primaires de neurones corticaux ont confirmé l'implication des TRPM7 dans le transport du zinc. L'ajout de zinc dans un milieu ne contenant pas de Ca^{2+} et de Mg^{2+} (donc favorable à l'activation des TRPM7) provoque une neurotoxicité plus importante qu'en présence de Ca^{2+} et de Mg^{2+}. L'activation des canaux TRPM7 provoque une accumulation intracellulaire de zinc qui est supprimée après utilisation de sh-RNA dirigés contre TRPM7[412]. Par des techniques de siRNA et des mesures d'incorporation de Cd[109] il a été démontré l'implication des canaux TRPM7 dans l'entrée de cadmium dans une lignée cellulaire d'ostéoblastes (MC3T3-E1). Le Ca^{2+} et le Mg^{2+} inhibent cette entrée de cadmium et donc empêchent l'accumulation de ce métal toxique[413].

TRPM6

Les canaux TRPM6, exprimés au niveau de la membrane apicale des cellules de l'épithélium du tubule rénal et du petit intestin, interviennent dans le processus d'absorption du magnésium[414]. Des expériences d'électrophysiologie ont permis de déterminer la perméabilité de ces canaux à différents cations dans des cellules HEK293 sur-exprimant soit TRPM6, soit TRPM6 et TRPM7. La séquence des courant mesurés pour l'entrée de cation via TRPM6 est la suivante : Zn> Ba > Mn > Ca > Mg> Sr > Cd > Ni. La sur-expression des TRPM6 + TRPM7 modifie légèrement la taille des courants observés avec la séquence suivante : Zn > Mg > Ba > Ca > Sr > Cd > Ni[409].

TRPM3

Les canaux TRPM3 sont exprimés dans les cellules β du pancréas. Ces cellules ont besoin de zinc pour permettre la séquestration de l'insuline dans les granules d'exocytose[415]. Ces canaux participent à l'entrée du zinc dans ces cellules par un mécanisme indépendant des canaux calciques dépendants du voltage. Ils sont aussi perméables au nickel, au baryum, au magnésium et au manganèse. La conductivité des canaux semble être différente de celle des TRPM7 ou TRPM6 avec comme séquence : $Ca^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+} > Ni^{2+}$ [410].

TRPV6

Les canaux TRPV6 sont retrouvés dans les épithéliums impliqués dans l'absorption et la sécrétion. Ils sont notamment fortement exprimés dans le placenta, le duodénum, le jejunum, le colon, le pancréas, les glandes salivaires, les glandes mammaires ou encore la prostate. Les canaux TRPV6 forment la voie principale de transport du calcium vers le fœtus au niveau placentaire et une voie d'absorption majeure du calcium dans l'intestin[416]. Des expériences d'imagerie de fluorescence avec la sonde Fura2 et la sonde Newport Green DCF sur des cellules HEK293 exprimant hTRPV6 ont permis de mettre en évidence leur perméabilité au zinc, au cadmium, au strontium, au manganèse, au cobalt mais aussi au gadolinium et au lanthane. Ces résultats d'imagerie sont complétés par des expériences d'électrophysiologie qui démontrent la perméabilité des canaux TRPV6 au zinc, au cadmium mais pas au cobalt. Un phénomène identique est observé dans les cellules MCF-7 de cancer du sein qui expriment les TRPV6 de façon endogène[411].

TRPA1

Les canaux TRPA1, uniques représentants des canaux TRPA, sont exprimés dans les neurones nociceptifs[417]. L'activation constitutive des canaux TRPA1 permet une entrée de zinc qui semble pouvoir se fixer sur les parties N-ter et C-ter de TRPA1, régulant ainsi la sensibilité et l'activation de ces canaux[22,418]. Ce processus a lieu pour des concentrations intracellulaires en zinc comprises entre 1 nM et 1 µM[22]. Le cadmium est capable de mimer les effets du zinc sur les canaux TRPA1. L'injection de zinc à des souris génère des réponses nociceptives via un mécanisme dépendant de TRPA1, faisant de ces canaux un probable senseur du zinc[419].

Les canaux TRPC6 s'ajoutent donc à cette famille de TRP impliqués dans l'homéostasie des métaux au niveau cellulaire. Les rôles précis de l'entrée de ces métaux (Fe et Zn) via les canaux TRPC6 sur les fonctions cellulaires restent cependant à déterminer.

Des résultats précédents ont montré la présence de canaux SOC et de canaux sensibles à l'hyperforine/DAG dans les neurones corticaux à E13. Ces canaux SOC sont inhibés par le zinc extracellulaire (figure additionnelle 2 de l'article 1) alors que les canaux TRPC6 sont perméables à ce métal. De ce fait, il semblerait que ces deux voies d'entrée calciques soient distinctes. Dans le chapitre suivant, nous déterminerons si la vidange des stocks calciques internes et l'hyperforine activent des voies calciques distinctes ou identiques. Dans ce dernier cas, cela supposerait que les canaux pourraient s'ouvrir via diverses modalités d'activation comme dans les plaquettes où TRPC6 participe à l'entrée de calcium en réponse à la vidange des stocks calciques et en réponse au DAG[111].

Article 2 : Canaux TRPC6 et canaux capacitifs

Introduction

Il existe différents modes d'activation des canaux TRPC6 selon le type cellulaire. Dans les plaquettes, les canaux TRPC6 s'activent en réponse au DAG et en réponse à la déplétion des stocks internes de calcium[112]. Dans les hépatomes, la sur-expression des canaux TRPC6 augmente l'entrée calcique par la voie SOC[108]. Dans les cellules COS, l'expression de TRPC6 ne modifie pas l'entrée calcique stimulée par la déplétion des stocks internes[69]. Dans les cellules de muscles lisses A7r5, l'inhibition des canaux TRPC6 endogènes par siRNA ne modifie ni la réponse calcique en réponse à l'OAG ni la réponse SOC des cellules[140].

Dans ce 2ème volet de la thèse, nous utiliserons différentes propriétés pharmacologiques connues des canaux TRPC6 et des canaux SOC afin de déterminer si ces deux voies d'entrée du calcium sont distinctes ou non dans les neurones corticaux embryonnaires de souris.

Nous tenterons de les discriminer l'une de l'autre par l'imagerie de fluorescence. Plusieurs questions seront abordées dont la localisation membranaire, la régulation par les tyrosines kinases, l'effet d'inhibiteurs et d'activateurs de certains TRPC et la régulation par les immunophilines.

Store-depletion and hyperforin activate distinct types of Ca^{2+}-conducting channels in cortical neurons

Cell Calcium 47 (2010) 538–543

Contents lists available at ScienceDirect

Cell Calcium

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceca

Store-depletion and hyperforin activate distinct types of Ca^{2+}-conducting channels in cortical neurons

Julien Gibon[a,b,c], Peng Tu[a,b,c,1], Alexandre Bouron[a,b,c,*]

[a] UMR CNRS 5249, Grenoble, France
[b] CEA, DSV, IRTSV, Grenoble, France
[c] Université Joseph Fourier, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 March 2010
Received in revised form 4 May 2010
Accepted 6 May 2010
Available online 2 June 2010

Keywords:
Mice
Brain
Cortex
Neurons
Calcium channels
Calcium stores
TRPC
Hyperforin
TRPC3
TRPC6

ABSTRACT

Cortical neurons embryos (E13) from murine brain have a wide diversity of plasma membrane Ca^{2+}-conducting channels. For instance, they express several types of transient receptor potential channels of C-type (TRPC) and hyperforin, a potent TRPC6-channel activator, controls the activity of TRPC6-like channels. In addition, E13 cortical neurons possess plasma membrane channels activated in response to the depletion of internal Ca^{2+} pools. Since some TRPC channels seem to be involved in the activity of store-depletion-activated channels, we investigated whether hyperforin and the depletion of the Ca^{2+} stores control similar or distinct Ca^{2+} routes. Calcium imaging experiments performed with the fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-4 showed that the TRPC3 channel blocker Pyr3 potently inhibits with an IC_{50} of 0.5 μM the entry of Ca^{2+} triggered in response to the thapsigargin-dependent depletion of the Ca^{2+} stores. On the other hand, Pyr3 does not block the hyperforin-sensitive Ca^{2+} entry. In contrast to the hyperforin responses, the Ca^{2+} entry through the store-depletion-activated channels is down-regulated by the competitive tyrosine kinase inhibitors genistein and PP2. In addition, the immunosuppressant FK506, known to modulate several classes of Ca^{2+}-conducting channels, strongly attenuates the entry of Ca^{2+} through the store-depletion-activated channels, leaving the hyperforin-sensitive responses unaffected. Hence, the Zn^{2+} chelator TPEN markedly attenuated the hyperforin-sensitive responses without modifying the thapsigargin-dependent Ca^{2+} signals. Pyr3-insensitive channels are key components of the hyperforin-sensitive channels, whereas the thapsigargin-dependent depletion of the Ca^{2+} stores of the endoplasmic reticulum activates Pyr3-sensitive channels. Altogether, these data support the notion that hyperforin and the depletion of the Ca^{2+} pools control distinct plasma membrane Ca^{2+}-conducting channels. This report further illustrates that, at the beginning of the corticogenesis, immature cortical neurons express diverse functional Ca^{2+} channels.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the cortex of mouse embryo, the first post-mitotic neurons appear at E11–12 [1]. Even at this embryonic age, cortical neurons of the immature cortex possess a large repertoire of Ca^{2+}-conducting channels. For instance, E13 cortical cells express intracellular channels: IP3-sensitive receptors (IP3R) (IP3R1–IP3R3) and ryanodine-sensitive receptors (RyR) (RyR1–RyR3), with IP3R1 and RyR2 being the predominant proteins [2]. Hence, several types of plasma membrane Ca^{2+}-conducting channels are present in E13 cortical cells, like voltage-gated Ca^{2+} channels [3], NMDA receptors [4], and Ca^{2+}-conducting channels activated in response to the depletion of internal Ca^{2+} stores [5]. In addition, E13 cortical neurons have several types of TRPC channels [6] and possess functional diacylglycerol-sensitive channels that can be recruited by hyperforin [7], a plant extract known to activate TRPC6 channels without activating TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC5 channels [8].

Store-depletion-activated channels (also called store-operated channels, SOC) form a class of voltage-independent Ca^{2+} channels. They open in response to the emptying of the endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} pools [9]. The molecular characterisation of the SOC has long been awaited but recent data revealed that Orai and Stim are two key molecular players involved in SOC activity [10,11]. However, the role of C-class transient receptor potential (TRPC) cations channels in this Ca^{2+} signalling is still discussed [12–14]. Indeed, some experimental data support the notion that TRPC channels, at least some of them, could participate in SOC activity.

* Corresponding author at: Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS 5249, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.
Tel.: +33 4 38 78 44 23; fax: +33 4 38 78 54 87.
E-mail address: alexandre.bouron@cea.fr (A. Bouron).
[1] Present address: Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, CNRS UMR8197, Paris, France.

0143-4160/$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ceca.2010.05.003

In the present report, the properties of the hyperforin-sensitive and the store-depletion-activated channels of cortical neurons were compared. The data gained provide new insights into these Ca^{2+}-conducting channels present in the immature cortex at the beginning of the neurogenesis. This study highlights the large repertoire of families of Ca^{2+}-conducting channels even at early stages of the corticogenesis.

2. Materials and methods

2.1. Primary cell cultures

Cultures of cortical neurons were prepared according to [5]. The procedures used were approved by the Ethical Committee of Rhône-Alpes Region and by the Ethical Committee of Grenoble (ComEth) (France). Briefly, embryos (E13) from C57BL6/J mice (vaginal plug was designated E0) were sacrificed and the brains were kept in an ice-cold Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free Hank's solution supplemented with 33 mM glucose, 4.2 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 1% penicillin/streptomycin. The isolated cortices were triturated by means of repetitive aspirations though a sterile and fire-polished Pasteur pipette. Four to five E13 mice (e.g. 8–10 cortices) were used for each culture. The cell suspension was then filtered through a 70 μm cell strainer (BD Falcon). Sterile glass cover-slips (Ø 16 mm, Marienfield, Germany) were coated with poly-L-ornithine (2 h at 37 °C) and washed twice with sterile water before plating the cells. Cells grown in a Neurobasal medium containing 2% B27, 1% penicillin/streptomycin and 500 μM glutamine.

2.2. Calcium imaging experiments with Fluo-4

The experiments were carried out according to experimental procedures described previously [7]. In these experiments, the baseline Fluo-4 fluorescence was recorded for ≥1 min and averaged (F0). The results are expressed as F/F0 as a function of time, with F being the Fluo-4 fluorescence. Data are presented as mean ± S.E.M., with *n* being the number of cell bodies analyzed. Recordings were made at room temperature 1–3 days after the plating of the cells. At that time, ≥75% of them displayed a depletion-activated Ca^{2+} entry [5]. Certain variability in the size of the thapsigargin-dependent Fluo-4 signals was observed from one batch of cultured cells to the other. Each treatment was compared to its proper control (non treated cells from the same batch of cells). In every case, and unless otherwise indicated, conditions to be tested were repeated on at least three batches of cultured cells.

2.3. Materials

Genistein, FK-506, calyculin A, methyl-β-cyclodextrin, and cholesterol were from Sigma–Aldrich (France). Fluo-4/AM was purchased from Molecular Probes (Invitrogen, France). The Neurobasal medium, B27, glutamine were from (Invitrogren, France). 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2) was from Calbiochem (Merck Chemicals, France). The ethyl-1-(4-(2,3,3-trichloroacrylamide)phenyl)-5-(trif luoromethyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (Pyr3) was kindly provided by Dr. Y. Mori (Kyoto University, Japan). Hyperforin, prepared as a mixture of hyperforin with its homologue adhyperforin (ratio 8:2), was prepared as a sodium salt. It was a kind gift from Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. (Karlsruhe, Germany). The hyperforin-dependent Fluo-4 responses reported in the present report were smaller than previously found [7]. Since the hyperforin extract is not pure, this may explain the variability between our two reports (present one and [7]) carried with two different batches of hyperforin.

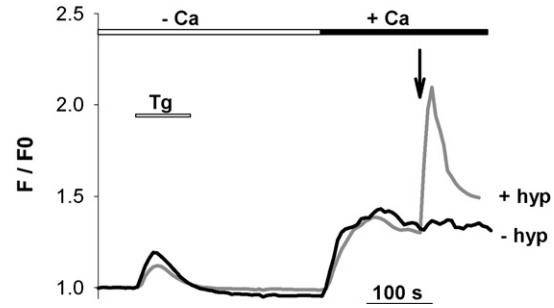


Fig. 1. Cortical neurons possess store-depletion-activated channels and hyperforin-sensitive channels. The figure shows somatic changes in fluo-4 fluorescence (F/F0) as a function of time in two cultured cortical neurons. Thapsigargin (Tg, 1 μM) was applied on a cell kept in a Ca^{2+}-free medium, washed away and 2 mM external Ca^{2+} was reintroduced (as illustrated by the horizontal black bar) which provoked a second Ca^{2+} rise through store-depletion-activated channels. Hyperforin (10 μM) or its vehicle (DMSO, 0.1%) was added (arrow) after the onset of the Tg-dependent Ca^{2+} entry. Similar data were obtained on 98 cells.

3. Results

We previously showed that E13 cortical neurons possess hyperforin-sensitive channels [7] and store-depletion-activated channels [5]. We first asked whether these two Ca^{2+} routes co-exist in the same cells. To this aim, cortical neurons were first treated with thapsigargin (Tg), a potent inhibitor of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps [15]. It caused a transient Fluo-4 signal reflecting the passive release of Ca^{2+} from internal pools followed by the extrusion of Ca^{2+} out of the cells. A subsequent superfusion with a Ca^{2+}-containing recording medium gave rise to a second Fluo-4 signal (Fig. 1). The addition of hyperforin (arrow, Fig. 1) during the Tg-dependent Ca^{2+} entry elicited a rapid and transient elevation of the Fluo-4 fluorescence as already reported [7,8]. The fact that these responses are additive suggests the coexistence of distinct Ca^{2+} routes. This latter hypothesis was tested below.

Hyperforin-sensitive channels of cortical neurons are insensitive to agents disturbing the actin cytoskeleton [7]. In the following experiments, cortical neurons were treated with cytochalasin D to inhibit actin filament polymerization. However, this agent did not affect the Tg-dependent Ca^{2+} release and entry (Fig. 2A). Another way to modify the actin filament network is to use phosphatase inhibitors such as calyculin A. Like cytochalasin D, pre-treating cells with calyculin A had no effect on the Tg-dependent Ca^{2+} release and entry (not shown, $n = 38$ cells). Caveolae have been shown to play important roles in Ca^{2+} signalling [16,17]. To determine whether the store-depletion-activated channels were located in caveolae-like structures, cortical neurons were kept 2 days in a culture medium supplemented with 20 μg/ml cholesterol. After this treatment, cells were transferred to (a cholesterol- and) nominally Ca^{2+}-free Tyrode solution and Tg was added to deplete the stores. Cholesterol had no effect on the Tg-dependent release and entry of Ca^{2+} (Fig. 2A). In another set of experiments, methyl-β-cyclodextrin was used as a modifier of caveolae structures. Here again, treating the cells with methyl-β-cyclodextrin did not affect the Tg-dependent release and entry of Ca^{2+} (not shown, $n = 35$ cells). In conclusion, like the hyperforin-sensitive channels, the store-depletion-activated channels of cortical neurons are not present in caveolae-like structures.

Regulation by tyrosine kinases seems to be a general feature of depletion-activated channels [18] but hyperforin-sensitive channels are not regulated by these kinases [7]. The involvement of tyrosine kinases in the Tg-dependent Ca^{2+} entry of embryonic cortical neurons was verified by using genistein and PP2, two tyrosine kinase inhibitors which do not affect the hyperforin-sensitive responses [7]. Both inhibitors depress the amplitude of the Tg-

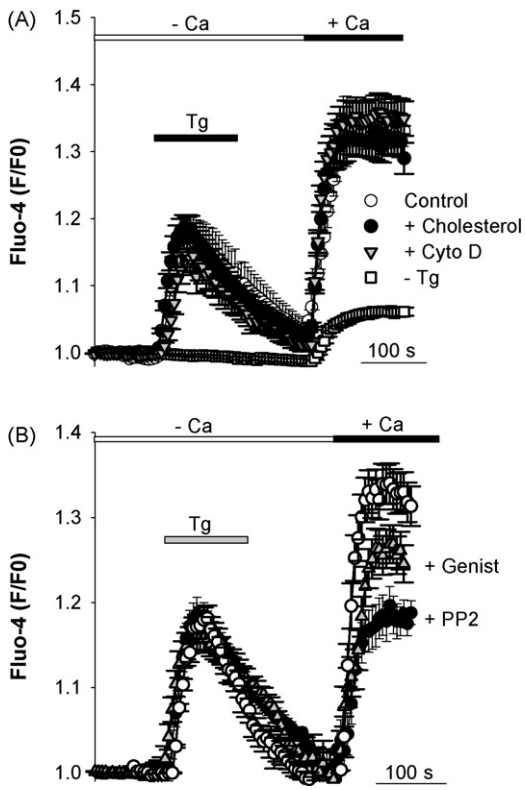


Fig. 2. The Tg-dependent Ca^{2+} entry is unaffected by cholesterol and cytochalasin D but is down-regulated by the tyrosine kinase inhibitors genistein and PP2. The protocol used was the same as in Fig. 1. Tg was applied and washed away. Panel (A) shows Fluo-4 responses (F/F0) as a function of time (mean ± S.E.M.) and illustrates the lack of effect of cytochalasin D (1 μM, filled circles) and cholesterol (1 μM, grey triangles) on the Tg-dependent Ca^{2+} release and entry. Cytochalasin D treatment: cells were pre-incubated for 1–2 h at 37 °C before the beginning of the recording; Cholesterol treatment: cells were kept for 48 h in a culture medium supplemented with 20 μg/ml cholesterol. As a control, cells were not treated with Tg. Under these conditions, they poorly responded to the reintroduction of Ca^{2+} (open squares). The total number of cells and dishes used was: 72/4 (control cells), 70/4 (cholesterol) and 83/5 (cytochalasin D), and 88/4 (cells not treated with Tg). In panel (B) are shown Fluo-4 recordings recorded in response to the application of Tg and the subsequent admission of Ca^{2+}. In this set of experiments, some cortical cells were pre-treated with either 50 μM genistein (for 10 min at 37 °C) or with 10 μM PP2 (for 20 min at room temperature) before the addition of Tg. The total number of cells and dishes used was: 47/3 (control cells, open circles), 30/3 (genistein, grey triangles) and 65/4 (PP2, filled circles).

dependent Ca^{2+} entry without altering the Tg-dependent Ca^{2+} release (Fig. 2B). This latter observation indicates that the depletion of the Ca^{2+} stores and hyperforin activate distinct channels.

Determining the molecular identity of the store-depletion-activated channels by means of pharmacological agents is not an easy task because of the lack of specific blockers of this family of channels [19]. However, the pyrazole compound Pyr3 has recently been described as a selective inhibitor of TRPC3 channels having an IC_{50} value of 0.7 μM. A complete blockade is seen in the presence of 3 μM Pyr3 [20]. Of interest, it does not block the other TRPC channels even when used at the concentration of 10 μM [20]. We thus took advantage of this property to further analyse the characteristics of the store-depletion-activated channels of E13 cortical neurons. As illustrated in Fig. 3A, Pyr3 attenuated the Tg-dependent entry of Ca^{2+} in a concentration-dependent manner but without altering the Tg-dependent Ca^{2+} release (Fig. 3A). The strongest inhibitory responses were seen for concentrations of Pyr3 ≥2 μM (Fig. 3B). Even when used at 10 or 20 μM, Pyr3 failed to completely abolish the Fluo-4 signals seen upon the readmission of Ca^{2+}. Of note, the amplitude of this Pyr3-insensitive Ca^{2+} signal is comparable to the one observed on Tg-untreated cells (see Fig. 2A, open

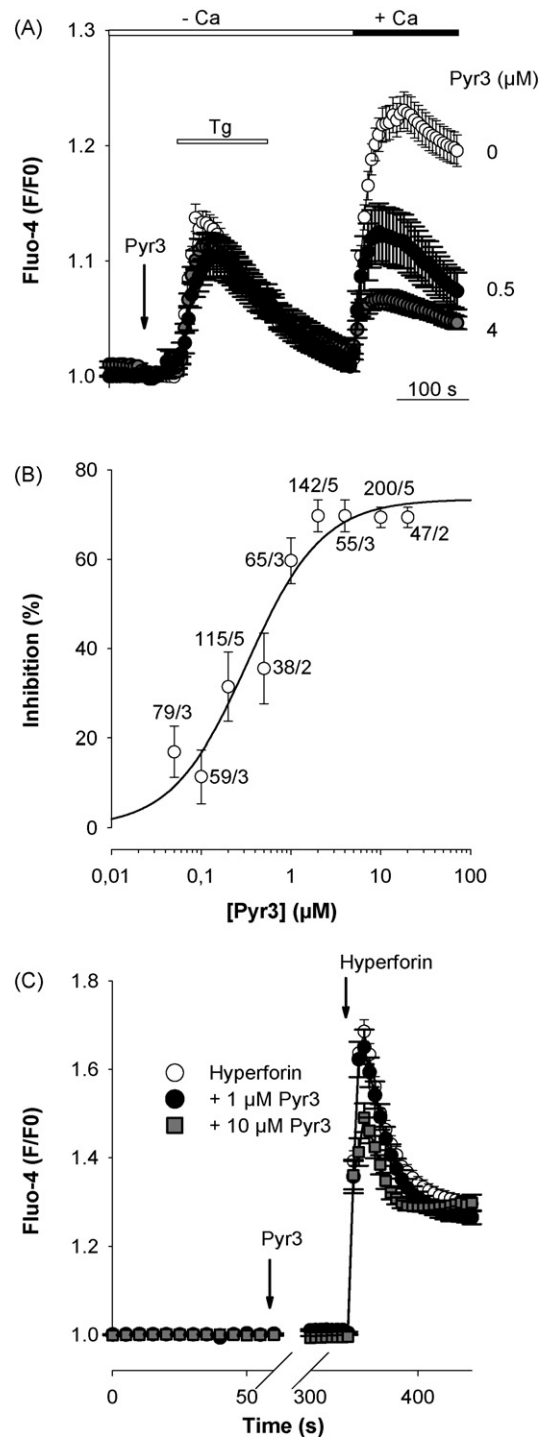


Fig. 3. The TRPC3 channel blocker Pyr3 strongly blocks the Tg-dependent Ca^{2+} entry but has a modest inhibitory action on the hyperforin-dependent responses. The store-depletion-activated Ca^{2+} entry was studied according to the protocol described in Fig. 1. Tg (1 μM) was applied and washed away before the readmission of Ca^{2+} (horizontal black bar). In some experiments, Pyr3 was added (arrow) and remained present throughout the recording. Panel (A) shows Fluo-4 changes (F/F0) as a function of time under control conditions (open circles) and in the presence of 0.5 and 4 μM Pyr3. In panel (B) is shown a summary graph of the experiments illustrated in (A) and presenting the blockage (% inhibition) of the store-depletion-activated Ca^{2+} entry in the presence of Pyr3 (μM). Mean ± S.E.M. The number of cells and dishes used is indicated. The effects of Pyr3 on the hyperforin-sensitive responses were also investigated (C). The figure shows Fluo-4 responses recorded in the presence of hyperforin (10 μM) alone and in the presence of hyperforin (10 μM) + 1 or 10 μM Pyr3. The total number of cells and dishes used was: 303/12 (hyperforin), 128/5 (hyperforin + 1 μM Pyr3), and 149/5 (hyperforin + 10 μM Pyr3).

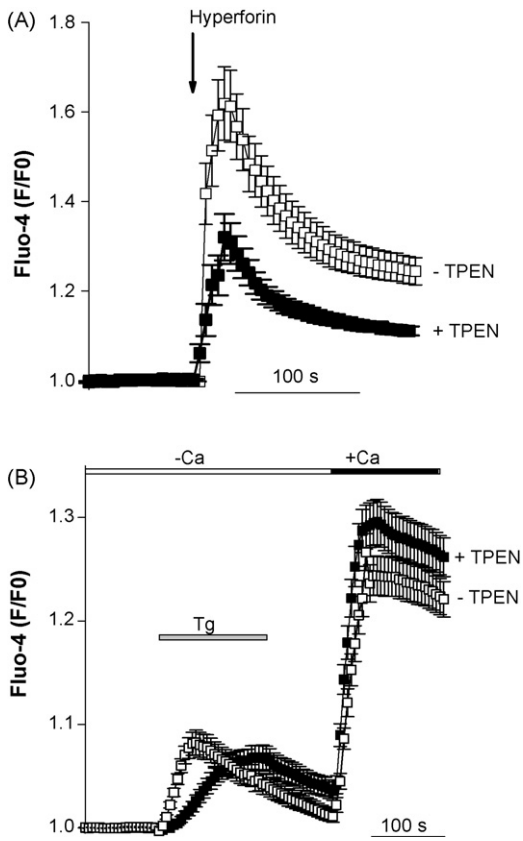


Fig. 4. (A and B) The Zn^{2+} chelator TPEN diminishes the hyperforin-sensitive responses without altering the Tg-dependent Ca^{2+} entry. In this set of experiments, the Zn^{2+} chelator TPEN (10 μM) was added 1–2 min before the beginning of the recording and remained present in the bath. It partially reduces the amplitude of the peak and the plateau phase observed in response to the addition of hyperforin (10 μM) whereas it failed to block the Tg-dependent Ca^{2+} responses. The total number of cells and dishes used was: 54/3 (hyperforin), 67/3 (hyperforin + TPEN), 85/3 (Tg), and 86/3 (Tg + TPEN).

squares). This indicates that Tg, via the emptying of the stores, controls the activity of a family of Pyr3-sensitive channels. The concentration producing 50% of the maximal inhibitory effect was observed for a Pyr3 concentration of ~0.5 μM, a value quite close to the one determined for TRPC3 channels (0.7 μM) [20]. After having shown that Pyr3 is a potent blocker of the store-depletion-activated channels of cortical neurons, this pharmacological tool was used to determine whether it blocked hyperforin-sensitive channels. Interestingly, concentrations up to 1 μM Pyr3 failed to block the hyperforin-sensitive Fluo-4 responses. In the presence of 10 μM, Pyr3 reduced the peak amplitude of the hyperforin response by only ~15–20% ($n = 149$, $p < 0.05$, Student' t-test). Increasing the Pyr3 concentration to 50 μM did not further potentiate the blockage ($n = 54$, not shown). Thus, concentrations of Pyr3 known to depress TRPC3 channels (0.3–1 μM) [20] have no effect on the hyperforin-sensitive responses. From these experiments, it can be concluded that Tg activates Pyr3-sensitive channels whereas hyperforin controls channels poorly sensitive to Pyr3.

Hyperforin is used as a convenient TRPC6-channel activator [8] but, in addition to its action on plasma membrane channels, hyperforin has also the property to release Zn^{2+} and Ca^{2+} from mitochondria [21]. During the time course of this latter study we noticed that the Zn^{2+} chelator TPEN partially abolished the hyperforin-dependent responses. This inhibitory effect is illustrated in Fig. 4A showing Fluo-4 responses elicited by hyperforin without or with TPEN (10 μM). It appears that TPEN reduces the size of the peak hyperforin-sensitive response but also the plateau phase. This sustained response reflects the hyperforin-dependent release of Ca^{2+} and Zn^{2+} [21]. TPEN reduces the amplitude of the plateau (or sustained) phase by chelating Zn^{2+} but not Ca^{2+} ions. On the other hand, the TPEN-dependent reduction of the maximal hyperforin-dependent response likely reflects its inhibitory action on the hyperforin-sensitive channels. Of note, TPEN has already been shown to block plasma membrane ion channels. Indeed, 30 μM of this Zn^{2+} chelator partially inhibits L-type voltage-gated Ca^{2+} channels [22]. Understanding the mechanism by which TPEN reduces the hyperforin-activated Ca^{2+} entry was beyond the scope of the present study and it was thus not investigated further but it is worth mentioning that TPEN also exerts cellular responses independently to its property of chelating trace elements. For instance, TPEN inhibits ligand binding to some trimeric G proteins, and interferes with G protein-coupled receptors [23]. Whether the TPEN-dependent inhibition of the hyperforin-sensitive channels unveils a G protein-dependent regulation of the hyperforin-sensitive TRPC6-like channels of cortical neurons remains to be explored. To gain further insight into the pharmacological properties of the Tg- and hyperforin-sensitive channels, the Zn^{2+} chelator TPEN was added before Tg. Under these conditions, TPEN did not block the Tg-dependent signals, namely the release and entry of Ca^{2+} (Fig. 4B), further indicating that Tg and hyperforin control distinct Ca^{2+} routes. If TPEN did not reduce the Tg-dependent entry of Ca^{2+} it however influenced the Ca^{2+} release and extrusion processes by slowing down their kinetics (Fig. 4B). A recent report showed that this chelator interacts with the ryanodine receptor and the Ca^{2+} pumps of the ER [24]. This may explain its effects on the Tg-induced Ca^{2+} release.

Immunophilins, which are receptors for immunosuppressant drugs like cyclosporine A or FK506, form an important class of proteins playing crucial roles including in the nervous system [25]. They influence the cellular homeostasis of Ca^{2+} by regulating the activity of various Ca^{2+} channels [25,26]. The experiments depicted in Fig. 5 show that FK506 exerted a strong inhibitory action on the Tg-dependent Ca^{2+} entry (Fig. 5A) without modifying the hyperforin-sensitive responses (Fig. 5B). Thus, in contrast to the hyperforin-sensitive channels, the activity of the store-depletion-activated channels is regulated by a FK506-sensitive target. Altogether, these data show that store-depletion and hyperforin control Ca^{2+} routes exhibiting distinct properties.

4. Discussion

Even at the beginning of the murine corticogenesis, neurons from the immature cortex express several types of internal [2] and plasma membrane Ca^{2+} channels [4,6,7], including store-depletion-activated channels [5]. TRPC, at least some of them, have been described as important components of SOC [12–14]. At E13, the mRNAs of all known TRPC (TRPC1–TRPC7) are already present in the cortex of C57Bl6 mice [6]. The antidepressant hyperforin activates TRPC6 channels without activating TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC5 channels [8]. In E13 cortical neurons, hyperforin elicits an entry of Ca^{2+} through TRPC6-like channels [7]. We hypothesized that hyperforin and Tg control the activity of plasma membrane cation channels of TRPC type and verified whether they were distinct or similar.

Many molecules exert an inhibitory action on TRPC channels and store-depletion-activated channels but most of them appear poorly selective [19]. The pyrazol derivative Pyr3 is a new potent and selective blocker of recombinant and native TRPC3 channels [20]. It has a direct action on the protein by binding to an external site of the TRPC3 channel. Furthermore, Pyr3 has no effect on TRPC1, TRPC2, TRPC4, TRPC5, TRPC6, TRPC7, TRPM2, TRPM4 and TRPM7 channels. But, of note, it blocks the stimulated entry of Ca^{2+} in HEK-293 cells

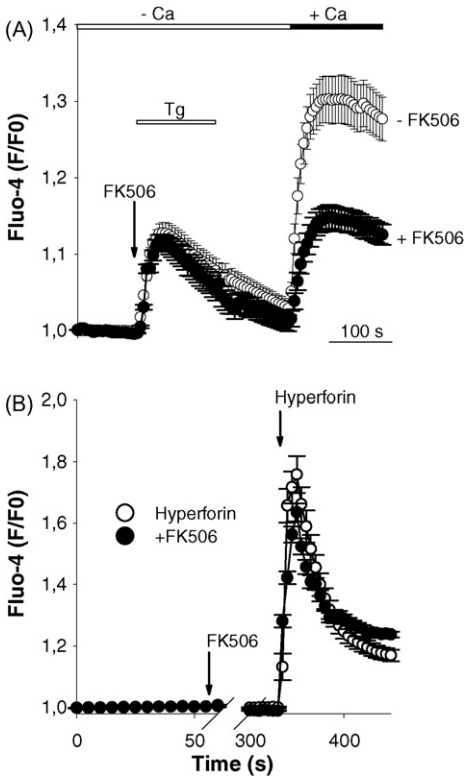


Fig. 5. The immunosuppressant FK506 blocks the Tg-dependent Ca^{2+} entry but not the hyperforin-sensitive responses. Panel (A) shows the inhibitory action exerted by the immunosuppressant FK506 on the Tg (1 μM)-dependent Ca^{2+} entry. FK506 (5 mM) was added when indicated by the arrow and remained present throughout the recording. The number of cells and culture dishes used was: 107/6 (control) and 122/5 (FK506). Mean ± S.E.M. (B) FK506 (5 mM) did not modify the hyperforin-sensitive responses. As above, the immunosuppressant was added when indicated by the arrow and remained present throughout the entire recording. The total number of cells and culture dishes used was: 136/5 (control) and 149/5 (FK506). Mean ± S.E.M.

co-expressing TRPC3 and TRPC6 [20]. In DT40 B lymphocytes Pyr3 suppresses receptor-dependent Ca^{2+} responses which develop via TRPC3 channels [20]. Pyr3 is thus a new and promising TRPC3 channel blocker which could help to unravel the physiological functions of native TRPC3 channels. The present report provides experimental evidence for the existence of Pyr3-sensitive channels in cultured cortical neurons dissociated from E13 embryonic mice. However, saturating concentrations of Pyr3 (e.g. ≥2 μM) do not fully block the entry of Ca^{2+} triggered in response to the depletion of the stores. This latter point indicates that, besides Pyr3-sensitive channels, Pyr3-insensitive channels seem to also participate in the store-depletion-activated Ca^{2+} entry. The molecular identity of these Pyr3-insensitive actors has not yet been characterized. For instance the contribution of Stim, Orai and other TRPC like TRPC1, the most abundant TRPC isoform in the immature cortex [6], in this neuronal Ca^{2+} route remains to be shown. Experiments are currently in progress to address this issue.

The store-depletion-activated channels are clearly different from the hyperforin-sensitive channels of TRPC6 type. Indeed, Pyr3 markedly suppresses the store-depletion-activated Ca^{2+} entry whereas it poorly blocks hyperforin-activated channels. Hence, TPEN inhibits the hyperforin- but not the Tg-dependent Ca^{2+} entry. In addition, only store-depletion-activated channels are regulated by tyrosine kinases since the tyrosine kinase inhibitors genistein and PP2 negatively regulate the Tg-dependent Ca^{2+} entry without altering the entry of Ca^{2+} through hyperforin-sensitive TRPC6-like channels [7]. The experiments carried out with the immunosuppressant FK506 further show that the depletion of Ca^{2+} stores and hyperforin control distinct plasma membrane Ca^{2+} channels since FK506 strongly depresses the Tg-dependent Ca^{2+} entry without influencing the hyperforin-sensitive responses. The immunosuppressant FK506 has been reported to displace the immunophilins from the TRPC and alter their activity [27]. In Drosophila photoreceptor cells, the immunophilin FKBP59 binds to TRPL [28]. In rat cerebral cortex FKBP12 binds to TRPC3 and TRPC6 whereas FKBP52 associates with TRPC1, TRPC4 and TRPC6 [27]. In *Xenopus* spinal neurons FKBP52 and FKBP12 regulate the gating of TRPC1 channels [29]. Of note, immunophilins ligands such as FK506 or rapamycin exert neuroprotective actions [25]. The FK506-dependent reduction of the Ca^{2+} influx through store-depletion-activated channels could participate, at least partially, in the immunosuppressant-dependent neuroprotective response. In HEK-293 cells stably over-expressing TRPC6, FK506 reduces the size of the currents through receptor-activated TRPC6 channels [27] whereas the hyperforin-sensitive TRPC6-like channels of cortical neurons are unaffected by the immunosuppressant.

If these Tg- and hyperforin-sensitive channels exhibit distinct pharmacological properties, our past [7] and present work shows that they however display some common features: for instance both types of responses are insensitive to manoeuvres aimed at manipulating the lipid composition of the plasma membrane. Indeed, maintaining cells in a cholesterol-enriched culture medium or depleting the plasma membrane cholesterol with methyl-β-cyclodextrin fails to influence the hyperforin-sensitive channels [7] and the store-depletion-activated channels. In addition, both responses are not governed by actin cytoskeleton-dependent processes since cytochalasin D and calyculin have no effect on the hyperforin-dependent Ca^{2+} entry [7] as well as on the Tg-dependent Ca^{2+} entry. Based on these results, it is proposed that these neuronal channels are present at the plasma membrane but not inserted into caveolae-like structures.

In summary, in cultured cortical neurons dissociated from E13 brain embryos, the depletion of internal Ca^{2+} pools and the TRPC6-channel activator hyperforin control the activity of distinct plasma membrane Ca^{2+} channels. Although, they possess some common features they clearly exhibit distinct pharmacological properties.

Conflict of interest

No conflict declared.

Acknowledgments

We wish to thank Drs. Willmar Schwabe (Karlsruhe, Germany) for the kind gift of hyperforin and Y. Mori (Kyoto University) for the kind gift of Pyr3. JG and PT were supported by studentships from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche, et de la Technologie. This work was supported by a grant from l'Agence Nationale de la Recherche (06-SEST-038).

References

[1] A.R. Kriegstein, S.C. Noctor, Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex, Trends Neurosci. 27 (2004) 392–399.
[2] A.V. Faure, D. Grunwald, M.J. Moutin, M. Hilly, J.P. Mauger, I. Marty, M. De Waard, M. Villaz, M. Albrieux, Developmental expression of the calcium release channels during early neurogenesis of the mouse cerebral cortex, Eur. J. Neurosci. 14 (2001) 1613–1622.
[3] A. Bouron, S. Boisseau, M. De Waard, L. Peris, Differential down-regulation of voltage-gated calcium channel currents by glutamate and BDNF in embryonic cortical neurons, Eur. J. Neurosci. 24 (2006) 699–708.
[4] J.C. Platel, S. Boisseau, A. Dupuis, J. Brocard, A. Poupard, M. Savasta, M. Villaz, M. Albrieux, Na^+ channel-mediated Ca^{2+} entry leads to glutamate secretion in mouse neocortical preplate, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (2005) 19174–19179.
[5] A. Bouron, X. Altafaj, S. Boisseau, M. De Waard, A store-operated Ca^{2+} influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca^{2+} stores is

developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice, Brain Res. Dev. Brain Res. 159 (2005) 64–71.
[6] S. Boisseau, C. Kunert-Keil, S. Lucke, A. Bouron, Heterogeneous distribution of TRPC proteins in the embryonic cortex, Histochem. Cell Biol. 131 (2009) 355–363.
[7] P. Tu, C. Kunert-Keil, S. Lucke, H. Brinkmeier, A. Bouron, Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons, J. Neurochem. 108 (2009) 126–138.
[8] K. Leuner, V. Kazanski, M. Muller, K. Essin, B. Henke, M. Gollasch, C. Harteneck, W.E. Muller, Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels, FASEB J. 21 (2007) 4101–4111.
[9] A.B. Parekh, Store-operated channels: mechanisms and function, J. Physiol. 586 (2008) 3033.
[10] P. Varnai, L. Hunyady, T. Balla, STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry, Trends Pharmacol. Sci. 30 (2009) 118–128.
[11] J.W. Putney, Capacitative calcium entry: from concept to molecules, Immunol. Rev. 231 (2009) 10–22.
[12] J.P. Yuan, M.S. Kim, W. Zeng, D.M. Shin, G. Huang, P.F. Worley, S. Muallem, TRPC channels as STIM1-regulated SOCs, Channels (Austin) 3 (2009) 221–225.
[13] J.W. Putney Jr., New molecular players in capacitative Ca^{2+} entry, J. Cell Sci. 120 (2007) 1959–1965.
[14] L. Birnbaumer, The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 49 (2009) 395–426.
[15] M. Treiman, C. Caspersen, S.B. Christensen, A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases, Trends Pharmacol. Sci. 19 (1998) 131–135.
[16] M. Isshiki, R.G. Anderson, Function of caveolae in Ca^{2+} entry and Ca^{2+}-dependent signal transduction, Traffic 4 (2003) 717–723.
[17] I.S. Ambudkar, Cellular domains that contribute to Ca^{2+} entry events, Sci. STKE 2004 (2004) pe32.
[18] B.T. Kawasaki, Y. Liao, L. Birnbaumer, Role of Src in C3 transient receptor potential channel function and evidence for a heterogeneous makeup of receptor- and store-operated Ca^{2+} entry channels, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (2006) 335–340.
[19] Z.K. Sweeney, A. Minatti, D.C. Button, S. Patrick, Small-molecule inhibitors of store-operated calcium entry, ChemMedChem 4 (2009) 706–718.
[20] S. Kiyonaka, K. Kato, M. Nishida, K. Mio, T. Numaga, Y. Sawaguchi, T. Yoshida, M. Wakamori, E. Mori, T. Numata, M. Ishii, H. Takemoto, A. Ojida, K. Watanabe, A. Uemura, H. Kurose, T. Morii, T. Kobayashi, Y. Sato, C. Sato, I. Hamachi, Y. Mori, Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (2009) 5400–5405.
[21] P. Tu, J. Gibon, A. Bouron, The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria, J. Neurochem. 112 (2010) 204–213.
[22] B. Turan, Zinc-induced changes in ionic currents of cardiomyocytes, Biol. Trace Elem. Res. 94 (2003) 49–60.
[23] J.M. Webster, M.T. Bentley, R.J. Wojcikiewicz, N,N,N′,N′-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine inhibits ligand binding to certain G protein-coupled receptors, Eur. J. Pharmacol. 474 (2003) 1–5.
[24] M. Sztretye, J. Almassy, T. Deli, P. Szentesi, C. Jung, B. Dienes, C.A. Simut, E. Niggli, I. Jona, L. Csernoch, Altered sarcoplasmic reticulum calcium transport in the presence of the heavy metal chelator TPEN, Cell Calcium 46 (2009) 347–355.
[25] S.H. Snyder, M.M. Lai, P.E. Burnett, Immunophilins in the nervous system, Neuron 21 (1998) 283–294.
[26] M.G. Chelu, C.I. Danila, C.P. Gilman, S.L. Hamilton, Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins, Trends Cardiovasc. Med. 14 (2004) 227–234.
[27] W.G. Sinkins, M. Goel, M. Estacion, W.P. Schilling, Association of immunophilins with mammalian TRPC channels, J. Biol. Chem. 279 (2004) 34521–34529.
[28] M. Goel, R. Garcia, M. Estacion, W.P. Schilling, Regulation of Drosophila TRPL channels by immunophilin FKBP59, J. Biol. Chem. 276 (2001) 38762–38773.
[29] S. Shim, J.P. Yuan, J.Y. Kim, W. Zeng, G. Huang, A. Milshteyn, D. Kern, S. Muallem, G.L. Ming, P.F. Worley, Peptidyl-prolyl isomerase FKBP52 controls chemotropic guidance of neuronal growth cones via regulation of TRPC1 channel opening, Neuron 64 (2009) 471–483.

Conclusion et perspectives

Nous avons dans un premier temps mis en évidence la présence de la voie d'entrée SOC et de la voie d'entrée du calcium en réponse à l'hyperforine dans une même cellule. Les réponses étant distinctes, il semblerait que ces deux voies d'entrée du calcium impliquent des acteurs différents.

Les premières expériences basées sur l'utilisation d'outils pharmacologiques déstabilisant la composition lipidique de la membrane plasmique (cholestérol et méthyl-β-cyclodextrine) ne modifient ni la réponse SOC ni la réponse hyperforine. De la même façon, la cytochalasine D et la calyculine A qui agissent sur la polymérisation de l'actine n'ont pas d'effet sur les réponses SOC et hyperforine. Ces résultats nous amènent à suggérer que les canaux SOC et les canaux TRPC6 ne sont pas insérés dans des rafts lipidiques sous membranaires. Nos résultats indiquent que, contrairement aux canaux surexprimés dans des cellules HEK[80], l'activation des canaux TRPC6 neuronaux n'est pas couplée à leur insertion membranaire via un processus d'exocytose.

Contrairement aux canaux capacitifs[90], les canaux sensibles à l'hyperforine ne sont pas régulés par une activité tyrosine kinase[95]. Ceci a été mis en évidence en utilisant la genisteine ou le PP2 (deux inhibiteurs de tyrosines kinases). Récemment, une équipe a mis au point un inhibiteur spécifique des canaux TRPC3, le Pyr3[420]. Nous avons utilisé ce composé afin de montrer que la réponse SOC est inhibée à de façon dose-dépendante par le Pyr3 avec une IC50 d'environ 0,7 µM. Les canaux sensibles à l'hyperforine sont très peu sensibles au Pyr3 puisqu'à 10 µM, une concentration induisant un blocage maximal de la voie SOC, il ne provoque qu'une diminution de 15 à 20% de la réponse hyperforine. Cette différence de sensibilité au Pyr3 suggère l'existence de canaux composés d'identités moléculaires distinctes. La sensibilité des réponses hyperforine au Pyr3 pourrait indiquer que TRPC3 serait un composant impliqué dans la composition des canaux sensibles à l'hyperforine. Ceci reste cependant à démontrer. La forte sensibilité des canaux SOC au Pyr3 indique que les canaux TRPC3 sont des éléments essentiels à cette voie calcique. On peut toutefois noter que même en présence de fortes concentrations de Pyr3 la voie SOC n'est jamais complètement bloquée, indiquant que des canaux insensibles au Pyr3 participent aussi à l'entrée de calcium induite par la vidange des stocks calciques. Un autre argument en faveur de l'existence de conductances calciques distinctes est la différence de sensibilité des voies calciques vis-à-vis du TPEN. En effet, nous avons observé qu'à des concentrations supérieures à 10 µM, le TPEN (un chélateur spécifique du zinc) inhibe la réponse hyperforine sans influencer la voie SOC. Outre son rôle de chélateur, le TPEN interfère avec des récepteurs couplés aux

protéines G trimériques [421], il serait donc intéressant de préciser si l'effet inhibiteur du TPEN se fait via cette action sur les protéines G.

Les immunophilines régulent les canaux TRPC. Par exemple, l'immunosuppresseur FK506 diminue l'amplitude des courants via les canaux TRPC6 dans les cellules HEK-TRPC6[422]. Dans nos expériences sur les neurones, la réponse SOC est très inhibée par le FK506 alors que la réponse hyperforine ne l'est pas. Il est possible que, contrairement aux canaux TRPC6 surexprimés dans les cellules HEK, les canaux natifs possèdent des propriétés différentes. Dans les HEK-TRPC6, la composition moléculaire des canaux tétramériques est probablement différente à celle des canaux endogènes neuronaux. La composition moléculaire des canaux sensibles à l'hyperforine dans les neurones corticaux reste à être clarifiée.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus qui suggèrent que les canaux SOC et les canaux sensibles à l'hyperforine (TRPC6) forment deux voies d'entrée du calcium distinctes dans les neurones corticaux embryonnaires.

Sensibilité à :	Canaux SOC	Canaux sensibles à l'hyperforine
Cytochalasine D 1 µM	-	-
Cholestérol 2 jours 20 µg/ml	-	-
Méthyl- β -cyclodextrine 10 µM	-	-
Génistéine 50 µM	+	-
PP2 10 µM	+	-
Pyr3 1 µM	+	-
Pyr3 10 µM	+	+
TPEN 10 µM	-	+
FK506 5 mM	+	-

Le – signifie que la réponse n'est pas influencée.
Le + signifie que la réponse est bloquée.

Les expériences d'imagerie de fluorescence Fluo4 montrent clairement que l'hyperforine provoque une réponse calcique bi-phasique: 1) Une phase précoce et transitoire, caractéristique d'une entrée de calcium via les canaux TRPC6[95]. 2) Une phase de plateau, plus tardive et insensible au gadolinium[95]. Dans la partie suivante, nous tenterons de mieux caractériser cette phase de plateau dans les neurones.

Article 3 : Effet de l'hyperforine sur l'homéostasie du calcium et du Zinc

Introduction

Dans les expériences décrites précédemment (articles 1 et 2), nous avons utilisé l'hyperforine en tant qu'activateur des canaux TRPC6. Cette molécule, purifiée à partir de millepertuis (*Hypericum perforatum)* est prescrite comme antidépresseur. Au niveau cellulaire, de nombreuses cibles ont été identifiées mais à ce jour les bases moléculaires de son action thérapeutique antidépressive ne sont pas connues. L'hyperforine bloque par exemple certaines conductances calciques dont des canaux dépendants du voltage et des récepteurs NMDA, AMPA et GABA. L'hyperforine inhibe la recapture des neurotransmetteurs (dopamine, sérotonine et noradrénaline) (Chapitre *5.1*). Cependant, elle possède la propriété d'activer les canaux TRPC6 sans ouvrir les autres canaux TRPC[15]. TRPC6 est, à ce jour, le seul canal ionique connu comme étant positivement régulé par cet antidépresseur.

Dans les articles suivants, nous nous intéresserons aux effets de cette molécule sur des neurones corticaux. Nous avons tout d'abord mis en évidence le fait que l'hyperforine libère des cations à partir de stocks internes dans les neurones[95] et dans les cellules HEK (figure supplémentaire 1 article 1). Dans une seconde partie, nous étudierons les effets d'un traitement chronique à l'hyperforine sur des neurones en culture et chez la souris.

The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria

Journal of Neurochemistry JNC

JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY | 2010 | 112 | 204–213 doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06446.x

The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria

Peng Tu,*,†,‡ Julien Gibon*,†,‡ and Alexandre Bouron*,†,‡

*UMR CNRS 5249, Grenoble, France

†CEA, DSV, IRTSV, Grenoble, France

‡Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Abstract

Hyperforin, an extract of the medicinal plant *hypericum perforatum* (also named St John's wort), possesses antidepressant properties. Recent data showed that it elevates the intracellular concentration of Ca^{2+} by activating diacylglycerol-sensitive C-class of transient receptor potential (TRPC6) channels without activating the other isoforms (TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, and TRPC7). This study was undertaken to further characterize the cellular neuronal responses induced by hyperforin. Experiments conducted on cortical neurons in primary culture and loaded with fluorescent probes for Ca^{2+} (Fluo-4) and Zn^{2+} (FluoZin-3) showed that it not only controls the activity of plasma membrane channels but it also mobilizes these two cations from internal pools. Experiments conducted on isolated brain mitochondria indicated that hyperforin, like the inhibitor of oxidative phosphorylation, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), collapses the mitochondrial membrane potential. Furthermore, it promotes the release of Ca^{2+} and Zn^{2+} from these organelles via a ruthenium red-sensitive transporter. In fact, hyperforin exerts complex actions on CNS neurons. This antidepressant not only triggers the entry of cations via plasma membrane TRPC6 channels but it displays protonophore-like properties. As hyperforin is now use to probe the functions of native TRPC6 channels, our data indicate that caution is required when interpreting results obtained with this antidepressant.

Keywords: brain, calcium, cortex, mice, zinc.

J. Neurochem. (2010) **112**, 204–213.

Hyperforin, an extract of the medicinal plant *hypericum perforatum* (also named St John's wort) exhibits antidepressant properties (Chatterjee *et al.* 1998). Indeed, hyperforin alleviates symptoms of mild to moderate depression and is now commonly prescribed worldwide (Nathan 1999; Mennini and Gobbi 2004; Zanoli 2004). *In vitro* experiments showed that hyperforin inhibits the synaptic uptake of various neurotransmitters, including serotonin and noradrenaline (Muller 2003). However, the mechanisms by which it exerts its antidepressive actions remain elusive (Mennini and Gobbi 2004).

Hyperforin, known to change membrane fluidity (Eckert *et al.* 2004), influences cell functions by altering the activity of some plasma membrane channels. For instance, it is a potent blocker of many voltage-gated (Ca, Na, and K) channels (Chatterjee *et al.* 1999; Fisunov *et al.* 2000) and ligand-gated (GABA, NMDA, and AMPA) channels (Chatterjee *et al.* 1999; Kumar *et al.* 2006). Besides inhibiting proteins involved in the transport of ions through the plasma membrane, hyperforin activates an inward cationic current in a dose-dependent manner (Chatterjee *et al.* 1999; Treiber *et al.* 2005). TRPC6, a member of the C-class of transient receptor potential (TRPC) proteins, is the key molecular component of these hyperforin-activated channels (Leuner *et al.* 2007). TRPC6 is activated by hyperforin but the other TRPC isoforms (TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, and

Received August 3, 2009; revised manuscript received October 1, 2009; accepted October 14, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Alexandre Bouron, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS 5249, CEA, 17 rue des Martyrs, Grenoble 38054, France.
E-mail: alexandre.bouron@cea.fr

Abbreviations used: $[Zn^{2+}]_i$, cytosolic concentration of Zn^{2+}; AM, acetoxymethyl ester; CsA, cyclosporin A; diS-C3-(5), 3,3′-dipropylthiodicarbocyanine; DTDP, 2,2′-dithiopyridine; ER, endoplasmic reticulum; FCCP, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; GPN, glycyl-phenylalanine-2-naphthylamide; Tg, thapsigargin; TPEN, *N,N,N′,N′*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylene-diamine; TRPC, C-class of transient receptor potential.

© 2009 The Authors

TRPC7) are insensitive to the antidepressant (Leuner *et al.* 2007).

Several authors took advantage of this characteristic to study the functions and properties of native TRPC6 channels (Leuner *et al.* 2007; Muller *et al.* 2008; Tu *et al.* 2009b). In cortical neurons, whole cell patch-clamp recordings showed that hyperforin elicits an inward current displaying TRPC6-like properties. Additional imaging experiments carried out with the Ca^{2+} sensitive probe Fluo-4 confirmed that hyperforin gave rise to an entry of cations (Tu *et al.* 2009b). However, the addition of Gd^{3+}, a potent blocker of TRPC channels, reduced but did not abolish the hyperforin-induced Ca^{2+} rise (Tu *et al.* 2009b), suggesting that it could release Ca^{2+} from internal stores.

This study was undertaken to further characterize the effects of hyperforin on neurons from the CNS. Our data show that this antidepressant exerts complex actions on cortical neurons. Hyperforin not only triggers an entry of cations via plasma membrane TRPC6 channels (Leuner *et al.* 2007) but displays protonophore-like properties, triggering the release of Ca^{2+} and Zn^{2+} from mitochondria.

Materials and methods

Primary cultures of embryonic cortical cells

Cortical cells were prepared from isolated cerebral cortices of C57BL6/J mice embryos (vaginal plug was designated embryonic day 0). Brains were removed and kept in an ice-cold Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free Hank's solution containing gentamycin (10 mg/mL) and glucose (6 g/L). Cells were mechanically isolated by means of successive aspirations through a fire-polished sterile Pasteur pipette. They were plated on 16 mm diameter glass coverslips and kept up to 4 days in a 5% CO_2/95% O_2 atmosphere at 37°C (Bouron *et al.* 2005). The procedures used have been approved by the Ethical Committee of Rhône-Alpes Region (France).

Calcium imaging experiments with Fluo-4

The culture medium was removed and the cortical cells were washed twice with a Tyrode solution containing (in mM): 136 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, and 10 glucose, pH 7.4 (NaOH). After a 10 min incubation period (at 21–23°C) in a Tyrode solution supplemented with 1.25 μM Fluo-4/acetoxymethyl ester (AM), cells were washed twice with a Fluo-4/AM-free Tyrode solution and kept at 21–23°C ≥ 20 min to allow the de-esterification of the dye. Glass coverslips, inserted into a perfusion chamber (RC-25F; Warner Instruments, Phymep, France), were placed on the stage of an Axio Observer A1 microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) equipped with a Fluar 40× oil immersion objective lens (1.3 numerical aperture) (Carl Zeiss). Light was provided by the DG-4 wavelength switcher (Princeton Instruments, Roper Scientific, Evry, France). The excitation light for Fluo-4 was filtered through a 470–495 nm excitation filter and the emitted light was collected through a 525 nm filter. Images, acquired by means of a high speed cooled charge-coupled device camera (CoolSnap HQ2; Princeton Instruments, Roper Scientific) were analyzed using the software METAFLUOR (Universal Imaging, Roper Scientific, Evry, France). Mean Fluo-4 values are reported as mean ± SEM, with *n* indicating the number of cell bodies analyzed. All the experiments were performed at 21–23°C. Several batches of cultured cells (prepared from two to seven pregnant mice) were used for each experimental condition.

Zinc imaging experiments with FluoZin-3

Changes in the intracellular concentration of Zn^{2+} were recorded with the specific fluorescent Zn^{2+} indicator FluoZin-3 (Gee *et al.* 2002). The experimental conditions were as described above except that the cells were incubated with 5 μM FluoZin-3/AM for 30 min at 21–23°C. Afterward, they were washed twice and kept for 30 min in a FluoZin-3-free Tyrode solution before starting the recordings. The Fluo-4 and FluoZin-3 recordings were performed as follows: images were captured every 5 s. The baseline Fluo-4 (or FluoZin-3) fluorescence was recorded for ≥ 1 min before adding hyperforin and averaged ($F0$). Unless otherwise indicated, the changes in Fluo-4 (or FluoZin-3) fluorescence as a function of time were expressed as $F/F0$, with F being the Fluo-4 (or FluoZin-3) fluorescence.

Zinc and calcium fluxes measurements from isolated brain mitochondria

Some experiments were conducted on isolated brain mitochondria. These organelles were prepared from brains of 1- to 5-day-old neonatal mice according to Chinopoulos *et al.* (2003) and experimental procedures described previously by Tu *et al.* (2009a). Neonatal mice were killed, brains were isolated, and homogenized in an ice-cold isolation solution containing (in mM) 225 mannitol, 75 sucrose, 5 HEPES, and 1 EGTA, pH 7.4 (KOH). Brain homogenate was centrifuged at 1500 *g* for 10 min (4°C). The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 10 000 *g* for 10 min (4°C). The pellet was resuspended into EGTA-free isolation medium and centrifuged at 1500 *g* for 5 min (4°C). The supernatant was finally centrifuged at 10 000 *g* for 10 min (4°C). The pellet containing the isolated mitochondria was resuspended into this EGTA-free isolation buffer and kept on ice for 3–4 h. Zinc and Ca^{2+} fluxes measurements were carried out on mitochondria kept in a medium consisting of (in mM) 5 DL-malic acid, 5 L-glutamic acid, 270 sucrose, 10 Tris, and 1 Pi (KH_2PO_4/K_2HPO_4), pH 7.35 (KOH). This medium was supplemented with either 0.25 μM Fluo-4 or 0.25 μM FluoZin-3.

Changes of the mitochondrial membrane potential

The changes of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) induced by hyperforin were assayed using the fluorescent cyanine dye 3,3′-dipropylthiodicarbocyanine [diS-C3-(5)] (Waggoner 1979) according to experimental conditions already described (Tu *et al.* 2009a).

Materials

FluoZin-3, FluoZin-3/AM, Fluo-4, Fluo-4/AM, and diS-C3-(5) were from Molecular Probes (Interchim, France). Glycyl-phenylalanine-2-naphthylamide (GPN), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), ruthenium red, *N*,*N*,*N*′,*N*′-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylene-diamine (TPEN), 2,2′-dithiopyridine (DTDP), and thapsigargin (Tg) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Bafilomycin A was from Tocris (Lucerna Chem AG, Switzerland). Cyclosporin A (CsA) was purchased from Calbiochem (Fontenay sous Bois, France). Tissue culture media

© 2009 The Authors

were obtained from Invitrogen (VWR, France). Hyperforin was a kind gift from Dr Willmar Schwabe GmbH & Co (Karlsruhe, Germany). The extract is a mixture of hyperforin with its homolog adhyperforin (ratio 8 : 2), prepared as sodium salts.

Results

Hyperforin releases Ca^{2+} from internal compartments

The antidepressant hyperforin promotes the entry of cations (including Ca^{2+}) through TRPC6 channels (Leuner *et al.* 2007) or channels exhibiting TRPC6-like properties (Tu *et al.* 2009b). The hyperforin-induced Fluo-4 signals were biphasic with a large and transient response followed by a plateau phase (Fig. 1a, filled circles). Even in the presence of a high concentration of Gd^{3+} (50 μM), a potent blocker of TRPC channels, hyperforin was still able to increase the cytosolic concentration of Ca^{2+} as illustrated in Fig. 1a (open circles). In this case, Gd^{3+} specifically suppressed the transient phase leaving the plateau unaffected. The latter result suggested that hyperforin controls at least two cellular responses: it promotes the entry of cations and also causes the release of Ca^{2+} from internal stores. In the following experiments, the hyperforin-induced Ca^{2+} responses were recorded when the cells were kept either in a 2 mM Ca^{2+} Tyrode solution (Fig. 1b) or in a Ca^{2+}-free solution (Fig. 1c), thus excluding a Ca^{2+} entry via Gd^{3+}-insensitive channels. In both instances, hyperforin increased cytosolic concentration of Ca^{2+} in a dose-dependent manner (Fig. 1d). The half-maximal effective concentrations were 3.3 and 3.5 μM when measured in Ca^{2+}-free and in normal (2 mM Ca^{2+}) Tyrode solutions, respectively. Thus, hyperforin not only triggers the entry of Ca^{2+} through plasma membrane channels but it causes the release of Ca^{2+} from internal compartments. The blocker of TRPC channels Gd^{3+} prevents the entry of cations through the hyperforin-activated channels without altering the hyperforin-induced release of Ca^{2+}.

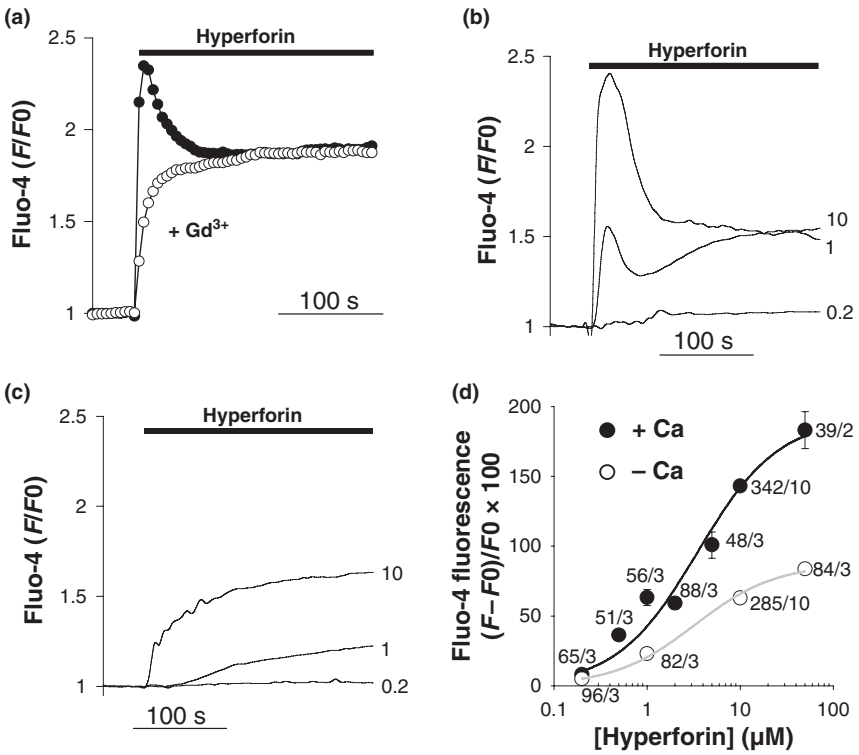


Fig. 1 Hyperforin releases Ca^{2+} from internal compartments. (a) Fluo-4 recordings from isolated cortical neurons kept 2 days in culture. The graph shows that the external application of 10 μM hyperforin causes a strong enhancement of the Fluo-4 fluorescence ($F/F0$). This response was never totally abolished by the TRPC channel blocker Gd^{3+} used at 50 μM (n = 53 cells from three culture dishes). Panels (b and c): representative Fluo-4 recordings from distinct cultured cortical neurons. Cells were kept in a normal (2 mM Ca^{2+}) Tyrode (b) or in a Ca^{2+}-free Tyrode solution (c). The external application of hyperforin (0.2, 1, and 10 μM) (indicated by the horizontal black bars) triggered a Fluo-4 response in a concentration-dependent manner. In these experiments where Gd^{3+} was not present, cells experienced only one application of hyperforin. (d) Dose–response curves obtained when hyperforin was added in the absence (open circles) or presence (filled circles) of external Ca^{2+} (2 mM). For each cell analyzed, the baseline Fluo-4 fluorescence was recorded for ≥ 1 min before adding hyperforin and averaged ($F0$). The changes in Fluo-4 fluorescence as a function of time were expressed as $(F - F0)/F0 \times 100$, with F being the maximal Fluo-4 fluorescence measured during a 250 s recording. The number of cells tested and the number of culture dishes used are given for each concentration. Mean ± SEM. When not visible, error bars are smaller than the symbol.

© 2009 The Authors

Hyperforin elevates the cytosolic concentration of Zn^{2+}

Fluo-4 is a well-known fluorescent Ca^{2+} indicator (Gee *et al.* 2000) but it can not be regarded as a specific sensitive Ca^{2+} probe because a plethora of metals like Zn, Cu, or Cd interfere with the fluorescence of Ca^{2+} sensitive dyes (Grynkiewicz *et al.* 1985; Marchi *et al.* 2000; Rousselet *et al.* 2008). Cations of metals like Fe or Mn quench the fluorescence of Ca^{2+} probes whereas the binding of Zn^{2+} gives rise to prominent fluorescent signals. An easy way to check for the contribution of Ca^{2+} in the Fluo-4 response is to use TPEN. Indeed, TPEN is a membrane permeant heavy metal chelator having a very low affinity for cations like Ca^{2+} (K_d 4×10^{-5} M for Ca^{2+}) and Mg^{2+} (Hofer *et al.* 1998) but a very high affinity for transition, mainly Zn^{2+}, metal ions (e.g. K_d 2.9×10^{-16} M for Zn^{2+}) (Arslan *et al.* 1985; Hofer *et al.* 1998). As Fe^{2+} and Mn^{2+} do not increase but rather quench the Fluo-4 fluorescence we hypothesized that the hyperforin-induced Fluo-4 signals could reflect cytosolic changes in the concentration of chelatable Zn^{2+} and/or Ca^{2+}. To check whether hyperforin elevated cytosolic concentration of Zn^{2+} ($[Zn^{2+}]_i$), the experiments illustrated in Fig. 1c were repeated but this time in the presence of TPEN. When extracellular Ca^{2+} was omitted, hyperforin increased the Fluo-4 fluorescence as already shown (Fig. 1c) but this hyperforin-induced Fluo-4 signal was markedly attenuated by TPEN (Fig. 2a). On average, the maximal increases in Fluo-4 fluorescence induced by a 250 s application of 10 μM hyperforin (added in a Ca^{2+}-free Tyrode solution) were 63 ± 1% (n = 285 from 10 culture dishes) and 8 ± 0.3% (n = 86 cells from three culture dishes), without and with TPEN (2 μM), respectively ($p < 0.001$, Student's t-test). Increasing the concentration of TPEN from 2 to 10 μM did not change the amplitude of the hyperforin-dependent Fluo-4 signals (not shown). Thus, the antidepressant mobilizes Ca^{2+} and Zn^{2+} from internal pools. To further verify the effect of hyperforin on the chelatable Zn^{2+}, we used the specific fluorescent Zn^{2+} indicator FluoZin-3 (Gee *et al.* 2002). To prevent any hyperforin-induced Zn^{2+} entry, cortical neurons were maintained in a Tyrode medium supplemented with Ca-EDTA to chelate extracellular Zn^{2+} (Kay 2004) and with Gd^{3+} to block cation channels. The addition of hyperforin gave rise to a robust elevation of the FluoZin-3 fluorescence (Fig. 2b). A subsequent addition of TPEN (2 μM) totally eliminated the hyperforin-induced FluoZin-3 response (Fig. 2b), providing further support to the idea that the antidepressant alters the homeostasis of Zn^{2+}. In Fig. 2c–e are shown images of FluoZin-3 loaded cells, before (i), during the addition of hyperforin (ii), and in the presence of TPEN (iii). Hyperforin did not seem to induce any compartmentalization of the fluorescent Zn^{2+} probe.

An oxidative stress can elevate the cytosolic concentration of free Zn^{2+} (Kroncke 2007). If hyperforin acts as an oxidant it could then give rise to FluoZin-3 signals. The oxidizing agent DTDP, known to elevate $[Zn^{2+}]_i$ in neuronal cells (Aizenman *et al.* 2000; Sensi *et al.* 2003) was used. DTDP produced a strong and long-lasting elevation of the FluoZin-3 fluorescence as illustrated in Fig. 2f. These DTDP-induced FluoZin-3 signals are smaller than the hyperforin-induced signals (Fig. 2f). This shows that cortical neurons posses a pool of Zn^{2+} that can be recruited during an oxidative stress. A subsequent application of hyperforin (still in the presence of DTDP) was followed by a very large increase of the FluoZin-3 fluorescence (Fig. 2f). The hyperforin response was thus not abolished but potentiated by DTDP (Fig. 2g). Hyperforin causes acidosis (Froestl *et al.* 2003). For instance in PC12 cells, 10 μM hyperforin causes a pH drop of ~0.6 unit (the cytosolic pH was ~7.1 and ~6.5, under control condition and in the presence of 10 μM hyperforin, respectively) (Froestl *et al.* 2003). The acidification of the cytosol could be the mechanism by which hyperforin alters the concentration of free Zn^{2+}. This was verified in the following set of experiments: FluoZin-3 loaded cortical neurons were kept in a Tyrode solution having a pH of 6.0. Lowering the extracellular pH causes an acidification of the cytosol of cortical neurons (Sensi *et al.* 2003). In our experiments, incubating cells at pH 6.0 did not evoke any FluoZin-3 signal (Fig. 2f). However, when hyperforin was added at pH 6.0, it caused a very strong elevation of the FluoZin-3 fluorescence, larger than at pH 7.4 (Fig. 2g). Taken together, these experiments show that hyperforin increases the cytosolic concentrations of free Ca^{2+} and Zn^{2+}. Acidifying the cytosol did not mimic the action of hyperforin on $[Zn^{2+}]_i$, and this latter response was not suppressed but potentiated by DTDP.

Characterization of the intracellular pools of Ca^{2+} and Zn^{2+}

We next addressed the question of the intracellular sources of Ca^{2+} and Zn^{2+}. To this aim, we first check the involvement of the endoplasmic reticulum (ER). Any release of Zn^{2+} from the ER could contribute to the hyperforin-induced Fluo-4 (or FluoZin-3) signals observed in Fig. 2. The application of Tg, an inhibitor of the ER Ca^{2+} pumps, elicited a transient Fluo-4 signal (Fig. 3a, n = 47 cells). However, FluoZin-3 loaded cells failed to respond to Tg (Fig. 3b, n = 75 cells) showing that the Tg-dependent depletion of the ER did not cause the release of Zn^{2+} but specifically reflected the leakage of Ca^{2+} out of this store. The contribution of additional intracellular stores was verified by using GPN. It provokes the osmotic lysis of lysosomes or lysosome-related organelles (Berg *et al.* 1994). These acidic compartments are known to store cations like Ca^{2+} (Haller *et al.* 1996; Srinivas *et al.* 2002) including in neural cells (Singaravelu and Deitmer 2006; McGuinness *et al.* 2007). Similar to Tg, GPN (200 μM) caused a transient Fluo-4 response (Fig. 3c) (n = 81 cells) but did not induce any FluoZin-3 signal (Fig. 3d) (n = 65 cells). The vacuolar ATPase inhibitor bafilomycin A (Bowman *et al.* 1988; Drose and Altendorf 1997) was also tested.

© 2009 The Authors

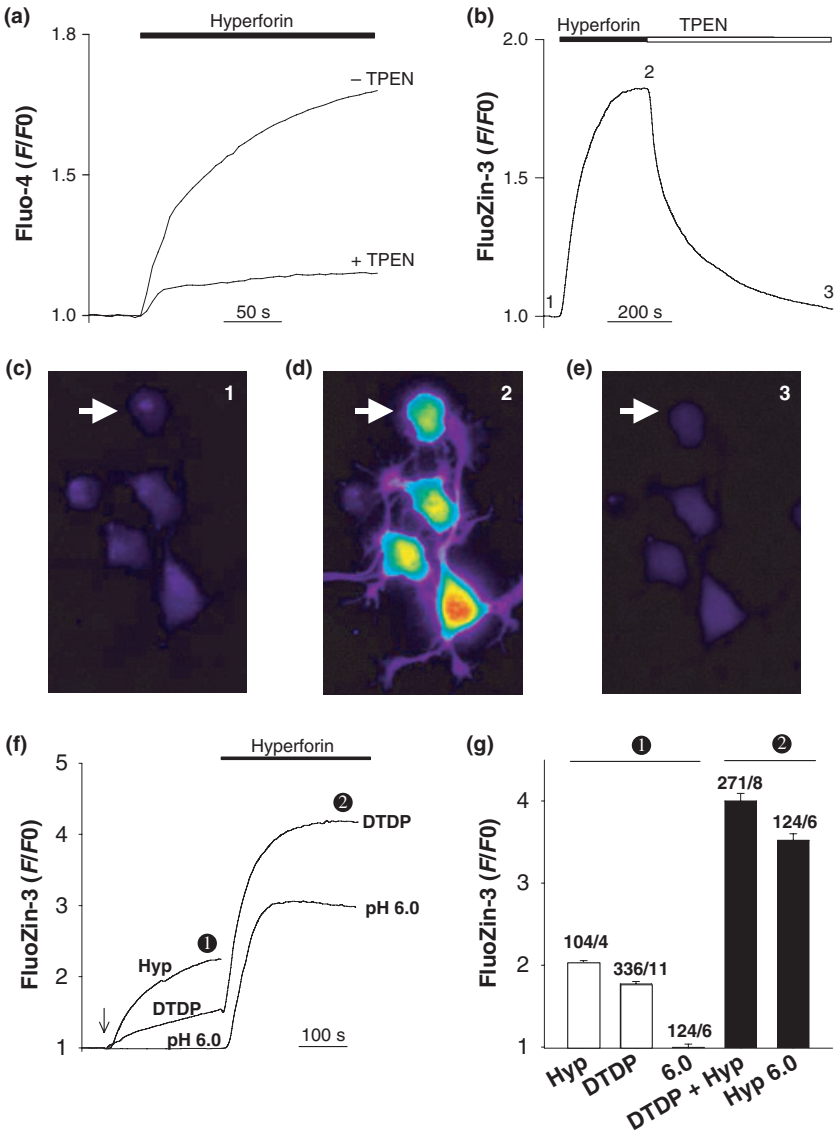


Fig. 2 Hyperforin increases the cytosolic concentration of free Ca^{2+} and Zn^{2+}. Representative Fluo-4 recordings from cortical neurons kept in a Ca^{2+}-free Tyrode solution without or with 2 μM TPEN (a). Panel (b) the experiments were performed with FluoZin-3-loaded cells bathed in a solution containing Ca-EDTA (1 mM) and Gd^{3+} (10 μM). In both instances (a and b), hyperforin (10 μM) was added when indicated (horizontal black bars). The hyperforin-induced FluoZin-3 response was observed in all cortical cells tested and was totally abolished by TPEN (2 μM) ($n = 180$ cells from three culture dishes). In (c–e) are shown cortical neurons kept 3 days *in vitro* and loaded with FluoZin-3, before (c, 1), during the application of hyperforin (10 μM, 2) (d), and in the presence of hyperforin (10 μM) + TPEN (2 μM) (e, 3). The arrow shows the cell used for the panel (b). (f) Representative FluoZin-3 traces showing the effect of hyperforin (10 μM), DTDP (100 μM) and when wells were kept at pH 6.0. The arrow indicates when hyperforin, DTDP, or the acidic Tyrode solution, pH 6.0, was added. The graph also shows the effect of a subsequent application of hyperforin (horizontal black bar) at pH 6.0 or in the presence of DTDP, pH 7.4. (g) Summary bar graph illustrating these experiments. The number of cells tested and the number of dishes used are indicated for each condition. For these experiments where the cells were kept in a Ca^{2+}-free Tyrode solution, isochronal measurements were made: the changes in FluoZin-3 fluorescence were quantified when indicated: ❶. ❷.

It blocks proton pumps located in endosomes and lysosomes (Drose and Altendorf 1997) and thus promotes the release of cations out of these compartments (Camacho *et al.* 2008; Lloyd-Evans *et al.* 2008). Regardless of the probe used, Fluo-4 ($n = 33$ cells) or FluoZin-3 ($n = 109$ cells), 0.5 μM bafilomycin A never elicited any fluorescent signal (Fig. 3e–f). In a last series of experiments, the protonophore FCCP was tested to further characterize the intracellular pools of Zn^{2+} and Ca^{2+}. FCCP alters the Ca^{2+} homeostasis by collapsing the mitochondrial membrane potential and it triggers the release of Ca^{2+} and Zn^{2+} from these organelles (Ichas *et al.* 1997; Sensi *et al.* 2002; Tu *et al.* 2009a). The

© 2009 The Authors

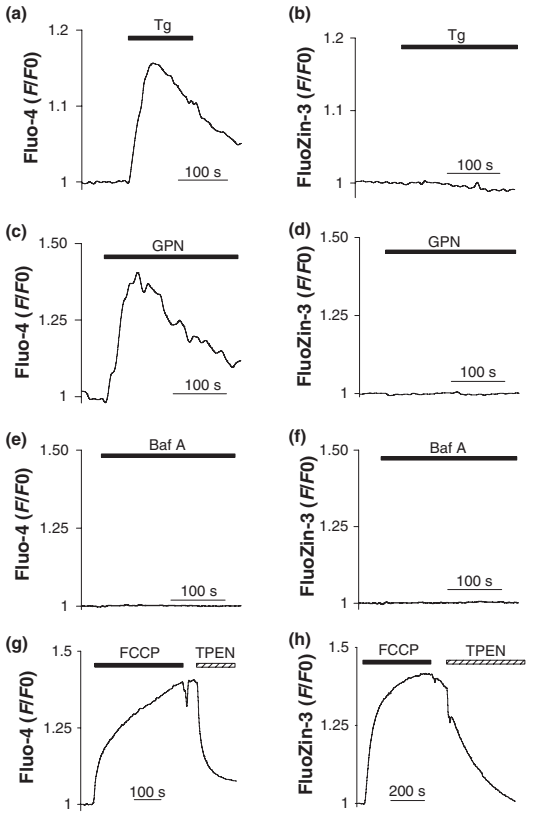


Fig. 3 Intracellular pools of Ca^{2+} and Zn^{2+}. Cortical neurons were loaded with Fluo-4 (a, c, e, and g) or FluoZin-3 (b, d, f, and h). The horizontal black bars indicated when the following agents were added: thapsigargin (Tg; 2 μM a: $n = 47$ cells, from three dishes, b: $n = 75$ from three dishes); glycyl-phenylalanine-2-naphthylamide (GPN; 200 μM, c: $n = 81$ from five dishes, d: $n = 65$ from six dishes); bafilomycin A (Baf A; 0.5 μM, e: $n = 33$ from three dishes, f: $n = 109$ from four dishes); and carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP, 2 μM, g: $n > 100$ from six dishes, h: $n = 76$ from three dishes). In (g and h) TPEN (2 μM) was added at the end of the recording. For these experiments (a–h), cells were maintained in a Ca^{2+}-free Tyrode solution.

addition of FCCP (2 μM) produced a Fluo-4 signal incompletely blocked by TPEN (Fig. 3g). On the other hand, FCCP gave rise to TPEN-sensitive FluoZin-3 signals (Fig. 3h). These responses were observed in all cells tested ($n > 100$ for Fluo-4, and $n = 76$ cells for FluoZin-3). Altogether, the results depicted in Fig. 3 indicate that cortical neurons possess (i) Tg-, GPN- and FCCP-sensitive Ca^{2+} stores and (ii) FCCP-sensitive Zn^{2+} stores. As FCCP is a potent mitochondrial uncoupler, hyperforin was applied on isolated brain mitochondria to verify whether it effectively releases Zn^{2+} from these organelles.

Hyperforin releases Zn^{2+} from isolated brain mitochondria

The application of FCCP to isolated brain mitochondria preincubated with the non-permeant form of Fluo-4 gave rise to a strong Fluo-4 signal (Fig. 4a) as already shown (Tu *et al.* 2009a). A subsequent addition of hyperforin (1 μM) had no additional effect (Fig. 4a). However, if hyperforin was added without FCCP, it produced a strong elevation of the Fluo-4 fluorescence (Fig. 4b). The hyperforin-induced Fluo-4 signals were strongly reduced in the presence of the Zn^{2+} chelator TPEN (2.5 μM, $n = 4$) (Fig. 4b) confirming that the antidepressant releases this metal from mitochondria. It is worth noting that hyperforin elicited a TPEN-resistant Fluo-4 signal which most likely reflected the release of Ca^{2+} from mitochondria. CsA, acting on cyclophylin D, a putative component of the mitochondrial permeability transition pore (Kroemer *et al.* 2007), and ruthenium red, a blocker of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (O'Rourke 2007), were used. CsA (5 μM, $n = 4$) had no effect but ruthenium red (3 μM, $n = 4$) completely blocked the hyperforin-induced Fluo-4 signal (Fig. 4b). Similar experiments were realized with the non-permeant form of the Zn^{2+} probe FluoZin-3 (Fig. 2c and d). The addition of FCCP provoked a time-dependent increase of the FluoZin-3 fluorescence that disappeared in the presence of low concentrations of TPEN ($n = 5$) (Fig. 2c). Similarly, hyperforin augmented the FluoZin-3 fluorescence ($n = 10$) (Fig. 2d). This effect was prevented by ruthenium red (added before hyperforin) ($n = 6$) and abolished by TPEN ($n = 10$) (Fig. 2d). A previous report showed that hyperforin has protonophore-like properties (Roz and Rehavi 2003). Its action on the mitochondrial membrane potential was assessed by using the fluorescent cyanine dye diS-C3-(5) (Waggoner 1979; Tu *et al.* 2009a). The addition of hyperforin (2 μM) to isolated brain mitochondria enhanced the diS-C3-(5) fluorescence (Fig. 4e), showing that it collapsed the mitochondrial membrane potential (Waggoner 1979). A subsequent addition of FCCP had no additional effect. In summary, these experiments show that hyperforin probably exerts an uncoupling action on isolated mitochondria by collapsing the membrane potential. This is accompanied by the release of Ca^{2+} and Zn^{2+} via a ruthenium red-sensitive mechanism.

Discussion

The antidepressant hyperforin exerts multiple cellular actions but it is now currently used to explore the properties and functions of TRPC6 channels. Indeed, hyperforin activates TRPC6, giving rise to a non-selective cation current (Leuner *et al.* 2007). Experiments conducted on cultured cortical neurons loaded with the sensitive Ca^{2+} probe Fluo-4 showed that hyperforin induced cytosolic Ca^{2+} changes (Tu *et al.* 2009b). However, the hyperforin-induced Fluo-4 signals were incompletely eliminated by Gd^{3+}, a potent blocker of TRPC channels, even when present at high concentrations (e.g. 50 μM). Based on this observation we hypothesized that the Gd^{3+}-resistant Fluo-4 responses triggered by hyperforin could reflect the release of Ca^{2+} from internal stores. But, as

© 2009 The Authors

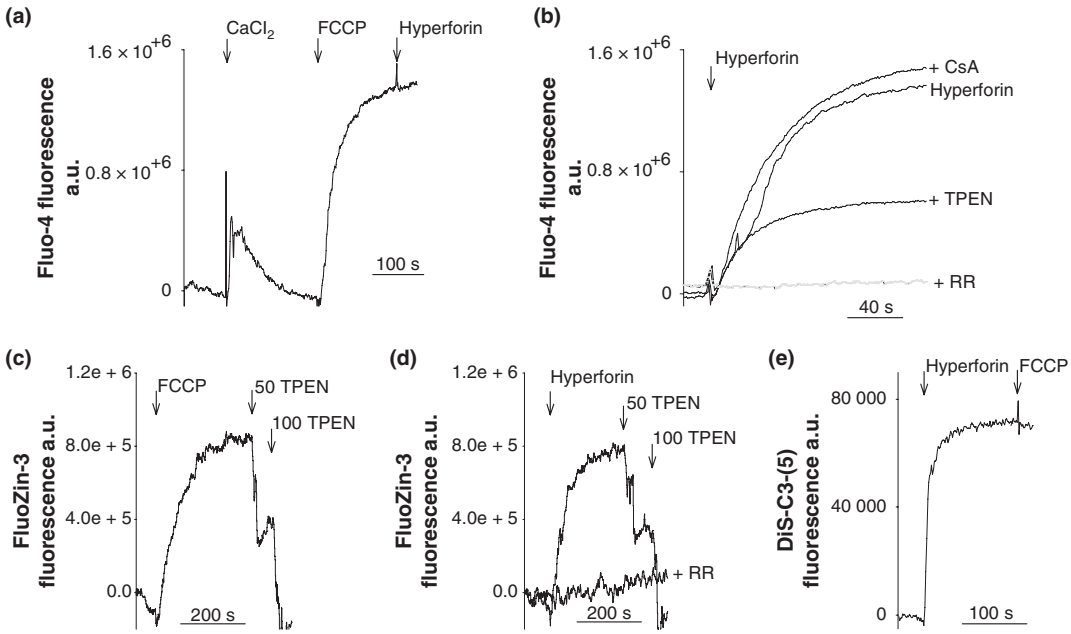


Fig. 4 Hyperforin releases Zn^{2+} from isolated brain mitochondria. To assess the functional state of the isolated mitochondria, Ca^{2+} (1 μM) was added to the medium. This provoked a rapid increase in Fluo-4 fluorescence followed by a delayed decline reflecting the mitochondrial Ca^{2+} uptake (Tu *et al.* 2009a). Panel (a) shows that FCCP (2 μM) produced a strong elevation of the Fluo-4 fluorescence. A subsequent addition of hyperforin (2.5 μM) had no effect. (b) Without FCCP, hyperforin (1 μM) caused a robust Fluo-4 signal insensitive to CsA (5 μM, $n = 4$) but strongly blocked by ruthenium red (3 μM, $n = 4$) (b). In the presence of TPEN (2.5 μM, $n = 4$), hyperforin caused a smaller Fluo-4 response (b). In these experiments, CsA, ruthenium red or TPEN were added to the recording medium (containing the isolated mitochondria) at least 2 min before hyperforin (c and d). The same experiments as in panels (a–b) were conducted but with the cell impermeant form of the Zn^{2+} probe FluoZin-3. Representative FluoZin-3 recordings are shown. The application of FCCP (5 μM, $n = 7$) gave rise to FluoZin-3 signals that were depressed by low concentrations of TPEN (50, 100 nM) (c). The arrows indicate when FCCP and TPEN were added. Panel (d), same experiment as in (c) but FCCP was replaced by hyperforin (5 μM, $n = 10$). The addition of ruthenium red (3 μM, $n = 6$) 3–4 min before hyperforin suppressed the hyperforin-dependent FluoZin-3 responses. Similarly to FCCP, TPEN (50 and 100 nM) eliminated the hyperforin-dependent FluoZin-3 signals. Panel (e) shows the effect of hyperforin on the mitochondrial membrane potential. The addition of the antidepressant on isolated brain mitochondria strongly enhanced the diS-C3-(5) fluorescence (c). A subsequent application of FCCP (2 μM) had no additional effect, indicating that the mitochondrial membrane was completely depolarized. A representative trace from four independent experiments is shown.

pointed out by other authors (Martin *et al.* 2006), caution is required when interpreting data obtained with fluorescent Ca^{2+} probes because they are sensitive to metals like Zn or Fe endogenously present in all living cells. This difficulty has for instance been recently illustrated in lymphocytes where thymerosal, described as a Ca^{2+} mobilizing agent, releases Zn^{2+} but no Ca^{2+} from internal compartments (Haase *et al.* 2009). These data prompted us to determine whether hyperforin could alter the intracellular homeostasis of cations like Ca^{2+} and Zn^{2+}.

FluoZin-3 is a specific fluorescent Zn^{2+} indicator (Gee *et al.* 2002), insensitive to Ca^{2+} and Mg^{2+} (Devinney *et al.* 2005). It has become a very useful tool for studying Zn^{2+} homeostasis. Our data clearly show that hyperforin enhanced the FluoZin-3 fluorescence in living neurons. This hyperforin-dependent FluoZin-3 signal could reflect an uptake of Zn^{2+} because this cation is a common contaminant present in physiological solutions but a chelator like Ca-EDTA minimizes this drawback (Kay 2004). Even when cells were kept in a Tyrode solution supplemented with Ca-EDTA, hyperforin was still able to elevate the FluoZin-3 fluorescence. Moreover, Gd^{3+}, a blocker of cation channels, did not prevent the hyperforin-dependent FluoZin-3 responses, showing that they had an intracellular origin. It is concluded that hyperforin did not promote the entry of Zn^{2+} but rather mobilized this cation from intracellular pools.

In neurons, the putative sources of intracellular Zn^{2+} are metallothioneins, an important family of Zn^{2+}-binding proteins which reversibly bind this metal (West *et al.* 2008), and synaptic vesicles (Palmiter *et al.* 1996; Paoletti *et al.* 2009). It is however important to mention that all the data reported in this study were obtained on immature cortical neurons kept for only 2–4 days in culture, before synaptogenesis and the establishment of a mature synaptically connected neuronal network. Experiments conducted

© 2009 The Authors

with bafilomycin A and GPN, known to act on acidic compartments (including synaptic vesicles), suggested that these stores did not contribute to the Zn^{2+} signal observed in response to the addition of hyperforin. Besides synaptic vesicles, various intracellular membrane-delimited compartments can store cations (e.g. the ER, lysosomes and lysosomes-like organelles, peroxisomes, and mitochondria). In our experiments, we found no evidence for the presence of a lysosomal pool of Zn^{2+}. However, in hippocampal neurons, an oxidative stress can permit the accumulation of this metal into these organelles (Hwang *et al.* 2008). Whether this phenomenon also occurs in cortical neurons has not been investigated. Inhibiting the Ca^{2+} pumps of the ER with Tg released Ca^{2+} but not Zn^{2+}. A similar observation was recently made on lymphocytes (Haase *et al.* 2009). Except for FCCP, none of the agents used (Tg, GPN, and bafilomycin A) elevated the FluoZin-3 fluorescence, pointing to mitochondria as the putative hyperforin-sensitive Zn^{2+} pool. This was confirmed by experiments carried out on isolated brain mitochondria. Hyperforin caused a robust Fluo-4 signal that was strongly attenuated by TPEN. It also elicited TPEN-sensitive FluoZin-3 responses. These results seem to indicate the presence of a mitochondrial pool of Zn^{2+} in cortical neurons. However, whether these organelles really represent a physiologically relevant Zn^{2+} storage site is currently under debate but previous studies reported the presence of a mitochondrial pool of Zn^{2+} in cortical neurons (Sensi *et al.* 2002; Malaiyandi *et al.* 2005). More recently, by using genetically targeted Zn^{2+} sensors to monitor the spatial distribution of Zn^{2+} (Dittmer *et al.* 2009) reported the presence of a labile and releasable pool of this metal in mitochondria of cultured hippocampal neurons. Although this matter is still debated, a growing number of studies suggest that mitochondria are a likely Zn^{2+} source. The mitochondrial Zn^{2+} uptake occurs via the Ca^{2+} uniporter (in a ruthenium-sensitive manner) (Caporale *et al.* 2009) and via a non-identified ruthenium red-insensitive pathway (Malaiyandi *et al.* 2005). On the other hand, the mechanisms controlling the mitochondrial Zn^{2+} efflux are still not characterized (Malaiyandi *et al.* 2005). In isolated murine brain mitochondria, ruthenium red, a blocker of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (O'Rourke 2007; Demaurex *et al.* 2009), strongly attenuated the hyperforin-induced release of Zn^{2+}. Ruthenium red can however influence the activity of other intracellular targets like ryanodine receptors, the voltage-dependent anion channels (Hajnoczky *et al.* 2006) and the so-called 'rapid-mode' uptake (Gunter and Sheu 2009). Interestingly, under certain conditions, ryanodine receptors can mediate a release of Ca^{2+} from mitochondria (O'Rourke 2007). But, to our knowledge, the presence of these Ca^{2+} channels in brain mitochondria has never been documented. Whatever the exact molecular identity of the hyperforin-sensitive mitochondrial target allowing the efflux of cations, our data show that this antidepressant releases Zn^{2+} and Ca^{2+} from mitochondria via a ruthenium red-sensitive process. Hyperforin collapses the mitochondrial membrane potential which is in agreement with a previous report demonstrating that, similarly to FCCP, the antidepressant has protonophore properties (Roz and Rehavi 2003). The hyperforin-induced loss of the mitochondrial potential permits the passive release of Ca^{2+} and Zn^{2+} out of these organelles.

Hyperforin is a potent uptake inhibitor of various neurotransmitters (Chatterjee *et al.* 1998; Nathan 1999). However, this latter characteristic does not seem to explain its antidepressant action. So far, the molecular mechanisms by which hyperforin alleviates mild depressions are unknown. Interestingly, it alters the neuronal homeostasis of zinc. Of note, clinical data show that subjects suffering from depression exhibit lower zinc serum levels than non-depressed control subjects (Nowak *et al.* 2005). As importantly, zinc has antidepressant properties (Szewczyk *et al.* 2008). Synthetic antidepressants like imipramine and citalopram affect zinc concentration in the blood serum and in the brain (Szewczyk *et al.* 2008). Moreover, zinc supplementation exerts an antidepressant-like activity and enhances the effects of synthetic antidepressants (Szewczyk *et al.* 2008). *In vitro* experiments, data collected from animal studies as well as clinical and postmortem studies point to a role of zinc in the physiopathology of depression and in its treatment. Whether the hyperforin-induced alteration of the neuronal homeostasis of Zn^{2+} is involved in its antidepressant action remains to be shown.

In conclusion, this report reveals that hyperforin collapses the mitochondrial membrane potential and releases Ca^{2+} and Zn^{2+} from these organelles via a ruthenium red-sensitive mechanism. Hyperforin is now commonly used to understand the functions and properties of native TRPC6 channels. However, when considering its large number of targets located either in the plasma membrane or intracellularly, caution is needed when interpreting data obtained with this protonophore-like agent disturbing Ca^{2+} and Zn^{2+} homeostasis.

Acknowledgements

We wish to thank Drs G. Brandolin for his help with the experiments on isolated brain mitochondria, J.-M. Moulis and P. Paoletti for their helpful comments on a previous version of this manuscript. We also wish to thank W. Schwabe (Karlsruhe, Germany) for the kind gift of hyperforin. This study was supported by a grant from l'Agence Nationale de la Recherche (06-SEST-038).

References

Aizenman E., Stout A. K., Hartnett K. A., Dineley K. E., McLaughlin B. and Reynolds I. J. (2000) Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release. *J. Neurochem.* **75**, 1878–1888.

© 2009 The Authors

Arslan P., Di Virgilio F., Beltrame M., Tsien R. Y. and Pozzan T. (1985) Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca^{2+}. *J. Biol. Chem.* **260**, 2719–2727.

Berg T. O., Stromhaug P. E., Berg T. and Seglen P. O. (1994) Separation of lysosomes and autophagosomes by means of glycyl-phenylalanine-naphthylamide, a lysosome-disrupting cathepsin-C substrate. *Eur. J. Biochem.* **221**, 595–602.

Bouron A., Altafaj X., Boisseau S. and De Waard M. (2005) A store-operated Ca^{2+} influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca^{2+} stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **159**, 64–71.

Bowman E. J., Siebers A. and Altendorf K. (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 7972–7976.

Camacho M., Machado J. D., Alvarez J. and Borges R. (2008) Intravesicular calcium release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: a study with adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 22383–22389.

Caporale T., Ciavardelli D., Di Ilio C., Lanuti P., Drago D. and Sensi S. L. (2009) Ratiometric-pericam-mt, a novel tool to evaluate intramitochondrial zinc. *Exp. Neurol.* **218**, 228–234.

Chatterjee S. S., Bhattacharya S. K., Wonnemann M., Singer A. and Muller W. E. (1998) Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sci.* **63**, 499–510.

Chatterjee S., Filippov V., Lishko P., Maximyuk O., Noldner M. and Krishtal O. (1999) Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. *Life Sci.* **65**, 2395–2405.

Chinopoulos C., Starkov A. A. and Fiskum G. (2003) Cyclosporin A-insensitive permeability transition in brain mitochondria: inhibition by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *J. Biol. Chem.* **278**, 27382–27389.

Demaurex N., Poburko D. and Frieden M. (2009) Regulation of plasma membrane calcium fluxes by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 1383–1394.

Devinney M. J. 2nd, Reynolds I. J. and Dineley K. E. (2005) Simultaneous detection of intracellular free calcium and zinc using fura-2FF and FluoZin-3. *Cell Calcium* **37**, 225–232.

Dittmer P. J., Miranda J. G., Gorski J. A. and Palmer A. E. (2009) Genetically encoded sensors to elucidate spatial distribution of cellular zinc. *J. Biol. Chem.* **284**, 16289–16297.

Drose S. and Altendorf K. (1997) Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* **200**, 1–8.

Eckert G. P., Keller J. H., Jourdan C., Karas M., Volmer D. A., Schubert-Zsilavecz M. and Muller W. E. (2004) Hyperforin modifies neuronal membrane properties *in vivo*. *Neurosci. Lett.* **367**, 139–143.

Fisunov A., Lozovaya N., Tsintsadze T., Chatterjee S., Noldner M. and Krishtal O. (2000) Hyperforin modulates gating of P-type Ca^{2+} current in cerebellar Purkinje neurons. *Pflugers Arch.* **440**, 427–434.

Froestl B., Steiner B. and Muller W. E. (2003) Enhancement of proteolytic processing of the beta-amyloid precursor protein by hyperforin. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 2177–2184.

Gee K. R., Brown K. A., Chen W. N., Bishop-Stewart J., Gray D. and Johnson I. (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* **27**, 97–106.

Gee K. R., Zhou Z. L., Ton-That D., Sensi S. L. and Weiss J. H. (2002) Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. *Cell Calcium* **31**, 245–251.

Grynkiewicz G., Poenie M. and Tsien R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450.

Gunter T. E. and Sheu S. S. (2009) Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 1291–1308.

Haase H., Hebel S., Engelhardt G. and Rink L. (2009) Zinc ions cause the thimerosal-induced signal of fluorescent calcium probes in lymphocytes. *Cell Calcium* **45**, 185–191.

Hajnoczky G., Csordas G., Das S., Garcia-Perez C., Saotome M., Sinha Roy S. and Yi M. (2006) Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. *Cell Calcium* **40**, 553–560.

Haller T., Dietl P., Deetjen P. and Volkl H. (1996) The lysosomal compartment as intracellular calcium store in MDCK cells: a possible involvement in InsP3-mediated Ca^{2+} release. *Cell Calcium* **19**, 157–165.

Hofer A. M., Fasolato C. and Pozzan T. (1998) Capacitative Ca^{2+} entry is closely linked to the filling state of internal Ca^{2+} stores: a study using simultaneous measurements of ICRAC and intraluminal $[Ca^{2+}]$. *J. Cell Biol.* **140**, 325–334.

Hwang J. J., Lee S. J., Kim T. Y., Cho J. H. and Koh J. Y. (2008) Zinc and 4-hydroxy-2-nonenal mediate lysosomal membrane permeabilization induced by H2O2 in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **28**, 3114–3122.

Ichas F., Jouaville L. S. and Mazat J. P. (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* **89**, 1145–1153.

Kay A. R. (2004) Detecting and minimizing zinc contamination in physiological solutions. *BMC Physiol.* **4**, 4.

Kroemer G., Galluzzi L. and Brenner C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**, 99–163.

Kroncke K. D. (2007) Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* **463**, 183–187.

Kumar V., Mdzinarishvili A., Kiewert C., Abbruscato T., Bickel U., van der Schyf C. J. and Klein J. (2006) NMDA receptor-antagonistic properties of hyperforin, a constituent of St. John's Wort. *J. Pharmacol. Sci.* **102**, 47–54.

Leuner K., Kazanski V., Muller M., Essin K., Henke B., Gollasch M., Harteneck C. and Muller W. E. (2007) Hyperforin – a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J.* **21**, 4101–4111.

Lloyd-Evans E., Morgan A. J., He X., Smith D. A., Elliot-Smith E., Sillence D. J., Churchill G. C., Schuchman E. H., Galione A. and Platt F. M. (2008) Niemann–Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat. Med.* **14**, 1247–1255.

Malaiyandi L. M., Vergun O., Dineley K. E. and Reynolds I. J. (2005) Direct visualization of mitochondrial zinc accumulation reveals uniporter-dependent and -independent transport mechanisms. *J. Neurochem.* **93**, 1242–1250.

Marchi B., Burlando B., Panfoli I. and Viarengo A. (2000) Interference of heavy metal cations with fluorescent Ca^{2+} probes does not affect Ca^{2+} measurements in living cells. *Cell Calcium* **28**, 225–231.

Martin J. L., Stork C. J. and Li Y. V. (2006) Determining zinc with commonly used calcium and zinc fluorescent indicators, a question on calcium signals. *Cell Calcium* **40**, 393–402.

McGuinness L., Bardo S. J. and Emptage N. J. (2007) The lysosome or lysosome-related organelle may serve as a Ca^{2+} store in the boutons of hippocampal pyramidal cells. *Neuropharmacology* **52**, 126–135.

Mennini T. and Gobbi M. (2004) The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Sci.* **75**, 1021–1027.

© 2009 The Authors

Muller W. E. (2003) Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol. Res.* **47**, 101–109.

Muller M., Essin K., Hill K. *et al.* (2008) Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **283**, 33942–33954.

Nathan P. (1999) The experimental and clinical pharmacology of St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Mol. Psychiatry* **4**, 333–338.

Nowak G., Szewczyk B. and Pilc A. (2005) Zinc and depression. An update. *Pharmacol. Rep.* **57**, 713–718.

O'Rourke B. (2007) Mitochondrial ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 19–49.

Palmiter R. D., Cole T. B., Quaife C. J. and Findley S. D. (1996) ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 14934–14939.

Paoletti P., Vergnano A. M., Barbour B. and Casado M. (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* **158**, 126–136.

Rousselet E., Richaud P., Douki T., Chantegrel J. G., Favier A., Bouron A. and Moulis J. M. (2008) A zinc-resistant human epithelial cell line is impaired in cadmium and manganese import. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **230**, 312–319.

Roz N. and Rehavi M. (2003) Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. *Life Sci.* **73**, 461–470.

Sensi S. L., Ton-That D. and Weiss J. H. (2002) Mitochondrial sequestration and Ca(2+)-dependent release of cytosolic Zn(2+) loads in cortical neurons. *Neurobiol. Dis.* **10**, 100–108.

Sensi S. L., Ton-That D., Sullivan P. G., Jonas E. A., Gee K. R., Kaczmarek L. K. and Weiss J. H. (2003) Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn^{2+} pools. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 6157–6162.

Singaravelu K. and Deitmer J. W. (2006) Calcium mobilization by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) in rat astrocytes. *Cell Calcium* **39**, 143–153.

Srinivas S. P., Ong A., Goon L. and Bonanno J. A. (2002) Lysosomal Ca(2+) stores in bovine corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2341–2350.

Szewczyk B., Poleszak E., Sowa-Kucma M. *et al.* (2008) Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. *Pharmacol. Rep.* **60**, 588–589.

Treiber K., Singer A., Henke B. and Muller W. E. (2005) Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). *Br. J. Pharmacol.* **145**, 75–83.

Tu P., Brandolin G. and Bouron A. (2009a) The anti-inflammatory agent flufenamic acid depresses store-operated channels by altering mitochondrial calcium homeostasis. *Neuropharmacology* **56**, 1010–1016.

Tu P., Kunert-Keil C., Lucke S., Brinkmeier H. and Bouron A. (2009b) Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. *J. Neurochem.* **108**, 126–138.

Waggoner A. S. (1979) The use of cyanine dyes for the determination of membrane potentials in cells, organelles, and vesicles. *Methods Enzymol.* **55**, 689–695.

West A. K., Hidalgo J., Eddins D., Levin E. D. and Aschner M. (2008) Metallothionein in the central nervous system: roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology* **29**, 488–502.

Zanoli P. (2004) Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drug Rev.* **10**, 203–218.

© 2009 The Authors

Conclusion et perspectives

Cette étude est basée sur une observation montrant la dualité de la réponse hyperforine dans les neurones corticaux[95]. Point de départ de nos expériences, nous avons montré par l'imagerie de fluorescence Fluo4 que l'hyperforine induit une réponse calcique transitoire sensible au gadolinium et une réponse prolongée insensible au gadolinium[95].

Cette seconde réponse n'est donc pas due à la présence des canaux TRPC6 (inhibés par le Gd) mais provient d'une libération de cations depuis un stock interne. La sonde Fluo4 est couramment utilisée pour observer des flux de calcium cependant cette sonde est peu sélective vis-à-vis de ce cation[403,423]. En effet, elle est sensible au Fe ou au Zn. Nous avons vérifié la nature des signaux mesurés en ajoutant du TPEN (chélateur spécifique du zinc) et nous avons observé que ces signaux Fluo4 sont en grande partie supprimés par ce chélateur. Il semble donc que l'hyperforine induise une libération de calcium et de zinc depuis des compartiments intracellulaires. Nous avons confirmé ce résultat en utilisant une sonde spécifique du zinc, le FluoZin-3. Cette étude et celle présentée en annexe (Gibon et al**.,** The thiol-modifying agent N-ethylmaleimide elevates the cytosolic concentration of free Zn^{2+} but not of Ca^{2+} in murine cortical neurons. *Cell calcium* (48) 37-43 (2010)[403]) illustrent les précautions à prendre lors de l'utilisation de la sonde Fluo4 pour enregistrer des variations calciques cytosoliques.

La suite de l'étude a consisté en la détermination des pools de calcium et de zinc intracellulaires affectés par l'hyperforine. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé une approche pharmacologique. Elle a permis de mettre en évidence le pool calcique sensible à la thapsigargine (réticulum endoplasmique), celui sensible au GPN (lysosomes) et celui sensible au FCCP (mitochondrie). En ce qui concerne les pools de zinc intracellulaires, nous avons uniquement détecté un pool de zinc sensible au FCCP en plus de celui sensible au DTDP (Cf article 1). Le fait de ne pas trouver de pool de zinc au niveau vésiculaire (compartiments riches en zinc dans certains neurones) est probablement du au modèle cellulaire de neurones cultivés *in vitro*. En effet, nous utilisons les neurones 2 à 4 jours après leur mise en culture c'est-à-dire avant la mise en place d'un réseau synaptique.

Nous avons posé l'hypothèse que l'hyperforine touche les mitochondries et induit une libération de calcium et de zinc depuis ce compartiment. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des mitochondries isolées de cerveaux de souris nouveau-nés et les sondes Fluo4 et FluoZin-3 non AM (donc non perméantes). Nous avons observé une libération de calcium et de zinc depuis les mitochondries. Cet efflux de cation se produit aussi en présence de FCCP. L'hyperforine et le FCCP agissent sur le même compartiment intracellulaire. L'action de

l'hyperforine sur la mitochondrie est inhibée en présence de rouge de ruthénium (un bloqueur de l'uniporteur calcique mitochondrial) ce qui suggère que l'efflux du zinc se fait via cette voie. Il serait maintenant intéressant de regarder au niveau cellulaire cette libération de zinc depuis les mitochondries avec une autre approche par exemple en utilisant la sonde RhodZin-3 ce qui permettrait de mesurer directement l'efflux de zinc depuis ces compartiments[403].

L'action de l'hyperforine sur les mitochondries semble aussi passer par une perte du potentiel de membrane mitochondriale (comme pour le protonophore FCCP), provoquant une fuite passive des cations hors de ce compartiment. La mitochondrie est le siège de la production d'espèces réactives de l'oxygène, ce résultat peut aussi être le signe d'une possible toxicité de l'hyperforine sur les neurones.

L'hyperforine est un antidépresseur utilisé dans le traitement des formes légères à modérées. En clinique humaine, les médicaments à base d'hyperforine impliquent des traitements de plusieurs jours voire semaines. Ceci nous a incité à nous intéresser aux conséquences d'un traitement chronique avec cet antidépresseur.

Article 4 : L'hyperforine modifie les capacités de séquestration du zinc dans les cellules neuronales.

Introduction

De nombreux travaux ont montré qu'*in vitro* l'hyperforine pouvait entrainer la mort de divers types cellulaires. Il est d'ailleurs intéressant de noter que ce composé possède, entre autres, des propriétés anti-angiogénique[390] et antiproliférative[392]. Pour notre étude, nous avons choisi une concentration de 1 µM et vérifié qu'elle ne provoquait pas de mort cellulaire, en accord avec d'autres travaux[424]. Les cellules en culture seront traitées pendant 72h. En parallèle, des souris seront traitées quotidiennement par voie intra-péritonéale avec une dose de 4 mg d'hyperforine/kg pendant 4 semaines pour tester l'effet de cet antidépresseur sur l'homéostasie des métaux au niveau du cerveau de ces souris. Le dosage utilisé correspond à celui recommandé par l'entreprise pharmaceutique (Willmar Schwabe, GmbH and Co) qui nous fournit le médicament.

The antidepressant hyperforin changes the zinc-buffering capacities of brain cells

Neuropharmacology xxx (2011) 1–6

Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Hyperforin changes the zinc-storage capacities of brain cells

Julien Gibon [a,b,f], Pierre Richaud [c,d,e], Alexandre Bouron [a,b,f,*]

[a] UMR CNRS 5249, Grenoble, France
[b] CEA, DSV, IRTSV, Grenoble, France
[c] CEA, DSV, iBEB, Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation, F-13108 St Paul les Durance, France
[d] CNRS, UMR 6191, F-13108 St Paul les Durance, France
[e] Université Aix-Marseille, F-13108 St Paul les Durance, France
[f] Université Joseph Fourier, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 April 2011
Received in revised form
19 July 2011
Accepted 3 August 2011

Keywords:
Hyperforin
Calcium
Zinc
Neurones
Calcium channels
Calcium stores
Mice

ABSTRACT

In vitro and *in vivo* experiments were carried out to investigate the consequences on brain cells of a chronic treatment with hyperforin, a plant extract known to dissipate the mitochondrial membrane potential and to release Zn^{2+} and Ca^{2+} from these organelles. Dissociated cortical neurons were grown in a culture medium supplemented with 1 μM hyperforin. Live-cell imaging experiments with the fluorescent probes FluoZin-3 and Fluo-4 show that a 3 day-hyperforin treatment diminishes the size of the hyperforin-sensitive pools of Ca^{2+} and Zn^{2+} whereas it increases the size of the DTDP-sensitive pool of Zn^{2+} without affecting the ionomycin-sensitive pool of Ca^{2+}. When assayed by quantitative PCR the levels of mRNA coding for metallothioneins (MTs) I, II and III were increased in cortical neurons after a 3 day-hyperforin treatment. This was prevented by the zinc chelator TPEN, indicating that the plant extract controls the expression of MTs in a zinc-dependent manner. Brains of adult mice who received a daily injection (i.p.) of hyperforin (4 mg/kg/day) for 4 weeks had a higher sulphur content than control animals. They also exhibited an enhanced expression of the genes coding for MTs. However, the long-term treatment did not affect the brain levels of calcium and zinc. Based on these results showing that hyperforin influences the size of the internal pools of Zn^{2+}, the expression of MTs and the brain cellular sulphur content, it is proposed that hyperforin changes the Zn-storage capacity of brain cells and interferes with their thiol status.

© 2011 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The medicinal plant *Hypericum perforatum*, also named St John's Wort (SJW), exhibits interesting pharmacological properties with anti-bacterial, anti-tumoral and anti-angiogenic properties (Medina et al., 2006; Schempp et al., 1999). It also exerts neurological actions (Griffith et al., 2010) and, is now currently used for the treatment of mild to moderate depression (Di Carlo et al., 2001; Linde et al., 1996; Muller, 2003; Nathan, 1999). *In vitro* experiments showed that hyperforin, one of the main extract of SJW, blocks the uptake of several neurotransmitters like dopamine, serotonin, noradrenaline and glutamate (Chatterjee et al., 1998) whereas *in vivo*, it elevates in the brain of rats the extracellular levels of glutamate, dopamine, noradrenaline and serotonin but not of GABA (Kaehler et al., 1999). It seems to influence the uptake of neurotransmitters by increasing the free cytosolic concentration of Na^{+} (Singer et al., 1999). Since these first studies, many reports have provided new and relevant data on the pharmacological properties of hyperforin. Among other features, this plant extract influences the cellular homeostasis of Ca^{2+}. For instance, it blocks some Ca^{2+}-conducting channels like voltage-gated Ca^{2+} channels and NMDA receptors (Chatterjee et al., 1999; Kumar et al., 2006). Although it is a potent blocker of plasma membrane ion channels it paradoxically has the unique property to activate a specific TRPC channel, TRPC6, which gives rise to prominent cytosolic Ca^{2+} signals (Leuner et al., 2007). Hyperforin can also elevate the cytosolic concentration of free Ca^{2+} by promoting the release of Ca^{2+} (Koch and Chatterjee, 2001) from mitochondria (Tu et al., 2010). Acutely applied, it collapses the mitochondrial membrane potential and affects the morphology and properties of mitochondria (Schempp et al., 2002; Tu et al., 2010). It provokes the release of cytochrome *c* (Schempp et al., 2002) and the mobilisation of Ca^{2+} and Zn^{2+} (Tu et al., 2010). Hyperforin exerts thus complex actions on neuronal Ca^{2+} signalling: it is able to promote the entry (via TRPC6 channels) and the release of Ca^{2+} from internal

* Corresponding author. Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS 5249, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France. Tel.: +33 4 38 78 44 23; fax: +33 4 38 78 54 87.
E-mail address: alexandre.bouron@cea.fr (A. Bouron).

0028-3908/$ – see front matter © 2011 Published by Elsevier Ltd.
doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.002

compartments (e.g. mitochondria) while it potently blocks plasma membrane Ca^{2+}-conducting channels (e.g. NMDA receptors).

We recently showed that, acutely applied, hyperforin triggers the release of Ca^{2+} and Zn^{2+} from brain mitochondria in a concentration-dependent manner (Tu et al., 2010). This result prompted us to precise its biological effects particularly on the homeostasis of Zn^{2+}. After having investigated some of the neuronal responses observed after an acute application of hyperforin, we then looked at the effects of a chronic treatment. Our past (Tu et al., 2010) and present data show hyperforin has the property to influence the Zn^{2+}-storage capacities of brain cells.

2. Experimental

2.1. Preparation of primary cultures of cortical neurons

Cortical neurons were prepared according to a protocol validated by the Ethical Committee of Rhône-Alpes Region and by ComEth (Grenoble, France) (Bouron et al., 2006). After plating, cortical cells were allowed to grow for 6 h at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO_2) before adding hyperforin (1 μM) or its vehicle (DMSO). The culture Neurobasal medium was renewed everyday. A fresh hyperforin-culture medium was prepared from a stock hyperforin solution (10 mM in DMSO). The final concentration of DMSO in the culture medium was <0.1%. In control experiments, cells were incubated with DMSO only. These DMSO-treated cells had the same phenotype as DMSO-untreated cells.

2.2. Expression of metallothioneins by qPCR

Total RNA was isolated from cortical neurons grown 6 days *in vitro* (DIV) using the TQ-RNA binding resin (Total Quick RNA cells and tissues kit, Talent, Trieste, Italy). Total RNA from cortices isolated from adult brain was isolated using the Nucleospin® RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel, France) according to the manufacturer' instructions. The RNA concentration was determined using a NanoDrop ND1000 spectrophotometer equipped with the ND1000 software (version 3.5.1, Labtech, Palaiseau, France). An amount of 100 ng total RNA was reverse transcribed using oligo DT18 primers and M-MuLV Reverse Transcriptase reagents (Euromedex, Souffelweyersheim, France). The expression levels of MT-I, -II, and -III were determined by quantitative real-time PCR using the MESA blue qPCR Mastermix plus for SYBR® assay (Eurogentec, France) with the Biorad CFX 96 apparatus (Bio-Rad, France) and analyzed with the Bio-Rad CFX Manager (version 2.0). All PCR primers were designed with NCBI Primer3/BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). The following primer sets were used for PCR amplification: Metallothionein I (NM_013602.3) (MT-I) forward, 5′-agctcctgcgcctgcaagaac-3′; MT-I reverse, 5′-tcaggcacagcacgtcactt-3′, Metallothionein II (NM_008630.2) (MT-II) forward, 5′-accccaactgctcctgtg-3′; MT-II reverse, 5′-acttgtcggaagcctctttg-3′; Metallothionein III (NM_013603.2) (MT-III) forward, 5′-agacctgcccctgtcctact-3′; MT-III reverse, 5′-cctcttcacctttgcacaca-3′; Actin-Beta (NM_007393.3) forward, 5′-agccatg tacgtagccatcc-3′; Actin-Beta reverse, 5′-ctctcagctgtggtggtgaa-3′; GAPDH (NM_008084) forward, 5′-acccagaagactgtggatgg-3′; GAPDH reverse, 5′-cacattggggtaggaacac-3′. The internal reference genes were actin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Samples were run in duplicate from 3 independent biological samples.

2.3. Calcium and zinc imaging experiments

Live-cell imaging experiments were carried out to analyze the changes in the intracellular concentration of free Zn^{2+}, with FluoZin-3 (Gee et al., 2002) and of free Ca^{2+}, with Fluo-4 (Thomas et al., 2000). The culture medium was removed and cells were washed twice with a saline solution containing in (mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 10 glucose, pH 7.4 (NaOH). Cells were incubated in this saline supplemented with 5 μM FluoZin-3/AM for 20 min (or for 15 min with 1.8 μM Fluo-4) at room temperature in the dark. After this loading period, cells were washed twice with a dye-free saline and kept at room temperature for 20 more minutes in the dark before being placed on the stage of an inverted Axio Observer A1 microscope (Carl Zeiss, France) equipped with a Fluar 40× oil immersion objective lens (1.3 NA) (Carl Zeiss, France). The experimental setup consisted of the DG-4 wavelength switcher (Princeton Instruments, Roper Scientific, France) and a cooled CCD camera (CoolSnap HQ2, Princeton Instruments, Roper Scientific, France). The excitation light for FluoZin-3 (or Fluo-4) was filtered through a 470–495 nm excitation filter and the emitted light was collected through a 525 nm filter. The baseline FluoZin-3 (or Fluo-4) fluorescence was recorded for ≥1 min before adding any agent (e.g. hyperforin, ionomycin or DTDP) and averaged (F0).

2.4. Chronic treatment of mice with hyperforin

Fifteen male C57Bl6/J mice (Charles River, France) were used. They were housed under standard conditions with a 12 h light/dark cycle and had free access to water and food. They were 5 month old at the beginning of the treatment. Eight animals received a daily intra-peritoneal injection of hyperforin diluted in a sterile NaCl solution (4 mg of hyperforin/kg of body weight) for 4 weeks. The hyperforin solution was prepared fresh each day before the injection. After the 4-week treatment, animals were killed and the brains were quickly removed and placed in an ice-cold saline solution. For control animals ($n = 7$) the procedure was the same except they received a sterile saline solution devoid of hyperforin. These experiments were conducted according to a protocol approved by the Ethical Committee of Grenoble (ComEth, France).

2.5. Determination of the zinc and sulphur content of the brain

Brains were dried by heating and vacuum and processed by incubation overnight in 70% nitric acid at 50 °C, before analysis with Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) with a Varian, Vista MPX instrument (Rousselet et al., 2008). The zinc, calcium and sulphur contents were normalized to the weight of dry brain.

2.6. Materials

Ionomycin and 2,2′-dithiodipyridine (DTDP) were from Sigma-Aldrich (France). FluoZin-3/AM and Fluo-4/AM was purchased from Molecular Probes (Invitrogen, France). The Neurobasal medium, B27, glutamine were from Invitrogren (France). Hyperforin used is a mixture of hyperforin with its homologue adhyperforin (ratio 8:2), prepared as a sodium salt. It was a kind gift from Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co (Karlsruhe, Germany).

3. Results

3.1. A chronic treatment with hyperforin affects the mitochondrial pools of Zn^{2+} and Ca^{2+}

Depending on the concentration used and the duration of the treatment, hyperforin can cause cell death (Schempp et al., 2002). However, at concentrations ≤1 μM this agent does not seem to be toxic (Kraus et al., 2010; Moore et al., 2000). It has recently been shown that when present for 3 days at the concentration of 1 μM, hyperforin stimulates the differentiation of keratinocytes (Muller et al., 2008). We followed the same protocol and investigated the effect of this plant extract on the Zn^{2+}-storage capacities of brain cells. Six hours after the plating of E13 cortical neurons the culture medium was changed and cells were kept in a culture medium supplemented with 1 μM hyperforin or its vehicle (DMSO). Subsequently, the culture medium was renewed everyday and the Zn^{2+} and Ca^{2+} imaging experiments were conducted 72 h after the beginning of this treatment. In order to determine the size of the mitochondrial pool of mobilisable Zn^{2+}, the fluorescent Zn^{2+} probe FluoZin-3 was used (Gee et al., 2002; Gibon et al., 2010; Tu et al., 2010). The culture medium was removed, cells were then washed twice with a hyperforin-free saline, and then incubated with FluoZin-3 (see Materials and methods). FluoZin-3-loaded cortical neurons were bathed in a nominally Ca^{2+}-free saline supplemented with 1 mM EDTA to minimize any contribution from residual Zn^{2+} ions present in saline solutions (Kay, 2004). The application of hyperforin (10 μM) provokes the release of Zn^{2+} (but also Ca^{2+}, see below) from mitochondria (Tu et al., 2010). This hyperforin-triggered Zn^{2+}-release gives rise to prominent FluoZin-3 signals (Fig. 1A). When compared to hyperforin-untreated (control) cells, cells chronically treated with 1 μM hyperforin exhibited smaller FluoZin-3 signals in response to the application of 10 μM hyperforin (Fig. 1A). The effect of a long-term (72 h) hyperforin treatment on the mobilisable pool of mitochondrial Ca^{2+} was also analyzed (Fig. 1B). For these experiments, cells were loaded with the fluorescent Ca^{2+} probe Fluo-4 and bathed in a nominally Ca^{2+}-free saline supplemented with 1 mM EDTA and 2 μM of the zinc chelator TPEN. Indeed, since most fluorescent Ca^{2+} probes have a high affinity for Zn^{2+}, the presence of the zinc chelator should abolish the contribution of the hyperforin-dependent release of Zn^{2+} (Tu et al., 2010). Under these conditions, the hyperforin-dependent Fluo-4 signals were reduced in chronically hyperforin-treated cells

Please cite this article in press as: Gibon, J., et al., Hyperforin changes the zinc-storage capacities of brain cells, Neuropharmacology (2011), doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.002

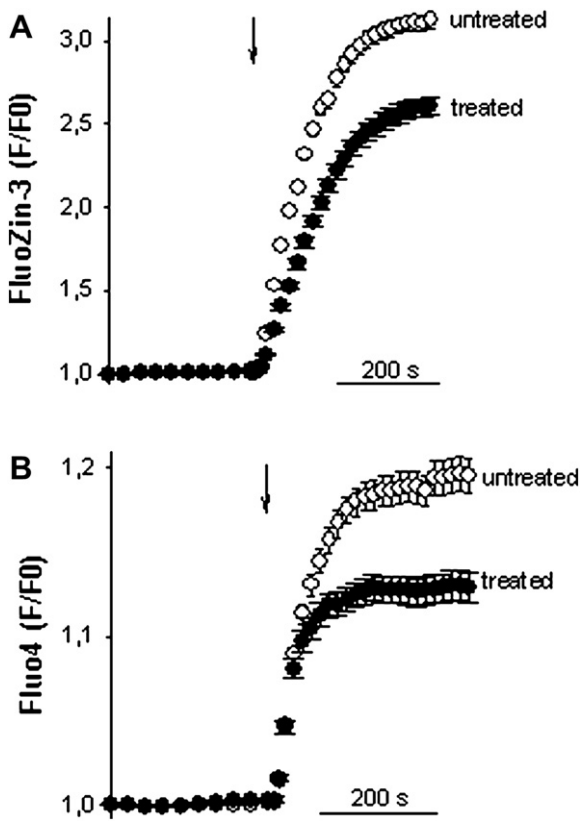


Fig. 1. Effects of a chronic hyperforin treatment on the mitochondrial pools of mobilisable Zn^{2+} and Ca^{2+}. Cortical neurons were maintained for 72 h in a culture medium supplemented with 1 μM hyperforin (or DMSO, control cells). They were washed away and loaded with FluoZin-3 (A) or Fluo-4 (B) to record cytosolic Zn^{2+} and Ca^{2+} signals, respectively. Cells were bathed in a nominally Ca^{2+}-free saline containing 1 mM EDTA. Figure A shows FluoZin-3 signals (F/F0) as a function of time recorded before and during the addition of 10 μM hyperforin (arrow). Hyperforin-untreated cells (open circles), $n = 114$ and hyperforin-treated (72 h) cells (filled circles), $n = 106$. Mean ± S.E.M. In Figure B, the recording medium was the same as in A but it also contained 2 μM TPEN to prevent any hyperforin-induced elevation of free Zn^{2+}. The graph in B shows Fluo-4 signals (F/F0) as a function of time before and during the addition of 10 μM hyperforin (arrow). Untreated cells (open circles), $n = 180$ and hyperforin-treated cells (filled circles), $n = 181$. Mean ± S.E.M.

when compared to untreated cells (Fig. 1B). The differences observed, namely the smaller Fluozin-3 and Fluo-4 signals found in hyperforin-treated cells could reflect distinct levels of dye loading. Indeed, the hyperforin treatment might have influenced the ability of cells to take up fluorescent probes which, in turn, could alter the amplitude of the hyperforin-triggered fluorescent signals. However, the basal fluorescence of control and hyperforin cells was comparable, regardless of the probe used (FluoZin-3 and Fluo-4) (see Supplementary Fig. S1), indicating that a chronic hyperforin treatment did not affect the loading of the cells. In conclusion, acutely applied, hyperforin stimulates the release of Zn^{2+} and Ca^{2+} from mitochondria (Tu et al., 2010). After a chronic treatment, the size of the hyperforin-sensitive pools of Zn^{2+} and Ca^{2+} were significantly reduced (Fig. 1).

3.2. A chronic treatment with hyperforin enhances the size of the DTDP-sensitive pool of Zn^{2+}

The redox state of cells influences the availability of free Zn^{2+} (Maret, 2009). For instance, the oxidizing agent 2,2'-dithiodipyridine (DTDP) elevates the cytosolic concentration of free Zn^{2+} ($[Zn^{2+}]_i$) in brain cells (Aizenman et al., 2000; Sensi et al., 2003; Tu et al., 2010), revealing the presence of a pool of mobilisable Zn^{2+}. DTDP (100 μM) was applied to control and hyperforin-treated cells. It elicited larger FluoZin-3 signals in hyperforin-treated neurons when compared to untreated neurons (Fig. 2A). Similar experiments were conducted on cells maintained 16 days *in vitro* (DIV) (in this case, hyperforin was present only the last 72 h). Similarly to the immature neurons cultured for only 3 days, these 16 DIV neurons treated for 72 h with hyperforin had a larger pool of DTDP-sensitive Zn^{2+} when compared to untreated 16 DIV neurons (not shown). Thus, this chronic hyperforin treatment enhances the size of the DTDP-sensitive pool of mobilisable Zn^{2+} in neurons kept 3 or 16 DIV. The size of the mobilisable pool of Ca^{2+} was assayed by means of the Ca^{2+} ionophore ionomycin. The experimental conditions were the same as in Fig. 1B, namely Fluo-4 cortical neurons were maintained in a nominally Ca^{2+}-free saline supplemented with 1 mM EDTA and 2 μM TPEN. The results shown in Fig. 2B indicate that a chronic hyperforin treatment does not affect the size of the ionomycin-sensitive pool of Ca^{2+}.

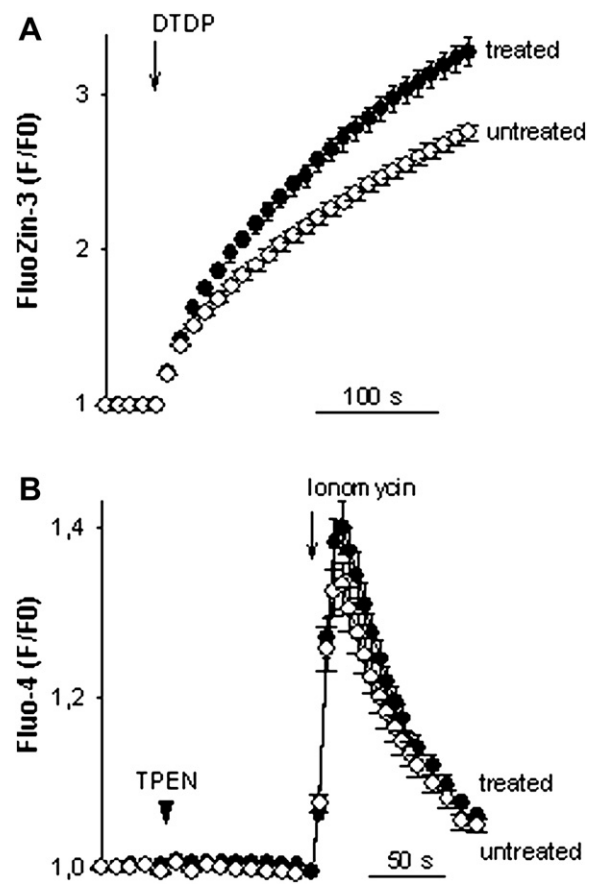


Fig. 2. A repeated administration of hyperforin influences the size of the DTDP-sensitive pool of mobilisable Zn^{2+}. A, The experimental conditions were the same as in Fig. 1A, namely FluoZin-3 loaded cells were bathed in a nominally Ca^{2+}-free saline supplemented with 1 mM EDTA. The application of 100 μM DTDP (arrow) provoked larger FluoZin-3 signals in cells chronically treated with 1 μM hyperforin ($n = 283$ cells), when compared to control (hyperforin-untreated) cells ($n = 309$ cells). When not visible, errors bars are smaller than symbols. Mean ± S.E.M. B, Same procedures as in Fig. 1B (cells kept in a nominally Ca^{2+}-free saline supplemented with 1 mM EDTA). When indicated (arrow) Fluo-4-loaded cortical neurons were challenged with ionomycin (2 μM). To prevent any ionomycin-dependent release of Zn^{2+}, TPEN (2 μM, arrowhead) was added before ionomycin. In hyperforin-treated cells (1 μM for 3 days) (filled circles, $n = 184$ cells), the ionomycin-dependent Fluo-4 signals were non-significantly different from the ones recorded on control cells (open circles, $n = 175$).

Please cite this article in press as: Gibon, J., et al., Hyperforin changes the zinc-storage capacities of brain cells, Neuropharmacology (2011), doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.002

3.3. A chronic treatment with hyperforin stimulates the expression of metallothioneins in vitro

Metallothioneins (MTs) constitute an important family of metal-binding proteins. They have a high content of cysteine residues and are consequently rich in sulphur. They can bind Zn^{2+} in a reversible manner (West et al., 2008). Four isoforms of MTs are so far known (MT-I to MT-IV). We focused our analysis on MT-I and MT-II, ubiquitously expressed, and on MT-III of which expression is more predominantly restricted to the brain. MT-IV, found in a few tissues (Penkowa, 2006; West et al., 2008), was excluded. The expression of these 3 isoforms was analyzed by qPCR. All MTs isoforms (MT-I, -II and -III) were found in cortical cells, with MT-III being the major isoform (Fig. 3A). Cultured cells were treated for 72 h with 1 μM hyperforin. This chronic treatment exerted a profound regulatory action on the expression of the MTs mRNAs. As illustrated in Fig. 3B, the plant extract enhances the levels of MTs transcripts, showing that it regulates the expression of MTs genes. The addition of 1 μM TPEN to the culture medium strongly attenuated the hyperforin-dependent upregulation of the expression of MTs (Fig. 3B).

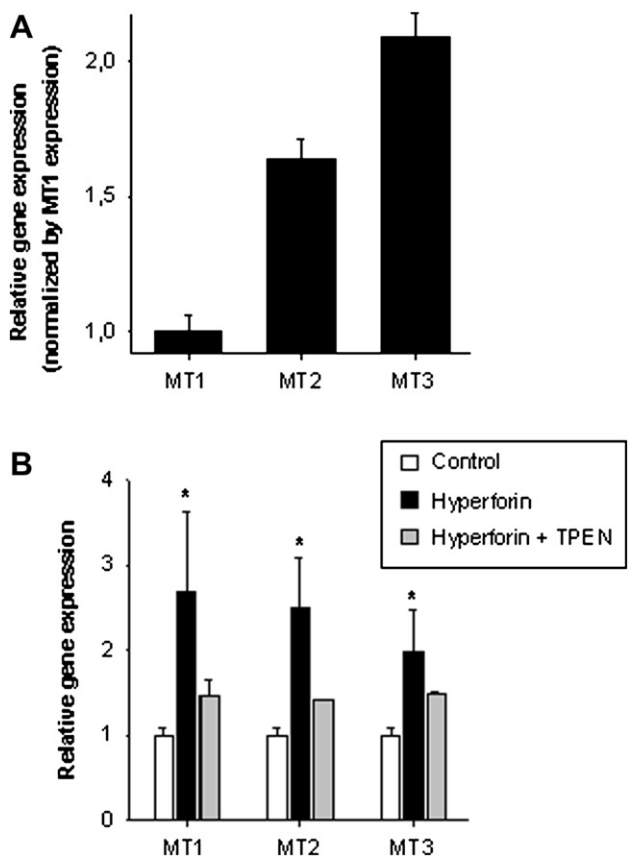


Fig. 3. A chronic hyperforin treatment of cortical neurons in culture enhances the levels of mRNA encoding MT-I, -II and -III. A, After 6 DIV, cortical neurons were harvested and mRNA levels of three MTs (MT-I, MT-II and MT-III) were analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR). Expression was normalized to the expression of MT-I using actin as the reference gene. MT-III is the main MT isoform in these cultures of neurons. Data collected from ≥3 batches of cells. B, Cortical neurons were grown for 72 h in a culture medium supplemented with DMSO alone (control cells) or with 1 μM hyperforin or with 1 μM hyperforin + 1 μM TPEN. Cells were washed away and mRNA levels of MT-I, MT-II and MT-III were analyzed by qPCR. Chronically applied, hyperforin up-regulates the levels of the transcripts. $^{*}p < 0.05$ Kruskal–Wallis ANOVA followed by a Dunn's test. Expression was normalized with respect to the mRNA levels under control conditions using actin and GAPDH as reference genes. Data collected from ≥3 batches of cells.

3.4. A chronic treatment of mice with hyperforin enhances the sulphur content of the brain

To better described the effects of hyperforin on brain cells, adults C57Bl6/J mice were chronically treated with hyperforin (intraperitoneal injection, 4 mg/kg/day for 4 weeks). Afterwards, brains were collected and the total content of several elements was determined by ICP-OES (see Methods section). The total brain content of Zn was 48.6 ± 3.9 and 49.9 ± 2.4 μg/g of dry brain ($p > 0.05$) in control and hyperforin-treated animals, respectively (Table 1). On the other hand, the total brain Ca content was 269.8 ± 46.9 (control) and 256.3 ± 46.7 μg/g of dry brain (hyperforin-treated animals, $p > 0.05$). Thus, the long-term treatment with the plant extract did not affect the Ca and Zn contents of the brain (Table 1). However, a marked elevation (~70%) of the total sulphur content was noted after the hyperforin treatment (1440.3 ± 255.8 μg S/g of dry brain in control versus 2392.2 ± 70.5 μg S/g of dry brain in the hyperforin-treated group, $p < 0.005$, Student's *t*-test) (Table 1). This indicates that hyperforin influences the expression of sulphur-containing molecules in the brain.

3.5. A chronic treatment with hyperforin stimulates the expression of metallothioneins in vivo

The expression of MTs in the cortex of mice was investigated. Animals were treated for 4 weeks and the cortices were collected before being analyzed by qPCR. Similarly to the *in vitro* experiments conducted on cultured cortical neurons, hyperforin has the ability to stimulate the expression of the MTs genes in the murine cortex (Fig. 4). Altogether, the data presented in Figs. 3 and 4 show that hyperforin is a potent inducer of the expression of MT-I, MT-II and MT-III both *in vitro* and *in vivo*.

4. Discussion

Several *in vitro* studies have investigated the effects of a repeated administration of hyperforin. For instance, a 3-day treatment of the human keratinocyte HaCaT cell line with 1 μM hyperforin triggers the differentiation of the cells via a mechanism involving TRPC6 channels (Muller et al., 2008). A 2-day treatment of human hepatocytes with 5 μM hyperforin decreases the mitochondrial activity, increases the expression (at the mRNA and protein levels) as well as the activity of CYP3A4 and CYP2C9, two drug-metabolizing enzymes (Komoroski et al., 2004). The data shown in the present report add new clues on the consequences of a chronic treatment on brain cells: whether applied acutely (Tu et al., 2010) or chronically (present report), hyperforin acts on mitochondria (Komoroski et al., 2004; Schempp et al., 2002). Hence, the dicyclohexylammonium salt of hyperforin (DCHA-hyperforin) dissipates the mitochondrial membrane potential (Liu et al., 2011). Altogether, these studies clearly show that hyperforin and hyperforin analogues act on mitochondria (Komoroski et al., 2004; Liu et al., 2011; Schempp

Table 1
Determination of the calcium, zinc and sulphur contents of the brain of C57BL/6J mice. Adult males received a daily injection (i.p) of hyperforin (4 mg/kg body weight) for 4 weeks. A few hours after the final injection, animals were sacrificed and the cerebral content of selected elements (Ca, S, Zn) was quantified by ICP-OES. Values are given as Mean ± S.E.M.

Element (μg/g dried brain)	Control ($n = 4$)	Hyperforin-treated ($n = 5$)	Student's *t*-test
Calcium	269.8 ± 46.9	256.3 ± 46.7	$p > 0.05$
Sulphur	1440.3 ± 255.8	2392.2 ± 70.5	$p < 0.005$
Zinc	48.6 ± 3.9	49.9 ± 2.4	$p > 0.05$

Please cite this article in press as: Gibon, J., et al., Hyperforin changes the zinc-storage capacities of brain cells, Neuropharmacology (2011), doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.002

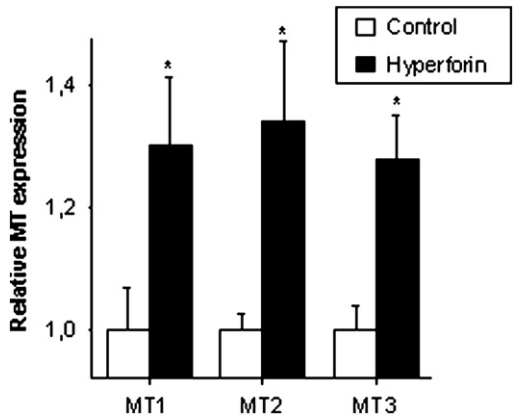


Fig. 4. A chronic hyperforin treatment of adult mice enhances the levels of mRNA encoding the MT-I, -II and -III in the cortex. Adult C57Bl6/J mice were treated (daily intra-peritoneal injection) with a sterile NaCl solution (control, $n = 4$) or with hyperforin (4 mg/kg, $n = 5$). After this treatment, brains were collected, cortices were isolated and the expression of MT-I, MT-II and MT-III were analyzed by qPCR. $^{*}p < 0.05$ Mann–Whitney test.

et al., 2002; Tu et al., 2010). When assayed by means of fluorescent dyes, the size of the hyperforin-sensitive pools of mobilisable Ca^{2+} and Zn^{2+} were depressed after a repeated administration of hyperforin. However, the ionomycin-sensitive pool of Ca^{2+} remained unaffected by the SJW extract whereas the DTDP-sensitive pool of Zn^{2+} was augmented. In addition, an enhanced level of mRNAs coding for MTs (MT-I, -II, and -III) was observed. This effect on the expression of MTs transcripts was reversed by TPEN indicating that Zn^{2+} ions are necessary for the hyperforin-dependent regulation of the MTs genes in cultured cortical neurons. *In vivo*, hyperforin augmented the sulphur content of the brain and up-regulated the expression of MTs. Previous observations showed that, acutely applied, hyperforin releases Zn^{2+} from mitochondria (Tu et al., 2010). We now find that a chronic hyperforin treatment affects the size of mobilisable pools of Zn^{2+}. This is accompanied by a Zn^{2+}-dependent augmentation of the expression of MTs and an elevation of the brain sulphur content.

MTs are an important family of cysteine- and zinc-rich proteins (Maret and Li, 2009; Penkowa, 2006; Vasak, 2005). Participating in many biological processes, they are described as multipurpose proteins but their exact pathophysiological relevance is still unclear (Penkowa, 2006). They are regarded as zinc donors and redox transducers, and, due to their translocation within cells and through the plasma membrane, they are able to deliver zinc to various compartments (Maret, 2005). The expression of MTs can be regulated by many factors notably metals and *in vitro* studies showed that an enhanced expression of MTs exerts beneficial effects with anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-oxidant and neuro-protective functions (Penkowa, 2006; Thirumoorthy et al., 2007; Vasak, 2005). It is important to mention that a chronic injection of SJW extract augments the expression of MTs in the kidney of rats but not in the liver (Shibayama et al., 2007). In a similar vein, our data showed that a chronic treatment of cultured cortical neurons stimulates in a TPEN-dependent manner the expression of genes coding for MT-I, -II and -III, confirming that hyperforin has the ability to regulate the expression of these zinc-binding proteins. Hence, a 4-week treatment of mice enhances by ~66% the brain sulphur content, showing that hyperforin influences the cellular content of sulphur-containing molecules like amino acids with a thiol group. They play key roles in the synthesis, structure and functions of proteins (Brosnan and Brosnan, 2006; Komarnisky et al., 2003). This higher content of sulphur is not associated with a higher brain level of zinc (calcium, or copper, not shown). Hyperforin does not seem to affect the cerebral zinc content but rather changes its storage capacities (enhanced expression of MTs and larger pool of DTDP-sensitive Zn^{2+}).

In summary, the data shown indicate that, when repeatedly administered, hyperforin diminishes the size of the hyperforin-sensitive pools of mobilisable Zn^{2+} and Ca^{2+}. This is accompanied by an upregulation of the DTDP-sensitive pool of Zn^{2+}, leaving the ionomycin-sensitive pool of Ca^{2+} unaffected. Furthermore, a chronic hyperforin treatment of cortical cells in culture and of adult mice influences the expression of the MTs genes. In addition, it augments the sulphur content of the brain without modifying the levels of calcium and zinc. It is proposed that hyperforin, by influencing the size of the internal pools of Zn^{2+}, the expression of MTs and the cerebral sulphur content, can interfere with the thiol status of the brain and regulates its Zn-storage capacities.

Acknowledgements

We wish to thank Drs M Hershfinkel and G. Nowak for their helpful comments and suggestions. We also thank Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co (Karlsruhe, Germany) for the kind gift of hyperforin. JG is supported by a studentship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche, et de la Technologie. We acknowledge the financial support from l'Agence Nationale de la Recherche (06-SEST-038), the Centre National de la Recherche Scientifique (program Longévité-Vieillissement) and Rhône-Alpes region (Cluster HVN). We also wish to express our thanks to S. Bama, N. Chaumontel, I. Jeannin and F. Sergent for their help with the daily injections of hyperforin.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.002.

References

Aizenman, E., Stout, A.K., Hartnett, K.A., Dineley, K.E., McLaughlin, B., Reynolds, I.J., 2000. Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release. J. Neurochem. 75, 1878–1888.

Bouron, A., Boisseau, S., De Waard, M., Peris, L., 2006. Differential down-regulation of voltage-gated calcium channel currents by glutamate and BDNF in embryonic cortical neurons. Eur. J. Neurosci. 24, 699–708.

Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., 2006. The sulfur-containing amino acids: an overview. J. Nutr. 136, 1636S–1640S.

Chatterjee, S., Filippov, V., Lishko, P., Maximyuk, O., Noldner, M., Krishtal, O., 1999. Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. Life Sci. 65, 2395–2405.

Chatterjee, S.S., Bhattacharya, S.K., Wonnemann, M., Singer, A., Muller, W.E., 1998. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. Life Sci. 63, 499–510.

Di Carlo, G., Borrelli, F., Ernst, E., Izzo, A.A., 2001. St John's wort: prozac from the plant kingdom. Trends Pharmacol. Sci. 22, 292–297.

Gee, K.R., Zhou, Z.L., Ton-That, D., Sensi, S.L., Weiss, J.H., 2002. Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. Cell Calcium 31, 245–251.

Gibon, J., Tu, P., Frazzini, V., Sensi, S.L., Bouron, A., 2010. The thiol-modifying agent N-ethylmaleimide elevates the cytosolic concentration of free Zn(2+) but not of Ca(2+) in murine cortical neurons. Cell Calcium 48, 37–43.

Griffith, T.N., Varela-Nallar, L., Dinamarca, M.C., Inestrosa, N.C., 2010. Neurobiological effects of hyperforin and its potential in Alzheimer's disease therapy. Curr. Med. Chem. 17, 391–406.

Kaehler, S.T., Sinner, C., Chatterjee, S.S., Philippu, A., 1999. Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. Neurosci. Lett. 262, 199–202.

Kay, A.R., 2004. Detecting and minimizing zinc contamination in physiological solutions. BMC Physiol. 4, 4.

Koch, E., Chatterjee, S.S., 2001. Hyperforin stimulates intracellular calcium mobilisation and enhances extracellular acidification in DDT1-MF2 smooth muscle cells. Pharmacopsychiatry 34 (Suppl. 1), S70–S73.

Komarnisky, L.A., Christopherson, R.J., Basu, T.K., 2003. Sulfur: its clinical and toxicologic aspects. Nutrition 19, 54–61.

ARTICLE IN PRESS

Komoroski, B.J., Zhang, S., Cai, H., Hutzler, J.M., Frye, R., Tracy, T.S., Strom, S.C., Lehmann, T., Ang, C.Y., Cui, Y.Y., Venkataramanan, R., 2004. Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures. Drug Metab. Dispos. 32, 512–518.

Kraus, B., Wolff, H., Elstner, E.F., Heilmann, J., 2010. Hyperforin is a modulator of inducible nitric oxide synthase and phagocytosis in microglia and macrophages. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 381, 541–553.

Kumar, V., Mdzinarishvili, A., Kiewert, C., Abbruscato, T., Bickel, U., van der Schyf, C.J., Klein, J., 2006. NMDA receptor-antagonistic properties of hyperforin, a constituent of St. John's wort. J. Pharmacol. Sci. 102, 47–54.

Leuner, K., Kazanski, V., Muller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, C., Muller, W.E., 2007. Hyperforin – a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. FASEB J. 21, 4101–4111.

Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C.D., Pauls, A., Weidenhammer, W., Melchart, D., 1996. St John's wort for depression – an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. BMJ 313, 253–258.

Liu, J.Y., Liu, Z., Wang, D.M., Li, M.M., Wang, S.X., Wang, R., Chen, J.P., Wang, Y.F., Yang, D.P., 2011. Induction of apoptosis in K562 cells by dicyclohexylammonium salt of hyperforin through a mitochondrial-related pathway. Chem. Biol. Interact..

Maret, W., 2005. Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. J. Trace Elem. Med. Biol. 19, 7–12.

Maret, W., 2009. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. Biometals 22, 149–157.

Maret, W., Li, Y., 2009. Coordination dynamics of zinc in proteins. Chem. Rev. 109, 4682–4707.

Medina, M.A., Martinez-Poveda, B., Amores-Sanchez, M.I., Quesada, A.R., 2006. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? Life Sci. 79, 105–111.

Moore, L.B., Goodwin, B., Jones, S.A., Wisely, G.B., Serabjit-Singh, C.J., Willson, T.M., Collins, J.L., Kliewer, S.A., 2000. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 7500–7502.

Muller, M., Essin, K., Hill, K., Beschmann, H., Rubant, S., Schempp, C.M., Gollasch, M., Boehncke, W.H., Harteneck, C., Muller, W.E., Leuner, K., 2008. Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation. J. Biol. Chem. 283, 33942–33954.

Muller, W.E., 2003. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. Pharmacol. Res. 47, 101–109.

Nathan, P., 1999. The experimental and clinical pharmacology of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). Mol. Psychiatry 4, 333–338.

Penkowa, M., 2006. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. FEBS J. 273, 1857–1870.

Rousselet, E., Richaud, P., Douki, T., Chantegrel, J.G., Favier, A., Bouron, A., Moulis, J.M., 2008. A zinc-resistant human epithelial cell line is impaired in cadmium and manganese import. Toxicol. Appl. Pharmacol. 230, 312–319.

Schempp, C.M., Pelz, K., Wittmer, A., Schopf, E., Simon, J.C., 1999. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. Lancet 353, 2129.

Schempp, C.M., Kirkin, V., Simon-Haarhaus, B., Kersten, A., Kiss, J., Termeer, C.C., Gilb, B., Kaufmann, T., Borner, C., Sleeman, J.P., Simon, J.C., 2002. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. Oncogene 21, 1242–1250.

Sensi, S.L., Ton-That, D., Sullivan, P.G., Jonas, E.A., Gee, K.R., Kaczmarek, L.K., Weiss, J.H., 2003. Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn2+ pools. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 6157–6162.

Shibayama, Y., Kawachi, A., Onimaru, S., Tokunaga, J., Ikeda, R., Nishida, K., Kuchiiwa, S., Nakagawa, S., Takamura, N., Motoya, T., Takeda, Y., Yamada, K., 2007. Effect of pre-treatment with St John's wort on nephrotoxicity of cisplatin in rats. Life Sci. 81, 103–108.

Singer, A., Wonnemann, M., Muller, W.E., 1999. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na^{+1}. J. Pharmacol. Exp. Ther 290, 1363–1368.

Thirumoorthy, N., Manisenthil Kumar, K.T., Shyam Sundar, A., Panayappan, L., Chatterjee, M., 2007. Metallothionein: an overview. World J. Gastroenterol. 13, 993–996.

Thomas, D., Tovey, S.C., Collins, T.J., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Lipp, P., 2000. A comparison of fluorescent Ca2+ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca2+ signals. Cell Calcium 28, 213–223.

Tu, P., Gibon, J., Bouron, A., 2010. The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria. J. Neurochem. 112, 204–213.

Vasak, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. J. Trace Elem. Med. Biol. 19, 13–17.

West, A.K., Hidalgo, J., Eddins, D., Levin, E.D., Aschner, M., 2008. Metallothionein in the central nervous system: roles in protection, regeneration and cognition. Neurotoxicology 29, 488–502.

Please cite this article in press as: Gibon, J., et al., Hyperforin changes the zinc-storage capacities of brain cells, Neuropharmacology (2011), doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.002

Conclusion et perspectives

Cette étude sur les effets chroniques de l'hyperforine sur l'homéostasie du calcium et du zinc peut se diviser en deux parties, les données *in vitro* et les données *in vivo*.

In vitro :

Le traitement des neurones corticaux embryonnaires pendant 72 h avec l'hyperforine conduit à une diminution significative de la taille des pools de calcium et de zinc mitochondriaux. Cependant, le pool de calcium sensible à la ionomycine n'est pas modifié ce qui signifie que le calcium libéré par la mitochondrie sous l'effet de l'hyperforine n'a pas été pris en charge par ce pool. Il est possible que ce calcium libéré des mitochondries soit expulsé des cellules.

Un traitement chronique à l'hyperforine diminue la taille du pool de zinc mitochondrial et augmente la taille du pool de zinc sensible au DTDP (un agent oxydant qui touche les groupements thiols). Les métallothionéines (MTs) sont des petites protéines qui possèdent de nombreux groupement thiols et qui permettent de fixer le zinc (Chapitre *3.2.3.3*). Par des expériences de qPCR, nous avons montré la présence des métallothionéines 1, 2 et 3 dans les neurones en culture ; MT3 étant l'isoforme majoritaire (ce qui est en accord avec la littérature). Un traitement de 72 h à l'hyperforine augmente significativement l'expression des métallothionéines dans les neurones. Il serait intéressant de confirmer ce résultat par Western Blot. De façon très intéressante, nous avons montré qu'un traitement au TPEN en même temps que le traitement à l'hyperforine diminue considérablement l'expression des MTs, suggérant ainsi que le zinc intervient dans la régulation de l'expression des MTs par l'hyperforine.

In vivo

Le contenu en métaux des cerveaux a été dosé par ICP-OES. Les contenus en calcium et en zinc sont identiques entre les souris traitées 4 semaines à l'hyperforine et les souris traitées 4 semaines avec du NaCl. En revanche, les cerveaux des souris traitées à l'hyperforine possèdent plus de soufre que les cerveaux des souris non traitées. Ces résultats suggèrent premièrement que le traitement chronique à l'hyperforine provoque une redistribution du zinc et du calcium puisque leur quantité totale n'est pas affectée et, deuxièmement, ils suggèrent une augmentation de la teneur cérébrale en molécules soufrées. Les MTs sont très riches en résidus cystéines (environ 20 cystéines ($C_3H_7NO_2$**S**)/protéine) nous avons posé l'hypothèse que l'expression des MTs est augmentée dans le cerveau des souris traitées à l'hyperforine. Pour tester cette hypothèse, nous avons prélevé les cortex des souris traitées à l'hyperforine et

des souris non traitées. Par qPCR, nous avons montré une augmentation de l'expression des gènes des MTs au niveau du cortex des animaux traités. A eux seuls ces résultats n'expliquent pas l'augmentation de 66% du contenu en soufre du cerveau des animaux traités avec l'hyperforine. Il serait à présent intéressant de regarder l'expression d'autres protéines à groupement thiols qui jouent un rôle dans l'homéostasie des métaux au niveau cellulaire.

Les résultats des traitements chroniques à l'hyperforine *in vitro* et *in vivo* vont donc dans le sens d'une relocalisation du zinc depuis la mitochondrie vers les métallothionéines en augmentant probablement la synthèse des acides aminés soufrés et en induisant l'expression de protéines fixant les métaux.

Article 5 : L'hyperforine augmente la phosphorylation de CREB et l'expression de TrkB de façon tissu-spécifique sans influencer la neurogénèse hippocampique chez la souris adulte.

Introduction

L'hyperforine est un des composants bioactifs extrait des plantes de millepertuis (*Hypericum perforatum*). Les effets antidépresseurs des extraits de millepertuis sont mis à profit pour soigner des dépressions légères à modérées en favorisant notamment l'expression du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) chez les patients[380]. De plus, des traitements chroniques avec ces extraits augmentent l'expression de CREB et de P-CREB chez le rat[381] et rétablissent la neurogénèse adulte lors d'un stress à la corticostérone chez la souris[383].

L'hyperforine est la molécule qui semble impliquée dans l'effet antidépresseur des extraits de millepertuis[365]. Ce principe actif est un activateur des canaux TRPC6[15] or l'activation de ces canaux au niveau de l'hippocampe favorise la croissance et la complexification du réseau dendritique via la voie CaMKIV-CREB[132,133]. De plus, la suppression des canaux TRPC6 empêche l'effet du BDNF sur le guidage des cônes de croissance neuronaux[93].

Dans les neurones, l'hyperforine induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale qui conduit à la libération de calcium et de zinc depuis ces compartiments[123]. Dans l'article précédent, nous avons montré qu'un traitement chronique à l'hyperforine conduisait à une relocalisation du zinc dans la cellule. C'est le deuxième métal le plus abondant de l'organisme et ses rôles sont divers tant au niveau catalytique que structural dans de nombreuses enzymes. Le Zn a aussi un rôle de second messager capable d'induire l'activation de TrkB (les récepteurs du BDNF) via les kinases de la famille Src (Fyn et Src)[194]. Le récepteur TrkB est la cible du BDNF et la fixation de cette neurotrophine induit la dimérisation du récepteur et la transphosphorylation des résidus tyrosines des domaines intracellulaires de TrkB conduisant à l'activation de voie de signalisation intracellulaires[349]. La suppression de TrkB dans les neurones d'hippocampe a permis de montrer leur rôle dans la neurogénèse, processus mis en jeu dans la réponse aux antidépresseurs[356]. La séquence promotrice du gène codant pour TrkB possède deux sites CRE (Ca^{2+}/cAMP response elements) suggérant que l'augmentation de calcium ou d'AMPc régule l'expression de ces récepteurs[425] via la protéine CREB phosphorylée[426].

Lors de ma 3ème année de thèse, j'ai tenté de caractériser les effets d'un traitement chronique à l'hyperforine sur le BDNF et sa voie de signalisation contrôlant l'expression des ses récepteurs dans les neurones et chez la souris. Un tel traitement augmente l'expression de TrkB, CREB et P-CREB *in vitro* et TrkB et P-TrkB *in vivo*. Le blocage des canaux TRPC6 par le SKF96365 supprime l'effet de l'hyperforine ce qui indique que ces canaux sont impliqués dans l'action de cette molécule. L'inhibition de la PKA par le RpcAMP supprime aussi l'effet de l'hyperforine. Un traitement chronique à l'hyperforine active donc une voie TRPC6 / PKA / P-CREB conduisant à la sur-expression de TrkB.

Hyperforin increases the phosphorylation of CREB and the expression of TrkB in a tissue-specific manner

Hyperforin increases the phosphorylation of CREB and the expression of TrkB in a tissue-specific manner without influencing the hippocampal neurogenesis in the adult brain of mouse

Julien Gibon [1,2,6], Chevallier Tiphaine [3,4*], Ladevèze Elodie [3,4*], Jean-Christophe Deloulme [5,6], Djoher Nora Abrous [3,4], Alexandre Bouron [1,2,6]

[1] UMR CNRS 5249, Grenoble, France.

[2] CEA, DSV, IRTSV, Grenoble, France.

[3] Inserm U 862, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France.

[4] Université Bordeaux, F33077 Bordeaux, France

[5] Inserm U 836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France.

[6] Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

** Both authors contributed equally to the work

Address correspondence to : Alexandre Bouron, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS 5249, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.

Phone : 00 33 4 38 78 44 23

FAX : 00 33 4 38 78 54 87

E-mail : alexandre.bouron@cea.fr

ABSTRACT

Hyperforin, an extract from the medicinal plant *Hypericum perforatum* (St John wort), possesses antidepressant properties. The following study was undertaken to extend our understanding of its mechanisms of action by characterizing the neuronal responses induced after a chronic hyperforin treatment. Western blot experiments show that in cultured cortical neurons from murine brain, hyperforin stimulated the expression of the BDNF receptor TrkB via SKF-96365-sensitive channels and a downstream signalling pathway involving Ca^{2+} ions, PKA, CREB and phospho-CREB. Parallels experiments were conducted on cortical and hippocampal tissues isolated from adult mice that had received a daily injection (i.p.) of hyperforin (4 mg/kg) for 4 weeks. Similarly to the *in vitro* experiments, this treatment augmented the expression of TrkB in the cortex but not in the hippocampus. In addition, hyperforin did not influence the hippocampal neurogenesis. These latter findings suggest that the cortex but not the hippocampus is an important brain structure participating in the CNS effects of hyperforin. Altogether, these data, showing that this plant extract acts via the cortical BDNF/TrkB pathway, leaving the hippocampal neurogenesis unaffected in the adult brain, add new clues on the neuronal responses controlled by hyperforin.

Keywords : brain, cortex, mice, hyperforin, antidepressants, BDNF, TrkB, CREB, PKA, neurogenesis, TRPC6.

INTRODUCTION

The medicinal plant *Hypericum perforatum*, also named St John wort (SJW), contains nearly two dozens of bioactive compounds which possess interesting pharmacological properties. They for instance exhibit anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-tumoral and anti-angiogenic activities (Lorusso et al., 2009; Saddiqe et al., 2010; Schempp et al., 1999). In addition, extracts of SJW have central nervous system effects and are used as antidepressants (Di Carlo et al., 2001; Linde et al., 1996; Mennini et al., 2004; Muller, 2003). Although several constituents of SJW seem to contribute to its therapeutic efficacy (Chatterjee et al., 1998a), the phloroglucinol derivative hyperforin is regarded as the main mood-stabilizer principle of this medicinal herb (Cervo et al., 2002; Chatterjee et al., 1998b; Zanoli, 2004). However, the cellular mechanisms underlying its clinical antidepressant action are so far currently unknown. Many cellular targets have been identified (Beerhues, 2006; Medina et al., 2006). For instance, hyperforin inhibits (Chatterjee et al., 1999; Fisunov et al., 2000; Kumar et al., 2006) or activates (Leuner et al., 2007) various plasma membrane channels, controls the activity of enzymes (Albert et al., 2002; Gey et al., 2007; Hoffmann et al., 2010; Komoroski et al., 2004), binds to intracellular receptors like the pregnane X receptor (Moore et al., 2000), and alters the expression of genes like CYP2C genes (Chen et al., 2009). Hyperforin has also been shown to interfere with neurotransmission. It for instance inhibits the reuptake of most if not all neurotransmitters and dissipates the pH gradient of synaptic vesicles. This causes a redistribution of monoamines from these vesicles to the cytoplasmic compartment (Roz et al., 2004).

The BDNF/neurotrophine system as well as the regulation of adult hippocampal neurogenesis by antidepressants seem to be two key issues involved in the molecular biology of depression

(Duman et al., 2006; Kozisek et al., 2008; Miguel-Hidalgo et al., 2002; Sahay et al., 2007). The aim of this present study was to advance our understanding of the pharmacological basis for the action of hyperforin on brain cells. A special focus was given to its impact on the BDNF receptor TrkB and on the adult hippocampal neurogenesis.

To better decipher the roles played by the bioactive molecules present in the extract of SJW, *in vitro* and *in vivo* experiments were conducted with hyperforin. The data collected indicate that a chronic treatment has the ability to set in motion an intracellular signalling pathway involving the cAMP-dependent protein kinase A and the transcription factor CREB (cyclic adenosine monophosphate response element binding protein), regulating the expression of the BDNF receptor TrkB. This hyperforin-dependent cascade occurs specifically in the cortex but not in the hippocampus. This suggests that the cortex is a key brain structure involved in the antidepressant action of hyperforin. Our findings provide new insights into the neurobiological actions of a chronic hyperforin treatment on cells of the central nervous system (CNS).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell cultures

Primary cultures of cortical neurons were prepared according to a protocol already described (Bouron et al., 2005). In brief, embryonic brains were isolated from E13 C57BL6/J mice and placed in an ice-cold Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free Hank's solution in which was added 33 mM glucose, 4.2 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, and 1 % penicillin/streptomycin. Depending on the number of embryos, 1 to 3 pregnant mice were needed to prepare one batch of cultured cells. The cortices were pooled and placed in a sterile 1.5 mL Eppendorf tube before being dissociated by means of repetitive aspirations of the cortices though a sterile and fire-polished Pasteur pipette. This cell suspension was then filtered through a 40 µm cell strainer (BD Falcon) and platted on poly-L-ornithine treated Petri dishes (Ø 6 cm). Cells were grown for 3 days in a Neurobasal medium containing 2 % B27, 1 % penicillin/streptomycin and 500 µM glutamine. After this, half of this culture medium was removed and replaced with a fresh Neurobasal medium. The procedures used were approved by the Ethical Committee of Grenoble (ComEth) (protocol 7_IRTSV-LCBM-AB-01).

2.2 Chronic treatment of C56Bl6/J mice with hyperforin

Twenty six 5-month old male C57Bl6/J mice (Charles River, France) were housed under standard conditions with a 12 h light/dark cycle and had free access to water and food. Thirteen animals received a daily intra-peritoneal injection of a fresh hyperforin solution (4 mg of hyperforin/kg of body weight) diluted in a sterile NaCl (0.9 %) solution. Control animals (n=14) were treated with a hyperforin-free NaCl solution. After 4 weeks of treatment, the brain of 3 hyperforin-treated mice and of 3 control mice were isolated and placed in an ice-cold saline solution. They were subsequently used for the extraction of proteins (see

below). The other animals received 2 BrdU injections at 24 h of intervalle (25 mg BrdU/animal). After this, the daily injections of hyperforin (or NaCl) were repeated for 3 more weeks before the intra-cardiac injection of paraformaldehyde (PFA) and the processing of the brains for the analysis of the hippocampal neurogenesis (see below).

2.3 Protein extraction and western blot analysis

For the *in vivo* experiments, proteins from the cortex and the hippocampus were extracted using the Nucleospin RNA/protein kit (Macherey-Nagel, France) followed by a precipitation with ethanol. Samples were kept in ice 30 minutes and centrifuged at 15000 rpm for 30 minutes at 4°C. Pellet was resuspended in a buffer containing 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 0,24 % Tric-HCl and 0,5 % Deoxycholate.

For the *in vitro* experiments, Hyperforin was added to the culture medium 5 days after the plating of the neuronal cells. At that time, the culture medium was removed and replaced by a fresh Neurobasal medium containing 1 µM hyperforin (or DMSO, control cells). Cells were subsequently kept for 72 h during which the culture medium containing hyperforin (or DMSO) was renewed everyday. At the end of the 72 h treatment, cells were harvested and centrifuged for 5 minutes at 3000 rpm. The pellet was resupended in a buffer containing (in mM): 10 HEPES, 3 $MgCl_2$, 40 KCl, glycerol 2 %, Triton X-100 1%, inhibitors of protease 1% (Sigma), pH 7,5. The samples were kept in ice 30 minutes and centrifuged at 15000 rpm for 30 minutes at 4°C before collecting the supernatant. Proteins were quantified using the Bio-Rad DC protein assay.

Immunoblotting analyses were performed with 50 µg of proteins after separation on a 8 % SDS-polyacrylamide gel. PVDF membranes were blocked 2 hours in 5 % non-fat dry milk. Primary antibodies were either anti-TrkB (Millipore) at 1:500, anti-Phospho-TrkB (tebu-bio) at 1:200, anti-CREB (Millipore) at 1:1000, anti Phospho-CREB (Millipore) at 1:1000 or actin

(Sigma) at 1:250. Incubation with primary antibodies was performed at 4°C over-night followed by incubation with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Bethyl). Detections of the bands by chemiluminescence (ECL, Pierce) was achieved using a Fusion Fx7 apparatus (Vilbert Lourmat). Quantification of protein expression was made with ImageJ software: for a given protein, its expression was normalized to the level of expression of actin.

2.4 Adult hippocampal neurogenesis

For these experiments 10 animals of each group (namely hyperforin-treated and NaCl-treated animals) was used. Animals were anesthetized with pentobarbital. The fixation of the brain was achieved after an intra-cardiac injection of 4 % PFA in PBS (Dupret et al., 2008). Free-floating sections (40 µm) were processed in a standard mmunohistochemical procedure in order to visualise BrdU (1:2000, Acurate, New York, USA), phosphorylated Histone H3 (pH3,1:2000, Upstate), doublecortin (Dcx, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), on alternate one-in-ten sections. The numbers of immunoreactive (IR) cells throughout the entire granular layer of the supragranular and infragranular blades of the DG (both sides for BrdU and HH3, and left side for Dcx) were estimated using the optical fractionator method (Dupret et al., 2007).

2.5 Statistical analysis

Throughout this study, data are presented as means ± s.e.m. The statistical significance of the difference between the groups was determined using SigmaStat (version 3.5, Systat Software).

2.6 Materials

Tissue culture media were obtained from Invitrogen (France). 5-Bromo-2'-deoxyurydine (BrdU) was from Serva (Coger, France). All other reagents were from Sigma-Aldrich (France). Hyperforin was a gift from Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co (Karlsruhe, Germany). The extract is a mixture of hyperforin with its homologue adhyperforin (ratio 8:2), prepared as sodium salts (Tu et al., 2009).

3. RESULTS

A previous report showed that a chronic treatment with 1 µM hyperforin can induce the differentiation of keratinocytes (Muller et al., 2008). This concentration was proved to be non toxic in several cell types (Kraus et al., 2010; Moore et al., 2000). We thus decided to use a similar concentration of hyperforin (1 µM) and looked at its effects on the expression of CREB, phospho-CREB (P-CREB), TrkB and phospho-TrkB (P-TrkB) in cultured cortical neurons (Figure 1A). A 72h-hyperforin treatment caused a clear augmentation of the expression of CREB, P-CREB and TrkB, leaving the phosphorylated form of TrkB (P-TrkB) unaffected. For instance, the expression of CREB, P-CREB and TrkB was enhanced by 70 %, 109 % and 71 %, respectively ($p<0.05$) (Figure 1B). After having shown that a chronic treatment of hyperforin influences the expression of the BDNF receptor TrkB probably via a CREB-dependent process, additional experiments were conducted to clarify the signalling pathway involved in this regulatory mechanism.

Hyperforin interferes with the activity of many cellular targets. Of interest, it blocks several plasma membrane conductances but, unexpectedly, enhances the activity of TRPC6 channels leaving the other TRPC channels unaffected (Leuner et al., 2007). So far, TRPC6 channels appear as the only Ca^{2+}-conducting channels positively regulated by hyperforin. These channels are present in the embryonic mice brain (Boisseau et al., 2009; Tu et al., 2009) and the entry of Ca^{2+} through these channels is blocked by SKF-96365 (Tu et al., 2009), a potent blocker of Ca^{2+} channels (Clementi et al., 1996). The next experiments were carried out in order to verify whether TRPC6 channels were implicated in the hyperforin-dependent regulation of TrkB expression. Cortical neurons were kept in a medium containing SKF-96365 (5 µM) alone or SKF-96365 (5 µM) + hyperforin (1 µM). In this latter case, SKF-

96365 was added 10 min before the addition of hyperforin, so that the Ca^{2+} channel blocker (SKF-96365) was present before the TRPC6 channel activator (hyperforin). In the presence of SKF-96365, hyperforin was unable to enhance the phosphorylation of CREB (Figure 2A). It also failed to up-regulate the expression of TrkB (Figure 2A). Since SKF-96365 is a blocker of Ca^{2+}-conducting channels, BAPTA was used to know whether the entry of Ca^{2+} controls the phosphorylation of CREB and the expression of TrkB. Preliminary experiments revealed that at concentrations higher than 1 µM, the Ca^{2+} chelator BAPTA-AM caused a clear cell loss (not shown). In the following experiments, cortical neurons were grown in a medium containing 100 nM BAPTA-AM. This low concentration partially reduced the hyperforin-dependent regulation of the expression of P-CREB and TrkB (Figure 2B). These results obtained with SKF-96365 and BAPTA suggested that Ca^{2+} is a central actor downstream to hyperforin, and upstream to P-CREB and TrkB. The cAMP-dependent protein kinase A (PKA) is a key player controlling CREB activity (Kingsbury et al., 2003; Lonze et al., 2002). Its involvement in the hyperforin-dependent phosphorylation of CREB was investigated. Cells were incubated with hyperforin (1 µM) or with hyperforin + RpcAMP (20 µM), a competitive inhibitor of PKA (Murray, 2008). Under this latter condition, the expression of TrkB and P-CREB was not up-regulated by the antidepressant (Figure 2C). The amount of TrkB and P-CREB was rather reduced by 9 % and 34 %, respectively. The data summarized in Figure D-E suggest that SKF-96365-sensitive channels, Ca^{2+} ions and PKA are likely candidates participating in the hyperforin-dependent regulation of TrkB expression.

Since hyperforin controls the expression of TrkB in cultured cortical neurons, we next addressed its effects on adult brains. Mice were chronically treated for 4 weeks (4 mg/kg/day) and the expression of TrkB was analysed in the cortex (Figure 3A) and in the hippocampus (Figure 3B). In agreement with the *in vitro* experiments, a 4 week hyperforin treatment exerts

a positive action on the expression of TrkB (+124 %, $p<0.05$). However, CREB and P-CREB seemed up-regulated but, when compared to their respective controls (NaCl-treated) the difference was not significant ($p>0.05$). *In vivo*, hyperforin also enhanced the expression of P-TrkB (+ 200 %, $p<0.05$) (Figure 3A). In striking contrast to the cortex, none of the actors analyzed in the hippocampus (CREB, TrkB and their phosphorylated forms) appeared regulated by hyperforin (Figure 3B). This latter observation indicates that this bioactive compound exerts tissue specific responses.

To further precise the action of hyperforin, its effects on the adult hippocampal neurogenesis was analyzed. Adult mice received (i.p.) a daily dose of hyperforin (4 mg/kg) for 4 weeks. They then received 2 injections of BrdU to label dividing cells and the hyperforin treatment was pursued for 3 more weeks before analysing the different step of neurogenesis: cell proliferation, cell survival and neurogenesis. We observed no effect on cell proliferation as measured by the number of phosphorylated Histone H3 (pH3, Figure 4A, $t_{18}=-0.70, p=0.49$**).** The survival of 3 weeks old BrdU-labelled cells was not either modified (Figure 4B, $t_{18}=-0.30$, $p=0.77$**).** As a consequence neurogenesis**,** evaluated by the number of doublecortine (DCX) a surrogate of neurogenesis (Figure 4C, $t_{18}=-1.05, p=0.31$) remained unchanged (Figure 4). In conclusion, under the experimental conditions used, hyperforin did not influence the hippocampal adult neurogenesis.

DISCUSSION

SJW is one of the most commonly used medicinal plant (Wills et al., 2000). Since the first meta-analysis of Linde et al (1996) showing that extracts of SJW were as effective as standard antidepressants for the treatment of some forms of depression (Linde et al., 1996), several authors have shown the usefulness of this medicinal plant for the treatment of mood disorders (Di Carlo et al., 2001; Stevinson et al., 1999). Although several constituents of SJW seem to contribute to this antidepressive action, the phloroglucinol derivative hyperforin is considered as the main mood-stabilizer principle of this medicinal herb (Cervo et al., 2002; Chatterjee et al., 1998b). Due to its recognized clinical efficacy, the use of the plant extract hyperforin is regarded as an alternative for the treatment of depression. The mechanisms by which it acts on CNS function and underlying its behavioural responses are still obscure. The data presented shed new light on its putative mechanisms of action.

In vitro and *in vivo* experiments illustrate the positive influence of a chronic hyperforin treatment on the expression of TrkB. This up-regulation was observed on cultured cortical neurons from embryonic mice (*in vitro* data) as well as on brain from adult mice (*in vivo* data). Therefore, the hyperforin-dependent regulation of the gene coding for this BDNF receptor can be observed in immature and mature brains. The hyperforin-dependent expression of TrkB is abolished in the presence of the channels blocker SKF-96365, is sensitive to the Ca^{2+} chelator BAPTA, critically depends on the activity of serine-threonine PKA and involves the inducible transcription factor CREB. Upon binding to gene promoters P-CREB, the active form of CREB, controls the expression of various proteins like TrkB for instance and plays a pivotal role in synaptic plasticity (Benito et al., 2010; Lonze et al., 2002). Many, but not all, antidepressants increase P-CREB levels. Whether the clinical efficacy of

antidepressant really involves P-CREB is not yet completely proven (Blendy, 2006). The findings of the present report indicate that hyperforin controls via a SKF-96365-sensitive pathway, a signalling cascade involving PKA and CREB. Since TRPC6 are the only plasma membrane channels known to be activated by this agent, it is proposed that TRPC6 channels mediate the hyperforin response. Since SKF-96365 is a blocker of Ca^{2+} conducting channels, hyperforin seems to enhance PKA activity via a Ca^{2+}-dependent process which most likely involves Ca^{2+}-sensitive adenylate cyclases.

Although, a great number of studies have contributed to a better understanding of the molecular biology of the depressive disorder, little is known regarding the precise mechanism of action of antidepressant drugs. According to some authors, the neurotrophine BDNF and the action of antidepressants on the hippocampal adult neurogenesis is one central feature involving TrkB receptors. Indeed, some experimental data support the existence of a functional link between BDNF, TrkB, the adult hippocampal neurogenesis and the behavioural effects of antidepressant drugs (Li et al., 2008). According to this model, TrkB appears as a central actor in the pathophysiology of the depressive disorder. Of interest, hyperforin augments its expression. However, there is no unequivocal demonstration showing that adult hippocampal neurogenesis is really necessary to produce the behavioural effects of antidepressants (Sahay et al., 2011). Although the BDNF-neurogenesis model has been well documented, it is debated (DeCarolis et al., 2010; Sapolsky, 2004), notably because it seems to suffer some exceptions (Bessa et al., 2009; David et al., 2009; Surget et al., 2008) suggesting that it may not fully cover the neurobiology of all the antidepressants. First, a decrease in hippocampal neurogenesis does not induce a depressive-like behaviour, indicating that this process is not involved in the pathogenesis of depression (Revest et al., 2009; Santarelli et al., 2003). Importantly, the effects of antidepressants on neurogenesis seem to

depend on the mouse strain used (Holick et al., 2008). In addition, antidepressants like fluoxetine seem to stimulate the hippocampal neurogenesis of mice under chronic stress but not when tested on unstressed animals (Surget et al., 2010). This latter finding could explain the inability of hyperforin to change the production of new hippocampal neurons since all the experiments were conducted on unstressed C57Bl6/J mice. Another important parameter to consider when trying to understand the requirement (or not) of the hippocampal neurogenesis in the efficacy of antidepressant drugs, is the type of antidepressant used. For instance, the hippocampal neurogenesis underlines the action monoaninergic compounds but however does not seem to be required for drugs acting on the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis (Surget et al., 2008).

In conclusion, *in vitro* and *in vivo* experiments were conducted to better address the CNS effects of the plant extract hyperforin which is commonly prescribed as an antidepressant (Cervo et al., 2002; Chatterjee et al., 1998b; Zanoli, 2004). The data presented show that it is a potent regulator of the expression of the BDNF receptor TrkB. It is proposed that hyperforin acts via a regulatory process involving TRPC6 channels, PKA and CREB. Additionally, and unexpectedly, this hyperforin-dependent control of the expression of TrkB occurs in the cortex but not in the hippocampus. Furthermore, this agent leaves unaffected the hippocampal neurogenesis in the brain of adult mice. Altogether, the cortex appears as an important brain structure participating in the CNS effects of this plant extract.

Acknowledgments

We wish to thank Dr W. Schwabe (Karlsruhe, Germany) for the gift of hyperforin. We also thank S. Bousquainaud for her assistance with the cell cultures, and S. Bama, N. Chaumontel, I. Jeannin and F. Sergent for their help with the daily injections of hyperforin. JG was supported by a studentship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche, et de la Technologie. AB was supported by a grant from the Rhône-Alpes Region (Cluster 11, “Handicap, Vieillissement, Neurosciences”). DNA was supported by INSERM.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Hyperforin enhances the expression of TrkB, CREB and P-CREB in cultured cortical neurons

Western blot analysis of the expression of TrkB, phospho-TrkB, CREB and phospho-CREB in cortical neurons kept in culture for 72h in the presence of 1 µM hyperforin. **A** Representative Western blots from > 3 independent experiments from control neurons (-) and neurons treated with hyperforin (+). **B** Summary plot showing the expression of each protein. Expression levels were normalized to the level of expression of Actin and are represented in % of the expression of each protein in control conditions. Data are collected from at least 3 independent experiments. *$p<0.05$ Mann-Whitney.

FIGURE 2: SKF-96365-sensitive channels and PKA are involved in the hyperforin-dependent controls of the expression of TrkB in cultured cortical neurons

Western blot analysis of the expression of TrkB and P-CREB in cortical neurons kept in culture for 72 h in the presence of 1 µM hyperforin without or with the channel blocker SKF-96365 (5 µM), the Ca chelator BAPTA/AM (100 nM), or the PKA inhibitor RpcAMP (20 µM). * $p<0.05$ (Mann Whitney).

FIGURE 3: Hyperforin regulates the expression of TrkB in the cortex but not in the hippocampus of adult mice

Panels **A** and **B** show the changes in the expression level of TrkB, P-TrkB, CREB and P-CREB in response to a 4 week treatment with hyperforin (i.p., 4 mg/kg/day). Control animals receiving a daily injection of NaCl. The expression of these proteins was analyzed by Western blotting in the cortex (**A**) and the hippocampus (**B**). Shown are representative Western blots of

TrkB, P-TrkB, CREB and P-CREB (left panels) and bar plots (right panels) summarizing the expression of each proteins in % of their expression in control (NaCl 0,9 %) animals.

FIGURE 4: Hyperforin does not influence adult hippocampal neurogenesis

Ten control (left panel) and ten treated animals (middle panel) received respectively a daily injection of NaCl 0,9 % or 4 mg/kg of hyperforin during 4 weeks. This treatment was followed by 2 injections of BrdU (at 24 hours of interval) and animals were treated for 3 more weeks with 4 mg/kg of hyperforin (or with NaCl 0,9 %). Animals were killed and brain slices were immunstained with antibodies against PH3, BrdU and DCX. Representative photomicrographies showing immunostained cells localized in the dentate gyrus. The total number of PH3-IR (A), BrdU-IR (B) and DCX-IR (C) cells is also given (right panels). No significant differences were observed between groups for cell proliferation (A), cell survival (B) and neurogenesis (C). Scale Bar = 50µm.

REFERENCES

Albert, D., Zundorf, I., Dingermann, T., Muller, W.E., Steinhilber, D., Werz, O. 2002. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. Biochem Pharmacol 64, 1767-75.

Beerhues, L. 2006. Hyperforin. Phytochemistry 67, 2201-7.

Benito, E., Barco, A. 2010. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. Trends Neurosci 33, 230-40.

Bessa, J.M., Ferreira, D., Melo, I., Marques, F., Cerqueira, J.J., Palha, J.A., Almeida, O.F., Sousa, N. 2009. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. Mol Psychiatry 14, 764-73, 739.

Blendy, J.A. 2006. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. Biol Psychiatry 59, 1144-50.

Boisseau, S., Kunert-Keil, C., Lucke, S., Bouron, A. 2009. Heterogeneous distribution of TRPC proteins in the embryonic cortex. Histochem Cell Biol 131, 355-63.

Bouron, A., Altafaj, X., Boisseau, S., De Waard, M. 2005. A store-operated Ca2+ influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca2+ stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice. Brain Res Dev Brain Res 159, 64-71.

Cervo, L., Rozio, M., Ekalle-Soppo, C.B., Guiso, G., Morazzoni, P., Caccia, S. 2002. Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of Hypericum perforatum extracts. Psychopharmacology (Berl) 164, 423-8.

Chatterjee, S., Filippov, V., Lishko, P., Maximyuk, O., Noldner, M., Krishtal, O. 1999. Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. Life Sci 65, 2395-405.

Chatterjee, S.S., Noldner, M., Koch, E., Erdelmeier, C. 1998a. Antidepressant activity of hypericum perforatum and hyperforin: the neglected possibility. Pharmacopsychiatry 31 Suppl 1, 7-15.

Chatterjee, S.S., Bhattacharya, S.K., Wonnemann, M., Singer, A., Muller, W.E. 1998b. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. Life Sci 63, 499-510.

Chen, Y., Goldstein, J.A. 2009. The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. Curr Drug Metab 10, 567-78.

Clementi, E., Meldolesi, J. 1996. Pharmacological and functional properties of voltage-independent Ca2+ channels. Cell Calcium 19, 269-79.

David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Artymyshyn, R.P., Gardier, A.M., Gerald, C., Antonijevic, I.A., Leonardo, E.D., Hen, R. 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. Neuron 62, 479-93.

DeCarolis, N.A., Eisch, A.J. 2010. Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: a critical evaluation. Neuropharmacology 58, 884-93.

Di Carlo, G., Borrelli, F., Ernst, E., Izzo, A.A. 2001. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. Trends Pharmacol Sci 22, 292-7.

Duman, R.S., Monteggia, L.M. 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. Biol Psychiatry 59, 1116-27.

Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., Piazza, P.V. 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. PLoS One 3, e1959.

Dupret, D., Fabre, A., Dobrossy, M.D., Panatier, A., Rodriguez, J.J., Lamarque, S., Lemaire, V., Oliet, S.H., Piazza, P.V., Abrous, D.N. 2007. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. PLoS Biol 5, e214.

Fisunov, A., Lozovaya, N., Tsintsadze, T., Chatterjee, S., Noldner, M., Krishtal, O. 2000. Hyperforin modulates gating of P-type Ca2+ current in cerebellar Purkinje neurons. Pflugers Arch 440, 427-34.

Gey, C., Kyrylenko, S., Hennig, L., Nguyen, L.H., Buttner, A., Pham, H.D., Giannis, A. 2007. Phloroglucinol derivatives guttiferone G, aristoforin, and hyperforin: inhibitors of human sirtuins SIRT1 and SIRT2. Angew Chem Int Ed Engl 46, 5219-22.

Hoffmann, M., Lopez, J.J., Pergola, C., Feisst, C., Pawelczik, S., Jakobsson, P.J., Sorg, B.L., Glaubitz, C., Steinhilber, D., Werz, O. 2010. Hyperforin induces Ca(2+)-independent arachidonic acid release in human platelets by facilitating cytosolic phospholipase A(2) activation through select phospholipid interactions. Biochim Biophys Acta 1801, 462-72.

Holick, K.A., Lee, D.C., Hen, R., Dulawa, S.C. 2008. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. Neuropsychopharmacology 33, 406-17.

Kingsbury, T.J., Murray, P.D., Bambrick, L.L., Krueger, B.K. 2003. Ca(2+)-dependent regulation of TrkB expression in neurons. J Biol Chem 278, 40744-8.

Komoroski, B.J., Zhang, S., Cai, H., Hutzler, J.M., Frye, R., Tracy, T.S., Strom, S.C., Lehmann, T., Ang, C.Y., Cui, Y.Y., Venkataramanan, R. 2004. Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures. Drug Metab Dispos 32, 512-8.

Kozisek, M.E., Middlemas, D., Bylund, D.B. 2008. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. Pharmacol Ther 117, 30-51.

Kraus, B., Wolff, H., Elstner, E.F., Heilmann, J. 2010. Hyperforin is a modulator of inducible nitric oxide synthase and phagocytosis in microglia and macrophages. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 381, 541-53.

Kumar, V., Mdzinarishvili, A., Kiewert, C., Abbruscato, T., Bickel, U., van der Schyf, C.J., Klein, J. 2006. NMDA receptor-antagonistic properties of hyperforin, a constituent of St. John's Wort. J Pharmacol Sci 102, 47-54.

Leuner, K., Kazanski, V., Muller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, C., Muller, W.E. 2007. Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. Faseb J 21, 4101-11.

Li, Y., Luikart, B.W., Birnbaum, S., Chen, J., Kwon, C.H., Kernie, S.G., Bassel-Duby, R., Parada, L.F. 2008. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. Neuron 59, 399-412.

Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C.D., Pauls, A., Weidenhammer, W., Melchart, D. 1996. St John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. Bmj 313, 253-8.

Lonze, B.E., Ginty, D.D. 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. Neuron 35, 605-23.

Lorusso, G., Vannini, N., Sogno, I., Generoso, L., Garbisa, S., Noonan, D.M., Albini, A. 2009. Mechanisms of Hyperforin as an anti-angiogenic angioprevention agent. Eur J Cancer 45, 1474-84.

Medina, M.A., Martinez-Poveda, B., Amores-Sanchez, M.I., Quesada, A.R. 2006. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? Life Sci 79, 105-11.

Mennini, T., Gobbi, M. 2004. The antidepressant mechanism of Hypericum perforatum. Life Sci 75, 1021-7.

Miguel-Hidalgo, J.J., Rajkowska, G. 2002. Morphological brain changes in depression: can antidepressants reverse them? CNS Drugs 16, 361-72.

Moore, L.B., Goodwin, B., Jones, S.A., Wisely, G.B., Serabjit-Singh, C.J., Willson, T.M., Collins, J.L., Kliewer, S.A. 2000. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 7500-2.

Muller, M., Essin, K., Hill, K., Beschmann, H., Rubant, S., Schempp, C.M., Gollasch, M., Boehncke, W.H., Harteneck, C., Muller, W.E., Leuner, K. 2008. Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation. J Biol Chem 283, 33942-54.

Muller, W.E. 2003. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. Pharmacol Res 47, 101-9.

Murray, A.J. 2008. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. Sci Signal 1, re4.

Revest, J.M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P.V., Abrous, D.N. 2009. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. Mol Psychiatry 14, 959-67.

Roz, N., Rehavi, M. 2004. Hyperforin depletes synaptic vesicles content and induces compartmental redistribution of nerve ending monoamines. Life Sci 75, 2841-50.

Saddiqe, Z., Naeem, I., Maimoona, A. 2010. A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L. J Ethnopharmacol 131, 511-21.

Sahay, A., Hen, R. 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. Nat Neurosci 10, 1110-5.

Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., Hen, R. 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. Nature 472, 466-70.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 301, 805-9.

Sapolsky, R.M. 2004. Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? Biol Psychiatry 56, 137-9.

Schempp, C.M., Pelz, K., Wittmer, A., Schopf, E., Simon, J.C. 1999. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant Staphylococcus aureus and gram-positive bacteria. Lancet 353, 2129.

Stevinson, C., Ernst, E. 1999. Hypericum for depression. An update of the clinical evidence. Eur Neuropsychopharmacol 9, 501-5.

Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., Hen, R., Belzung, C. 2008. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. Biol Psychiatry 64, 293-301.

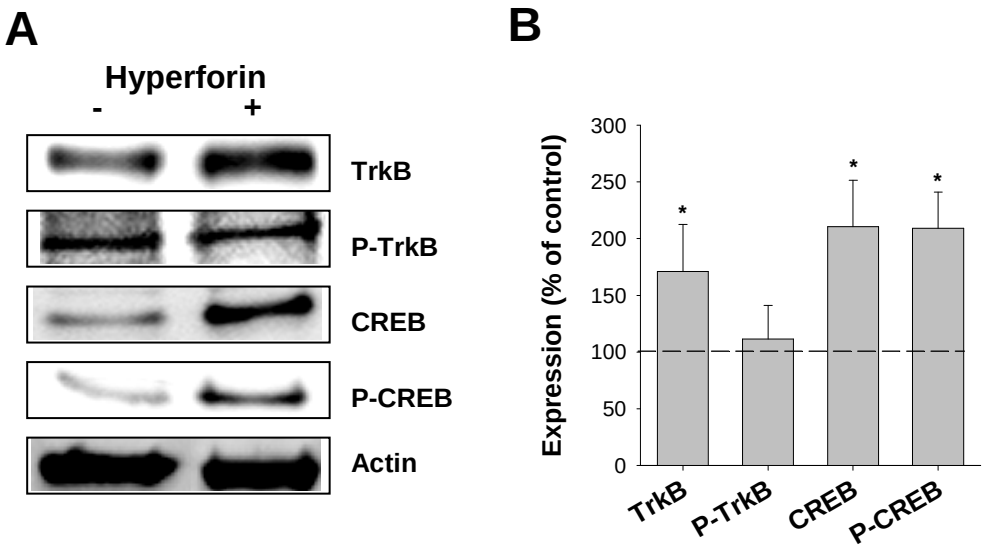
Surget, A., Tanti, A., Leonardo, E.D., Laugeray, A., Rainer, Q., Touma, C., Palme, R., Griebel, G., Ibarguen-Vargas, Y., Hen, R., Belzung, C. 2010. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. Mol Psychiatry.

Tu, P., Kunert-Keil, C., Lucke, S., Brinkmeier, H., Bouron, A. 2009. Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. J. Neurochem 108, 126-138.

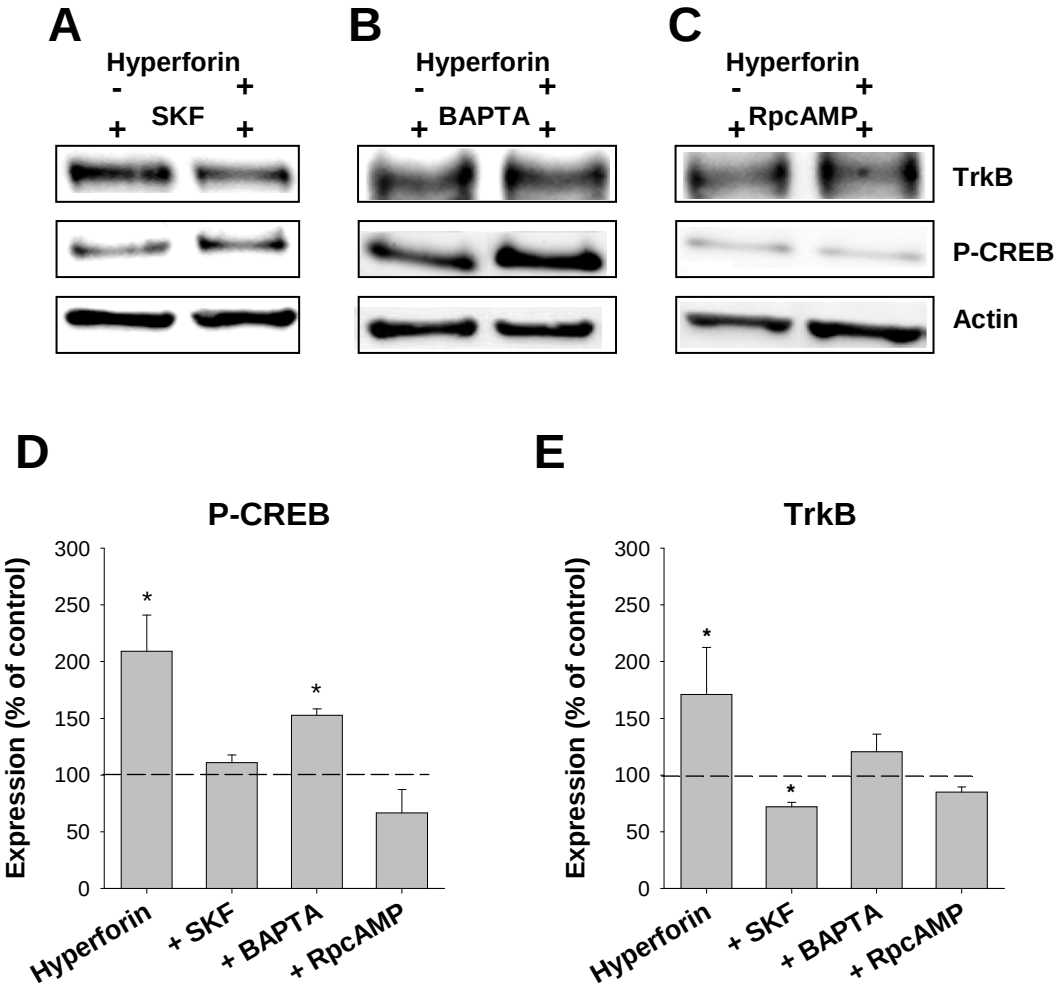
Wills, R.B., Bone, K., Morgan, M. 2000. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. Nutr Res Rev 13, 47-77.

Zanoli, P. 2004. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. CNS Drug Rev 10, 203-18.

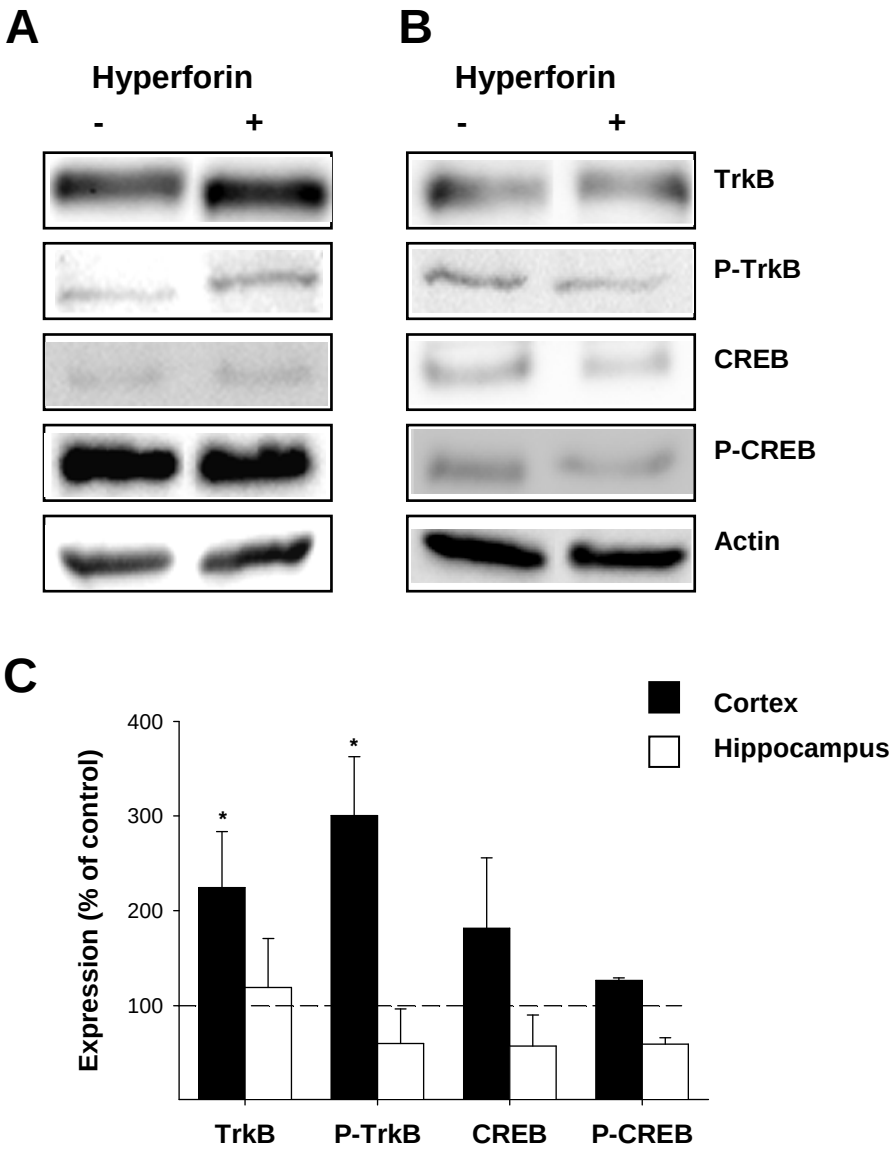
Gibon et al., Figure 1



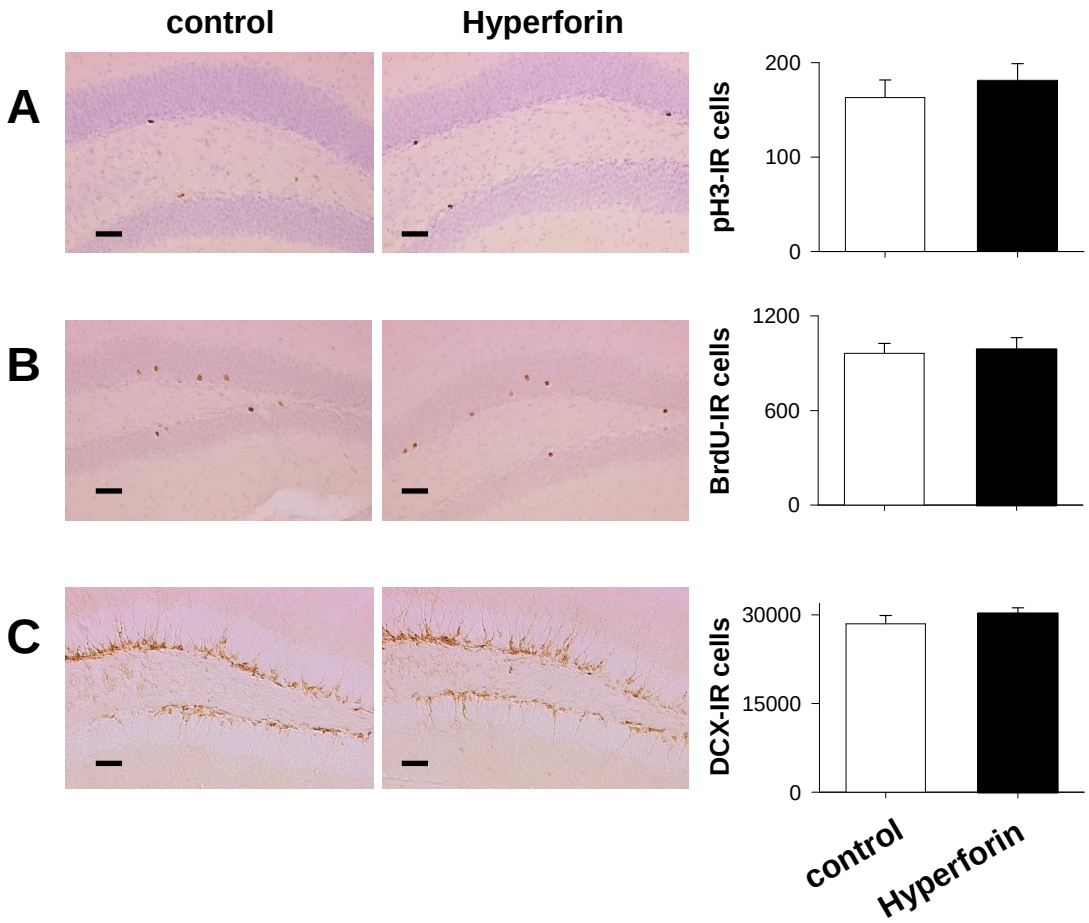
Gibon et al., Figure 2



Gibon et al., Figure 3



Gibon et al., Figure 4



Conclusion et perspectives

Les extraits de millepertuis sont couramment utilisés pour traiter des cas de dépression légère à modérée. Ces extraits contiennent plusieurs éléments naturels dont des flavonoides, des proanthocyanidines, des naphtodianthrones (hypericine) et des acylphloroglucinols (Hyperforine)[360]. Un traitement chronique avec ces extraits augmente le taux de BDNF sérique[380] et influence la neurogénèse adulte chez la souris[383]. Nous avons testé si l'hyperforine pouvait être responsable de ces actions. Nos résultats montrent que les expressions protéiques de CREB, P-CREB et TrkB sont augmentées lors d'un traitement chronique à l'hyperforine sur des neurones corticaux en culture. *In vivo*, un traitement de 4 semaines à l'hyperforine augmente les expressions protéiques de TrkB et P-TrkB dans le cortex de souris. Un traitement chronique avec uniquement l'hyperforine comme principe actif module donc l'expression des acteurs de la voie de signalisation du BDNF *in vivo* et *in vitro*.

Suite à cette observation, nous avons étudié la voie de signalisation intracellulaire qui conduit à l'activation de CREB et à la surexpression de TrkB dans les neurones. L'action de l'hyperforine sur la voie de signalisation conduisant à la surexpression de TrkB est en partie dépendante du calcium. L'hyperforine a été décrite pour activer les canaux TRPC6 présents dans les neurones corticaux[95] et pour induire une libération de calcium depuis la mitochondrie[123]. Ces deux actions distinctes augmentent la concentration en calcium libre dans le cytoplasme des neurones. La phosphorylation de CREB est sous le contrôle de nombreuses voies dont la voie Ca^{2+}-CaMKIV[426]. L'entrée de calcium favorise la formation du complexe Ca^{2+}-CaM (Calcium binding protein calmoduline) et active la CaMKIV[427]. L'entrée de calcium via les canaux TRPC6 augmente la croissance dendritique en favorisant notamment la voie CaMKIV-CREB dans les neurones d'hippocampe[133]. Les traitements chroniques à l'hyperforine en présence de SKF-96365 indiquent que les canaux TRPC6 sont probablement impliqués dans l'activation de la voie CREB/P-CREB. Ces expériences mériteraient d'être complétées par une approche de siRNA contre TRPC6 pour confirmer leur rôle dans l'action de l'hyperforine.

L'hyperforine modifie l'homéostasie du zinc dans les neurones suite à la dépolarisation du potentiel de membrane mitochondrial[123]. Une relocalisation du zinc est alors observée et l'expression des métallothionéines est augmentée (Cf article 4). Le TPEN qui possède un Kd pour le zinc de $2{,}910^{-16}$M[428] a été utilisé pour observer le rôle de ce métal dans l'effet de l'hyperforine sur les expressions de P-CREB et TrkB. De manière surprenante,

l'expression de P-CREB est augmentée dans le cas d'un co-traitement TPEN et hyperforine mais sans que l'expression de TrkB ne soit affectée (Figure supplémentaire 1, non soumise à publication). Le zinc serait donc nécessaire à l'activité de P-CREB. P-CREB se fixe sur les séquences CRE mais n'est actif qu'en présence du co-activateur CBP (CREB Binding Protein)[426]. Celui-ci possède un doigt de zinc et la fixation de CBP sur ses protéines cibles est sensible au TPEN[429]. Il est probable que dans nos expériences, la fixation de CBP sur P-CREB soit altérée en présence de ce chélateur. Cette hypothèse pourrait être testée en immunoprécipitant P-CREB et en quantifiant la quantité de CBP fixé à P-CREB lors d'un traitement par le TPEN.

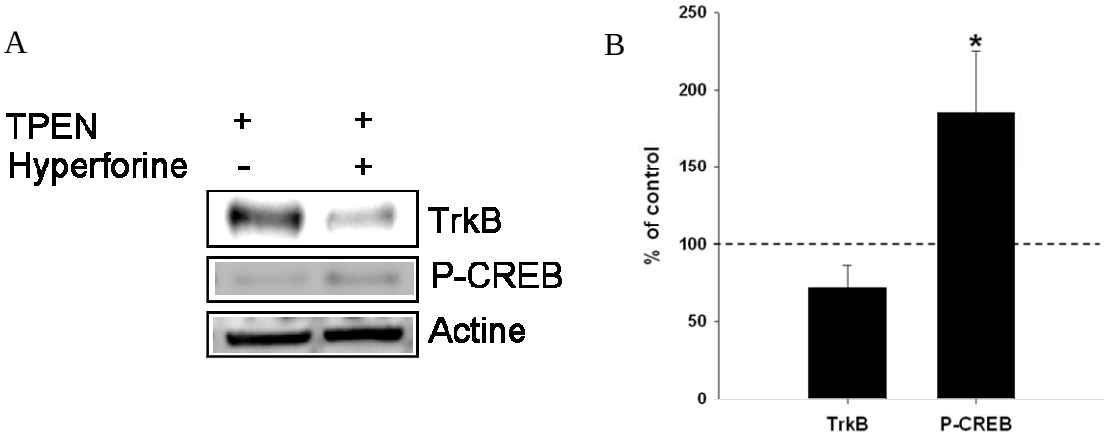


Figure supplémentaire 1 : Le TPEN bloque l'expression de TrkB sans affecter l'activation de CREB
Des cultures de neurones sont incubées en présence de 1 µM TPEN ou 1 µM TPEN + hyperforine 1 µM pendant 72 h. L'expression de TrkB et P-CREB est mesurée par Western Blot (A) puis normalisée par l'expression de l'actine. Le graphique (B) montre l'expression de TrkB et P-CREB dans les neurones traités avec 1 µM TPEN+ hyperforine 1 µM exprimées en pourcentage de l'expression de TrkB ou P-CREB en condition TPEN seul. *P<0,05 (Mann-Whitney).

L'hyperforine induit l'apoptose dans les cellules K562 via l'activation des caspases 3, 8 et 9 causée par une libération du cytochrome *c* et une dérégulation du potentiel de membrane mitochondrial[424]. Nous avons choisi une concentration non toxique d'hyperforine pour nos traitements (1 µM)[424] mais il n'est pas exclu que cette concentration n'affecte pas les propriétés de la mitochondrie. Il serait intéressant de quantifier la libération du cytochrome *c* dans les neurones suite aux différents traitements chroniques à l'hyperforine mais aussi d'observer la morphologie des mitochondries lors de ces traitements. Dans les cellules de mammifères, l'inhibition de l'activité mitochondriale provoque la phosphorylation de CREB sur la sérine 133 par l'intermédiaire de la CaMKIV[430]. L'hypothèse que l'action de l'hyperforine passe par une dérégulation de l'activité mitochondriale pourrait être testée dans les cellules HEK293 dans lesquelles l'hyperforine ne provoque pas d'entrée transitoire de calcium mais exerce son action au niveau des pools de cations intracellulaires (article 1 figure

supplémentaire 1). Le protonophore mitochondrial (et inhibiteur métabolique) FCCP induit l'activation de CREB par un mécanisme dépendant du calcium[430]. De plus, traiter des mitochondries isolées de cerveau par l'hyperforine dépolarise la membrane mitochondriale et supprime l'effet du FCCP (article 3)[123]. Cet antidépresseur pourrait donc induire les mêmes dysfonctionnements mitochondriaux que le FCCP.

La PKA est directement impliquée dans la phosphorylation de CREB[426]. Les expériences qui ont été réalisées avec le RpcAMP, un inhibiteur compétitif de la PKA[431], montrent que la voie P-CREB/TrkB n'est plus activée lors d'un traitement chronique à l'hyperforine en présence de cet antagoniste. Une voie de signalisation activant la PKA serait donc mise en jeu lors d'un traitement chronique à l'hyperforine. L'activité de la PKA est régulée par le niveau d'AMPc et donc par l'activité de l'adénylate cyclase (AC) or l'AC est principalement régulée par les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)[432]. Une hypothèse serait que l'hyperforine active un GPCR, activant l'AC puis la PKA par la production accrue d'AMPc et finalement augmente la phosphorylation de CREB et l'expression de TrkB. Cependant, l'AC de sous-type 1, exprimée spécifiquement dans certaines régions du cerveau (hippocampe, néocortex, cortex entorhinal, cortex olfactif, cervelet) est régulée positivement par le calcium, une augmentation du calcium intracellulaire favorise son activité[433,434]. Nous avons testé l'effet de la chélation du calcium par le BAPTA-AM sur la réponse hyperforine, les résultats indiquent que le calcium joue un rôle important dans l'activation de CREB par l'hyperforine (109 % d'augmentation en condition hyperforine seule contre 52 % d'augmentation en présence de BAPTA-AM + hyperforine). L'effet incomplet de la chélation du calcium par le BAPTA sur la réponse hyperforine peut venir du fait que la concentration en BAPTA employée est faible (0,1 µM). Toutefois, cette concentration a été choisie car elle n'affecte pas la viabilité cellulaire.

Il serait très intéressant de compléter l'étude par des expériences avec des inhibiteurs d'adénylate cyclase (Dideoxyadénosine), des inhibiteurs de protéines G (toxine pertussique, suramine) ou des inhibiteurs de la production de GTP (acide mycophénolique). Ces expériences sont en cours de réalisation et permettront de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu pour activer la PKA.

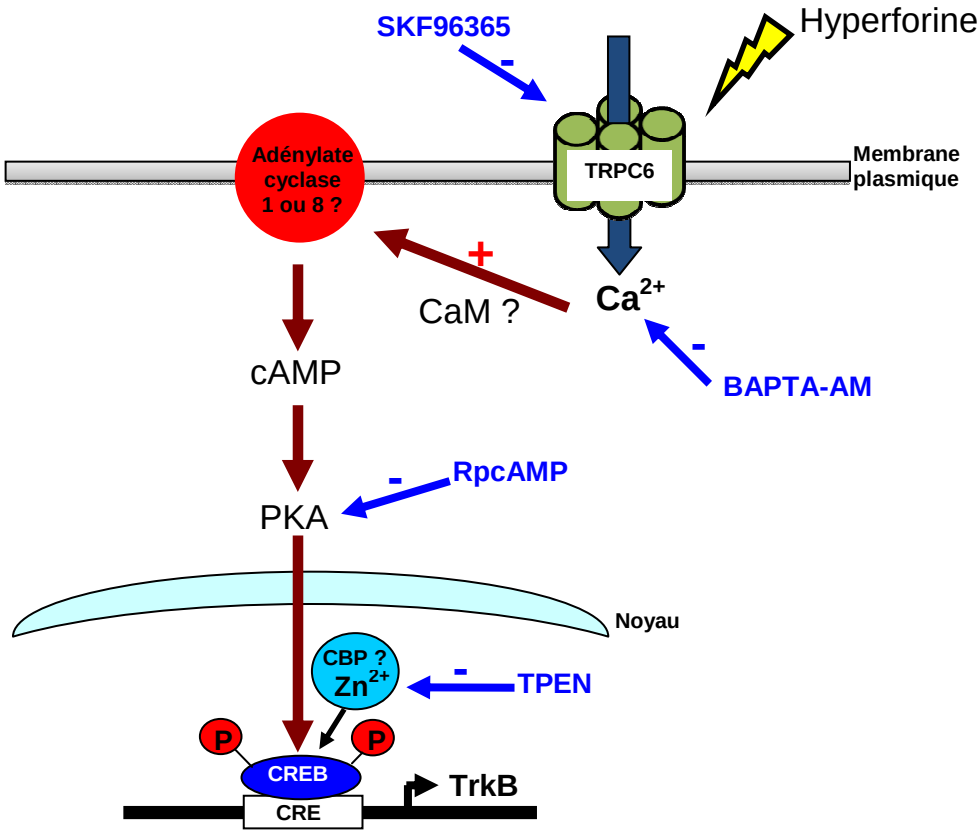
Pour compléter les expériences de description des voies de signalisation affectées par un traitement chronique à l'hyperforine, il serait important de caractériser les kinases mises en jeu pour la phosphorylation de CREB. L'utilisation du KN-93 (un inhibiteur de CaMK) pourrait nous renseigner sur l'implication des kinases CaMKI, II et IV. De nombreuses autres

kinases et acteurs comme MAPK, Akt ou ERK pourraient être quantifiés par Western Blot pour préciser leurs actions dans la réponse des neurones à l'hyperforine.

Un traitement chronique par les extraits de millepertuis favorise la neurogénèse adulte[383]. Nous avons testé si un traitement chronique par l'hyperforine produisait le même effet. La survie cellulaire, la prolifération cellulaire et la neurogénèse au niveau du gyrus denté ne sont pas affectées par un traitement chronique à l'hyperforine de 7 semaines. Nos résultats montrent de plus que lors d'une injection intra péritonéale quotidienne, l'hyperforine agit sur les acteurs de la voie du BDNF au niveau du cortex et non de l'hippocampe.

Les extraits de millepertuis exercent des effets complexes et variés (Chapitre 5), il est très probable que les principes actifs de ces plantes soient responsables des effets décrits dans la littérature. Bien que l'hyperforine soit un composé essentiel pour les effets antidépresseurs des extraits de millepertuis[365], un traitement chronique avec uniquement ce principe actif ne conduit pas à des effets similaires notamment au niveau de l'hippocampe.

Le schéma suivant résume le mécanisme d'action de l'hyperforine qui conduit à l'expression de TrkB selon les résultats de nos expériences.



Voie de signalisation impliquée dans la phosphorylation de CREB en réponse à l'hyperforine.
Les molécules pharmacologiques utilisées pour caractériser cette voie de signalisation sont noté en bleu sur le schéma. L'implication de certains acteurs dans cette voie de signalisation est encore à démontrer (protéines suivies d'un point d'interrogation).

Conclusions générales

La première problématique que j'ai abordée au cours de mon travail de thèse a consisté à déterminer les liens entre les canaux TRPC6 et l'augmentation du contenu en zinc des cellules qui sur expriment ces canaux. Nous avons démontré que les canaux TRPC6 forment une voie d'entrée du zinc et que leur surexpression confère une plus grande sensibilité aux cellules face à un stress oxydant. Nous avons exploité ces résultats pour poser la question du rôle des canaux TRPC6 natifs des neurones corticaux embryonnaires dans l'homéostasie neuronale du zinc. Dans ces expériences, nous avons pris soin d'utiliser des concentrations physiologiques de zinc (2 à 100 µM) et nous montrons que l'activation des canaux TRPC6 natifs permet l'entrée du zinc dans les neurones. Ce zinc est pris en charge par des protéines cytoplasmiques et ne charge pas la mitochondrie. Dans ce travail de thèse, nous avons abordé un nouvel aspect fonctionnel très intéressant des canaux TRPC6 mais certaines questions majeures restent à éclaircir pour mieux appréhender les phénomènes observés : Quelle est la composition des tétramères de TRPC (sensibles au DAG et à l'hyperforine) perméables au zinc dans les neurones ? Nous avons observé des différences d'amplitude et de densité des courants enregistrés en électrophysiologie entre les cellules HEK surexprimant TRPC6 et les neurones qui expriment de façon endogène ces canaux. Cela traduit des différences au niveau de la quantité de protéines exprimées mais il est aussi probable que la composition des tétramères ne soit pas la même entre ces deux types cellulaires. La caractérisation de ces complexes dans les neurones est une clef pour la compréhension du rôle des TRPC dans cette nouvelle voie d'entrée du zinc. Ce point nécessite la réalisation de transfection des neurones corticaux embryonnaires par des siRNA dirigés contre chacun des TRPC et de combiner cette approche par des tests d'imagerie du FluoZin-3 et d'électrophysiologie. Toutefois, un autre point important à soulever est le manque d'outils pharmacologiques spécifiques des canaux TRPC6. Finalement aucune des molécules agissant sur TRPC6 connues à ce jour n'est sélective pour bloquer ou activer ces canaux. Ceci rend les approches utilisées délicates et demande des approches de surexpression éloignée des systèmes physiologiques. Il est donc essentiel que des études soient menées pour trouver des molécules qui faciliteraient la caractérisation de ces canaux.

Il serait à présent intéressant d'étudier les effets cellulaires associés à l'entrée du zinc via TRPC6. Dans le système nerveux, une partie du zinc se trouve dans les vésicules synaptiques des neurones glutamatargiques. Le contenu vésiculaire est libéré lors de la neurotransmission au niveau de la fente synaptique ce qui contribue à augmenter la concentration en zinc au niveau de la synapse. Le zinc libéré va moduler l'activité de certains canaux et récepteurs post-synaptiques. Il serait intéressant d'étudier le rôle des canaux TRPC6,

présents dans les neurones post-synaptiques hippocampiques, dans la prise en charge du zinc synaptique. Il est possible que ces canaux soient impliqués dans la plasticité synaptique via un processus impliquant le zinc, en limitant l'effet de ce métal sur les récepteurs NMDA ou GABA. Le zinc intracellulaire module de nombreuses voies de signalisation, notamment celle de l'apoptose ou de la nécrose mais aussi permet la transactivation de certains récepteurs. A l'heure actuelle, nous ne connaissons pas d'effets liés à l'augmentation de la concentration en zinc suite à l'activation des canaux TRPC6 sur les voies de signalisation intracellulaires. Cet axe d'étude est important pour comprendre le rôle joué par ces canaux dans l'homéostasie du zinc mais aussi pour expliquer pourquoi la surexpression des canaux TRPC6 conduit à une augmentation de la quantité de zinc au niveau du noyau. Enfin, TRPC6 étant surexprimé dans les glioblastomes, ceci pose la question du rôle du transport du zinc via TRPC6 sur la prolifération et la vascularisation de ces tumeurs agressives du cerveau.

L'utilisation de l'hyperforine comme activateur des canaux TRPC6 nous a permis d'observer que cette molécule doit être utilisée avec certaines précautions. L'hyperforine module les stocks de calcium et de zinc des neurones corticaux. De plus, un traitement chronique à l'hyperforine augmente la quantité de soufre dans le cerveau des souris. Cette augmentation est en partie due à l'expression accrue des métallothionéines lors du traitement. Cependant elle n'explique pas à elle seule l'augmentation de la quantité totale de soufre du cerveau de ces animaux. Il est envisageable que d'autres protéines à groupement thiols soient surexprimées lors d'un traitement chronique à l'hyperforine. Ces résultats amènent à se demander si l'augmentation de la teneur en soufre du cerveau est à l'origine de l'effet antidépresseur de l'hyperforine.

Des traitements chroniques à l'hyperforine augmentent l'expression du facteur de transcription CREB et stimule sont activation via un mécanisme dépendant de la protéine kinase A, du calcium et des canaux TRPC6. La voie de signalisation conduisant à la phosphorylation de CREB et à l'expression de TrkB dans les neurones reste cependant à éclaircir sur certains points, notamment le rôle de kinases mises en jeu dans la phosphorylation de CREB mais aussi le rôle de l'adénylate cyclase et des récepteurs couplés aux protéines G. Et finalement, est-ce que l'effet antidépresseur de l'hyperforine passe par l'activation de CREB et la surexpression de TrkB au niveau neuronal ?

Une meilleure compréhension des effets cellulaires de l'hyperforine permettrait de mieux appréhender le fonctionnement de cet antidépresseur et de forger de nouvelles hypothèses pour le traitement de la dépression.

Annexes

Annexe 1

The thiol-modifying agent N-ethylmaleimide elevates the cytosolic concentration of free Zn^{2+} but not of Ca^{2+} in murine cortical neurons

Cell Calcium 48 (2010) 37–43

Contents lists available at ScienceDirect

Cell Calcium

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceca

The thiol-modifying agent N-ethylmaleimide elevates the cytosolic concentration of free Zn^{2+} but not of Ca^{2+} in murine cortical neurons

Julien Gibon[a,b,c], Peng Tu[a,b,c,1], Valerio Frazzini[d,e], Stefano L. Sensi[d,e,f], Alexandre Bouron[a,b,c,*]

[a] UMR CNRS 5249, Grenoble, France
[b] CEA, DSV, IRTSV, Grenoble, France
[c] Université Joseph Fourier, Grenoble, France
[d] Molecular Neurology Unit-Center of Excellence on Aging (Ce.S.I.), Chieti, Italy
[e] Department of Neuroscience and Imaging, University of Chieti, Italy
[f] Department of Neurology, University of California-Irvine, Irvine, CA 92697, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 March 2010
Received in revised form 22 June 2010
Accepted 22 June 2010
Available online 25 July 2010

Keywords:
Mice
Brain
Cortex
Neurons
Oxidative stress
Zinc
N-ethylmaleimide
Mitochondria

ABSTRACT

The membrane permeant alkylating agent N-ethylmaleimide (NEM) regulates numerous biological processes by reacting with thiol groups. Among other actions, NEM influences the cytosolic concentration of free Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Depending on the cell type and the concentration used, NEM can promote the release of Ca^{2+}, affect its extrusion, stimulate or block its entry. However, most of these findings were obtained in experiments that employed fluorescent Ca^{2+} probes and one major disadvantage of such experimental setting derives from the lack of specificity of the probes as all the so-called "Ca^{2+}-sensitive" indicators also bind metals like Zn^{2+} or Mn^{2+} with higher affinities than Ca^{2+}. In this study, we examined the effects of NEM on the $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis of murine cortical neurons. We performed live-cell Ca^{2+} and Zn^{2+} imaging experiments using the fluorescent probes Fluo-4, FluoZin-3 and RhodZin-3 and found that NEM does not affect the neuronal $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis but specifically increases the cytosolic and mitochondrial concentration of free Zn^{2+}($[Zn^{2+}]_i$). In addition, NEM triggers some neuronal loss that is prevented by anti-oxidants such as N-acetylcysteine or glutathione. NEM-induced toxicity is dependent on changes in $[Zn^{2+}]_i$ levels as chelation of the cation with the cell-permeable heavy metal chelator, N,N,N′N′-tetrakis(−)[2-pyridylmethyl]-ethylenediamine (TPEN), promotes neuroprotection of cortical neurons exposed to NEM. Our data indicate that NEM affects $[Zn^{2+}]_i$ but not $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis and shed new light on the physiological actions of this alkylating agent on central nervous system neurons.
© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

N-ethylmaleimide (NEM) is a membrane permeant alkylating agent. By covalently modifying cysteine residues and thus preventing the regulation of thiol groups, NEM affects many cellular responses. For instance, NEM is an uncoupler of pertussis toxin-sensitive G proteins [1]. Although it increases γ-aminobutyric acid (GABAergic) synaptic transmission in a Ca^{2+}-independent manner [2,3], NEM is currently used to block exocytotic processes due to its action on the NEM-sensitive factor (NSF) [4], a key player involved in membrane fusion.

Among other characteristics, NEM alters the intracellular homeostasis of Ca^{2+}($[Ca^{2+}]_i$). For instance, live-cell Ca^{2+} imaging experiments conducted with fluorescent Ca^{2+}-sensitive probes reported that NEM (10–30 μM) triggers $[Ca^{2+}]_i$ rises in DDT_1MF-2 cells, a smooth muscle cell line [5], and neutrophils [6]. This process uses a DTT-sensitive mechanism as the compound promotes cation entry through the oxidation of thiol groups [6]. A few studies also reported that the NEM-induced Ca^{2+} influx is enhanced after the depletion of thapsigargin-sensitive Ca^{2+} pools [5,6]. On the other hand, NEM blocks store-operated Mn^{2+}entry indicating that NEM-sensitive Ca^{2+} channels and store-operated Ca^{2+} channels are distinct entities [6,7].

Moreover, NEM is a well-known and multifaceted regulator of the ryanodine receptor (RyR) activity [8] with low concentrations (20–200 μM) of the compound favouring RyR opening without alkylation of thiol groups [9]. However, in neutrophils, NEM (30–100 μM) has been found to block the release of Ca^{2+} that is induced by the formyl peptide fMLP but sustains the thapsigargin-dependent release of the cation [7]. In smooth muscle cells (at concentrations higher than 10 μM), NEM has been reported to

* Corresponding author at: Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS 5249, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.
Tel.: +33 4 38 78 44 23; fax: +33 4 38 78 54 87.
E-mail addresses: alexandre.bouron@cea.fr, abouron@cea.fr (A. Bouron).
[1] Present address: Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, CNRS UMR 8197, Paris, France.

0143-4160/$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ceca.2010.06.004

induce the release of Ca^{2+} from intracellular stores [5] through an unidentified mechanism. It is worth mentioning that, in hepatic microsomal vesicles, a high concentration (1 mM) of NEM depresses the activity of the Ca^{2+}-ATPase [10]. In addition, NEM can influence plasma membrane fluxes because it diminishes the activity of the Na^+/Ca^{2+} exchanger heterogeneously expressed in HEK cells [11] or strongly blocks voltage-gated Ca^{2+} channels in vestibular hair cells [12]. In conclusion, depending on the cell type and on the applied concentrations, NEM exerts a wide array of actions that affect the $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis as the compound can promote the release of the cation, affect its extrusion, stimulate or block its entry. However, when interpreting data obtained with fluorescent Ca^{2+}-sensitive probes such as Fura-2, Fluo-3, Fluo-4 or Calcium Green-1, caution is required. All the Ca^{2+} indicators can bind metals like Zn^{2+} or Mn^{2+} with higher affinities than Ca^{2+} [13]. Zn^{2+} is an important regulator of physiological and pathological signalling [14] and recent reports have shown that, at least in some instances, data obtained with fluorescent Ca^{2+}-sensitive probes need to be re-evaluated in light of their high affinity for Zn^{2+} [15–18].

In this study, we examined the effects of NEM on the $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis of murine cortical neurons. By performing live-cell imaging experiments with fluorescent probes for Ca^{2+} and Zn^{2+} like Fluo-4 and FluoZin-3, respectively, we found that NEM does not promote $[Ca^{2+}]_i$ rises but specifically increases the cytosolic concentration of free Zn^{2+} ($[Zn^{2+}]_i$). We also explored whether NEM-driven $[Zn^{2+}]_i$ rises can promote Zn^{2+} sequestration in mitochondria. Finally, we investigated whether NEM causes neuronal cell death through mechanisms that are dependent on $[Zn^{2+}]_i$ changes.

2. Materials and methods

2.1. Primary cell cultures

Cortical cells were dissociated from cerebral cortices isolated from embryonic (E13) C57BL6/J mice (vaginal plug was designated E0) as described before in Ref. [19]. Briefly, embryonic (E13) C57BL6/J mice were sacrificed and brains kept in an ice-cold Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free Hank's solution supplemented with 33 mM glucose, 4.2 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 1% penicillin/streptomycin. Isolated cortices were mechanically minced by repetitive aspirations through a sterile and fire-polished Pasteur pipette. Four to five E13 mice (e.g. 8–10 cortices) were used for each culture. The cell suspension was filtered through a 40 μm cell strainer (BD Falcon). Sterile glass cover-slips (Marienfield, Germany) were coated with poly-L-ornithine (2 h at 37 °C) and washed twice with sterile water before plating the cells. Cells were grown in a Neurobasal medium containing 2% B27, 1% penicillin/streptomycin and 500 μM glutamine. Three days after the plating of the cells, half of this culture medium was removed and replaced with a fresh medium. For the RhodZin-3 experiments (see below) neurons were plated on poly-lysine + laminin coated cover-slips as previously described [20]. All these procedures were approved by the Ethical Committee of Rhône-Alpes Region and ComEth (Grenoble, France).

2.2. Zn^{2+} and Ca^{2+} imaging experiments

Changes in the intracellular concentration of free Zn^{2+} and Ca^{2+} were recorded with FluoZin-3 [21] and Fluo-4 [22], respectively. The experimental conditions were as follows: after removal of the culture medium, cells were washed twice with a Tyrode solution containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 10 glucose, pH 7.4 (NaOH) and incubated for 20 min (at room temperature) in a Tyrode solution supplemented with 5 μM FluoZin-3/AM (or for 15 min with 1.8 μM Fluo-4). Cells were washed twice with a FluoZin-3/AM- (or Fluo-4/AM)-free Tyrode solution and kept at room temperature for 20 more minutes to allow the de-esterification of the dye. Glass cover-slips, inserted into a perfusion chamber (RC-25F, Warner Instruments, Phymep, France), were placed on the stage of an Axio Observer A1 microscope (Carl Zeiss, France) equipped with a Fluar 40× oil immersion objective lens (1.3 NA) (Carl Zeiss, France). Light was provided by the DG-4 wavelength switcher (Princeton Instruments, Roper Scientific, France). The excitation light for FluoZin-3 (or Fluo-4) was filtered through a 470–495 nm excitation filter and the emitted light was collected through a 525 nm filter. Images, acquired by means of a cooled CCD camera (CoolSnap HQ2, Princeton Instruments, Roper Scientific, France) were analyzed off-line using the software MetaFluor (Universal Imaging, Roper Scientific, France). Images were captured every 5 s. The baseline ($F0$) FluoZin-3 (or Fluo-4) fluorescence was recorded for ≥1 min before adding NEM and averaged.

For mitochondrial Zn^{2+} imaging, cortical cultures were loaded with RhodZin-3 AM [20] (10 μM + 0.1% pluronic acid) at 4 °C for 30 min and then left at 37 °C for 4 h for de-esterification. Experiments were carried out using a HEPES-buffered medium (HSS) whose composition was (in mM): 120 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 0.8 $MgCl_2$, 20 HEPES, 15 glucose, 10 NaOH, pH 7.4. Fluorescence imaging was performed using an inverted microscope (Nikon, Italy) equipped with a xenon lamp, filter wheel, a 40× epifluorescence oil immersion objective, and a red fluorescence cube (Ex: 540 nm, Em: >640 nm). Images were acquired with a 12 bit digital CCD camera

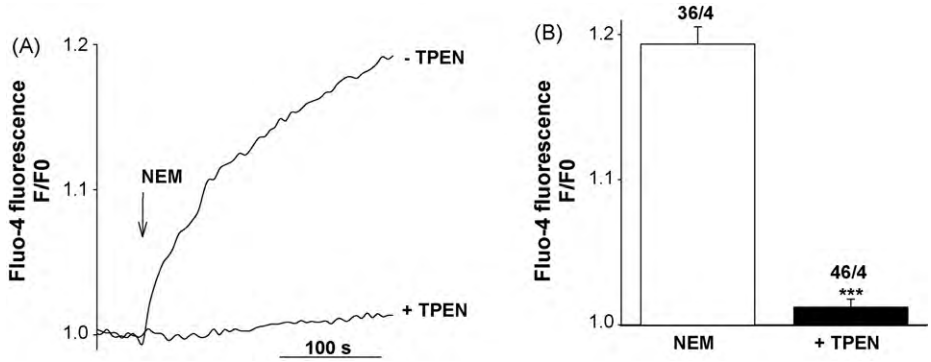


Fig. 1. The alkylating agent NEM does not affect the cytosolic concentration of Ca^{2+}. (A) Cortical neurons were loaded with the fluorescent Ca^{2+} probe Fluo-4. The figure shows representative Fluo-4 recordings from 2 cortical neurons kept 4 days *in vitro*. Externally applied NEM (50 μM, arrow) provoked an elevation of the Fluo-4 fluorescence ($F/F0$) which was not observed in the presence of TPEN (10 μM). In this latter case, TPEN was added at least 3 min before NEM. (B) A summary bar graph showing the averaged maximal Fluo-4 signals ($F/F0$) (mean ± SEM) recorded without or with 10 μM TPEN. The Fluo-4 signals were quantified 250 s after the addition of NEM. The number of cells and culture dishes used are indicated. ***$p < 0.001$ (Student's t test) when compared to NEM alone.

(Orca, Hamamatsu, Japan), and analyzed (after background subtraction from a cell-free region of the dish) with MetaFluor 6.0 software.

In all the imaging experiments, to compensate for cell-to-cell variability in dye loading, probe fluorescence measurements for each cell (*F*) were normalized to the fluorescence intensity for that cell at the beginning of the experiment (*F*0). Values are reported as mean ± SEM, with *n* indicating the number of cell bodies analyzed. All the experiments were performed at room temperature.

2.3. Colorimetric MTT assay

Mitochondrial activity was measured as an indicator of cell viability [23]. Briefly, isolated cortical cells were plated in poly-L-ornithine-treated 96-well culture plates. After 6–7 days *in vitro* cells were incubated with 50 μM NEM for 10 min at 37 °C. The alkylating agent was then washed away. Twenty-four hours later, MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] was added at 0.5 mg/ml for 3 h at 37 °C. The medium was removed and the dark blue crystals formed were dissolved by adding 100 μl DMSO/well. The optical density was measured at 570 nm with a Tecan Infinite M200 microplate reader (Tecan, France). Results are presented as the percentage of survival with NEM-untreated (control) cells as 100% and with Triton X-100-treated cells as 0% [24].

2.4. Materials

Fluo-4/AM and FluoZin-3/AM were purchased from Molecular Probes (Invitrogen, France). RhodZin-3 was purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Italy). Tissue culture media were from Invitrogen (France). Unless otherwise indicated all other reagents were from Sigma–Aldrich (France).

3. Results

3.1. NEM does not increase $[Ca^{2+}]i$

The fluorescent Ca^{2+}-sensitive probe Fluo-4 was used to analyze the effect of the alkylating agent NEM on the neuronal $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis. A bath application of NEM (50 μM) provoked a time-dependent increase of Fluo-4 fluorescence (Fig. 1A). However, if the membrane permeant metal chelator, N,N,N′N′-tetrakis(−)[2-pyridylmethyl]-ethylenediamine (TPEN; 10 μM), was added prior to the NEM exposure, NEM failed to elicit any Fluo-4 signal (Fig. 1B). Since TPEN has a lower dissociation constant for Zn^{2+} (K_d 2.6×10^{-16} M) than for Ca^{2+} (K_d 4×10^{-5} M) [25], these results suggest that NEM is more likely to alter the concentration of neuronal $[Zn^{2+}]_i$ instead of $[Ca^{2+}]_i$. This hypothesis was further verified by employing FluoZin-3, a fluorescent probe that is selective for Zn^{2+} and has no affinity for Ca^{2+} [21].

3.2. NEM increases $[Zn^{2+}]_i$

Fig. 2A shows a representative recording from a FluoZin-3-loaded cortical neuron. In this set of experiments, the external application of 50 μM NEM produced a robust rise in the FluoZin-3 signal that was completely reversed by TPEN (10 μM; Fig. 2A), thereby substantiating the idea that the alkylating agent increases neuronal $[Zn^{2+}]_i$ but not $[Ca^{2+}]_i$ levels. In the 0.1–0.5 μM range, NEM failed to evoke any FluoZin-3 signal; however, at concentrations ≥1 μM it increased $[Zn^{2+}]_i$ levels in a concentration-dependent manner as illustrated in Fig. 2B. Our data are in agreement with a previous study conducted in C6 cells [26] that made use of the Zn^{2+} indicator Zinquin-E and showed that NEM increases $[Zn^{2+}]_i$ by promoting the intracellular release of the cation from Zn^{2+}-binding proteins [26]. To explore the possibility

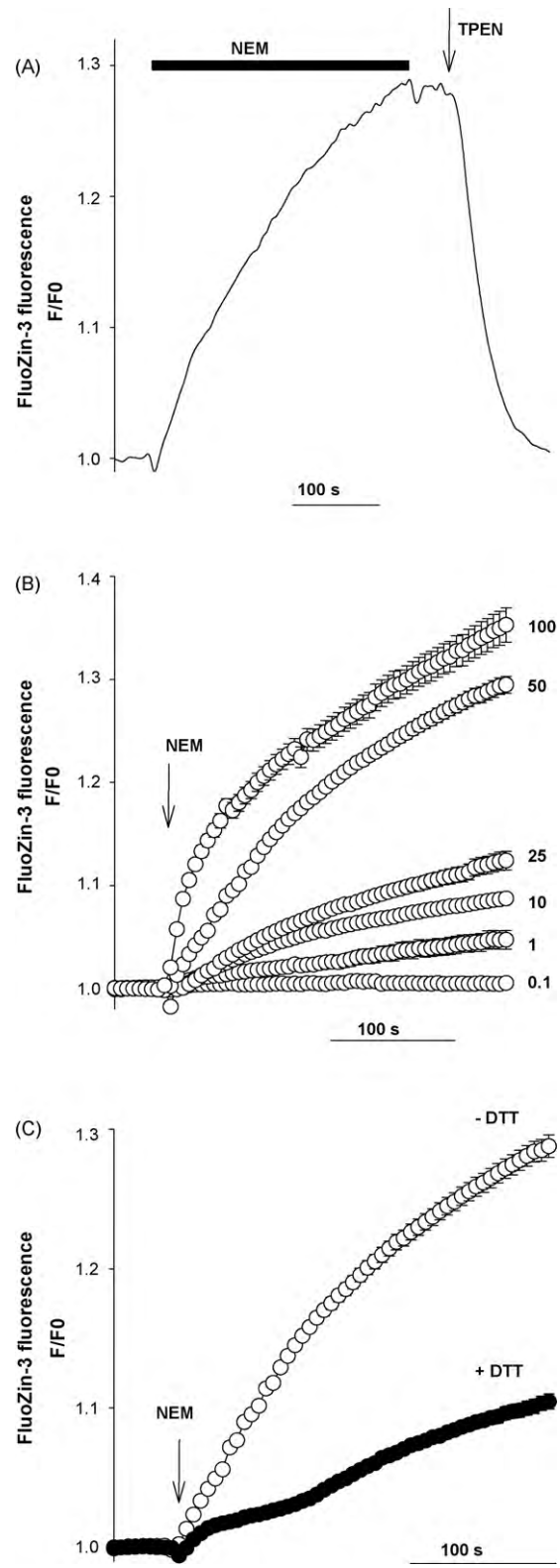


Fig. 2. NEM increases the cytosolic concentration of free Zn^{2+}. (A) NEM (50 μM, horizontal black bar) promotes a FluoZin-3 response that is suppressed by TPEN (10 μM, arrow). (B) Averaged concentration–response curves of the FluoZin-3 responses recorded in the presence of 0.1, 1, 10, 25, 50 or 100 μM NEM. Values are shown as mean ± SEM. The number of cells and culture dishes used were, respectively 23/2, 14/2, 116/5, 120/4, 488/18, and 84/4. (C) The effect of the thiol reducing agent DTT (0.5 mM) was tested. DTT was added to the cells 5 min before (and remained present during) the application of NEM (50 μM, arrow). NEM (without DTT): same data as in panel B; NEM + 0.5 mM DTT (n = 49 cells), mean ± SEM. When not visible, the error bars are smaller than the symbols.

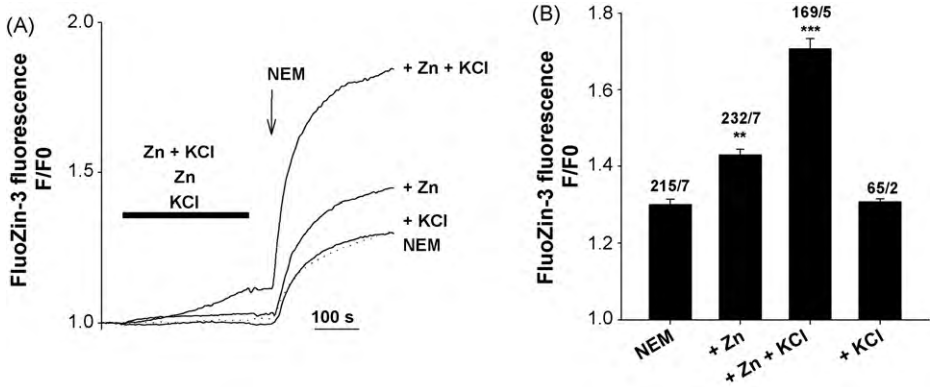


Fig. 3. Loading of the NEM-sensitive pool of Zn^{2+}. (A) The panel shows representative FluoZin-3 recordings from cortical neurons maintained at 2–3 DIV. NEM (50 μM) was applied as indicated by the arrow and remained present until the end of the recording. In some instances either Zn-acetate (15 μM), Zn-acetate (15 μM) + KCl (50 mM), or KCl (50 mM) alone were added (as indicated by the black bar) and washed away before the NEM challenge. Dotted line: NEM was added alone without a preceding treatment. (B) Summary graph showing the averaged maximal FluoZin-3 signals (*F*/*F*0) recorded in each condition (mean ± SEM). The FluoZin-3 signals were quantified 250 s after the addition of NEM. The number of cells and culture dishes used are given. ** and *** indicate $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Student's *t* test) when compared to NEM.

that NEM acts in neurons as an oxidant that releases Zn^{2+} from Zn^{2+}-binding proteins, neuronal cultures were exposed to the thiol reducing agent DTT (0.5 mM), a compound that can alter the redox state of such proteins. Our findings summarized in Fig. 2C indicate that DTT, when added 5 min before the application of NEM (50 μM), prevents the NEM-driven rises of FluoZin-3 fluorescence.

3.3. Regulation of the NEM-sensitive pool of Zn^{2+}

We next determined whether the size of the releasable pool of Zn^{2+} can be manipulated and found that the NEM-induced elevation of the FluoZin-3 fluorescence is strongly enhanced by pre-exposure of cortical neurons to a low (15 μM) concentration of extracellular Zn^{2+} (Fig. 3A). This finding suggests that the external application of Zn^{2+} can increase the cation uptake and refills the NEM-sensitive pool of Zn^{2+}. Several Zn^{2+} entry routes have been identified in cultured cortical neurons [27]. Among them, voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs) represent a prominent pathway. To check whether the entry of Zn^{2+} through VGCC can influence the size of the NEM-sensitive pool of Zn^{2+}, cells were challenged with a high potassium solution containing 50 mM KCl (instead of 5 mM KCl for the control external medium) supplemented with 15 μM Zn-acetate. NEM was then added after the washout of the Zn^{2+}-enriched depolarizing solution. Under these conditions, NEM provoked large rises of FluoZin-3 signals as illustrated in Fig. 3A. Control experiments were carried out with KCl alone and we found that, in the absence of externally added Zn^{2+}, the K^+-rich medium does not influence the amplitude of the NEM responses (Fig. 3B). Altogether, these data show that NEM influences $[Zn^{2+}]_i$ levels and that the size of the NEM-releasable pool of Zn^{2+} can be regulated notably in response to the uptake of external Zn^{2+} through the activation of VGCCs.

3.4. NEM promotes mitochondrial Zn^{2+} uptake

In a different set of experiments, we investigated whether NEM-driven cytosolic $[Zn^{2+}]_i$ rises could result in the sequestration of the cation in mitochondria. To explore this possibility, cortical neurons were loaded with the Zn^{2+}-sensitive mitochondrial fluorescent probe, RhodZin-3. RhodZin-3 is taken up by mitochondria [20,28,29], has a K_d for Zn^{2+} of ~65 nM but shows no sensitivity to Ca^{2+} up to mM levels [20]. As we have reported before [20,28], RhodZin-3 loading resulted in a most prominent accumulation of the probe in the perinuclear region with a distinct speckled pattern of fluorescence that is consistent with a preferential sequestration of the probe in the mitochondria. After a 5 min baseline acquisition, RhodZin-3-loaded neurons were exposed to 50 μM NEM for 10 min and fluorescence changes were evaluated for an additional 20 min. Fig. 4A shows that upon exposure to NEM, Zn^{2+} starts to slowly rise inside mitochondria, a process that continues even upon washout of the compound. In agreement with the idea that the NEM-driven RhodZin-3 fluorescence changes are largely due to mitochondrial Zn^{2+} sequestration, treatment (before, during and after the NEM exposure) with 10 μM of ruthenium red, a compound that blocks the Ca^{2+} uniporter which is also a major route for mitochondrial Zn^{2+} sequestration [30], completely abolished any NEM-triggered RhodZin-3 fluorescence signal (Fig. 4B). Further substantiating the idea that NEM triggers Zn^{2+} uptake in the mitochondria, addition prior to the NEM exposure of the mitochondrial protonophore, CCCP (10 μM), a compound that induces rapid mitochondrial depolarization, completely occluded any NEM-triggered RhodZin-3 fluorescence changes (Fig. 4C).

3.5. NEM triggers cell death in a Zn^{2+}-dependent manner

Zn^{2+} can induce apoptosis when in excess. Since NEM alters the homeostasis of this metal, it was of interest to investigate its effect on neuronal survival. In another set of experiments neurons grown for 6 days *in vitro* were incubated for 10 min in the presence of 50 μM NEM and cell survival was assayed 24 h later by means of the MTT test. It is based on the ability of mitochondrial dehydrogenases to transform the water soluble MTT into insoluble formazan. Results from these experiments indicate that a 10 min exposure to NEM triggers a sharp neuronal loss (Fig. 5A). When cells were incubated with 2 mM of N-acetylcysteine (NAC) or glutathione (GSH) for 4 h at 37 °C prior to the addition of NEM, cell death was almost totally prevented (Fig. 5A) indicating that NEM controls an oxidative (or nitrosative)-dependent stress that affects neuronal survival. Finally, in order to test whether the NEM-dependent neuronal cell loss was dependent on $[Zn^{2+}]_i$ rises, cortical neurons were pre-treated with TPEN (2.5 μM). The metal chelator was introduced before (and was present during) the addition of NEM and markedly reduced the NEM-dependent toxicity (Fig. 5A). In order to better identify the action of NAC and GSH, Zn^{2+} imaging experiments with Fluozin-3 were conducted according to the protocol illustrated in Fig. 2A. Cells were pre-treated with NAC or GSH before adding 50 μM NEM. Under these conditions, NEM-dependent Zn^{2+} rises were partially reduced (Fig. 5B). This indicates that both agents not only reduced the NEM-dependent release of Zn^{2+} but they also exert a neuroprotective action.

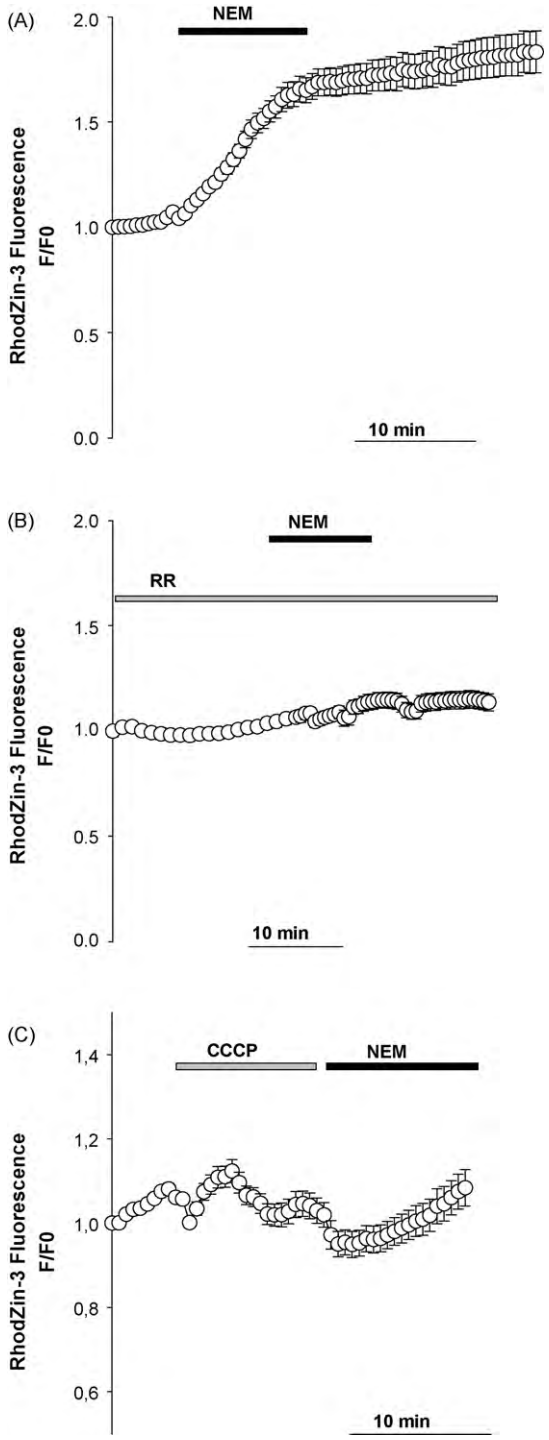


Fig. 4. NEM induces Zn^{2+} uptake in mitochondria. (A) Cortical neurons loaded with the Zn^{2+} sensitive mitochondrial probe RhodZin-3 were challenged, after a 5 min baseline in regular bathing medium, for 10 min with a solution containing 50 μM of NEM. NEM application induced a rapid elevation of the RhodZin-3 signal (shown as *F*/*F*0 values) that persisted even upon removal of the compound in the washout period. The graph shows the averaged (mean ± SEM) fluorescence values of 47 cortical neurons obtained from 3 independent experiments. (B) Effect of ruthenium red, an inhibitor of the Ca^{2+} uniporter, on the NEM-driven changes in RhodZin-3 fluorescence. Ruthenium red (RR, 10 μM, grey bar) was present before during and after the NEM exposure (black bar). Graph shows the averaged (mean ± SEM) fluorescence values (expressed as *F*/*F*0) of 70 cortical neurons from 3 different experiments. (C) Mitochondrial depolarization prevents NEM-triggered mitochondrial Zn^{2+} rises. CCCP (10 μM; left) was added for 10 min followed by the addition of NEM (50 μM) in the continued presence of the drug. Note that CCCP occludes any response to subsequent NEM exposure. Graph shows the averaged (mean ± SEM) fluorescence values (expressed as *F*/*F*0) of 41 neurons from 2 different experiments.

4. Discussion

By performing live-cell Ca^{2+} and Zn^{2+} imaging experiments with the fluorescent probes Fluo-4 and FluoZin-3, we could show that the alkylating agent NEM specifically elevates $[Zn^{2+}]_i$ levels in cortical neurons. The NEM-dependent Fluo-4 or FluoZin-3 responses were observed in the presence of a very low concentration of the alkylating agent (≥1 μM). Increasing the compound concentration (from 1 to 100 μM) further enhanced the amplitude of the Fluo-4 (data not shown) or FluoZin-3 responses. These NEM-dependent signals, which develop slowly over time, persisted throughout the bath application of NEM. They were completely suppressed by the application of TPEN. Since this chelator has a low affinity for Ca^{2+} (K_d 4×10^{-5} M) but a high affinity for Zn^{2+} (K_d 2.9×10^{-16} M) [25], we conclude that NEM specifically affects $[Zn^{2+}]_i$ but not $[Ca^{2+}]_i$. Furthermore, experiments with RhodZin-3 indicate that these NEM-driven cytosolic $[Zn^{2+}]_i$ rises eventually end up in increasing mitochondrial Zn^{2+} levels.

NEM is a well-known regulator of Ca^{2+} homeostasis. For instance, it influences the activity of plasma membrane and intracellular Ca^{2+} channels [12,13]. It can even promote the entry of Ca^{2+} or trigger its release from internal pools [5–7]. However, caution is needed when interpreting data obtained with fluorescent Ca^{2+} probes because various endogenous metals present in all living cells can interfere with the fluorescent signals [13]. This includes Zn^{2+}, an important trace element fulfilling a myriad of biological functions. Zn^{2+} binds on specific domains of nuclear proteins, serves as an enzymatic co-factor, or plays a role as a signalling messenger [14,31,32]. Most of this metal is generally bound to proteins but, depending on the redox state of the cell, can be mobilized which results in an elevation of $[Zn^{2+}]_i$ [33]. Our data are in line with a previous study showing that NEM increases $[Zn^{2+}]_i$ [26]. However we here demonstrate that, in neurons, the compound does not affect $[Ca^{2+}]_i$ levels. NEM is not the only agent known to elevate $[Zn^{2+}]_i$ in cortical neurons. For instance, the oxidizing agent DTDP, like NEM, enhances $[Zn^{2+}]_i$ and causes neuronal injury [34]. But, in contrast to DTDP-induced neuronal loss, NEM-induced cell death is not prevented when cells are maintained in a medium containing blockers of potassium channels like TEA or 4-AP (Gibon et al., unpublished data). DTDP and NEM may therefore act by recruiting distinct cell death pathways.

Changes in neuronal $[Zn^{2+}]_i$ levels can have important consequences as a deficit or an excess of Zn^{2+} can alter cell viability and survival [35]. Results shown in Fig. 5 clearly demonstrate that NEM promotes cell death via a NAC- or GSH-sensitive process as low concentrations of NEM are able to generate an oxidative stress that causes neuronal loss. NEM-dependent cell death is triggered by $[Zn^{2+}]_i$ rises since it is attenuated by the Zn^{2+} chelator TPEN. Of interest, it was reported that NEM causes the fusion of mitochondria [36,37], giving rise to a mitochondrial reticulum. This response does not occur when the cells are pre-treated with NAC [36]. Mitochondria are highly dynamic organelles undergoing processes of fusion/fission. Altering these processes dramatically impairs the mitochondrial functions and lead to cell death [38]. NEM promotes the sequestration of Zn^{2+} into mitochondria (Fig. 4) and triggers neuronal death in a Zn^{2+}-dependent manner, thus it is tempting to speculate that this phenomenon might involve a perturbation of the fission/fusion processes of the organelles.

In conclusion, by employing live-cell Ca^{2+} and Zn^{2+} imaging experiments we show that, in cortical neurons, the alkylating agent NEM specifically increases $[Zn^{2+}]_i$ without influencing $[Ca^{2+}]_i$. Moreover, Zn^{2+} uptake via the activation of VGCCs increases the size of the NEM-sensitive pool of Zn^{2+}. Finally, NEM displays neurotoxic properties. N-acetylcysteine and GSH prevent the NEM-dependent neuronal cell death that is set in motion by $[Zn^{2+}]_i$ rises. Collectively, our data increase our understanding of the action of this alkylat-

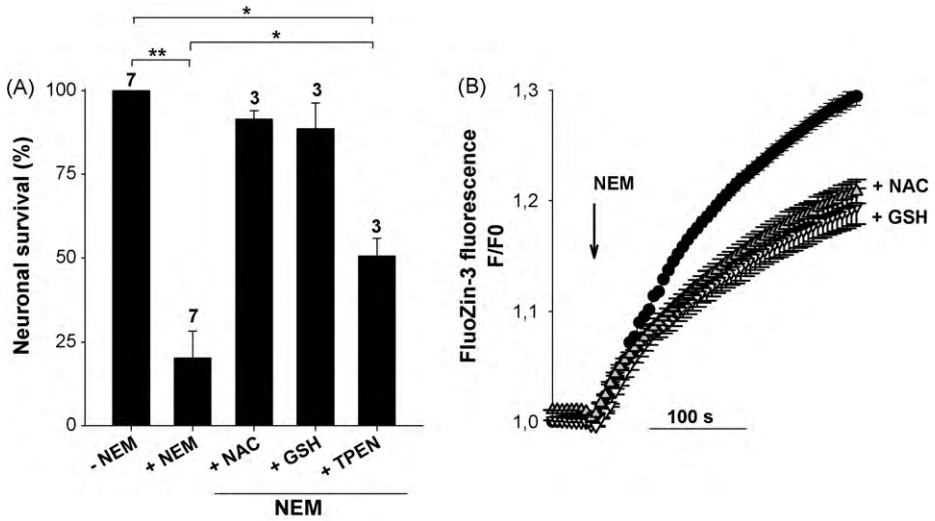


Fig. 5. Neurotoxic properties of NEM. (A) Neurons at 6–7 DIV were treated with 50 μM NEM for 10 min at 37 °C. NEM was then washed away and the cells remained 1 more day in culture before performing the colorimetric MTT assay. In some experiments, cells were first pre-treated for 10 min with TPEN (2.5 μM), before adding NEM (still in the presence of TPEN). In another set of experiments NAC (2 mM) or GSH (2 mM) was added 4 h before NEM. In each instance, cell viability was determined 24 h after the washout of NEM. The data presented are the mean ± SEM. The number of independent experiments performed is indicated for each condition. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, Mann–Whitney test. (B) Same protocol as in Fig. 2B. FluoZin-3-loaded cortical neurons were challenged with 50 μM NEM (arrow) without (filled symbols, $n = 62$ cells/2 dishes) or after one of the following pre-treatment: NAC (2 mM, $n = 128$ cells/4 dishes, grey triangles) or GSH (2 mM, $n = 106$ cells/4 dishes, open triangles) (4 h at 37 °C) added before the beginning of the recording. The data presented are the mean ± SEM. When not visible, error bars are smaller than symbols.

ing agent on central nervous system neurons, reveal a new feature of this compound, and further illustrate the lack of specificity of fluorescent Ca^{2+} probes.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgements

We wish to thank J-M Moulis for his helpful comments. This study was supported by a grant from l'Agence Nationale de la Recherche (06-SEST-038; AB) and by funds from the Italian Dept. of Education (FIRB 2003; PRIN 2006; PRIN 2008; SLS).

References

[1] K.H. Jakobs, P. Lasch, M. Minuth, K. Aktories, G. Schultz, Uncoupling of alpha-adrenoceptor-mediated inhibition of human platelet adenylate cyclase by N-ethylmaleimide, J. Biol. Chem. 257 (1982) 2829–2833.
[2] W. Morishita, S.A. Kirov, T.A. Pitler, L.A. Martin, R.A. Lenz, B.E. Alger, N-ethylmaleimide blocks depolarization-induced suppression of inhibition and enhances GABA release in the rat hippocampal slice in vitro, J. Neurosci. 17 (1997) 941–950.
[3] K. Kirmse, S. Kirischuk, N-ethylmaleimide increases release probability at GABAergic synapses in layer I of the mouse visual cortex, Eur. J. Neurosci. 24 (2006) 2741–2748.
[4] C.J.M. Beckers, M.R. Block, B.S. Glick, J.E. Rothman, W.E. Balch, Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein Nature (1989) 397–398.
[5] C.J. Favre, C.A. Ufret-Vincenty, M.R. Stone, H.T. Ma, D.L. Gill, Ca^{2+} pool emptying stimulates Ca^{2+} entry activated by S-nitrosylation, J. Biol. Chem. 273 (1998) 30855–30858.
[6] J.P. Wang, Characterization of maleimide-activated Ca^{2+} entry in neutrophils, Biochem. Pharmacol. 65 (2003) 1923–1929.
[7] M.F. Hsu, S.P. Sun, Y.S. Chen, C.R. Tsai, L.J. Huang, L.T. Tsao, et al., Distinct effects of N-ethylmaleimide on formyl peptide- and cyclopiazonic acid-induced Ca^{2+} signals through thiol modification in neutrophils, Biochem. Pharmacol. 70 (2005) 1320–1329.
[8] R. Zucchi, S. Ronca-Testoni, The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states, Pharmacol. Rev. 49 (1997) 1–51.
[9] E.V. Menshikova, E. Cheong, G. Salama, Low N-ethylmaleimide concentrations activate ryanodine receptors by a reversible interaction, not an alkylation of critical thiols, J. Biol. Chem. 275 (2000) 36775–36780.
[10] G.H. Zhang, M. Yamaguchi, S. Kimura, S. Higham, N. Kraus-Friedmann, Effects of heavy metal on rat liver microsomal Ca2(+)-ATPase and Ca^{2+} sequestering. Relation to SH groups, J. Biol. Chem. 265 (1990) 2184–2189.
[11] X. Ren, J. Kasir, H. Rahamimoff, The transport activity of the Na^{+}–Ca^{2+} exchanger NCX1 expressed in HEK 293 cells is sensitive to covalent modification of intracellular cysteine residues by sulfhydryl reagents, J. Biol. Chem. 276 (2001) 9572–9579.
[12] A. Almanza, F. Navarrete, R. Vega, E. Soto, Modulation of voltage-gated Ca^{2+} current in vestibular hair cells by nitric oxide, J. Neurophysiol. 97 (2007) 1188–1195.
[13] A. Takahashi, P. Camacho, J.D. Lechleiter, B. Herman, Measurement of intracellular calcium, Physiol. Rev. 79 (1999) 1089–1125.
[14] S.L. Sensi, P. Paoletti, A.I. Bush, I. Sekler, Zinc in the physiology and pathology of the CNS, Nat. Rev. Neurosci. 10 (2009) 780–791.
[15] C.J. Stork, Y.V. Li, Intracellular zinc elevation measured with a "calcium-specific" indicator during ischemia and reperfusion in rat hippocampus: a question on calcium overload, J. Neurosci. 26 (2006) 10430–10437.
[16] H. Haase, S. Hebel, G. Engelhardt, L. Rink, Zinc ions cause the thimerosal-induced signal of fluorescent calcium probes in lymphocytes, Cell Calcium 45 (2009) 185–191.
[17] J.L. Martin, C.J. Stork, Y.V. Li, Determining zinc with commonly used calcium and zinc fluorescent indicators, a question on calcium signals, Cell Calcium 40 (2006) 393–402.
[18] M.J. Devinney II, I.J. Reynolds, K.E. Dineley, Simultaneous detection of intracellular free calcium and zinc using fura-2FF and FluoZin-3, Cell Calcium 37 (2005) 225–232.
[19] A. Bouron, X. Altafaj, S. Boisseau, M. De Waard, A store-operated Ca^{2+} influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca^{2+} stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice, Brain Res. Dev. Brain Res. 159 (2005) 64–71.
[20] S.L. Sensi, D. Ton-That, J.H. Weiss, A. Rothe, K.R. Gee, A new mitochondrial fluorescent zinc sensor, Cell Calcium 34 (2003) 281–284.
[21] K.R. Gee, Z.L. Zhou, D. Ton-That, S.L. Sensi, J.H. Weiss, Measuring zinc in living cells: a new generation of sensitive and selective fluorescent probes, Cell Calcium 31 (2002) 245–251.
[22] D. Thomas, S.C. Tovey, T.J. Collins, M.D. Bootman, M.J. Berridge, P. Lipp, A comparison of fluorescent Ca^{2+} indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca^{2+} signals, Cell Calcium 28 (2000) 213–223.
[23] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55–63.
[24] A. Bouron, C. Mbebi, J.P. Loeffler, M. De Waard, The beta-amyloid precursor protein controls a store-operated Ca entry in cortical neurons, Eur. J. Neurosci. 20 (2004) 2071–2078.
[25] P. Arslan, F. Di Virgilio, M. Beltrame, R.Y. Tsien, T. Pozzan, Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas: a new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca^{2+}, J. Biol. Chem. 260 (1985) 2719–2727.
[26] H. Haase, D. Beyersmann, Intracellular zinc distribution and transport in C6 rat glioma cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 296 (2002) 923–928.

[27] S.L. Sensi, L.M. Canzoniero, S.P. Yu, H.S. Ying, J.Y. Koh, G.A. Kerchner, et al., Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry, J. Neurosci. 17 (1997) 9554–9564.
[28] S.L. Sensi, D. Ton-That, P.G. Sullivan, E.A. Jonas, K.R. Gee, L.K. Kaczmarek, et al., Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn^{2+} pools, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (2003) 6157–6162.
[29] L. Bonanni, M. Chachar, T. Jover-Mengual, H. Li, A. Jones, H. Yokota, et al., Zinc-dependent multi-conductance channel activity in mitochondria isolated from ischemic brain, J. Neurosci. 26 (2006) 6851–6862.
[30] N.E. Saris, K. Niva, Is Zn^{2+} transported by the mitochondrial calcium uniporter? FEBS Lett. 356 (1994) 195–198.
[31] S. Frassinetti, G. Bronzetti, L. Caltavuturo, M. Cini, C.D. Croce, The role of zinc in life: a review, J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 25 (2006) 597–610.
[32] M. Stefanidou, C. Maravelias, A. Dona, C. Spiliopoulou, Zinc: a multipurpose trace element, Arch. Toxicol. 80 (2006) 1–9.
[33] K.D. Kroncke, Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis, Arch. Biochem. Biophys. 463 (2007) 183–187.
[34] E. Aizenman, A.K. Stout, K.A. Hartnett, K.E. Dineley, B. McLaughlin, I.J. Reynolds, Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release, J. Neurochem. 75 (2000) 1878–1888.
[35] R.A. Colvin, C.P. Fontaine, M. Laskowski, D. Thomas, Zn^{2+} transporters and Zn^{2+} homeostasis in neurons, Eur. J. Pharmacol. 479 (2003) 171–185.
[36] T.J. Bowes, R.S. Gupta, Induction of mitochondrial fusion by cysteine-alkylators ethacrynic acid and N-ethylmaleimide, J. Cell Physiol. 202 (2005) 796–804.
[37] T. Bowes, R.S. Gupta, Novel mitochondrial extensions provide evidence for a link between microtubule-directed movement and mitochondrial fission, Biochem. Biophys. Res. Commun. 376 (2008) 40–45.
[38] D.C. Chan, Mitochondrial fusion and fission in mammals, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22 (2006) 79–99.

Annexe 2

Biological roles of trace elements in the brain with special focus on Zn and Fe

Author's personal copy

REVUE NEUROLOGIQUE 167 (2011) 269–279

Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

Revue générale

Rôles biologiques des éléments traces dans le cerveau – exemples du Zn et du Fe

Biological roles of trace elements in the brain with special focus on Zn and Fe

S. Bohic [a,b], J.-F. Ghersi-Egea [c], J. Gibon [b,d], P. Paoletti [e], J. Arnaud [f,g], S. Hunot [h,i,j], A. Boom [k], A. Bouron [b,,d]*

[a] *Inserm U836, équipe 6 « Rayonnement synchrotron et recherches médicales », Grenoble institut des neurosciences, 38054 Grenoble, France*
[b] *Université Joseph-Fourier, 38000 Grenoble, France*
[c] *Inserm U842, université de Lyon, Lyon-1, 69372 Lyon, France*
[d] *UMRS CNRS 5249, laboratoire de chimie et biologie des métaux, CEA, 38054 Grenoble, France*
[e] *CNRS UMR8197, Inserm U1024, institut de biologie, école normale supérieure, 75005 Paris, France*
[f] *Inserm U884, bioénergétique fondamentale et appliquée, 38041 Grenoble, France*
[g] *Département de biochimie, toxicologie et pharmacologie, CHU de Grenoble, 38043 Grenoble, France*
[h] *Centre de recherche de l'institut du cerveau et de la moelle épinière, université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR-S975, Paris, France*
[i] *Inserm UMR 975, Paris, France*
[j] *CNRS UMR 7225, Paris, France*
[k] *Laboratoire d'histologie générale, de neuroanatomie et neuropathologie, université Libre-de-Bruxelles, Bruxelles, Belgique*

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Reçu le 7 avril 2010
Reçu sous la forme révisée le 14 juin 2010
Accepté le 20 juillet 2010
Disponible sur Internet le 5 novembre 2010

Mots clés :
Métaux
Maladies neurologiques
Neurodégénérescence
Zinc
Fer
Manganèse
Cerveau

RÉSUMÉ

Introduction. – De nombreux métaux comme le fer, le cuivre ou le zinc sont vitaux pour tous les organismes vivants car ils interviennent dans de nombreux processus biologiques (synthèse de l'ADN, transport d'oxygène par l'hémoglobine...). Dans le tissu nerveux, ces métaux participent à des processus essentiels comme la formation de la gaine de myéline ou la régulation de la transmission synaptique.

État des connaissances. – Leur concentration est très finement régulée et toute carence ou excès peut provoquer des dommages cellulaires et altérer les performances cognitives. Au cours du vieillissement certaines structures cérébrales accumulent des métaux. Par ailleurs, une perturbation de l'homéostasie d'éléments comme le zinc, le fer ou le cuivre est observée dans diverses pathologies neurologiques. De nombreux travaux ont mis en évidence l'importance physiopathologique des métaux dans le fonctionnement cérébral.

Conclusion et perspectives. – Cette revue, principalement focalisée sur le zinc et le fer, aborde certains aspects moléculaires et cellulaires de leur entrée, distribution, métabolisme et mécanismes d'action dans le cerveau, ainsi que leur impact potentiel sur les fonctions cognitives et le développement de maladies neurodégénératives.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* *Auteur correspondant.*
Adresse e-mail : alexandre.bouron@cea.fr (A. Bouron).

0035-3787/$ – see front matter © 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.neurol.2010.07.035

Author's personal copy

Keywords:
Metals
Iron
Zinc
Manganese
Brain
Neurological diseases
Neurodegeneration

ABSTRACT

Introduction. – Many metals like iron (Fe), copper (Cu) or zinc (Zn) fulfil various essential biological functions and are thus vital for all living organisms. For instance, they play important roles in nervous tissue, participating in a wide range of processes such as neurotransmitter synthesis, myelination or synaptic transmission.

State of the art. – As in other tissues, brain cells tightly control the concentration of metals but any excess or deficit can lead to deleterious responses and alter cognitive functions. Of note, certain metals such as Zn, Fe or Cu accumulate in specific brain structures over lifespan and several neurodegenerative diseases are associated with a dysregulation of the homeostatic mechanisms controlling the concentration of these cations.

Conclusion and perspectives. – This review will address some of the cellular and molecular processes controlling the entry and distribution of selected metals (mainly Zn and Fe) in the brain, as well as their roles in synaptic transmission, in the pathogenesis of some neurologic diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease, and their impact on cognitive functions.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Dans un contexte de vieillissement des populations, comprendre l'impact de facteurs environnementaux sur la santé humaine de façon à élaborer des recommandations et des mesures préventives représente un des challenges majeurs en santé publique. Parmi ces facteurs figurent les métaux qui sont présents dans notre environnement quotidien (existence de gisements naturels, utilisation dans l'industrie des nanotechnologies, à des fins médicales dans de nombreux agents pharmacologiques, agents de contraste et radiopharmaceutiques, présence dans des cosmétiques, des emballages, métaux présents dans des particules générées par le trafic routier, les incinérateurs...). Ils sont dispersés et se retrouvent ainsi dans l'air, l'eau et notre alimentation. Ils pénètrent dans l'organisme principalement via les voies respiratoires et digestives et plus rarement par voie cutanée. Certains métaux, comme le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le mercure (Hg) ou l'aluminium (Al), n'ont pas de fonctions biologiques et exercent uniquement des actions toxiques. En revanche, de nombreux métaux comme le fer (Fe), le cuivre (Cu) ou le zinc (Zn) sont vitaux car ils interviennent dans une myriade de processus biologiques (synthèse de l'ADN, transport d'oxygène par l'hémoglobine, fonction mitochondriale...). Leur concentration est très finement régulée et toute carence ou excès peut provoquer des dommages cellulaires et altérer les performances cognitives. Le cerveau présente la particularité d'accumuler, au cours du vieillissement, des métaux dans certaines de ses structures. Par exemple, une accumulation intracérébrale de manganèse (Mn), Fe, Cu et Zn est observée dans des zones spécifiques du cerveau chez le rat (Tarohda et al., 2004), la souris (Hahn et al., 2009) mais aussi chez l'homme (Bartzokis et al., 2007 ; Xu et al., 2008 ; Zecca et al., 2001). Par ailleurs, une perturbation de l'homéostasie d'éléments comme le Zn, le Fe ou le Cu est observée dans diverses pathologies neurologiques.

Les deux voies d'accès des métaux au cerveau sont les voies nasales et la circulation sanguine. Les échanges entre le sang et le système nerveux central (SNC) sont régulés, d'une part, au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux formant la barrière hémato-encéphalique (BHE) et, d'autre part, au niveau de l'épithélium des plexus choroïdes formant la barrière entre le sang et le liquide-céphalo-rachidien (LCR) (Ghersi-Egea et al., 2009). Celui-ci circule dans les ventricules cérébraux et les espaces sous-arachnoïdiens et permet un accès et des échanges rapides avec le parenchyme cérébral (Strazielle et Ghersi-Egea, 2000). Au niveau des deux types d'interfaces, les jonctions serrées liant les cellules entre elles et des transporteurs d'efflux participent au phénotype de barrière, alors que des mécanismes de transfert impliquant des transporteurs (diffusion facilitée/transport actif) ou des récepteurs (transcytose) régulent la pénétration cérébrale de solutés polaires. Ces interfaces sont donc une porte mais également un site potentiel d'élimination active des métaux hors du SNC.

Leur pénétration dans le cerveau a été clairement démontrée in vivo. Par exemple, le Fe entre principalement sous forme liée à la transferrine, via des mécanismes impliquant le récepteur à la transferrine ainsi que d'autres transporteurs de métaux au niveau des plexus choroïdes et des capillaires (Deane et al., 2004 ; Qian et Shen, 2001). Les voies de pénétration du Mn dans le cerveau dépendent de sa concentration plasmatique et les mécanismes mis en jeu diffèrent en fonction de sa spéciation qui gouverne la liaison du métal à la transferrine. Ces mécanismes impliquent de multiples protéines de transport (Aschner et al., 2007). Le cuivre pénètre sous forme non liée aux protéines dans le cerveau, et la régulation de son homéostasie cérébrale pourrait impliquer plusieurs protéines de transport d'influx et d'efflux répartis au sein des deux interfaces (Choi et Zheng, 2009). L'entrée d'autres métaux comme l'Al (à travers les deux barrières), le Cd et le Pb a également été établie (Allen et Yokel, 1992 ; Bradbury et Deane, 1993 ; Ilback et al., 2006). Un mécanisme d'efflux semble réguler la biodisponibilité de l'Al (Allen et al., 1995). L'importance relative de la BHE et de la barrière sang-LCR dans l'accumulation de ces métaux reste cependant mal définie, et les mécanismes moléculaires régulant les échanges des métaux à travers ces barrières sont encore mal compris, notamment parce qu'ils sont abordés via l'utilisation de lignées cellulaires qui ne reflètent pas nécessairement les propriétés de l'endothélium cérébral et de l'épithélium

Author's personal copy

choroïdien. Les plexus choroïdes présentent in vivo la capacité d'accumuler les métaux lourds, et ils pourraient être une voie d'entrée prépondérante de certains de ces éléments dans le cerveau (Bock et al., 2008 ; Zheng et al., 2003). L'exposition simultanée à différents métaux peut également changer leur biodisponibilité relative. Par exemple, l'exposition in vivo au Mn altère la biodisponibilité du Fe dans le cerveau via une altération de la voie de transcytose médiée par le récepteur à la transferrine (Li et al., 2006). Enfin, en plus de leur fonction de barrière anatomique et de transport sélectif, les interfaces sang-cerveau assurent des fonctions neuroprotectrices (barrière métabolique, détoxification enzymatique et élimination de composés organiques délétères hors du LCR), neuro-endocrines (régulation des taux cérébraux d'hormones et polypeptides biologiquement actifs) et neuro-immunitaires (efflux de médiateurs de l'inflammation, relais cytokinique de la réponse immunitaire). Les modifications de ces différentes fonctions, liées à l'accumulation cérébrale des métaux, contribuent à leur toxicité. L'exemple le plus connu est l'altération du transport choroïdien des hormones thyroïdiennes par le Pb. Cela participe aux défauts de développement du SNC et à l'apparition des désordres mentaux associés à l'intoxication par ce métal chez l'enfant (Zheng et al., 2003). En ce qui concerne la voie nasale, aucune barrière ne protège le cerveau et les particules en suspension dans l'air peuvent pénétrer directement via la voie olfactive. Mais l'accumulation cérébrale dépend du métal considéré. Par exemple, pour le Fe, il n'y a pas de transfert entre la cavité nasale et le bulbe olfactif. En revanche, des métaux tels que le Cd, le cobalt (Co), le Hg ou le Zn peuvent s'accumuler dans cette dernière structure et d'autres comme le Mn, l'uranium (Ur), le nickel (Ni) ou le titane (Ti) peuvent passer du bulbe olfactif vers diverses zones cérébrales où ils s'accumulent (Bondier et al., 2008 ; Persson et al., 2003a,b ; Sunderman, 2001 ; Tournier et al., 2009).

La très faible concentration des métaux dans les cellules neurales constitue une des principales difficultés à leur étude dans le SNC. Leur abondance est le plus souvent mesurée en *parts per million* (ppm) qui est un rapport massique correspondant généralement à un millionième de gramme. Pour la plupart des métaux, les concentrations dans le cerveau sont dans une gamme allant de 0,1 ppm à quelques centaines de ppm (Rajan et al., 1997). En plus de l'importance de la quantité et de la forme chimique de ces métaux traces, un point particulièrement critique pour le bon fonctionnement cellulaire est la façon dont ils sont distribués au sein des tissus et des compartiments cellulaires. Toute modification de la distribution et compartimentalisation des métaux peut altérer le fonctionnement et la survie cellulaires. Parmi les approches méthodologiques disponibles pour étudier les métaux dans le cerveau, l'imagerie chimique par rayonnement synchrotron constitue une méthode de choix permettant d'analyser quantitativement, au niveau subcellulaire, la distribution spatiale et l'état d'oxydation des éléments chimiques, même à l'état de traces. Ce type d'imagerie multi-élémentaires utilise une puissante source de lumière (rayonnement synchrotron) dans le domaine des rayons X et qui est produite uniquement sur de grandes installations notamment celles situées à Grenoble[1] (source européenne de rayonnement synchrotron [ESRF]) mais aussi à Saclay[2] (source Soleil). Les développements méthodologiques récents réalisés à l'ESRF ont permis d'aboutir à un outil unique de nano-analyse et de nano-imagerie par rayons X dont la haute résolution spatiale (< 100 nm) et la très haute sensibilité chimique (de l'ordre de l'attogramme = 10^{-18} g) rendent accessibles l'étude intracellulaire des métaux traces sur des échantillons biologiques fixés. À titre d'exemple, la Fig. 1 présente la distribution du Fe et du potassium dans des neurones de cortex de souris préalablement cultivés sur des substrats appropriés pour l'analyse et cryofixés puis lyophilisés à basse température sous vide. Les applications en neuroscience pour cet outil en émergence sont en nombre croissant. Des études in vitro par nano-imagerie chimique synchrotron portant sur la distribution subcellulaire du Fe dans un modèle de cellules catécholaminergiques (lignée PC12) ont récemment montré que ce métal s'accumulait dans des structures subcellulaires vraisemblablement de type vésicules dopaminergiques (Ortega et al., 2007). Ces résultats révèlent un rôle physiologique jusque-là insoupçonné de la dopamine dans le stockage

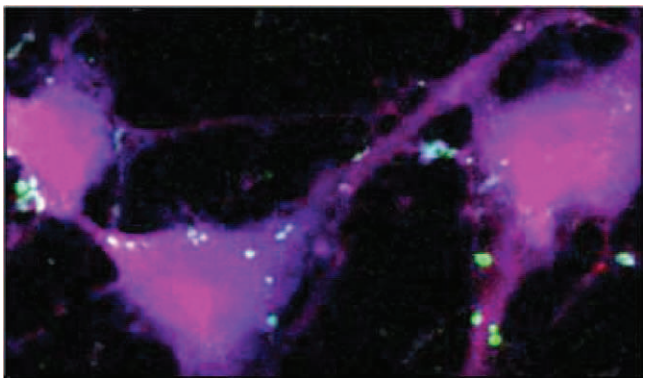


Fig. 1 – Distribution du potassium et du fer dans des neurones corticaux. Ce cliché présente la distribution élémentaire du potassium (violet) et du fer (vert) dans des neurones corticaux de souris. Ces cellules ont été incubées cinq minutes avec 10 μM de Fe^{2+} puis elles ont ensuite été cryofixées et lyophilisées avant de réaliser les analyses avec la nanosonde X synchrotron. Cela permet de révéler que la distribution du potassium est généralement homogène alors que la distribution du fer est essentiellement granulaire, rencontré dans le cytosol et dans certains prolongements neuritiques (S. Bohic, A. Bouron, données non publiées).

Distribution of potassium and iron in cortical neurons. This microphotograph shows the intracellular distribution of potassium (violet) and iron (green) in murine cortical neurons. Cells were incubated in a culture medium supplemented with 10 μM Fe^{2+} for 5 min at 37 °C. The iron-containing medium was washed away and cells were then cryofixed at −160 °C and freeze dried at −65 °C in vacuum before performing the X-ray fluorescence nanoanalyses. As can be shown, potassium has a more homogeneous distribution than iron of which distribution is more punctiform and found in the cytosol and some neuronal processes (S. Bohic, A. Bouron, unpublished data).

[1] http://www.esrf.eu/decouvrir.

[2] http://www.synchrotron-soleil.fr.

Author's personal copy

intracellulaire du Fe dans ce modèle cellulaire. Des études récentes ont pu mettre en évidence l'implication de l'appareil de Golgi dans le stockage du Mn dans les cellules PC12 (Carmona et al., 2010. Par ailleurs, ce type d'approche expérimentale a été utilisé pour étudier la neuromélanine, un pigment endogène de neurones de la substance noire (*substantia nigra* [SN]) et dont la fonction biologique reste méconnue. Les analyses réalisées chez l'homme, en post mortem, sur coupes de tissus, ont permis de préciser la métalloneurochimie de ce pigment au cours du vieillissement cérébral (Bohic et al., 2008). Ce sont ces mêmes neurones mélanisés de la SN qui dégénèrent massivement au cours de la maladie de Parkinson. Des travaux en cours sur des tissus de cerveaux de patients parkinsoniens apporteront de précieuses informations sur la distribution cellulaire des métaux dans cette maladie neurodégénérative.

1. Le zinc

Le Zn est, après le Fe, l'élément trace le plus abondant du corps humain qui en contient 2–3 g. Ce métal est présent dans tous les organes mais plus particulièrement dans les muscles, le foie, les reins, les os et la prostate. La nourriture est, bien avant l'eau de boisson, la principale source de Zn pour l'homme. En général, les apports alimentaires recommandés varient entre 10 et 12 mg/j chez l'adulte, en fonction du sexe et de la biodisponibilité du Zn de la ration alimentaire. Le Zn joue un rôle important dans la biologie du cerveau (Sandstead, 1986). Il a notamment été rapporté que des régimes carencés en Zn provoquent des troubles neurologiques et comportementaux variés (Golub et al., 1995). Tout comme dans le reste du corps, le Zn exerce des rôles biologiques essentiels au niveau cérébral notamment via son rôle structural et/ou catalytique dans une myriade de protéines (près de 300 enzymes nécessitent ce métal pour leur activité). À l'instar du calcium, les concentrations de Zn à l'intérieur des cellules nerveuses sont activement régulées et des augmentations trop importantes du Zn cytoplasmique peuvent aboutir à la mort neuronale (Sensi et al., 2009). La grande majorité du Zn cytoplasmique est fixé à des protéines ou accumulé à l'intérieur de compartiments intracellulaires par des transporteurs spécifiques (*zinc transporters* [ZnT]) ; ainsi la concentration de Zn « libre », non lié à des protéines, est très faible, de l'ordre du picomolaire. Mais le métal peut être mobilisé (ou recruté) à partir de pools internes, notamment dans des situations de stress oxydant (Fig. 2). Dans le tissu nerveux, les principales sources de Zn mobilisable sont les métallothionéines (protéines riches en cystéine liant des métaux de façon réversible et avec une haute affinité), les mitochondries et les vésicules synaptiques (Sensi et al., 2009). Les mitochondries sont des organelles qui apparaissent comme des acteurs essentiels dans l'homéostasie du Zn puisqu'elles peuvent le stocker mais aussi le libérer. À titre d'exemple, l'hyperforine, un antidépresseur d'origine végétal, induit une libération de Zn à partir des mitochondries (Tu et al., 2010).

Dans le cerveau, le Zn ne serait pas seulement un messager intracellulaire contrôlant diverses voies de signalisation, mais également un messager intercellulaire impliqué dans la communication entre cellules nerveuses. En effet, du Zn est concentré en grande quantité (de l'ordre du millimolaire) dans les terminaisons axoniques de nombreux neurones excitateurs du SNC. Ceux-ci sont appelés neurones « zincergiques » ou encore « gluzinergiques ». La distribution de ce pool de Zn est remarquable sous deux aspects :

- premièrement, elle est restreinte au cerveau antérieur (cortex, structures limbiques), avec notamment un très fort

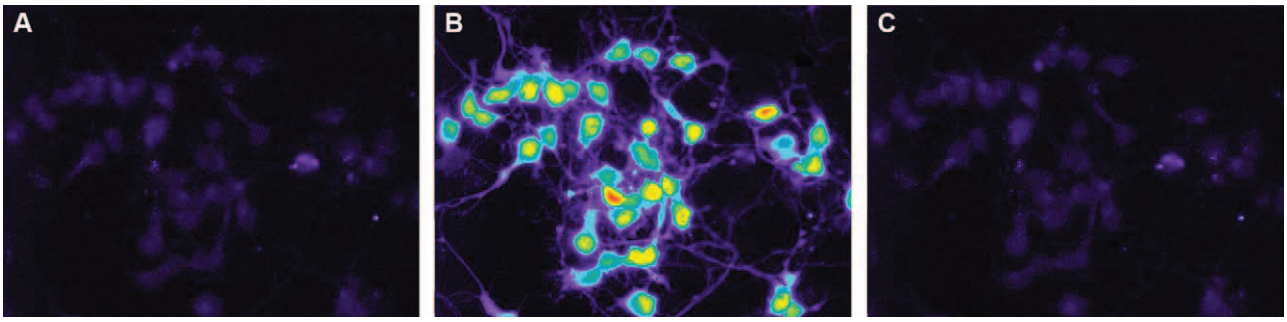


Fig. 2 – Augmentation de la concentration de Zn libre dans les neurones soumis à un stress oxydant. Pour ces expériences, les changements de la concentration des ions Zn^{2+} libres ont été analysés à l'aide d'une sonde fluorescente spécifique : le FluoZin-3. Celle-ci a une très forte affinité pour le Zn^{2+} (K_D : 15 nM) et est insensible aux ions Ca^{2+} et Mg^{2+}. Une augmentation de la concentration en Zn^{2+} libre se traduit par une augmentation de la fluorescence du FluoZin-3 (mesurée à > 525 nm). Cela est illustré sur les trois clichés montrant des neurones de cortex de souris en culture primaire avant (a) et pendant (b) l'application d'un agent oxydant (le 2-2′ dithiopyridine [DTDP]). L'ajout d'un chélateur spécifique des ions Zn^{2+}, le TPEN, supprime la réponse du DTDP (c). (J. Gibon, A. Bouron, données non publiées).

Oxidative stress elevates the intracellular concentration of free zinc. In this set of experiments, the specific fluorescent zinc probe FluoZin-3 was used to monitor the intracellular changes of the concentration of free zinc ([Zn^{2+}]i). This dye has a high affinity for Zn^{2+} (K_D: 15 nM) and is not sensitive to Ca^{2+} and Mg^{2+} ions. Any augmentation of [Zn^{2+}]i gives rise to an enhancement of the FluoZin-3 fluorescence (measured at > 525 nm). The figure shows cortical neurons in culture loaded with FluoZin-3 before (a) and during the application of the oxidant 2-2′ dithiopyridine (DTDP) (b). The addition of the zinc chelator TPEN abolishes the DTDP-dependent FluoZin-3 signal (c) (J. Gibon, A. Bouron, unpublished data).

Author's personal copy

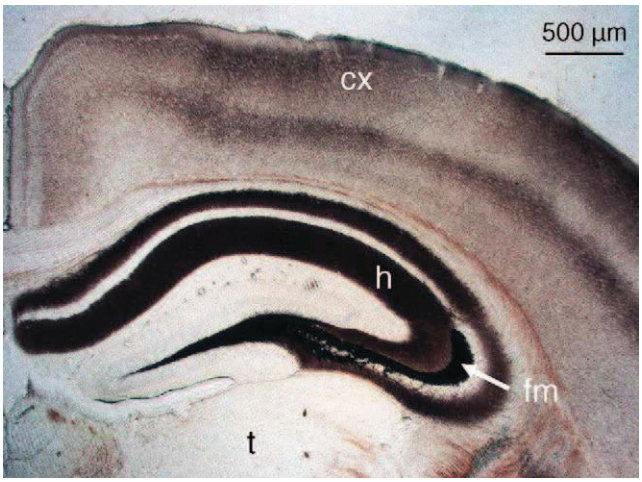


Fig. 3 – Distribution du zinc histo-chimiquement réactif dans le cerveau de souris. Coupe coronale du cerveau antérieur d'une souris jeune adulte après marquage par la méthode de Timm-Danscher (coloration brun/noire). Le zinc marqué correspond exclusivement au zinc contenu dans les vésicules synaptiques de certaines terminaisons axoniques excitatrices (libérant le glutamate comme neurotransmetteur). On note un très fort marquage dans l'hippocampe (h), notamment au niveau des fibres moussues (FM). Cx : cortex ; t : thalamus. (P. Paoletti, données non publiées).

Distribution of the histochemical reactive zinc in a murine brain. Coronal section of a murine brain after staining with the Timm-Danscher method (tan–brown–black). The zinc staining is specifically found in synaptic vesicles of some glutamatergic nerve terminals. Of note, is the strong staining in the hippocampus (mainly in mossy fibers, fm). Cx: cortex; t: thalamus. (P. Paoletti, unpublished data).

enrichissement dans l'hippocampe, région impliquée dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Fig. 3) ;

- en second lieu, au niveau subcellulaire, le Zn axonique se retrouve systématiquement co-accumulé avec le glutamate (principal neurotransmetteur excitateur) dans les vésicules présynaptiques (même si tous les neurones glutamatergiques ne sont pas « zincergiques » (Paoletti et al., 2009).

Le transporteur vésiculaire ZnT3 assure le remplissage en Zn des vésicules synaptiques (Palmiter et al., 1996). Durant l'activité neuronale, suite à l'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison axonique, la libération par exocytose du neurotransmetteur glutamate s'accompagnerait donc, à certaines synapses excitatrices, d'une co-libération de Zn ce qui, localement, élèverait de façon transitoire et brève la concentration extracellulaire de ce métal. Si certains auteurs ont estimé que lors d'activités neuronales intenses, les concentrations de Zn libérées puissent atteindre des dizaines de micromolaires (10–100 µM), en conditions de stimulations plus physiologiques les niveaux de Zn libérés seraient nettement moindres (< 1 µM) (Paoletti et al., 2009). Quelle est l'action de ce Zn dans le compartiment extracellulaire ? Il semble que sa fonction principale soit de moduler la transmission synaptique par le biais d'une interaction directe avec les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), un sous-type de récepteurs du glutamate abondant au niveau de la membrane post-synaptique (Vogt et al., 2000). Les récepteurs NMDA forment des canaux ioniques fortement perméables au calcium, activés par la fixation du glutamate et sont bien connus pour leur rôle central dans la plasticité synaptique à long-terme, phénomène qui résulte d'un changement de l'efficacité des synapses sur des heures, voire des jours, et qui serait le substrat cellulaire des processus mnésiques (Malenka et Nicoll, 1999). Or, il est maintenant bien établi que les récepteurs NMDA possèdent dans leur région extracellulaire des sites modulateurs de liaison du Zn, distincts des sites de liaison du glutamate, et qui agissent comme autant de « senseurs » du Zn extracellulaire (Paoletti et Neyton, 2007). Notamment, les récepteurs NMDA qui contiennent la sous-unité NR2A (sous-unité fortement exprimée dans le cerveau adulte) sont particulièrement sensibles au Zn extracellulaire, étant inhibés par des concentrations nanomolaires de cet ion (Gielen et al., 2008 ; Paoletti et al., 1997). Une telle sensibilité suggère d'ailleurs que le Zn pourrait exercer son action modulatrice non seulement de façon phasique (transitoire) lors de la libération synaptique mais également sous un mode tonique plus lent. En d'autres termes, en conditions basales (de repos), une fraction des récepteurs NMDA pourraient être constitutivement inhibés par le Zn présent à l'état de traces dans le milieu extracellulaire. Quel rôle jouerait cette inhibition et, plus généralement, quel serait l'intérêt pour certains neurones d'accumuler dans les mêmes vésicules d'exocytose le glutamate, activateur des récepteurs NMDA et le Zn, un puissant inhibiteur de ces mêmes récepteurs ? Ce paradoxe apparent reste encore entier. Une explication souvent mise en avant est que le Zn, via son action inhibitrice sur les récepteurs NMDA, exerce une sorte de boucle de rétrocontrôle négatif, empêchant une sur-activation de ces récepteurs et protégeant ainsi les neurones contre une entrée massive de calcium via les canaux NMDA (Sensi et al., 2009). Cette hypothèse est cohérente avec l'observation que les souris où le gène codant pour ZnT3 a été invalidé (souris ZnT3−/−), et qui de ce fait sont dépourvues de Zn vésiculaire, montrent une susceptibilité accrue à la mort neuronale suite à des crises épileptiques limbiques (Cole et al., 2000).

L'implication du Zn dans des processus neurotoxiques illustre les liens étroits entre les métaux et divers processus pathologiques dont les maladies neurodégénératives. Celles-ci constituent un problème de santé publique majeure pour nos populations vieillissantes. Certaines pathologies se caractérisent par des dépôts de métaux. C'est par exemple le cas de la maladie d'Alzheimer (MA). Elle toucherait 5 à 10 % des individus de plus de 65 ans et ce chiffre avoisine 30 % pour la tranche des individus de 80 ans et plus. Sur le plan histopathologique, la MA est caractérisée par deux types de lésions présentes dans le cerveau humain, pathognomoniques de l'affection. Ce sont les plaques amyloïdes (ou séniles) et la dégénérescence neurofibrillaire. Les plaques, situées dans l'espace extracellulaire, sont des dépôts fibrillaires formés des peptides amyloïdes Aβ 1-40 et Aβ 1-42. Les peptides Aβ résultent de la coupure séquentielle de type amyloïdogénique d'une protéine transmembranaire de plus grande taille nommée *amyloid precursor protein* (APP) (Dries et Yu, 2008)

Author's personal copy

par un complexe protéique comprenant les présénilines 1 et 2. L'activité d'une sécrétase de type α est prépondérante et ne mène pas à la production des fragments amyloïdes Aβ 1-40 et Aβ 1-42 (Thinakaran et Koo, 2008). Des mutations au niveau du gène codant pour APP ou dans ceux des présénilines sont responsables de certaines formes familiales de la MA caractérisées notamment par une apparition précoce de la maladie (Janssen et al., 2003). Via des processus encore mal élucidées, les fragments peptidiques amyloïdes Aβ sécrétés s'oligomérisent et précipitent en adoptant une conformation en feuillet β-plissé, contribuant à la formation des plaques dites séniles. C'est au niveau de ces plaques que la concentration en certains métaux, et parmi ceux-ci le Zn, est particulièrement élevée (Stoltenberg et al., 2005).

La dégénérescence neurofibrillaire constitue la seconde caractéristique histopathologique de la MA. Elle a pour origine l'agrégation intraneuronale de la protéine tau appartenant à la famille des protéines associées aux microtubules. Le gène de tau se trouve en 17q21-22 et des mutations sont responsables des formes familiales précoces de démence frontotemporales (Goedert et Spillantini, 2000). Dans la forme sporadique de la MA, qui est la présentation majoritaire, la protéine tau n'est pas mutée mais est anormalement hyperphosphorylée, ce qui conduit à son détachement des microtubules et à sa précipitation dans le neurone sous forme de paires de filaments hélicoïdaux (PHF) (ou *neurofibrillary tangles*). À terme, l'accumulation des PHF va entraîner la mort du neurone.

La présence des PHF et des plaques amyloïdes à l'examen neuropathologique *post-mortem* pose le diagnostic de certitude de la MA. La cinétique d'apparition de ces deux types de lésions a été bien décrite (Braak et Braak, 1991) mais le *primum movens* de l'affection fait toujours débat entre ceux qui privilégient la pathologie « amyloïde » ou la pathologie « tau ». Dans ce débat, le Zn occupe une place intéressante comme élément favorisant la pathologie tau, une fois présentes les plaques amyloïdes.

Avec l'âge, la concentration en Zn augmente dans le SNC et cette caractéristique est exacerbée chez les patients Alzheimer (Religa et al., 2006) où l'on note une distribution originale de type « focale » puisque c'est essentiellement au niveau de la plaque amyloïde que le Zn se concentre (Suh et al., 2000). On mesure ainsi à ce niveau des concentrations avoisinant le millimolaire, une valeur cinq mille fois plus élevée que celle observée physiologiquement (Bush, 2003). D'où vient le Zn présent à de telles concentrations au niveau de la plaque amyloïde ? Une part de la réponse est donnée par la distribution spécifique du Zn dans certaines régions cérébrales. Physiologiquement, seule une sous-population de neurones glutamatergiques co-séquestrent du Zn avec le glutamate dans leurs vésicules synaptiques (Frederickson et al., 2000 ; Paoletti et al., 2009). Ceux-ci sont plus particulièrement présents dans les régions atteintes par la MA tels que les cortex associatifs, l'hippocampe et les noyaux limbiques. Confortant l'idée d'une implication du Zn dans la genèse de la maladie, on ne retrouve pas ce métal dans les neurones des régions épargnées, tels que les noyaux thalamiques, le striatum, le cervelet, le tronc cérébral et la moelle. Au cours de la MA, la déstructuration du parenchyme neuronal par la multiplication des dépôts amyloïdes affecte l'homéostasie des échanges cellulaires avec une recapture invalidée du glutamate s'accompagnant d'une excitotoxicité (Hynd et al., 2004) et d'une accumulation parallèle de Zn. Les régions riches en neurones gluzinergiques sont aussi celles ayant la plus grande densité de plaques amyloïdes. Outre l'accumulation de Zn, d'autres métaux sont rencontrés dans la plaque tels le Fe et le Cu (Zatta et al., 2009). Ces deux derniers sont bien connus pour générer, par réaction de Fenton, des espèces oxydantes responsables, entre autres, de la peroxydation lipidique et de l'oxydation des protéines. Concomitamment, la microglie activée engendre la libération de médiateurs inflammatoires qui vont exercer des effets délétères (Matsuoka et al., 2001). Le rôle indubitable du Zn dans le développement de la pathologie amyloïde a été élégamment démontré par le groupe de Ashley I. Bush qui, à partir d'un modèle de souris transgéniques développant des plaques amyloïdes, a noté leur disparition après un traitement par un chélateur spécifique du Zn (Cherny et al., 2001). De la même manière, dans un modèle transgénique de la MA, l'invalidation du transporteur ZnT3, empêchant le Zn d'être concentré dans les vésicules synaptiques, s'accompagne d'une très nette raréfaction des plaques (Lee et al., 2002). La présence, en périphérie de la plaque amyloïde, de prolongements nerveux ayant une morphologie anormale appelés « neurites dystrophiques », est en relation avec les processus inflammatoires présents au sein de la plaque sénile.

Au niveau des neurites dystrophiques, le Zn est retrouvé aux mêmes concentrations anormales que celles observées dans la plaque amyloïde et, par ailleurs, la protéine tau fait également l'objet d'une transformation post-traductionnelle caractéristique de la MA : l'hyperphosphorylation. En ayant recours aux procédés autométallographiques, deux types de neurites sont observables en microscopie : les neurites dystrophiques dilatés entourant la plaque, composés de corps multivésiculaires riches en Zn, et un second type, peu on non marqué pour ce métal, mais comprenant un nombre important de mitochondries. C'est dans les neurites dystrophiques contenant du Zn qu'une hyperphosphorylation de la protéine tau est observée (Boom et al., résultats non publiés). Ce lien entre le Zn et l'hyper-phosphorylation de tau a déjà pu être démontré in vitro en testant l'effet du métal sur des cellules transfectées sur-exprimant la protéine tau (Boom et al., 2009). L'addition de Zn entraîne une nette hyper-phosphorylation de tau, effet passant par l'activation d'une kinase, la glycogène synthase kinase 3-β. Dans la MA, le Zn apparaît comme un élément favorisant la formation de la plaque amyloïde et le lien entre l'amyloïde et la pathologie tau semble, au moins au niveau de la plaque amyloïde, se concrétiser. Deux hypothèses peuvent être avancées :

- il y aurait un transfert du Zn de la plaque vers les prolongements neuronaux en périphérie de celle-ci. Il reste cependant à comprendre si ces processus de relocalisation du Zn s'effectuent de manière non spécifique, traduisant une perméabilité affectée de la membrane neuritique ou si un transporteur spécifique au niveau du neurite pourrait rendre compte de l'accumulation de Zn ;
- alternativement, le transport axoplasmique altéré en périphérie de la plaque modifierait le fonctionnement d'une série d'organites, dont les vésicules contenant le Zn, au niveau des neurites. Dans ces structures, le métal pourrait rendre compte de l'hyperphosphorylation de

Author's personal copy

tau et de la formation des PHF. Les résultats des études en cours devraient prochainement préciser ces mécanismes.

2. Le fer

Outre le Zn, d'autres métaux sont impliqués dans des pathologies neurologiques. C'est par exemple le cas du Cu dans la maladie de Wilson. Il s'agit d'une maladie génétique autosomique récessive caractérisée par une accumulation de ce métal dans divers organes dont le foie et le cerveau. Elle est provoquée par une mutation dans un gène codant pour une ATPAse, ATP7B, qui est une pompe à Cu, et s'accompagne une accumulation cellulaire de Cu (Madsen et Gitlin, 2007 ; Trocello et al., 2009). Le Fe, l'élément trace le plus abondant du corps humain, est également associé à plusieurs pathologies neurodégénératives comme l'ataxie de Friedrich (Babady et al., 2007 ; Puccio, 2009), la plus fréquente des ataxies héréditaires, ou la maladie de Parkinson (MP). Celle-ci se caractérise par l'atteinte préférentielle de neurones dopaminergiques du mésencéphale et, en particulier, ceux localisés dans la substance noire *pars compacta* (SNpc). Malgré l'identification de gènes impliqués dans des formes héréditaires de la maladie, l'étiologie des formes sporadiques (très majoritaires, puisqu'elles représentent 90 % des cas) reste incertaine. Plusieurs anomalies cellulaires et moléculaires pourraient contribuer au dysfonctionnement et à la mort neuronale. L'accumulation de protéines (peut-être en lien avec un dysfonctionnement du protéasome), un déficit d'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et un état de stress oxydant participeraient à la cascade d'événements dégénératifs (Dauer et Przedborski, 2003). Les groupes dirigés par Youdim et Riederer furent parmi les premiers à mettre en évidence une augmentation importante des taux de Fe ferrique (Fe III) et totaux dans la SN de cerveaux de patients parkinsoniens (Sofic et al., 1988). Cette observation, qui a été par la suite confirmée par de nombreuses études, soulève un certain nombre de questions, notamment celles concernant les mécanismes d'entrée du Fe ainsi que ceux impliqués dans son homéostasie intracellulaire dans la MP. Ces questions sont d'autant plus pertinentes que le rôle pathogénique du Fe a été formellement démontré dans plusieurs modèles expérimentaux in vitro et in vivo de la maladie (Berg et al., 2002 ; Dexter et al., 1989 ; Gorell et al., 1995 ; Hirsch et al., 1991 ; Kaur et al., 2003 ; Morris et Edwardson, 1994).

Parmi les voies d'entrée du Fe dans le parenchyme cérébral et potentiellement altérées au cours de la MP, celle impliquant la liaison de la transferrine (Tf) diferrique à son récepteur de haute affinité (TfR) a été le sujet de nombreuses investigations. Des études de liaison utilisant de la Tf marquée à l'iode 125 ont permis de montrer un faible niveau de liaison du ligand dans la SNpc de sujets sains et une absence de modifications macroscopiques chez les sujets parkinsoniens (Faucheux et al., 1993). Cependant, une réduction de 50 % de la densité des sites de liaison à la transferrine au niveau des corps cellulaires des neurones dopaminergiques de la SNpc a été observée chez les sujets parkinsoniens (Faucheux et al., 1997). Si le récepteur à la transferrine ne semble pas être impliqué dans l'augmentation des taux de Fe au sein des neurones dopaminergiques, qu'en est-il des autres systèmes de transport et en particulier du récepteur à la lactoferrine (LfR) dont l'expression neuronale et vasculaire a été rapportée dans le mésencéphale chez l'homme (Faucheux et al., 1995) ? Des études immuno-histochimiques ont en fait démontré que l'immunoréactivité pour le LfR était augmentée de façon significative dans la SNpc de patients parkinsoniens, aussi bien au niveau de la microvasculature que dans les neurones dopaminergiques mélanisés (Faucheux et al., 1995). En outre, une corrélation positive entre l'intensité de l'immunoréactivité pour le LfR et la perte neuronale a été mise en évidence suggérant un lien étroit entre l'augmentation de LfR et la dégénérescence dopaminergique. Cette hypothèse est renforcée par l'augmentation concomitante de l'immunoréactivité pour la lactoferrine (Lf) dans les neurones nigraux de sujets parkinsoniens ainsi que dans le modèle expérimental murin d'intoxication par le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) (Fillebeen et al., 2001). Toutefois, ces variations d'expression de la Lf et de son récepteur ont également été rapportées dans d'autres affections neurologiques et en particulier dans la MA, la maladie de Pick, le syndrome de Down, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Guam (Kawamata et al., 1993 ; Leveugle et al., 1994 ; Rebeck et al., 1995). Cela conforte l'idée que l'expression anormalement élevée du couple Lf/LfR pourrait ne représenter qu'une conséquence commune de la mort neuronale et pose la question de son implication directe dans les processus physiopathologiques de la MP.

D'autres mécanismes de transport du Fe ont été étudiés dans cette maladie neurologique. Il s'agit notamment du transporteur de métaux divalents DMT-1 dont l'expression est considérablement augmentée dans la SN de patients atteints de la MP (Salazar et al., 2008). Cette augmentation a également été rapportée dans le mésencéphale ventral de souris intoxiquées par le MPTP et ce, en concomitance avec l'élévation des niveaux de Fe et de stress oxydant dans cette région cérébrale, suggérant un lien possible entre ces évènements. La preuve irréfutable du rôle de DMT1 dans l'accumulation nigrale de Fe et la mort des neurones dopaminergiques dans des modèles expérimentaux de la MP a été obtenue grâce à la manipulation d'animaux porteurs d'une mutation naturelle dans le gène codant pour DMT1 et associée à une chute d'activité du transporteur. Chez la souris (microcytique) comme chez le rat (Belgrade), cette mutation confère aux animaux une plus grande résistance aux effets neurotoxiques du MPTP et de la 6-hydroxydopamine (Salazar et al., 2008).

Enfin, l'accumulation excessive de Fe dans les neurones dopaminergiques au cours de la MP pourrait également être expliquée par un dysfonctionnement des systèmes d'export cellulaire de ce métal. C'est le cas notamment de la ferroportine, dont l'expression nigrale chute de façon importante aussi bien chez le rat lésé à la 6-hydroxydopamine que chez la souris intoxiquée par le MPTP (Lee et al., 2009 ; Wang et al., 2007). Comme le montrent de récentes études in vitro, la régulation négative de la ferroportine dans les neurones dopaminergiques est directement associée à une élévation des taux de Fe et du stress oxydant dans ces cellules (Song et al., 2010).

L'accumulation du Fe dans la SN des patients parkinsoniens pourrait être d'autant plus dommageable que les systèmes de régulation homéostatique du Fe semblent être également altérés. En effet, alors que l'augmentation cellulaire des taux de Fe devrait conduire à une baisse d'activité de liaison des IRP aux IRE présents dans les transcrits codant pour le TfR et la ferritine (afin de diminuer les capacités de transport

Author's personal copy

du Fe dans les cellules tout en augmentant les capacités tampon du Fe libre via l'expression accrue de Ferritine), l'activité de liaison des IRP reste inchangée dans la SN des sujets parkinsoniens (Faucheux et al., 2002). Cette observation est à mettre en relation avec l'absence de régulation positive des concentrations de ferritine dans le cerveau des patients parkinsoniens (Dexter et al., 1991 ; Faucheux et al., 2002 ; Mann et al., 1994). Comment expliquer un tel paradoxe ? Une des raisons évoquées est la présence d'une forte concentration de monoxyde d'azote (NO) produit par la glie inflammatoire (Hunot et al., 1996 ; Liberatore et al., 1999) qui augmenterait l'activité de liaison de l'IRP1 au transcrit de la ferritine (Mulero et Brock, 1999) contribuant ainsi à un défaut de synthèse de la protéine dans les neurones dopaminergiques surchargés en Fe. Une deuxième possibilité est que le pool de Fe en excès puisse être principalement localisé dans les granules de neuromélanine et les inclusions intracytoplasmiques (corps de Lewy) échappant ainsi aux systèmes de régulation homéostatique. L'augmentation observée du niveau d'activité redox des agrégats de neuromélanine chez les patients parkinsoniens (Faucheux et al., 2003) semble conforter cette hypothèse. Enfin, il est important de noter que, dans leur très grande majorité, les études portant sur l'accumulation et les systèmes de régulation du Fe dans la MP et ses modèles expérimentaux in vivo ont rarement considéré l'importance que pourraient avoir les cellules non-neuronales dans ces phénomènes. Ainsi, l'accumulation et le stockage du Fe notamment dans les cellules microgliales activées (Hirsch et al., 1991 ; Morris et Edwardson, 1994) pourraient en partie expliquer certaines altérations homéostatiques du Fe dans la MP et mériteraient une attention toute particulière concernant son impact physiopathologique.

Les quelques exemples présentés ci-dessus illustrent l'importance des rôles joués par certains éléments traces dans les fonctions des cellules neurales et leur incidence dans la survenue de troubles neurologiques. D'autres éléments essentiels interviennent également tel que le sélénium (Se). Ce métalloïde, via les glutathions peroxydases et les thioredoxines réductases, fournit au cerveau un moyen de défense face à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène observée dans les maladies neurodégénératives. La sélénoprotéine P permettrait la détoxication des métaux lourds impliqués dans différentes maladies neurologiques. Elle aurait également un rôle dans le maintien des fonctions neuronales et cérébrales. Diverses données cliniques indiquent qu'une carence en Se est associée à certaines formes d'épilepsies et serait impliquée dans le développement de la MP, les accidents vasculaires cérébraux et la MA (Schweizer et al., 2004). Par ailleurs, de nombreux travaux soulignent l'épargne du Se (et de la sélénoprotéine P) au niveau du cerveau en cas de carence, indiquant que le Se aurait un rôle important à ce niveau bien qu'encore imparfaitement compris (Schweizer et al., 2004).

Un autre point essentiel à souligner concerne l'influence de ces éléments sur les fonctions cognitives. L'impact de la carence martiale sur les difficultés d'apprentissage chez l'enfant est connu depuis plusieurs décennies. La carence en Zn pourrait également être associée à des modifications des fonctions cognitives. L'étude ZENITH, réalisée chez des sujets âgés en bonne santé, a montré que la supplémentation pouvait être bénéfique sur certaines fonctions et sans effet sur d'autres. Concernant le Se, l'étude nationale Étude du vieillissement artériel (EVA) conduit à des résultats contrastés pouvant en partie être expliqués par un manque de sensibilité des marqueurs utilisés (Se plasmatique) compte tenu de l'épargne du Se observée au niveau du cerveau en cas de carence. Ainsi, contrairement à ce qui avait déjà été rapporté (Gao et al., 2007 ; Smorgon et al., 2004), le bilan réalisé à l'entrée dans l'étude ne montrait pas d'association entre les concentrations de Se plasmatique et les performances cognitives. En revanche, les valeurs de Se étaient prédictives du déclin cognitif (Berr et al., 2000).

Cette revue a tenté de mieux cerner l'importance physiopathologique de certains métaux dans la physiologie neuronale et l'impact d'une carence ou d'une surcharge sur les cellules du SNC et les performances cognitives. Ces aspects ont fait l'objet d'une journée scientifique organisée par l'Institut des métaux en biologie de Grenoble (IMBG), le 22 septembre 2009 à Minatec (Grenoble). Tous les aspects de la neurobiologie des métaux n'ont pu être traités dans cette revue. Si une dérégulation de l'homéostasie cellulaire des métaux semble bien documentée dans nombre de pathologies neurologiques, l'impact sur la santé humaine d'une exposition aux métaux reste encore mal compris. Présents dans notre environnement quotidien, ils constituent une importante source de pollution (Azimi et al., 2005 ; Hernandez et al., 2003). La Commission d'orientation du plan national santé environnement (2004) a clairement indiqué que les métaux constituent, avec les solvants organiques et certains pesticides, les principaux polluants neurotoxiques et que leurs impacts sur la santé humaine sont sous-évalués. Ainsi, les rôles du Cu ou de métaux neurotoxiques comme l'Al, le Hg, le Cd ou le Pb n'ont pas été abordés ici en détail mais le lecteur pourra consulter d'excellentes publications récentes sur ce sujet (Denhez, 2007 ; Landrigan et al., 2005 ; Molina-Holgado et al., 2007 ; Wright et Baccarelli, 2007). Les données épidémiologiques d'une exposition aux métaux lourds sont fragmentaires mais elles font apparaître qu'une fraction importante de la population serait touchée par ce phénomène. Par exemple, une étude de l'Inserm a estimé qu'en France, près de 2 % des enfants auraient une plombémie supérieure à 100 μg/L (valeur de base des populations non exposées) (Inserm, 1999 ; Tratner, 2003) traduisant une exposition au plomb. La neurobiologie des métaux étant l'objet d'un nombre sans cesse croissant d'études et de publications, nul doute que les années à venir apporteront des résultats prometteurs et nouveaux qui approfondiront notre compréhension des rôles joués par ces cations dans les fonctions cérébrales et dans la survenue de maladies neurologiques.

Conflit d'intérêt

Aucun.

RÉFÉRENCES

Allen DD, Orvig C, Yokel R. Evidence for energy-dependent transport of aluminum out of brain extracellular fluid. Toxicology 1995;98:31–9.

Author's personal copy

Allen DD, Yokel RA. Dissimilar aluminum and gallium permeation of the blood-brain barrier demonstrated by in vivo microdialysis. J Neurochem 1992;58:903–8.
Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, Zheng W. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol 2007;221:131–47.
Azimi S, Rocher V, Muller M, Moilleron R, Thevenot DR. Sources, distribution and variability of hydrocarbons and metals in atmospheric deposition in an urban area (Paris, France). Sci Total Environ 2005;337:223–39.
Babady NE, Carelle N, Wells RD, Rouault TA, Hirano M, Lynch DR, et al. Advancements in the pathophysiology of Friedreich's Ataxia and new prospects for treatments. Mol Genet Metab 2007;92:23–35.
Bartzokis G, Tishler TA, Lu PH, Villablanca P, Altshuler LL, Carter M, et al. Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. Neurobiol Aging 2007;28:414–23.
Berg D, Roggendorf W, Schroder U, Klein R, Tatschner T, Benz P, et al. Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. Arch Neurol 2002;59:999–1005.
Berr C, Balansard B, Arnaud J, Roussel AM, Alperovitch A. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Étude du vieillissement arteriel. J Am Geriatr Soc 2000;48:1285–91.
Bock NA, Paiva FF, Nascimento GC, Newman JD, Silva AC. Cerebrospinal fluid to brain transport of manganese in a non-human primate revealed by MRI. Brain Res 2008;1198:160–70.
Bohic S, Murphy K, Paulus W, Cloetens P, Salome M, Susini J, et al. Intracellular chemical imaging of the developmental phases of human neuromelanin using synchrotron X-ray microspectroscopy. Anal Chem 2008;80:9557–66.
Bondier JR, Michel G, Propper A, Badot PM. Harmful effects of cadmium on olfactory system in mice. Inhal Toxicol 2008;20:1169–77.
Boom A, Authelet M, Dedecker R, Frederick C, Van Heurck R, Daubie V, et al. Bimodal modulation of tau protein phosphorylation and conformation by extracellular Zn2+ in human-tau transfected cells. Biochim Biophys Acta 2009;1793:1058–67.
Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 1991;82:239–59.
Bradbury MW, Deane R. Permeability of the blood-brain barrier to lead. Neurotoxicology 1993;14:131–6.
Bush AI. The metallobiology of Alzheimer's disease. Trends Neurosci 2003;26:207–14.
Carmona A, Deves G, Roudeau S, Cloetens P, Bohic S, Ortega R. Manganese accumulates within golgi apparatus in dopaminergic cells as revealed by synchrotron X-ray fluorescence nanoimaging. ACS Chem Neurosci 2010;1: 193–203.
Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, et al. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. Neuron 2001;30: 665–76.
Choi BS, Zheng W. Copper transport to the brain by the blood-brain barrier and blood-CSF barrier. Brain Res 2009;1248:14–21.
Cole TB, Robbins CA, Wenzel HJ, Schwartzkroin PA, Palmiter RD. Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. Epilepsy Res 2000;39:153–69.
Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron 2003;39:889–909.
Deane R, Zheng W, Zlokovic BV. Brain capillary endothelium and choroid plexus epithelium regulate transport of transferrin-bound and free iron into the rat brain. J Neurochem 2004;88:813–20.
Denhez F. Les pollutions invisibles. Delachaux et Niestlé, 2007.
Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE, et al. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. Brain 1991;114(Pt 4):1953–75.
Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, et al. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. J Neurochem 1989;52:1830–6.
Dries DR, Yu G. Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 2008;5:132–46.
Faucheux BA, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. The density of [125I]-transferrin binding sites on perikarya of melanized neurons of the substantia nigra is decreased in Parkinson's disease. Brain Res 1997;749:170–4.
Faucheux BA, Hirsch EC, Villares J, Selimi F, Mouatt-Prigent A, Javoy-Agid F, et al. Distribution of 125I-ferrotransferrin binding sites in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's disease. J Neurochem 1993;60:2338–41.
Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. J Neurochem 2003;86:1142–8.
Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hunot S, Hauw JJ, Agid Y, et al. Lack of up-regulation of ferritin is associated with sustained iron regulatory protein-1 binding activity in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. J Neurochem 2002;83:320–30.
Faucheux BA, Nillesse N, Damier P, Spik G, Mouatt-Prigent A, Pierce A, et al. Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:9603–7.
Fillebeen C, Ruchoux MM, Mitchell V, Vincent S, Benaissa M, Pierce A. Lactoferrin is synthesized by activated microglia in the human substantia nigra and its synthesis by the human microglial CHME cell line is upregulated by tumor necrosis factor alpha or 1-methyl-4-phenylpyridinium treatment. Brain Res Mol Brain Res 2001;96:103–13.
Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. J Nutr 2000;130:1471S–83S.
Gao S, Jin Y, Hall KS, Liang C, Unverzagt FW, Ji R, et al. Selenium level and cognitive function in rural elderly Chinese. Am J Epidemiol 2007;165:955–65.
Ghersi-Egea JF, Monkkonen KS, Schmitt C, Honnorat J, Fevre-Montange M, Strazielle N. Blood-brain interfaces and cerebral drug bioavailability. Rev Neurol (Paris) 2009;165:1029–38.
Gielen M, Le Goff A, Stroebel D, Johnson JW, Neyton J, Paoletti P. Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. Neuron 2008;57:80–93.
Goedert M, Spillantini MG. Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta 2000;1502:110–21.
Golub MS, Keen CL, Gershwin ME, Hendrickx AG. Developmental zinc deficiency and behavior. J Nutr 1995;125:2263S–71S.
Gorell JM, Ordidge RJ, Brown GG, Deniau JC, Buderer NM, Helpern JA. Increased iron-related MRI contrast in the substantia nigra in Parkinson's disease. Neurology 1995;45:1138–43.
Hahn P, Song Y, Ying GS, He X, Beard J, Dunaief JL. Age-dependent and gender-specific changes in mouse tissue iron by strain. Exp Gerontol 2009;44:594–600.
Hernandez L, Probst A, Probst JL, Ulrich E. Heavy metal distribution in some French forest soils: evidence for

Author's personal copy

atmospheric contamination. Sci Total Environ 2003;312:195–219.
Hirsch EC, Brandel JP, Galle P, Javoy-Agid F, Agid Y. Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. J Neurochem 1991;56:446–51.
Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, et al. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Neuroscience 1996;72:355–63.
Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. Neurochem Int 2004;45:583–95.
Ilback NG, Lindh U, Minqin R, Friman G, Watt F. Iron and copper accumulation in the brain of coxsackievirus-infected mice exposed to cadmium. Environ Res 2006;102:308–13.
Inserm, 1999. Plomb dans l'environnement : quels risques pour la santé ? Expertise collective Inserm, 1999.
Janssen JC, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Fox NC, Harvey RJ, et al. Early onset familial Alzheimer's disease: mutation frequency in 31 families. Neurology 2003;60:235–9.
Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, Boonplueang R, et al. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. Neuron 2003;37:899–909.
Kawamata T, Tooyama I, Yamada T, Walker DG, McGeer PL. Lactotransferrin immunocytochemistry in Alzheimer and normal human brain. Am J Pathol 1993;142:1574–85.
Landrigan PJ, Sonawane B, Butler RN, Trasande L, Callan R, Droller D. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. Environ Health Perspect 2005;113:1230–3.
Lee DW, Rajagopalan S, Siddiq A, Gwiazda R, Yang L, Beal MF, et al. Inhibition of prolyl hydroxylase protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity: model for the potential involvement of the hypoxia-inducible factor pathway in Parkinson disease. J Biol Chem 2009;284:29065–76.
Lee JY, Cole TB, Palmiter RD, Suh SW, Koh JY. Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:7705–10.
Leveugle B, Spik G, Perl DP, Bouras C, Fillit HM, Hof PR. The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders: a comparative immunohistochemical analysis. Brain Res 1994;650:20–31.
Li GJ, Choi BS, Wang X, Liu J, Waalkes MP, Zheng W. Molecular mechanism of distorted iron regulation in the blood-CSF barrier and regional blood-brain barrier following in vivo subchronic manganese exposure. Neurotoxicology 2006;27:737–44.
Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, et al. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. Nat Med 1999;5:1403–9.
Madsen E, Gitlin JD. Copper and iron disorders of the brain. Annu Rev Neurosci 2007;30:317–37.
Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation – a decade of progress? Science 1999;285:1870–4.
Mann VM, Cooper JM, Daniel SE, Srai K, Jenner P, Marsden CD, et al. Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. Ann Neurol 1994;36:876–81.
Matsuoka Y, Picciano M, Malester B, LaFrancois J, Zehr C, Daeschner JM, et al. Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Am J Pathol 2001;158:1345–54.
Molina-Holgado F, Hider RC, Gaeta A, Williams R, Francis P. Metals ions and neurodegeneration. Biometals 2007;20: 639–54.
Morris CM, Edwardson JA. Iron histochemistry of the substantia nigra in Parkinson's disease. Neurodegeneration 1994;3:277–82.
Mulero V, Brock JH. Regulation of iron metabolism in murine J774 macrophages: role of nitric oxide-dependent and -independent pathways following activation with gamma interferon and lipopolysaccharide. Blood 1999;94:2383–9.
Ortega R, Cloetens P, Deves G, Carmona A, Bohic S. Iron storage within dopamine neurovesicles revealed by chemical nano-imaging. PLoS ONE 2007;2:e925.
Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:14934–9.
Paoletti P, Ascher P, Neyton J. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. J Neurosci 1997;17:5711–25.
Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. Curr Opin Pharmacol 2007;7:39–47.
Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M. Zinc at glutamatergic synapses. Neuroscience 2009;158:126–36.
Persson E, Henriksson J, Tallkvist J, Rouleau C, Tjalve H. Transport and subcellular distribution of intranasally administered zinc in the olfactory system of rats and pikes. Toxicology 2003;191:97–108.
Persson E, Henriksson J, Tjalve H. Uptake of cobalt from the nasal mucosa into the brain via olfactory pathways in rats. Toxicol Lett 2003;145:19–27.
Puccio H. Multicellular models of Friedreich ataxia. J Neurol 2009;256(Suppl. 1):18–24.
Qian ZM, Shen X. Brain iron transport and neurodegeneration. Trends Mol Med 2001;7:103–8.
Rajan MT, Jagannatha Rao KS, Mamatha BM, Rao RV, Shanmugavelu P, Menon RB, et al. Quantification of trace elements in normal human brain by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. J Neurol Sci 1997;146:153–66.
Rebeck GW, Harr SD, Strickland DK, Hyman BT. Multiple, diverse senile plaque-associated proteins are ligands of an apolipoprotein E receptor, the alpha 2-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein receptor-related protein. Ann Neurol 1995;37:211–7.
Religa D, Strozyk D, Cherny RA, Volitakis I, Haroutunian V, Winblad B, et al. Elevated cortical zinc in Alzheimer disease. Neurology 2006;67:69–75.
Salazar J, Mena N, Hunot S, Prigent A, Alvarez-Fischer D, Arredondo M, et al. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:18578–83.
Sandstead HH. A brief history of the influence of trace elements on brain function. Am J Clin Nutr 1986;43:293–8.
Schweizer U, Brauer AU, Kohrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. Brain Res Brain Res Rev 2004;45:164–78.
Sensi SL, Paoletti P, Bush AI, Sekler I. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. Nat Rev Neurosci 2009;10:780–91.
Smorgon C, Mari E, Atti AR, Dalla Nora E, Zamboni PF, Calzoni F, et al. Trace elements and cognitive impairment: an elderly cohort study. Arch Gerontol Geriatr Suppl 2004;9:393–402.
Sofic E, Riederer P, Heinsen H, Beckmann H, Reynolds GP, Hebenstreit G, et al. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. J Neural Transm 1988;74:199–205.
Song N, Wang J, Jiang H, Xie J. Ferroportin 1 but not hephaestin contributes to iron accumulation in a cell model of Parkinson's disease. Free Radic Biol Med 2010;48:332–41.
Stoltenberg M, Bruhn M, Sondergaard C, Doering P, West MJ, Larsen A, et al. Immersion autometallographic tracing of zinc ions in Alzheimer beta-amyloid plaques. Histochem Cell Biol 2005;123:605–11.

Author's personal copy

Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. J Neuropathol Exp Neurol 2000;59:561–74.
Suh SW, Jensen KB, Jensen MS, Silva DS, Kesslak PJ, Danscher G, et al. Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains. Brain Res 2000;852:274–8.
Sunderman Jr FW. Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals. Ann Clin Lab Sci 2001;31:3–24.
Tarohda T, Yamamoto M, Amamo R. Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development. Anal Bioanal Chem 2004;380:240–6.
Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. J Biol Chem 2008;283:29615–9.
Tournier BB, Frelon S, Tourlonias E, Agez L, Delissen O, Dublineau I, et al. Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain. Toxicol Lett 2009;190:66–73.
Tratner I. Children lead poisoning: what progress in 20 years? Med Sci (Paris) 2003;19:873–7.
Trocello JM, Chappuis P, Chaine P, Remy P, Debray D, Duclos-Vallee JC, et al. Wilson disease. Presse Med 2009;38:1089–98.
Tu P, Gibon J, Bouron A. The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria. J Neurochem 2010;112:204–13.
Vogt K, Mellor J, Tong G, Nicoll R. The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. Neuron 2000;26:187–96.
Wang J, Jiang H, Xie JX. Ferroportin1 and hephaestin are involved in the nigral iron accumulation of 6-OHDA-lesioned rats. Eur J Neurosci 2007;25: 2766–72.
Wright RO, Baccarelli A. Metals and neurotoxicology. J Nutr 2007;137:2809–13.
Xu X, Wang Q, Zhang M. Age, gender, and hemispheric differences in iron deposition in the human brain: an in vivo MRI study. Neuroimage 2008;40:35–42.
Zatta P, Drago D, Bolognin S, Sensi SL. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. Trends Pharmacol Sci 2009;30:346–55.
Zecca L, Gallorini M, Schunemann V, Trautwein AX, Gerlach M, Riederer P, et al. Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. J Neurochem 2001;76: 1766–73.
Zheng W, Aschner M, Ghersi-Egea JF. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. Toxicol Appl Pharmacol 2003;192:1–11.

Références Bibliographiques

1. Cosens, D. J. & Manning, A. Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. *Nature* **224**, 285-7 (1969).
2. Minke, B., Wu, C. & Pak, W. L. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant. *Nature* **258**, 84-7 (1975).
3. Montell, C. & Rubin, G. M. Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313-23 (1989).
4. Phillips, A. M., Bull, A. & Kelly, L. E. Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron* **8**, 631-42 (1992).
5. Niemeyer, B. A., Suzuki, E., Scott, K., Jalink, K. & Zuker, C. S. The Drosophila light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell* **85**, 651-9 (1996).
6. Montell, C. TRP channels in Drosophila photoreceptor cells. *J Physiol* **567**, 45-51 (2005).
7. Flockerzi, V. An introduction on TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*, 1-19 (2007).
8. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**, 387-417 (2007).
9. Pedersen, S. F., Owsianik, G. & Nilius, B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38**, 233-52 (2005).
10. Clapham, D. E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-24 (2003).
11. Ramsey, I. S., Delling, M. & Clapham, D. E. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**, 619-47 (2006).
12. Caterina, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-24 (1997).
13. Fajardo, O., Meseguer, V., Belmonte, C. & Viana, F. TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *J Neurosci* **28**, 7863-75 (2008).
14. Hu, H. Z. et al. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* **279**, 35741-8 (2004).
15. Leuner, K. et al. Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *Faseb J* **21**, 4101-11 (2007).
16. Hofmann, T. et al. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* **397**, 259-63 (1999).
17. Rohacs, T. & Nilius, B. Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflugers Arch* **455**, 157-68 (2007).
18. Watanabe, H. et al. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**, 434-8 (2003).
19. Kolisek, M., Beck, A., Fleig, A. & Penner, R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* **18**, 61-9 (2005).
20. Graham, S. et al. Canonical transient receptor potential 6 (TRPC6), a redox-regulated cation channel. *J Biol Chem* **285**, 23466-76.
21. Jung, S. et al. Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem* **278**, 3562-71 (2003).
22. Hu, H., Bandell, M., Petrus, M. J., Zhu, M. X. & Patapoutian, A. Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol* **5**, 183-90 (2009).

23. Vriens, J. et al. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 396-401 (2004).
24. Colbert, H. A., Smith, T. L. & Bargmann, C. I. OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in Caenorhabditis elegans. *J Neurosci* **17**, 8259-69 (1997).
25. Bourque, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* **9**, 519-31 (2008).
26. Tobin, D. et al. Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in C. elegans neurons. *Neuron* **35**, 307-18 (2002).
27. Damak, S. et al. Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem Senses* **31**, 253-64 (2006).
28. Stowers, L., Holy, T. E., Meister, M., Dulac, C. & Koentges, G. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* **295**, 1493-500 (2002).
29. Talavera, K., Nilius, B. & Voets, T. Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends Neurosci* **31**, 287-95 (2008).
30. Del Camino, D. et al. TRPA1 Contributes to Cold Hypersensitivity. *J Neurosci* **30**, 15165-15174.
31. Voets, T. et al. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**, 748-54 (2004).
32. Voets, T., Talavera, K., Owsianik, G. & Nilius, B. Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* **1**, 85-92 (2005).
33. Oancea, E., Wolfe, J. T. & Clapham, D. E. Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow. *Circ Res* **98**, 245-53 (2006).
34. Christensen, A. P. & Corey, D. P. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci* **8**, 510-21 (2007).
35. Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G. & Harteneck, C. Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* **278**, 21493-501 (2003).
36. Birder, L. A. et al. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci* **5**, 856-60 (2002).
37. Praetorius, H. A. & Spring, K. R. A physiological view of the primary cilium. *Annu Rev Physiol* **67**, 515-29 (2005).
38. Palmer, C. P. et al. A TRP homolog in Saccharomyces cerevisiae forms an intracellular Ca(2+)-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7801-5 (2001).
39. Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G. & Plant, T. D. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* **2**, 695-702 (2000).
40. Damann, N., Voets, T. & Nilius, B. TRPs in our senses. *Curr Biol* **18**, R880-9 (2008).
41. Bautista, D. M. et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**, 1269-82 (2006).
42. Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K. & Imai, M. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* **278**, 22664-8 (2003).
43. Panda, S. et al. Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* **307**, 600-4 (2005).
44. Qiu, X. et al. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* **433**, 745-9 (2005).

45. Sekaran, S. et al. 2-Aminoethoxydiphenylborane is an acute inhibitor of directly photosensitive retinal ganglion cell activity in vitro and in vivo. *J Neurosci* **27**, 3981-6 (2007).
46. Liu, X. et al. Attenuation of store-operated Ca2+ current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17542-7 (2007).
47. Liu, X., Singh, B. B. & Ambudkar, I. S. TRPC1 is required for functional store-operated Ca2+ channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region. *J Biol Chem* **278**, 11337-43 (2003).
48. Liu, X. et al. Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells. *J Biol Chem* **275**, 3403-11 (2000).
49. Wu, X., Babnigg, G. & Villereal, M. L. Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca(2+) entry in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C526-36 (2000).
50. Brough, G. H. et al. Contribution of endogenously expressed Trp1 to a Ca2+-selective, store-operated Ca2+ entry pathway. *Faseb J* **15**, 1727-38 (2001).
51. Ong, H. L. et al. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem* **282**, 9105-16 (2007).
52. Sinkins, W. G., Estacion, M. & Schilling, W. P. Functional expression of TrpC1: a human homologue of the Drosophila Trp channel. *Biochem J* **331 (Pt 1)**, 331-9 (1998).
53. Wedel, B., Boyles, R. R., Putney, J. W., Jr. & Bird, G. S. Role of the store-operated calcium entry proteins Stim1 and Orai1 in muscarinic cholinergic receptor-stimulated calcium oscillations in human embryonic kidney cells. *J Physiol* **579**, 679-89 (2007).
54. Dietrich, A. et al. Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch* **455**, 465-77 (2007).
55. Varga-Szabo, D. et al. Store-operated Ca(2+) entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflugers Arch* **457**, 377-87 (2008).
56. Salido, G. M., Sage, S. O. & Rosado, J. A. TRPC channels and store-operated Ca(2+) entry. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 223-30 (2009).
57. Vannier, B. et al. Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca2+ entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2060-4 (1999).
58. Kaznacheyeva, E. et al. Suppression of TRPC3 leads to disappearance of store-operated channels and formation of a new type of store-independent channels in A431 cells. *J Biol Chem* **282**, 23655-62 (2007).
59. Brechard, S., Melchior, C., Plancon, S., Schenten, V. & Tschirhart, E. J. Store-operated Ca2+ channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. *Cell Calcium* **44**, 492-506 (2008).
60. Warnat, J., Philipp, S., Zimmer, S., Flockerzi, V. & Cavalie, A. Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca2+. *J Physiol* **518 (Pt 3)**, 631-8 (1999).
61. Ma, H. T. et al. Canonical transient receptor potential 5 channel in conjunction with Orai1 and STIM1 allows Sr2+ entry, optimal influx of Ca2+, and degranulation in a rat mast cell line. *J Immunol* **180**, 2233-9 (2008).
62. Freichel, M. et al. Lack of an endothelial store-operated Ca2+ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4-/- mice. *Nat Cell Biol* **3**, 121-7 (2001).

63. Schaefer, M. et al. Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* **275**, 17517-26 (2000).
64. Wu, X., Babnigg, G., Zagranichnaya, T. & Villereal, M. L. The role of endogenous human Trp4 in regulating carbachol-induced calcium oscillations in HEK-293 cells. *J Biol Chem* **277**, 13597-608 (2002).
65. Okada, T. et al. Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **274**, 27359-70 (1999).
66. Riccio, A. et al. Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca2+ influx. *J Biol Chem* **277**, 12302-9 (2002).
67. Lievremont, J. P., Bird, G. S. & Putney, J. W., Jr. Canonical transient receptor potential TRPC7 can function as both a receptor- and store-operated channel in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1709-16 (2004).
68. Putney, J. W., Jr. New molecular players in capacitative Ca2+ entry. *J Cell Sci* **120**, 1959-65 (2007).
69. Boulay, G. et al. Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* **272**, 29672-80 (1997).
70. Dietrich, A. & Gudermann, T. Trpc6. *Handb Exp Pharmacol*, 125-41 (2007).
71. Kim, J. Y. & Saffen, D. Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *J Biol Chem* **280**, 32035-47 (2005).
72. Bousquet, S. M., Monet, M. & Boulay, G. Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. *J Biol Chem*.
73. Takahashi, S. et al. Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *J Physiol* **586**, 4209-23 (2008).
74. Bousquet, S. M., Monet, M. & Boulay, G. The Serine 814 of TRPC6 Is Phosphorylated under Unstimulated Conditions. *PLoS One* **6**, e18121.
75. Lussier, M. P. et al. MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. *J Biol Chem* **280**, 19393-400 (2005).
76. Vazquez, G., Wedel, B. J., Aziz, O., Trebak, M. & Putney, J. W., Jr. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta* **1742**, 21-36 (2004).
77. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* **278**, 39014-9 (2003).
78. Kini, V., Chavez, A. & Mehta, D. A new role for PTEN in regulating transient receptor potential canonical channel 6- mediated Ca2+ entry, endothelial permeability and angiogenesis. *J Biol Chem*.
79. Shi, J. et al. Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol* **561**, 415-32 (2004).
80. Cayouette, S., Lussier, M. P., Mathieu, E. L., Bousquet, S. M. & Boulay, G. Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* **279**, 7241-6 (2004).
81. Inoue, R. et al. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. *Circ Res* **88**, 325-32 (2001).

82. Onohara, N. et al. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Embo J* **25**, 5305-16 (2006).
83. Saleh, S. N., Albert, A. P., Peppiatt, C. M. & Large, W. A. Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes. *J Physiol* **577**, 479-95 (2006).
84. Delmas, P., Wanaverbecq, N., Abogadie, F. C., Mistry, M. & Brown, D. A. Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons. *Neuron* **34**, 209-20 (2002).
85. Estacion, M. et al. Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. *J Biol Chem* **279**, 22047-56 (2004).
86. Nasman, J. et al. The orexin OX1 receptor regulates Ca2+ entry via diacylglycerol-activated channels in differentiated neuroblastoma cells. *J Neurosci* **26**, 10658-66 (2006).
87. Lemos, V. S., Poburko, D., Liao, C. H., Cole, W. C. & van Breemen, C. Na+ entry via TRPC6 causes Ca2+ entry via NCX reversal in ATP stimulated smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **352**, 130-4 (2007).
88. Jung, S., Strotmann, R., Schultz, G. & Plant, T. D. TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C347-59 (2002).
89. Singh, I. et al. Galphaq-TRPC6-mediated Ca2+ entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. *J Biol Chem* **282**, 7833-43 (2007).
90. Kawasaki, B. T., Liao, Y. & Birnbaumer, L. Role of Src in C3 transient receptor potential channel function and evidence for a heterogeneous makeup of receptor- and store-operated Ca2+ entry channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 335-40 (2006).
91. Beskina, O., Miller, A., Mazzocco-Spezzia, A., Pulina, M. V. & Golovina, V. A. Mechanisms of interleukin-1beta-induced Ca2+ signals in mouse cortical astrocytes: roles of store- and receptor-operated Ca2+ entry. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1103-11 (2007).
92. Hisatsune, C. et al. Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **279**, 18887-94 (2004).
93. Li, Y. et al. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **434**, 894-8 (2005).
94. Pocock, T. M., Foster, R. R. & Bates, D. O. Evidence of a role for TRPC channels in VEGF-mediated increased vascular permeability in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H1015-26 (2004).
95. Tu, P., Kunert-Keil, C., Lucke, S., Brinkmeier, H. & Bouron, A. Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. *J Neurochem* **108**, 126-38 (2009).
96. Basora, N., Boulay, G., Bilodeau, L., Rousseau, E. & Payet, M. D. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem* **278**, 31709-16 (2003).
97. Fleming, I. et al. Epoxyeicosatrienoic acids regulate Trp channel dependent Ca2+ signaling and hyperpolarization in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2612-8 (2007).
98. Liu, Y. et al. Stable EET urea agonist and soluble epoxide hydrolase inhibitor regulate rat pulmonary arteries through TRPCs. *Hypertens Res*.
99. Albert, A. P. & Large, W. A. Synergism between inositol phosphates and diacylglycerol on native TRPC6-like channels in rabbit portal vein myocytes. *J Physiol* **552**, 789-95 (2003).

100. Ju, M., Shi, J., Saleh, S. N., Albert, A. P. & Large, W. A. Ins(1,4,5)P3 interacts with PIP2 to regulate activation of TRPC6/C7 channels by diacylglycerol in native vascular myocytes. *J Physiol* **588**, 1419-33.
101. Lemonnier, L., Trebak, M. & Putney, J. W., Jr. Complex regulation of the TRPC3, 6 and 7 channel subfamily by diacylglycerol and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Cell Calcium* **43**, 506-14 (2008).
102. Albert, A. P., Saleh, S. N. & Large, W. A. Inhibition of native TRPC6 channel activity by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in mesenteric artery myocytes. *J Physiol* **586**, 3087-95 (2008).
103. Tseng, P. H. et al. The canonical transient receptor potential 6 channel as a putative phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-sensitive calcium entry system. *Biochemistry* **43**, 11701-8 (2004).
104. Kwon, Y., Hofmann, T. & Montell, C. Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol Cell* **25**, 491-503 (2007).
105. Huber, T. B. et al. Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17079-86 (2006).
106. Liao, Y. et al. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4682-7 (2007).
107. Yu, Y. et al. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C316-30 (2003).
108. El Boustany, C. et al. Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology* **47**, 2068-77 (2008).
109. Redondo, P. C., Jardin, I., Lopez, J. J., Salido, G. M. & Rosado, J. A. Intracellular Ca2+ store depletion induces the formation of macromolecular complexes involving hTRPC1, hTRPC6, the type II IP3 receptor and SERCA3 in human platelets. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 1163-76 (2008).
110. Zbidi, H. et al. STIM1 and STIM2 are located in the acidic Ca2+ stores and associates with Orai1 upon depletion of the acidic stores in human platelets. *J Biol Chem*.
111. Jardin, I., Gomez, L. J., Salido, G. M. & Rosado, J. A. Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1/STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca2+ entry pathways. *Biochem J* (2009).
112. Jardin, I., Redondo, P. C., Salido, G. M. & Rosado, J. A. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 84-97 (2008).
113. Spassova, M. A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J. & Gill, D. L. A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16586-91 (2006).
114. Dyachenko, V., Husse, B., Rueckschloss, U. & Isenberg, G. Mechanical deformation of ventricular myocytes modulates both TRPC6 and Kir2.3 channels. *Cell Calcium* **45**, 38-54 (2009).
115. Alessandri-Haber, N., Dina, O. A., Chen, X. & Levine, J. D. TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensitization. *J Neurosci* **29**, 6217-28 (2009).
116. Mederos y Schnitzler, M. et al. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *Embo J* **27**, 3092-103 (2008).
117. Inoue, R. et al. Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase C/diacylglycerol and phospholipase A2/omega-hydroxylase/20-HETE pathways. *Circ Res* **104**, 1399-409 (2009).

118. Foster, R. R. et al. Flufenamic acid is a tool for investigating TRPC6-mediated calcium signalling in human conditionally immortalised podocytes and HEK293 cells. *Cell Calcium* **45**, 384-90 (2009).
119. Tu, P., Brandolin, G. & Bouron, A. The anti-inflammatory agent flufenamic acid depresses store-operated channels by altering mitochondrial calcium homeostasis. *Neuropharmacology* (2009).
120. Leuner, K. et al. Simple 2,4-diacylphloroglucinols as classic transient receptor potential-6 activators--identification of a novel pharmacophore. *Mol Pharmacol* **77**, 368-77.
121. Muller, M. et al. Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* (2008).
122. Schempp, C. M. et al. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* **21**, 1242-50 (2002).
123. Tu, P., Gibon, J. & Bouron, A. The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria. *J Neurochem* (2009).
124. Shi, J., Ju, M., Saleh, S. N., Albert, A. P. & Large, W. A. TRPC6 channels stimulated by angiotensin II are inhibited by TRPC1/C5 channel activity through a Ca2+- and PKC-dependent mechanism in native vascular myocytes. *J Physiol* **588**, 3671-82.
125. Hassock, S. R., Zhu, M. X., Trost, C., Flockerzi, V. & Authi, K. S. Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood* **100**, 2801-11 (2002).
126. Koitabashi, N. et al. Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 713-24.
127. Nishida, M. et al. Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J Biol Chem* **285**, 13244-53.
128. Kinoshita, H. et al. Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart. *Circ Res* **106**, 1849-60.
129. Yu, L. et al. TGF-beta1 induces podocyte injury through Smad3-ERK-NF-kappaB pathway and Fyn-dependent TRPC6 phosphorylation. *Cell Physiol Biochem* **26**, 869-78.
130. Boulay, G. Ca(2+)-calmodulin regulates receptor-operated Ca(2+) entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells. *Cell Calcium* **32**, 201-7 (2002).
131. Friedlova, E. et al. The interactions of the C-terminal region of the TRPC6 channel with calmodulin. *Neurochem Int* **56**, 363-6.
132. Zhou, J. et al. Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat Neurosci* **11**, 741-3 (2008).
133. Tai, Y. et al. TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *J Cell Sci* **121**, 2301-7 (2008).
134. Wang, Z. et al. NADPH oxidase-derived ROS contributes to upregulation of TRPC6 expression in puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury. *Cell Physiol Biochem* **24**, 619-26 (2009).
135. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. & Lake, R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6 (1999).
136. Kyriazis, G. A. et al. Stress-induced switch in Numb isoforms enhances Notch-dependent expression of subtype-specific transient receptor potential channel. *J Biol Chem* **285**, 6811-25.

137. Chigurupati, S. et al. Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res* **70**, 418-27 (2010).
138. Foller, M. et al. TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* **21**, 183-92 (2008).
139. Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047-58 (2007).
140. Soboloff, J. et al. Role of endogenous TRPC6 channels in Ca2+ signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J Biol Chem* **280**, 39786-94 (2005).
141. Eder, P., Poteser, M., Romanin, C. & Groschner, K. Na(+) entry and modulation of Na(+)/Ca(2+) exchange as a key mechanism of TRPC signaling. *Pflugers Arch* **451**, 99-104 (2005).
142. Poburko, D. et al. Transient receptor potential channel 6-mediated, localized cytosolic [Na+] transients drive Na+/Ca2+ exchanger-mediated Ca2+ entry in purinergically stimulated aorta smooth muscle cells. *Circ Res* **101**, 1030-8 (2007).
143. Fellner, S. K. & Arendshorst, W. J. Angiotensin II-stimulated Ca2+ entry mechanisms in afferent arterioles: role of transient receptor potential canonical channels and reverse Na+/Ca2+ exchange. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**, F212-9 (2008).
144. Estacion, M., Sinkins, W. G., Jones, S. W., Applegate, M. A. & Schilling, W. P. Human TRPC6 expressed in HEK 293 cells forms non-selective cation channels with limited Ca2+ permeability. *J Physiol* **572**, 359-77 (2006).
145. Poburko, D., Fameli, N., Kuo, K. H. & van Breemen, C. Ca2+ signaling in smooth muscle: TRPC6, NCX and LNats in nanodomains. *Channels (Austin)* **2**, 10-2 (2008).
146. Goel, M., Sinkins, W., Keightley, A., Kinter, M. & Schilling, W. P. Proteomic analysis of TRPC5- and TRPC6-binding partners reveals interaction with the plasmalemmal Na(+)/K(+)-ATPase. *Pflugers Arch* **451**, 87-98 (2005).
147. Riccio, A. et al. mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* **109**, 95-104 (2002).
148. Abramowitz, J. & Birnbaumer, L. Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *Faseb J* (2008).
149. Beech, D. J., Muraki, K. & Flemming, R. Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. *J Physiol* **559**, 685-706 (2004).
150. Garcia, R. L. & Schilling, W. P. Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 279-83 (1997).
151. Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T. & Brayden, J. E. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* **90**, 248-50 (2002).
152. Yu, Y. et al. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13861-6 (2004).
153. Chaudhuri, P. et al. Elucidation of a TRPC6-TRPC5 channel cascade that restricts endothelial cell movement. *Mol Biol Cell* **19**, 3203-11 (2008).
154. Antigny, F. et al. TRPC6 Links Ca2+ Mishandling to CFTR Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
155. Kuwahara, K. et al. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest* **116**, 3114-26 (2006).
156. Harper, M. T. & Sage, S. O. Src family tyrosine kinases activate thrombin-induced non-capacitative cation entry in human platelets. *Platelets* **21**, 445-50.
157. Zbidi, H. et al. Enhanced expression of STIM1/Orai1 and TRPC3 in platelets from patients with type 2 diabetes mellitus. *Blood Cells Mol Dis* **43**, 211-3 (2009).

158. Leuner, K. et al. Reduced TRPC Channel Expression in Psoriatic Keratinocytes Is Associated with Impaired Differentiation and Enhanced Proliferation. *PLoS One* **6**, e14716.
159. Winn, M. P. et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* **308**, 1801-4 (2005).
160. Moller, C. C. et al. Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **18**, 29-36 (2007).
161. Reiser, J. et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* **37**, 739-44 (2005).
162. Graham, S. et al. Downregulation of TRPC6 protein expression by high glucose, a possible mechanism for the impaired Ca2+ signaling in glomerular mesangial cells in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, F1381-90 (2007).
163. Yue, D., Wang, Y., Xiao, J. Y., Wang, P. & Ren, C. S. Expression of TRPC6 in benign and malignant human prostate tissues. *Asian J Androl* **11**, 541-7 (2009).
164. Thebault, S. et al. Differential role of transient receptor potential channels in Ca2+ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* **66**, 2038-47 (2006).
165. Guilbert, A. et al. Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells. *BMC Cancer* **8**, 125 (2008).
166. Aydar, E., Yeo, S., Djamgoz, M. & Palmer, C. Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: a potential target for breast cancer diagnosis and therapy. *Cancer Cell Int* **9**, 23 (2009).
167. Chigurupati, S. et al. Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res* **70**, 418-27.
168. Huang, W. C., Young, J. S. & Glitsch, M. D. Changes in TRPC channel expression during postnatal development of cerebellar neurons. *Cell Calcium* **42**, 1-10 (2007).
169. Mizuno, N. et al. Molecular cloning and characterization of rat trp homologues from brain. *Brain Res Mol Brain Res* **64**, 41-51 (1999).
170. Chung, Y. H. et al. Immunohistochemical study on the distribution of TRPC channels in the rat hippocampus. *Brain Res* **1085**, 132-7 (2006).
171. Giampa, C., DeMarch, Z., Patassini, S., Bernardi, G. & Fusco, F. R. Immunohistochemical localization of TRPC6 in the rat substantia nigra. *Neurosci Lett* **424**, 170-4 (2007).
172. Chung, Y. H. et al. Immunohistochemical study on the distribution of canonical transient receptor potential channels in rat basal ganglia. *Neurosci Lett* **422**, 18-23 (2007).
173. Boisseau, S., Kunert-Keil, C., Lucke, S. & Bouron, A. Heterogeneous distribution of TRPC proteins in the embryonic cortex. *Histochem Cell Biol* **131**, 355-63 (2009).
174. Jia, Y., Zhou, J., Tai, Y. & Wang, Y. TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat Neurosci* **10**, 559-67 (2007).
175. Du, W. et al. Inhibition of TRPC6 degradation suppresses ischemic brain damage in rats. *J Clin Invest* **120**, 3480-92.
176. Mwanjewe, J. & Grover, A. K. Role of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) in non-transferrin-bound iron uptake in neuronal phenotype PC12 cells. *Biochem J* **378**, 975-82 (2004).
177. Lessard, C. B., Lussier, M. P., Cayouette, S., Bourque, G. & Boulay, G. The overexpression of presenilin2 and Alzheimer's-disease-linked presenilin2 variants influences TRPC6-enhanced Ca2+ entry into HEK293 cells. *Cell Signal* **17**, 437-45 (2005).

178. Frassinetti, S., Bronzetti, G., Caltavuturo, L., Cini, M. & Croce, C. D. The role of zinc in life: a review. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **25**, 597-610 (2006).
179. Sandstead. Zinc. *handbook on toxicology of metals*, 925-947 (2007).
180. Frederickson, C. J., Koh, J. Y. & Bush, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* **6**, 449-62 (2005).
181. Tarohda, T., Yamamoto, M. & Amamo, R. Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development. *Anal Bioanal Chem* **380**, 240-6 (2004).
182. Frederickson, C. J., Suh, S. W., Silva, D. & Thompson, R. B. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr* **130**, 1471S-83S (2000).
183. Bitanihirwe, B. K. & Cunningham, M. G. Zinc: the brain's dark horse. *Synapse* **63**, 1029-49 (2009).
184. Sensi, S. L., Paoletti, P., Bush, A. I. & Sekler, I. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci* **10**, 780-91 (2009).
185. Colvin, R. A., Fontaine, C. P., Laskowski, M. & Thomas, D. Zn2+ transporters and Zn2+ homeostasis in neurons. *Eur J Pharmacol* **479**, 171-85 (2003).
186. Hershkovitz, E., Printzman, L., Segev, Y., Levy, J. & Phillip, M. Zinc supplementation increases the level of serum insulin-like growth factor-I but does not promote growth in infants with nonorganic failure to thrive. *Horm Res* **52**, 200-4 (1999).
187. McNall, A. D., Etherton, T. D. & Fosmire, G. J. The impaired growth induced by zinc deficiency in rats is associated with decreased expression of the hepatic insulin-like growth factor I and growth hormone receptor genes. *J Nutr* **125**, 874-9 (1995).
188. Powell, S. R. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* **130**, 1447S-54S (2000).
189. Prasad, A. S., Bao, B., Beck, F. W., Kucuk, O. & Sarkar, F. H. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med* **37**, 1182-90 (2004).
190. Mackenzie, G. G. & Oteiza, P. I. Zinc and the cytoskeleton in the neuronal modulation of transcription factor NFAT. *J Cell Physiol* **210**, 246-56 (2007).
191. Aizenman, E. et al. Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release. *J Neurochem* **75**, 1878-88 (2000).
192. Canzoniero, L. M., Manzerra, P., Sheline, C. T. & Choi, D. W. Membrane-permeant chelators can attenuate Zn2+-induced cortical neuronal death. *Neuropharmacology* **45**, 420-8 (2003).
193. Cho, E. et al. Endogenous Zinc Mediates Apoptotic Programmed Cell Death in the Developing Brain. *Neurotox Res* (2009).
194. Huang, Y. Z., Pan, E., Xiong, Z. Q. & McNamara, J. O. Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron* **57**, 546-58 (2008).
195. Saito, T. et al. Deficiencies of hippocampal Zn and ZnT3 accelerate brain aging of Rat. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 505-11 (2000).
196. Frederickson, C. J., Howell, G. A., Haigh, M. D. & Danscher, G. Zinc-containing fiber systems in the cochlear nuclei of the rat and mouse. *Hear Res* **36**, 203-11 (1988).
197. Jo, S. M., Danscher, G., Daa Schroder, H., Won, M. H. & Cole, T. B. Zinc-enriched (ZEN) terminals in mouse spinal cord: immunohistochemistry and autometallography. *Brain Res* **870**, 163-9 (2000).
198. Vincent, S. R. & Semba, K. A heavy metal marker of the developing striatal mosaic. *Brain Res Dev Brain Res* **45**, 155-9 (1989).
199. Nowak, G., Szewczyk, B. & Pilc, A. Zinc and depression. An update. *Pharmacol Rep* **57**, 713-8 (2005).

200. Szewczyk, B. et al. Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. *Pharmacol Rep* **60**, 588-9 (2008).
201. Larson, A. A. & Kitto, K. F. Manipulations of zinc in the spinal cord, by intrathecal injection of zinc chloride, disodium-calcium-EDTA, or dipicolinic acid, alter nociceptive activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **282**, 1319-25 (1997).
202. Larson, A. A. & Kitto, K. F. Chelation of zinc in the extracellular area of the spinal cord, using ethylenediaminetetraacetic acid disodium-calcium salt or dipicolinic acid, inhibits the antinociceptive effect of capsaicin in adult mice. *J Pharmacol Exp Ther* **288**, 759-65 (1999).
203. Prasad, A. S. Zinc: an overview. *Nutrition* **11**, 93-9 (1995).
204. Prasad, A. S. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med* **14**, 353-7 (2008).
205. Alpers, D. H. Zinc and deficiencies of taste and smell. *Jama* **272**, 1233-4 (1994).
206. Heuchel, R. et al. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *Embo J* **13**, 2870-5 (1994).
207. Cunningham, M. G., Ames, H. M., Christensen, M. K. & Sorensen, J. C. Zincergic innervation of medial prefrontal cortex by basolateral projection neurons. *Neuroreport* **18**, 531-5 (2007).
208. Kay, A. R. & Toth, K. Is zinc a neuromodulator? *Sci Signal* **1**, re3 (2008).
209. Jo, S. M. et al. Zinc-enriched (ZEN) terminals in mouse olfactory bulb. *Brain Res* **865**, 227-36 (2000).
210. Nakashima, A. S. & Dyck, R. H. Zinc and cortical plasticity. *Brain Res Rev* **59**, 347-73 (2009).
211. Colvin, R. A. et al. Insights into Zn2+ homeostasis in neurons from experimental and modeling studies. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C726-42 (2008).
212. Dvergsten, C. L., Fosmire, G. J., Ollerich, D. A. & Sandstead, H. H. Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. I. Impaired acquisition of granule cells. *Brain Res* **271**, 217-26 (1983).
213. Gong, H., Takami, Y., Amemiya, T., Tozu, M. & Ohashi, Y. Ocular surface in Zn-deficient rats. *Ophthalmic Res* **36**, 129-38 (2004).
214. Grahn, B. H., Paterson, P. G., Gottschall-Pass, K. T. & Zhang, Z. Zinc and the eye. *J Am Coll Nutr* **20**, 106-18 (2001).
215. Hershfinkel, M., Moran, A., Grossman, N. & Sekler, I. A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca2+ and regulates ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11749-54 (2001).
216. Sharir, H. & Hershfinkel, M. The extracellular zinc-sensing receptor mediates intercellular communication by inducing ATP release. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 845-52 (2005).
217. Besser, L. et al. Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus. *J Neurosci* **29**, 2890-901 (2009).
218. Azriel-Tamir, H., Sharir, H., Schwartz, B. & Hershfinkel, M. Extracellular zinc triggers ERK-dependent activation of Na+/H+ exchange in colonocytes mediated by the zinc-sensing receptor. *J Biol Chem* **279**, 51804-16 (2004).
219. Sharir, H., Zinger, A., Nevo, A., Sekler, I. & Hershfinkel, M. Zinc released from injured cells is acting via the Zn2+-sensing receptor, ZnR, to trigger signaling leading to epithelial repair. *J Biol Chem* **285**, 26097-106.
220. Lichten, L. A. & Cousins, R. J. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr* **29**, 153-76 (2009).
221. Liuzzi, J. P. & Cousins, R. J. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr* **24**, 151-72 (2004).

222. Sekler, I., Sensi, S. L., Hershfinkel, M. & Silverman, W. F. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol Med* **13**, 337-43 (2007).
223. Qin, Y., Thomas, D., Fontaine, C. P. & Colvin, R. A. Silencing of ZnT1 reduces Zn2+ efflux in cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* **450**, 206-10 (2009).
224. Seo, Y. A., Lopez, V. & Kelleher, S. L. A histidine-rich motif mediates mitochondrial localization of ZnT2 to modulate mitochondrial function. *Am J Physiol Cell Physiol*.
225. Palmiter, R. D. & Huang, L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch* **447**, 744-51 (2004).
226. Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A. & Seve, M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* **53**, 2330-7 (2004).
227. Palmiter, R. D., Cole, T. B., Quaife, C. J. & Findley, S. D. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14934-9 (1996).
228. Ellis, C. D., Macdiarmid, C. W. & Eide, D. J. Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J Biol Chem* **280**, 28811-8 (2005).
229. Huang, L., Kirschke, C. P. & Gitschier, J. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J Biol Chem* **277**, 26389-95 (2002).
230. Kirschke, C. P. & Huang, L. ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **278**, 4096-102 (2003).
231. Lopez, V., Foolad, F. & Kelleher, S. L. ZnT2-overexpression represses the cytotoxic effects of zinc hyper-accumulation in malignant metallothionein-null T47D breast tumor cells. *Cancer Lett* **304**, 41-51.
232. Sindreu, C., Palmiter, R. D. & Storm, D. R. From the Cover: Zinc transporter ZnT-3 regulates presynaptic Erk1/2 signaling and hippocampus-dependent memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3366-70.
233. Cuajungco, M. P. & Lees, G. J. Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol Dis* **4**, 137-69 (1997).
234. Seve, M., Chimienti, F., Devergnas, S. & Favier, A. In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. *BMC Genomics* **5**, 32 (2004).
235. Eide, D. J. The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch* **447**, 796-800 (2004).
236. Costello, L. C., Liu, Y., Zou, J. & Franklin, R. B. Evidence for a zinc uptake transporter in human prostate cancer cells which is regulated by prolactin and testosterone. *J Biol Chem* **274**, 17499-504 (1999).
237. Desouki, M. M., Geradts, J., Milon, B., Franklin, R. B. & Costello, L. C. hZip2 and hZip3 zinc transporters are down regulated in human prostate adenocarcinomatous glands. *Mol Cancer* **6**, 37 (2007).
238. Weaver, B. P. et al. Zip4 (Slc39a4) expression is activated in hepatocellular carcinomas and functions to repress apoptosis, enhance cell cycle and increase migration. *PLoS One* **5**.
239. Andrews, G. K. Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem Soc Trans* **36**, 1242-6 (2008).
240. Taylor, K. M. et al. The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. *Mol Med* **13**, 396-406 (2007).

241. Wang, F., Kim, B. E., Petris, M. J. & Eide, D. J. The mammalian Zip5 protein is a zinc transporter that localizes to the basolateral surface of polarized cells. *J Biol Chem* **279**, 51433-41 (2004).
242. Weaver, B. P., Dufner-Beattie, J., Kambe, T. & Andrews, G. K. Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biol Chem* **388**, 1301-12 (2007).
243. Taylor, K. M. A distinct role in breast cancer for two LIV-1 family zinc transporters. *Biochem Soc Trans* **36**, 1247-51 (2008).
244. Taylor, K. M. & Nicholson, R. I. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim Biophys Acta* **1611**, 16-30 (2003).
245. Huang, L., Kirschke, C. P., Zhang, Y. & Yu, Y. Y. The ZIP7 gene (Slc39a7) encodes a zinc transporter involved in zinc homeostasis of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **280**, 15456-63 (2005).
246. Hogstrand, C., Kille, P., Nicholson, R. I. & Taylor, K. M. Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation. *Trends Mol Med* **15**, 101-11 (2009).
247. Taylor, K. M., Morgan, H. E., Johnson, A. & Nicholson, R. I. Structure-function analysis of HKE4, a member of the new LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochem J* **377**, 131-9 (2004).
248. Dalton, T. P. et al. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3401-6 (2005).
249. He, L. et al. ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. *Mol Pharmacol* **70**, 171-80 (2006).
250. Fujishiro, H., Okugaki, S., Yasumitsu, S., Enomoto, S. & Himeno, S. Involvement of DNA hypermethylation in down-regulation of the zinc transporter ZIP8 in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **241**, 195-201 (2009).
251. Matsuura, W. et al. SLC39A9 (ZIP9) regulates zinc homeostasis in the secretory pathway: characterization of the ZIP subfamily I protein in vertebrate cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 1142-8 (2009).
252. Kagara, N., Tanaka, N., Noguchi, S. & Hirano, T. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells. *Cancer Sci* **98**, 692-7 (2007).
253. Wimmer, U., Wang, Y., Georgiev, O. & Schaffner, W. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. *Nucleic Acids Res* **33**, 5715-27 (2005).
254. Bly, M. Examination of the zinc transporter gene, SLC39A12. *Schizophr Res* **81**, 321-2 (2006).
255. Lang, C. et al. Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**, L577-84 (2007).
256. Fukada, T. et al. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS One* **3**, e3642 (2008).
257. Hojyo, S. et al. The Zinc Transporter SLC39A14/ZIP14 Controls G-Protein Coupled Receptor-Mediated Signaling Required for Systemic Growth. *PLoS One* **6**, e18059.
258. Liuzzi, J. P., Aydemir, F., Nam, H., Knutson, M. D. & Cousins, R. J. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13612-7 (2006).
259. Girijashanker, K. et al. Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Mol Pharmacol* **73**, 1413-23 (2008).

260. Liuzzi, J. P. et al. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6843-8 (2005).
261. Sensi, S. L. et al. Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry. *J Neurosci* **17**, 9554-64 (1997).
262. Gyulkhandanyan, A. V., Lee, S. C., Bikopoulos, G., Dai, F. & Wheeler, M. B. The Zn2+-transporting pathways in pancreatic beta-cells: a role for the L-type voltage-gated Ca2+ channel. *J Biol Chem* **281**, 9361-72 (2006).
263. Kerchner, G. A., Canzoniero, L. M., Yu, S. P., Ling, C. & Choi, D. W. Zn2+ current is mediated by voltage-gated Ca2+ channels and enhanced by extracellular acidity in mouse cortical neurones. *J Physiol* **528 Pt 1**, 39-52 (2000).
264. Colvin, R. A., Davis, N., Nipper, R. W. & Carter, P. A. Zinc transport in the brain: routes of zinc influx and efflux in neurons. *J Nutr* **130**, 1484S-7S (2000).
265. Liu, S. et al. Expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron* **43**, 43-55 (2004).
266. Sensi, S. L., Yin, H. Z., Carriedo, S. G., Rao, S. S. & Weiss, J. H. Preferential Zn2+ influx through Ca2+-permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2414-9 (1999).
267. Weiss, J. H. & Sensi, S. L. Ca2+-Zn2+ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci* **23**, 365-71 (2000).
268. Takeda, A., Sakurada, N., Ando, M., Kanno, S. & Oku, N. Facilitation of zinc influx via AMPA/kainate receptor activation in the hippocampus. *Neurochem Int* **55**, 376-82 (2009).
269. Sensi, S. L., Yin, H. Z. & Weiss, J. H. AMPA/kainate receptor-triggered Zn2+ entry into cortical neurons induces mitochondrial Zn2+ uptake and persistent mitochondrial dysfunction. *Eur J Neurosci* **12**, 3813-8 (2000).
270. Weiss, J. H., Hartley, D. M., Koh, J. Y. & Choi, D. W. AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity. *Neuron* **10**, 43-9 (1993).
271. Koh, J. Y. & Choi, D. W. Zinc toxicity on cultured cortical neurons: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* **60**, 1049-57 (1994).
272. Paoletti, P., Ascher, P. & Neyton, J. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* **17**, 5711-25 (1997).
273. Erreger, K. & Traynelis, S. F. Zinc inhibition of rat NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors. *J Physiol* **586**, 763-78 (2008).
274. Ohana, E. et al. A sodium zinc exchange mechanism is mediating extrusion of zinc in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**, 4278-84 (2004).
275. Qin, Y., Thomas, D., Fontaine, C. P. & Colvin, R. A. Mechanisms of Zn2+ efflux in cultured cortical neurons. *J Neurochem* **107**, 1304-13 (2008).
276. Mocchegiani, E., Bertoni-Freddari, C., Marcellini, F. & Malavolta, M. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol* **75**, 367-90 (2005).
277. Colvin, R. A., Holmes, W. R., Fontaine, C. P. & Maret, W. Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics* **2**, 306-17.
278. Cole, T. B., Wenzel, H. J., Kafer, K. E., Schwartzkroin, P. A. & Palmiter, R. D. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1716-21 (1999).
279. Paoletti, P., Vergnano, A. M., Barbour, B. & Casado, M. Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* **158**, 126-36 (2009).

280. Colvin, R. A. pH dependence and compartmentalization of zinc transported across plasma membrane of rat cortical neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C317-29 (2002).
281. Colvin, R. A., Laskowski, M. & Fontaine, C. P. Zinquin identifies subcellular compartmentalization of zinc in cortical neurons. Relation to the trafficking of zinc and the mitochondrial compartment. *Brain Res* **1085**, 1-10 (2006).
282. Sensi, S. L., Ton-That, D., Weiss, J. H., Rothe, A. & Gee, K. R. A new mitochondrial fluorescent zinc sensor. *Cell Calcium* **34**, 281-4 (2003).
283. Sensi, S. L. et al. Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn2+ pools. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6157-62 (2003).
284. Caporale, T. et al. Ratiometric-pericam-mt, a novel tool to evaluate intramitochondrial zinc. *Exp Neurol* **218**, 228-34 (2009).
285. Saris, N. E. & Niva, K. Is Zn2+ transported by the mitochondrial calcium uniporter? *FEBS Lett* **356**, 195-8 (1994).
286. Malaiyandi, L. M., Vergun, O., Dineley, K. E. & Reynolds, I. J. Direct visualization of mitochondrial zinc accumulation reveals uniporter-dependent and -independent transport mechanisms. *J Neurochem* **93**, 1242-50 (2005).
287. Dineley, K. E., Richards, L. L., Votyakova, T. V. & Reynolds, I. J. Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* **5**, 55-65 (2005).
288. Jiang, D., Sullivan, P. G., Sensi, S. L., Steward, O. & Weiss, J. H. Zn(2+) induces permeability transition pore opening and release of pro-apoptotic peptides from neuronal mitochondria. *J Biol Chem* **276**, 47524-9 (2001).
289. Zoratti, M. & Szabo, I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 139-76 (1995).
290. Zamzami, N. & Kroemer, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 67-71 (2001).
291. Sensi, S. L., Ton-That, D. & Weiss, J. H. Mitochondrial sequestration and Ca(2+)-dependent release of cytosolic Zn(2+) loads in cortical neurons. *Neurobiol Dis* **10**, 100-8 (2002).
292. West, A. K., Hidalgo, J., Eddins, D., Levin, E. D. & Aschner, M. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology* **29**, 489-503 (2008).
293. Haq, F., Mahoney, M. & Koropatnick, J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res* **533**, 211-26 (2003).
294. Formigari, A., Irato, P. & Santon, A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **146**, 443-59 (2007).
295. Sato, M. & Kondoh, M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med* **196**, 9-22 (2002).
296. Thirumoorthy, N., Manisenthil Kumar, K. T., Shyam Sundar, A., Panayappan, L. & Chatterjee, M. Metallothionein: an overview. *World J Gastroenterol* **13**, 993-6 (2007).
297. Aschner, M. The functional significance of brain metallothioneins. *Faseb J* **10**, 1129-36 (1996).
298. Palmiter, R. D., Findley, S. D., Whitmore, T. E. & Durnam, D. M. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6333-7 (1992).
299. Quaife, C. J. et al. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* **33**, 7250-9 (1994).

300. Palmiter, R. D. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1219-23 (1994).
301. Palmiter, R. D. The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8428-30 (1998).
302. Andrews, G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* **59**, 95-104 (2000).
303. Anezaki, T. et al. Expression of growth inhibitory factor (GIF) in normal and injured rat brains. *Neurochem Int* **27**, 89-94 (1995).
304. Yuguchi, T. et al. Expression of growth inhibitory factor mRNA following cortical injury in rat. *J Neurotrauma* **12**, 299-306 (1995).
305. Yuguchi, T. et al. Changes in growth inhibitory factor mRNA expression compared with those in c-jun mRNA expression following facial nerve transection. *Brain Res Mol Brain Res* **28**, 181-5 (1995).
306. Ye, B., Maret, W. & Vallee, B. L. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2317-22 (2001).
307. Cherian, M. G. & Apostolova, M. D. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**, 347-56 (2000).
308. Takahashi, Y., Ogra, Y. & Suzuki, K. T. Nuclear trafficking of metallothionein requires oxidation of a cytosolic partner. *J Cell Physiol* **202**, 563-9 (2005).
309. Porter, H. The particulate half-cystine-rich copper protein of newborn liver. Relationship to metallothionein and subcellular localization in non-mitochondrial particles possibly representing heavy lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **56**, 661-8 (1974).
310. Sabolic, I., Breljak, D., Skarica, M. & Herak-Kramberger, C. M. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals* **23**, 897-926.
311. Dalton, T., Fu, K., Enders, G. C., Palmiter, R. D. & Andrews, G. K. Analysis of the effects of overexpression of metallothionein-I in transgenic mice on the reproductive toxicology of cadmium. *Environ Health Perspect* **104**, 68-76 (1996).
312. Masters, B. A., Kelly, E. J., Quaife, C. J., Brinster, R. L. & Palmiter, R. D. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 584-8 (1994).
313. Masters, B. A. et al. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci* **14**, 5844-57 (1994).
314. Park, J. D., Liu, Y. & Klaassen, C. D. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals(1). *Toxicology* **163**, 93-100 (2001).
315. Kang, Y. J. Metallothionein redox cycle and function. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 1459-67 (2006).
316. Schwarz, M. A. et al. Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4452-6 (1995).
317. Maret, W. & Vallee, B. L. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3478-82 (1998).
318. Maret, W. Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc. *Neurochem Int* **27**, 111-7 (1995).
319. St Croix, C. M. et al. Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**, L185-92 (2002).
320. Weser, U. & Bischoff, E. Incorporation of 65Zn in rat liver nuclei. *Eur J Biochem* **12**, 571-5 (1970).

321. Spahl, D. U., Berendji-Grun, D., Suschek, C. V., Kolb-Bachofen, V. & Kroncke, K. D. Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn2+ release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13952-7 (2003).
322. Nagano, T. et al. The transport mechanism of metallothionein is different from that of classical NLS-bearing protein. *J Cell Physiol* **185**, 440-6 (2000).
323. Chang, C. J. et al. Bright fluorescent chemosensor platforms for imaging endogenous pools of neuronal zinc. *Chem Biol* **11**, 203-10 (2004).
324. Ohana, E. et al. Identification of the Zn2+ binding site and mode of operation of a mammalian Zn2+ transporter. *J Biol Chem* **284**, 17677-86 (2009).
325. Yamasaki, S. et al. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol* **177**, 637-45 (2007).
326. Stork, C. J. & Li, Y. V. Zinc release from thapsigargin/IP3-sensitive stores in cultured cortical neurons. *J Mol Signal* **5**, 5.
327. Mackenzie, G. G., Zago, M. P., Aimo, L. & Oteiza, P. I. Zinc deficiency in neuronal biology. *IUBMB Life* **59**, 299-307 (2007).
328. Vonk, W. I. & Klomp, L. W. Role of transition metals in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Soc Trans* **36**, 1322-8 (2008).
329. Ermilova, I. P. et al. Protection by dietary zinc in ALS mutant G93A SOD transgenic mice. *Neurosci Lett* **379**, 42-6 (2005).
330. Frederickson, C. J. et al. Concentrations of extracellular free zinc (pZn)e in the central nervous system during simple anesthetization, ischemia and reperfusion. *Exp Neurol* **198**, 285-93 (2006).
331. Takeda, A., Hirate, M., Tamano, H. & Oku, N. Zinc movement in the brain under kainate-induced seizures. *Epilepsy Res* **54**, 123-9 (2003).
332. Fukahori, M., Itoh, M., Oomagari, K. & Kawasaki, H. Zinc content in discrete hippocampal and amygdaloid areas of the epilepsy (El) mouse and normal mice. *Brain Res* **455**, 381-4 (1988).
333. Fukahori, M. & Itoh, M. Effects of dietary zinc status on seizure susceptibility and hippocampal zinc content in the El (epilepsy) mouse. *Brain Res* **529**, 16-22 (1990).
334. Buhl, E. H., Otis, T. S. & Mody, I. Zinc-induced collapse of augmented inhibition by GABA in a temporal lobe epilepsy model. *Science* **271**, 369-73 (1996).
335. Mathie, A., Sutton, G. L., Clarke, C. E. & Veale, E. L. Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharmacol Ther* **111**, 567-83 (2006).
336. Dwivedi, Y. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. *Neuropsychiatr Dis Treat* **5**, 433-49 (2009).
337. Krishnan, V. & Nestler, E. J. The molecular neurobiology of depression. *Nature* **455**, 894-902 (2008).
338. Lanni, C., Govoni, S., Lucchelli, A. & Boselli, C. Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2985-3008 (2009).
339. Kozisek, M. E., Middlemas, D. & Bylund, D. B. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol Ther* **117**, 30-51 (2008).
340. Duman, R. S. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *Eur Psychiatry* **17 Suppl 3**, 306-10 (2002).
341. Ongur, D., Drevets, W. C. & Price, J. L. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13290-5 (1998).

342. Cotter, D. et al. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb Cortex* **12**, 386-94 (2002).
343. Miguel-Hidalgo, J. J. & Rajkowska, G. Morphological brain changes in depression: can antidepressants reverse them? *CNS Drugs* **16**, 361-72 (2002).
344. Andreasen, N. C. Linking mind and brain in the study of mental illnesses: a project for a scientific psychopathology. *Science* **275**, 1586-93 (1997).
345. McEwen, B. S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry* **48**, 721-31 (2000).
346. Porter, R. J., Gallagher, P., Thompson, J. M. & Young, A. H. Neurocognitive impairment in drug-free patients with major depressive disorder. *Br J Psychiatry* **182**, 214-20 (2003).
347. Lewin, G. R. & Barde, Y. A. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* **19**, 289-317 (1996).
348. Sofroniew, M. V., Galletly, N. P., Isacson, O. & Svendsen, C. N. Survival of adult basal forebrain cholinergic neurons after loss of target neurons. *Science* **247**, 338-42 (1990).
349. Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* **4**, 299-309 (2003).
350. Altieri, M., Marini, F., Arban, R., Vitulli, G. & Jansson, B. O. Expression analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA isoforms after chronic and acute antidepressant treatment. *Brain Res* **1000**, 148-55 (2004).
351. Shirayama, Y., Chen, A. C., Nakagawa, S., Russell, D. S. & Duman, R. S. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* **22**, 3251-61 (2002).
352. Chen, B., Dowlatshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F. & Young, L. T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* **50**, 260-5 (2001).
353. Nowak, G. & Schlegel-Zawadzka, M. Alterations in serum and brain trace element levels after antidepressant treatment: part I. Zinc. *Biol Trace Elem Res* **67**, 85-92 (1999).
354. Sun, Y., Zhang, Y. T., Gong, H. Q. & Liang, P. J. The mechanisms of Zn2+ effects on Ca2+-permeable AMPA receptors on carp retinal horizontal cells. *Brain Res* **1345**, 103-9 (2010).
355. Ilouz, R., Kaidanovich, O., Gurwitz, D. & Eldar-Finkelman, H. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by bivalent zinc ions: insight into the insulin-mimetic action of zinc. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 102-6 (2002).
356. Li, Y. et al. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* **59**, 399-412 (2008).
357. Saarelainen, T. et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* **23**, 349-57 (2003).
358. MacQueen, G. M. et al. Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. *Behav Neurosci* **115**, 1145-53 (2001).
359. Berton, O. et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* **311**, 864-8 (2006).
360. Mennini, T. & Gobbi, M. The antidepressant mechanism of Hypericum perforatum. *Life Sci* **75**, 1021-7 (2004).

361. Medina, M. A., Martinez-Poveda, B., Amores-Sanchez, M. I. & Quesada, A. R. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci* **79**, 105-11 (2006).
362. Zhou, C. et al. Hyperforin, the active component of St. John's wort, induces IL-8 expression in human intestinal epithelial cells via a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *J Clin Immunol* **24**, 623-36 (2004).
363. Erdelmeier, C. A. Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of Hypericum perforatum L. *Pharmacopsychiatry* **31 Suppl 1**, 2-6 (1998).
364. Butterweck, V., Petereit, F., Winterhoff, H. & Nahrstedt, A. Solubilized hypericin and pseudohypericin from Hypericum perforatum exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* **64**, 291-4 (1998).
365. Laakmann, G., Schule, C., Baghai, T. & Kieser, M. St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* **31 Suppl 1**, 54-9 (1998).
366. Muller, W. E. et al. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract. *Pharmacopsychiatry* **31 Suppl 1**, 16-21 (1998).
367. Griffith, T. N., Varela-Nallar, L., Dinamarca, M. C. & Inestrosa, N. C. Neurobiological effects of Hyperforin and its potential in Alzheimer's disease therapy. *Curr Med Chem* **17**, 391-406.
368. Singer, A., Wonnemann, M. & Muller, W. E. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na+1. *J Pharmacol Exp Ther* **290**, 1363-8 (1999).
369. Malandro, M. S. & Kilberg, M. S. Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annu Rev Biochem* **65**, 305-36 (1996).
370. Roz, N. & Rehavi, M. Hyperforin depletes synaptic vesicles content and induces compartmental redistribution of nerve ending monoamines. *Life Sci* **75**, 2841-50 (2004).
371. Roz, N. & Rehavi, M. Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. *Life Sci* **73**, 461-70 (2003).
372. Eckert, G. P. et al. Hyperforin modifies neuronal membrane properties in vivo. *Neurosci Lett* **367**, 139-43 (2004).
373. Chatterjee, S. S., Biber, A. & Weibezahn, C. Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin. *Pharmacopsychiatry* **34 Suppl 1**, S11-9 (2001).
374. Franklin, M., Chi, J. D., Mannel, M. & Cowen, P. J. Acute effects of LI 160 (extract of Hypericum perforatum, St John's wort) and two of its constituents on neuroendocrine responses in the rat. *J Psychopharmacol* **14**, 360-3 (2000).
375. Philippu, A. In vivo neurotransmitter release in the locus coeruleus--effects of hyperforin, inescapable shock and fear. *Pharmacopsychiatry* **34 Suppl 1**, S111-5 (2001).
376. Linde, K. et al. St John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *Bmj* **313**, 253-8 (1996).
377. Effect of Hypericum perforatum (St John's wort) in major depressive disorder: a randomized controlled trial. *Jama* **287**, 1807-14 (2002).
378. Madabushi, R., Frank, B., Drewelow, B., Derendorf, H. & Butterweck, V. Hyperforin in St. John's wort drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol* **62**, 225-33 (2006).
379. Ott, M., Huls, M., Cornelius, M. G. & Fricker, G. St. John's Wort constituents modulate P-glycoprotein transport activity at the blood-brain barrier. *Pharm Res* **27**, 811-22.

380. Molendijk, M. L. et al. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. *Mol Psychiatry* (2010).
381. Trofimiuk, E., Holownia, A. & Braszko, J. J. Activation of CREB by St. John's wort may diminish deletorious effects of aging on spatial memory. *Arch Pharm Res* **33**, 469-77 (2010).
382. Trofimiuk, E., Holownia, A. & Braszko, J. J. St. John's wort may relieve negative effects of stress on spatial working memory by changing synaptic plasticity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*.
383. Crupi, R. et al. Hypericum perforatum treatment: effect on behaviour and neurogenesis in a chronic stress model in mice. *BMC Complement Altern Med* **11**, 7 (2011).
384. Klusa, V., Germane, S., Noldner, M. & Chatterjee, S. S. Hypericum extract and hyperforin: memory-enhancing properties in rodents. *Pharmacopsychiatry* **34 Suppl 1**, S61-9 (2001).
385. Froestl, B., Steiner, B. & Muller, W. E. Enhancement of proteolytic processing of the beta-amyloid precursor protein by hyperforin. *Biochem Pharmacol* **66**, 2177-84 (2003).
386. Schempp, C. M. et al. Topical application of St John's wort (Hypericum perforatum L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *Br J Dermatol* **142**, 979-84 (2000).
387. Albert, D. et al. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* **64**, 1767-75 (2002).
388. Feisst, C. & Werz, O. Suppression of receptor-mediated Ca2+ mobilization and functional leukocyte responses by hyperforin. *Biochem Pharmacol* **67**, 1531-9 (2004).
389. Schempp, C. M., Pelz, K., Wittmer, A., Schopf, E. & Simon, J. C. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant Staphylococcus aureus and gram-positive bacteria. *Lancet* **353**, 2129 (1999).
390. Dona, M. et al. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* **64**, 6225-32 (2004).
391. Hostanska, K., Reichling, J., Bommer, S., Weber, M. & Saller, R. Hyperforin a constituent of St John's wort (Hypericum perforatum L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur J Pharm Biopharm* **56**, 121-32 (2003).
392. Rothley, M. et al. Hyperforin and aristoforin inhibit lymphatic endothelial cell proliferation in vitro and suppress tumor-induced lymphangiogenesis in vivo. *Int J Cancer* **125**, 34-42 (2009).
393. Tassone, E. et al. Antidepressant hyperforin up-regulates VEGF in CNS tumour cells. *Pharmacol Res*.
394. Zhu, X., Jiang, M. & Birnbaumer, L. Receptor-activated Ca2+ influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca2+ entry. *J Biol Chem* **273**, 133-42 (1998).
395. Gee, K. R., Zhou, Z. L., Ton-That, D., Sensi, S. L. & Weiss, J. H. Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. *Cell Calcium* **31**, 245-51 (2002).
396. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100 (1981).
397. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63 (1983).

398. Willis, M. S. et al. Zinc-induced copper deficiency: a report of three cases initially recognized on bone marrow examination. *Am J Clin Pathol* **123**, 125-31 (2005).
399. Lutsenko, S. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr Opin Chem Biol* **14**, 211-7 (2010).
400. Wang, Z., Wong, N. C., Cheng, Y., Kehl, S. J. & Fedida, D. Control of voltage-gated K+ channel permeability to NMDG+ by a residue at the outer pore. *J Gen Physiol* **133**, 361-74 (2009).
401. Chen, J. et al. Pore dilation occurs in TRPA1 but not in TRPM8 channels. *Mol Pain* **5**, 3 (2009).
402. Dietrich, A. et al. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6-/- mice. *Mol Cell Biol* **25**, 6980-9 (2005).
403. Gibon, J., Tu, P., Frazzini, V., Sensi, S. L. & Bouron, A. The thiol-modifying agent N-ethylmaleimide elevates the cytosolic concentration of free Zn(2+) but not of Ca(2+) in murine cortical neurons. *Cell Calcium* **48**, 37-43 (2010).
404. Dong, X. P. et al. The type IV mucolipidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. *Nature* **455**, 992-6 (2008).
405. Kiselyov, K. et al. TRPML: Transporters of metals in lysosomes essential for cell survival? *Cell Calcium* (2011).
406. Bassi, M. T. et al. Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucolipidin-and identification of the two major founder mutations causing mucolipidosis type IV. *Am J Hum Genet* **67**, 1110-20 (2000).
407. Sun, M. et al. Mucolipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet* **9**, 2471-8 (2000).
408. Monteilh-Zoller, M. K. et al. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* **121**, 49-60 (2003).
409. Li, M., Jiang, J. & Yue, L. Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol* **127**, 525-37 (2006).
410. Wagner, T. F. et al. TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells. *Pflugers Arch* **460**, 755-65.
411. Kovacs, G. et al. Heavy metal cations permeate the TRPV6 epithelial cation channel. *Cell Calcium* **49**, 43-55.
412. Inoue, K., Branigan, D. & Xiong, Z. G. Zinc-induced neurotoxicity mediated by transient receptor potential melastatin 7 channels. *J Biol Chem* **285**, 7430-9.
413. Martineau, C. et al. Involvement of transient receptor potential melastatin-related 7 (TRPM7) channels in cadmium uptake and cytotoxicity in MC3T3-E1 osteoblasts. *Toxicol Lett* **199**, 357-63.
414. Voets, T. et al. TRPM6 forms the Mg2+ influx channel involved in intestinal and renal Mg2+ absorption. *J Biol Chem* **279**, 19-25 (2004).
415. Dunn, M. F. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. *Biometals* **18**, 295-303 (2005).
416. Suzuki, Y. et al. Calcium channel TRPV6 is involved in murine maternal-fetal calcium transport. *J Bone Miner Res* **23**, 1249-56 (2008).
417. Patapoutian, A., Tate, S. & Woolf, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 55-68 (2009).
418. Andersson, D. A., Gentry, C., Moss, S. & Bevan, S. Clioquinol and pyrithione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn2+. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8374-9 (2009).
419. Gu, Q. & Lin, R. L. Heavy metals zinc, cadmium, and copper stimulate pulmonary sensory neurons via direct activation of TRPA1. *J Appl Physiol* **108**, 891-7.

420. Kiyonaka, S. et al. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5400-5 (2009).
421. Webster, J. M., Bentley, M. T. & Wojcikiewicz, R. J. N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine inhibits ligand binding to certain G protein-coupled receptors. *Eur J Pharmacol* **474**, 1-5 (2003).
422. Sinkins, W. G., Goel, M., Estacion, M. & Schilling, W. P. Association of immunophilins with mammalian TRPC channels. *J Biol Chem* **279**, 34521-9 (2004).
423. Martin, J. L., Stork, C. J. & Li, Y. V. Determining zinc with commonly used calcium and zinc fluorescent indicators, a question on calcium signals. *Cell Calcium* **40**, 393-402 (2006).
424. Liu, J. Y. et al. Induction of apoptosis in K562 cells by dicyclohexylammonium salt of hyperforin through a mitochondrial-related pathway. *Chem Biol Interact* (2011).
425. Kingsbury, T. J., Murray, P. D., Bambrick, L. L. & Krueger, B. K. Ca(2+)-dependent regulation of TrkB expression in neurons. *J Biol Chem* **278**, 40744-8 (2003).
426. Lonze, B. E. & Ginty, D. D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* **35**, 605-23 (2002).
427. Soderling, T. R. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci* **24**, 232-6 (1999).
428. Arslan, P., Di Virgilio, F., Beltrame, M., Tsien, R. Y. & Pozzan, T. Cytosolic Ca2+ homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca2+. *J Biol Chem* **260**, 2719-27 (1985).
429. Choi, S. M., Choi, K. O., Lee, N., Oh, M. & Park, H. The zinc chelator, N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine, increases the level of nonfunctional HIF-1alpha protein in normoxic cells. *Biochem Biophys Res Commun* **343**, 1002-8 (2006).
430. Arnould, T. et al. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *Embo J* **21**, 53-63 (2002).
431. Murray, A. J. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* **1**, re4 (2008).
432. Hanoune, J. & Defer, N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 145-74 (2001).
433. Poser, S. & Storm, D. R. Role of Ca2+-stimulated adenylyl cyclases in LTP and memory formation. *Int J Dev Neurosci* **19**, 387-94 (2001).
434. Xia, Z. & Storm, D. R. Calmodulin-regulated adenylyl cyclases and neuromodulation. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 391-6 (1997).

Résumé

Les canaux TRPC6 sont des canaux cationiques non sélectifs perméables au calcium et au sodium. In vitro, ils laissent passer du manganèse, du baryum ou du fer. Ces canaux peuvent être activés par des analogues du diacylglycérol (SAG ou OAG) et par l'hyperforine (un antidépresseur d'origine végétal). Des expériences de dosages par ICP-OES, d'imagerie synchrotron et d'imagerie de fluorescence du FluoZin-3 ont montré que les cellules HEK surexprimant TRPC6 sont enrichies en zinc. Ces cellules sont plus sensibles à un stress oxydant et produisent plus d'espèces réactives de l'oxygène que les cellules HEK non transfectées. Dans les cellules HEK exprimant TRPC6, l'entrée de zinc en réponse au SAG est plus importante que celle observée dans les cellules HEK ou HEK-TRPC3.

Les canaux TRPC6 sont exprimés dans les neurones corticaux. En réalisant des expériences d'imagerie de fluorescence et d'électrophysiologie, nous avons observé que l'activation de ces canaux par le SAG ou par l'hyperforine permettait l'entrée de zinc dans les neurones. La taille du pool de zinc fixé sur des protéines à groupement thiols est augmentée après un influx de zinc via TRPC6. Ceux-ci forment donc une voie d'entrée pour ce métal dans les neurones corticaux embryonnaires.

Dans certains types cellulaires, les canaux TRPC6 participent à l'entrée calcique déclenchée en réponse à la déplétion du stock calcique du réticulum (canaux SOC). Cependant, dans les neurones corticaux, les voies SOC et activées par l'hyperforine possèdent des propriétés pharmacologiques distinctes suggérant que les canaux TRPC6 ne participent pas à la voie SOC.

L'homéostasie des métaux dans les neurones est perturbée par l'hyperforine. Cet antidépresseur diminue la taille des pools de calcium et de zinc des mitochondries à la fois lors de traitements aigus et chroniques. Une relocalisation du zinc est observée dans les neurones traités de façon chronique à l'hyperforine ainsi qu'une augmentation de l'expression des métallothionéines à la fois *in vitro* et *in vivo*. Chez la souris, la quantité de soufre du cerveau est augmentée lors un traitement à l'hyperforine. Celle-ci serait donc un antidépresseur qui module les capacités de stockage du zinc en augmentant le nombre de groupements thiols cellulaires.

L'hyperforine est présente dans les extraits de millepertuis. Ceux-ci ont diverses cibles pharmacologiques, agissant notamment sur la voie de signalisation du BDNF. Nos expériences montrent que, lors d'un traitement chronique de souris adultes, l'hyperforine augmente l'expression de TrkB et P-TrkB dans le cortex. *In vitro*, dans les neurones corticaux, TrkB, CREB et P-CREB sont surexprimés après un traitement de trois jours à l'hyperforine. L'inhibition de la PKA ou le blocage des canaux TRPC6 par le SKF-96365 empêche l'effet de l'hyperforine. Par ailleurs, la chélation du calcium par le BAPTA-AM supprime partiellement l'effet de l'hyperforine. Un traitement chronique avec cet extrait végétal semble agir sur une voie dépendante de la PKA et du calcium pour réguler la phosphorylation de CREB et l'expression de TrkB. Nos expériences montrent que l'effet de l'hyperforine sur les acteurs de la voie du BDNF n'est pas présent au niveau de l'hippocampe où l'expression de TrkB n'est pas affectée. De plus, ces traitements n'influencent pas la neurogenèse adulte chez la souris. L'hyperforine seule n'explique donc pas les effets complexes des extraits de millepertuis sur les activités neuronales.

Abstract

TRPC6 channels are non selective plasma membrane cation channels permeable to calcium and sodium. In addition, in vitro data showed that they can transport manganese, barium or iron. These channels can be activated by diacylglycerol (DAG) or DAG analogues like SAG or OAG. They are also sensitive to hyperforin (a plant extract exhibiting antidepressant properties). ICP-OES experiments, X-ray synchrotron imaging and live-cell FluoZin-3 imaging show that the over expression of TRPC6 in HEK cells increases their zinc and sulfur content. This enrichment is associated with an increased sensitivity of transfected cells to oxidative stress by enhancing the production of reactive oxygen species in response to oxidative insults. The entry of zinc permitted by SAG or hyperforin is more pronounced in cells over-expressing TRPC6 when compared to HEK or HEK-TRPC3 cells.

TRPC6 channels are expressed in cortical neurons. Electrophysiological recordings and experiments with the fluorescent zinc probe FluoZin-3 demonstrated that TRPC6 channels are permeable to zinc in neurons. The size of the 2-2 'dithiodipyridine (DTDP) sensitive pool of zinc is augmented after the entry of this metal through TRPC6. These channels form a zinc entry pathway in cortical neurons.

In some cell types, TRPC6 are involved in the mechanism of calcium entry in response to the depletion of intracellular pools of calcium. This calcium entry occurs via store-operated Ca channels (SOC). In our experiments, we have shown that in cortical neurons, hyperforin-sensitive channels and SOC are distinct since they exhibit distinct pharmacological properties.

Hyperforin influences the homeostasis of metals in cortical neurons. We found that acute or chronic applications of this antidepressant decreases the size of the mitochondrial pools of calcium and zinc. In addition, in vitro and in vivo data show that a chronic treatment causes a cellular redistribution of zinc, associated with an increased expression of metallothioneins. Furthermore, brains of mice are enriched in sulfur. It seems that this antidepressant influences the zinc storage capacities of brain cells by altering the cellular expression of thiol-containing molecules.

Hyperforin is an extract of the medicinal plant St John Worth. This latter one possesses complex properties, acting notably on the BDNF pathway. A chronic treatment with hyperforin increases the expression of TrkB and P-TrkB in the cortex of mice. In cortical neurons, TrkB, CREB and P-CREB are up regulated by a chronic treatment with hyperforin. This process is sensitive to inhibitors of PKA, TRPC6 channels and to the chelator of calcium BAPTA-AM. On the other hand, a chronic treatment with hyperforin does not influence the BDNF pathway in the hippocampus and also does not modulate the adult neurogenesis. Thus, the brain effects of hyperforin are distinct from those induced by the whole St John Worth extract.