

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

ISABELLE RIVARD

**DÉTECTION ÉLECTROCHIMIQUE DE L'OXYDE NITRIQUE DANS
DES COUPES DE CERVEAU.**

DÉCEMBRE 1999

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

La découverte de la formation endogène d'oxyde nitrique a conduit à une explosion de recherche afin de déterminer le rôle de cette molécule dans les nombreux processus biologiques. On a découvert l'implication de l'oxyde nitrique (NO) dans de nombreuses fonctions physiologiques telles la vasodilatation, l'agrégation plaquettaire, la neurotransmission et comme l'agent cytotoxique des macrophages. Son implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques a stimulé la recherche sur les techniques permettant la détection et la mesure du NO produit dans les cellules et les tissus. La méthode ampérométrique s'est révélée être une approche permettant de faire des études au niveau cellulaire, avec une très grande sensibilité et surtout une grande sélectivité. De nombreuses recherches ont été effectuées afin d'améliorer les électrodes utilisées.

Durant mon projet de maîtrise, nous avons mis au point une méthode de détection électrochimique du NO. Nous avons testé différents recouvrements des électrodes afin d'augmenter leur sensibilité et surtout leur sélectivité. Nous avons démontré que l'utilisation de l'eugenol présente une meilleure sélectivité. L'utilisation du sodium nitroprusside nous a permis d'évaluer la qualité du système de mesure utilisé, ce qui a permis de constater un effet de l'oxygène lors de la libération du NO. Nous avons démontré que

l'électrode utilisée était suffisamment sensible pour détecter la libération endogène de NO par l'activation de la NOS suite, à l'activation du récepteur NMDA. En effet, nous avons été capables de détecter la libération endogène de NO dans une coupe d'hippocampe de souris, suite à l'activation du récepteur NMDA. De plus, lors de cette étude, nous avons pu remarquer la présence d'un composé lorsqu'il y a inhibition de la production de NO. Ce composé qui semble être inactivé en présence de NO reste à caractériser. Cependant, selon les travaux menés par l'équipe de Privat, le potentiel d'oxydation de ce composé correspondrait à l'anion superoxyde. Des expériences de contrôle pourraient venir confirmer la présence de ce composé.

En conclusion, mes recherches ont démontré que l'électrode de carbone permet de détecter le NO libéré de façon endogène sur des coupes de tissus. L'utilisation de cette technique, permet de faire une étude de distribution spatiale et temporelle et de mieux caractériser son rôle au niveau des maladies neurodégénératives.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes qui m'ont aidée au cours de ce projet de maîtrise. Je tiens tout d'abord à remercier le docteur Claude Arbour, directeur de ce projet, qui a cru en moi et qui m'a permis d'acquérir une autonomie et une rigueur scientifique.

Je tiens à remercier également le docteur Guy Massicotte pour sa collaboration pour les coupes de cerveaux ainsi que son étudiante Judith Cossette qui m'a beaucoup aidée lors de l'utilisation de celles-ci. Je tiens aussi à remercier des personnes qui m'ont apporté une aide technique importante tout au long de mon projet, soit Luc Marchand, Sylvie Gélinas et mon père.

Je voudrais souligner l'appui et les encouragements de ma famille, de mon copain Philippe et de mes amis Sylvie, Hugo, Sonya, Stéphanie, Céline, Meghan, Éric, Jean-Michel, Luc ainsi que tous les autres qui ont suivi mes aventures tout au long de mes travaux de maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
REMERCIEMENTS.....	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 L'OXYDE NITRIQUE	1
1.2 RÔLES PHYSIOLOGIQUES DU NO	5
1.2.1 Vasodilatation.....	5
1.2.2 Inhibition de l'agrégation plaquettaire	5
1.2.3 Agent cytotoxique des macrophages	5
1.2.4 Neurotransmission.....	6
1.3 RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE DU NO PAR LE RÉCEPTEUR NMDA.....	7
1.4 RÉACTIVITÉ DU NO	12
1.3 LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DÉTECTION DU NO	18
1.4 LA MÉTHODE AMPÉROMÉTRIQUE.....	24
1.5 L'ÉLECTRODE DE DÉTECTION DU NO (HISTORIQUE).....	24
1.6 OBJECTIFS DU PROJET DE MAÎTRISE	32
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	34

2.1 MATÉRIELS	34
2.1.1 Préparation des solutions	34
2.1.2 Coupe d'hippocampe	35
2.2 MÉTHODES	38
2.2.1 Mesure électrochimique	40
2.2.2 Fabrication de l'électrode de travail	40
2.2.3 Sublimation de la phtalocyanine	42
2.2.4 Électrodéposition de l'ortho-phénylènediamine	43
2.2.5 Électrodéposition du nafion	43
2.2.6 Électrodéposition de l'eugénol	44
CHAPITRE 3 RÉSULTATS	45
3.1 FABRICATION DE L'ÉLECTRODE	45
3.2 SENSIBILITÉ ET SÉLECTIVITÉ DE L'ÉLECTRODE	46
3.2.1 Sensibilité de l'électrode	47
3.2.2 Sélectivité de l'électrode	49
3.3 DÉTECTION DU NO LIBÉRÉ PAR LE NITROPRUSSIDE DE SODIUM (SNP)	54
3.4 DÉTECTION DE NO LIBÉRÉ DANS UNE COUPE SUITE À L'ACTIVATION AU NMDA	59
3.5 EFFET DE L'INHIBITEUR N-NITRO-L-ARGININE SUR LA DÉTECTION DU NO	61
CHAPITRE 4 DISCUSSION	64
4.1 L'ÉLECTRODE DE CARBONE	64
4.1.2 LA SENSIBILITÉ	64
4.1.2 LA SÉLECTIVITÉ	65
4.2 UTILISATION DU SNP	67
4.3 ACTIVATION DU RÉCEPTEUR NMDA	68
CONCLUSION	73
BIBLIOGRAPHIE	75

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Formation de l'oxyde nitrique (NO) via la voie constitutive de l'oxyde nitrique synthase (NOS).....	2
Figure 2. Localisation de la cNOS dans le cerveau..	4
Figure 3. Schéma du fonctionnement du récepteur au glutamate de type NMDA.	9
Figure 4. Régulation de la synthèse du NO..	11
Figure 5. Différents effets biologiques de l'oxyde nitrique.....	14
Figure 6. La chimie biologie du NO	17
Figure 7. Schéma du microsenseur pour la détection du NO de type Clark développé par Shibuki.	26
Figure 8. Schéma d'une microélectrode de carbone pour la détection du NO développé par Malinski et Taha.	30
Figure 9. Représentation schématique de la chambre à électrophysiologie....	36
Figure 10. Représentation schématique de la région CA1 de l'hippocampe....	37

Figure 11. Fabrication de l'électrode de carbone.	41
Figure 12. Courbe d'étalonnage des différentes électrodes testées..	48
Figure 13. Graphique du profil d'oxydation des différentes substances utilisées..	50
Figure 14. Étude comparative de la sélectivité du nafion et de l'eugénol..	52
Figure 15. Profil du potentiel d'oxydation d'une solution de NO/A.A.....	53
Figure 16. Profil de libération du NO par un donneur de NO (SNP) en solution..	55
Figure 17. Profil de libération du NO par un donneur de NO (SNP) dans une coupe d'hippocampe.....	56
Figure 18. Effet de l'oxygénation lors de la libération du NO.	58
Figure 19. Profil de libération de NO endogène dans une coupe d'hippocampe suite à l'activation du récepteur NMDA.	60
Figure 20. Effet de l'inhibiteur N-nitro-L-arginine sur la détection du NO.....	62
Figure 21. Effet de l'inhibiteur N-nitro-L-arginine sur la détection du NO. Agrandissement de l'échelle du graphique de la figure 16.	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principales méthodes de mesure directe du NO.....	20
--------------------------------------------------------------	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.A. :	acide ascorbique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMPA :	Acide α -amino-3-hydroxy-5 methyl-4-isoxazole propionique
ARNm :	Acide ribonucléique messager
BH ₄ :	Tétrahydrobioptérine
cNOS :	oxyde nitrique synthase constitutive
DA :	dopamine
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FMN :	Flavine mononucléotide
GC :	Guanylate cyclase
GMPc :	3',5' guanosine monophosphate cyclique
Hb :	hémoglobine
iNOS :	oxyde nitrique synthase inductive
nm :	nanomètre (longueur d'onde)
nM :	nanomolaire (nanomole par litre)
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
NO :	oxyde nitrique
NOS :	oxyde nitrique synthase
pA :	picomolaire (picomole par litre)
RNOS :	espèce réactive de l'oxygène
RPE :	résonance paramagnétique électronique
SNP :	sodium nitroprusside
V :	volt
μ M :	micromolaire (micromole par litre)
μ m :	micromètre

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 L'oxyde nitrique

Les premières études portant sur l'oxyde nitrique étaient principalement liées à la fumée de cigarette et à son implication en tant que polluant atmosphérique. C'est en 1980 que Furchgott et Zawadzki attribuèrent un rôle biologique à l'oxyde nitrique, en démontrant que la relaxation vasculaire induite par l'acétylcholine est dépendante de l'intégrité de l'endothélium et que cet effet est dû à la présence d'un facteur humoral labile qu'ils ont baptisé EDRF (*endothelium derived relaxing factor*) (Furchgott and Zawadzki, 1980). Mais ce n'est qu'en 1987 que l'équipe de Moncada identifia l'EDRF comme étant bien l'oxyde nitrique (Palmer et coll., 1987). Dès lors, c'est l'avalanche de découvertes, les nombreuses et importantes propriétés biologiques font de l'oxyde nitrique la molécule de l'année en 1992, par la revue science (Koshland, 1992). Depuis, on lui a attribué un rôle physiologique important dans divers mécanismes tels que la vasodilatation de l'agrégation plaquettaire, de l'adhésion des leucocytes cytotoxiques, la neurotransmission et la neuromodulation (Pelligrino et coll., 1996). Selon les mêmes chercheurs, le NO est également impliqué dans des réactions antimicrobiennes, cytostatiques et cytotoxiques. L'oxyde nitrique (NO) est une molécule composée d'un atome

d'azote et d'un atome d'oxygène. C'est un petit radical gazeux paramagnétique synthétisé *in vivo* par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS) qui convertit par deux mono-oxygénations successives la L-arginine en L-citrulline (figure 1). Un des inhibiteurs de cette enzyme est le N-nitro-L-arginine, un analogue structural du substrat.

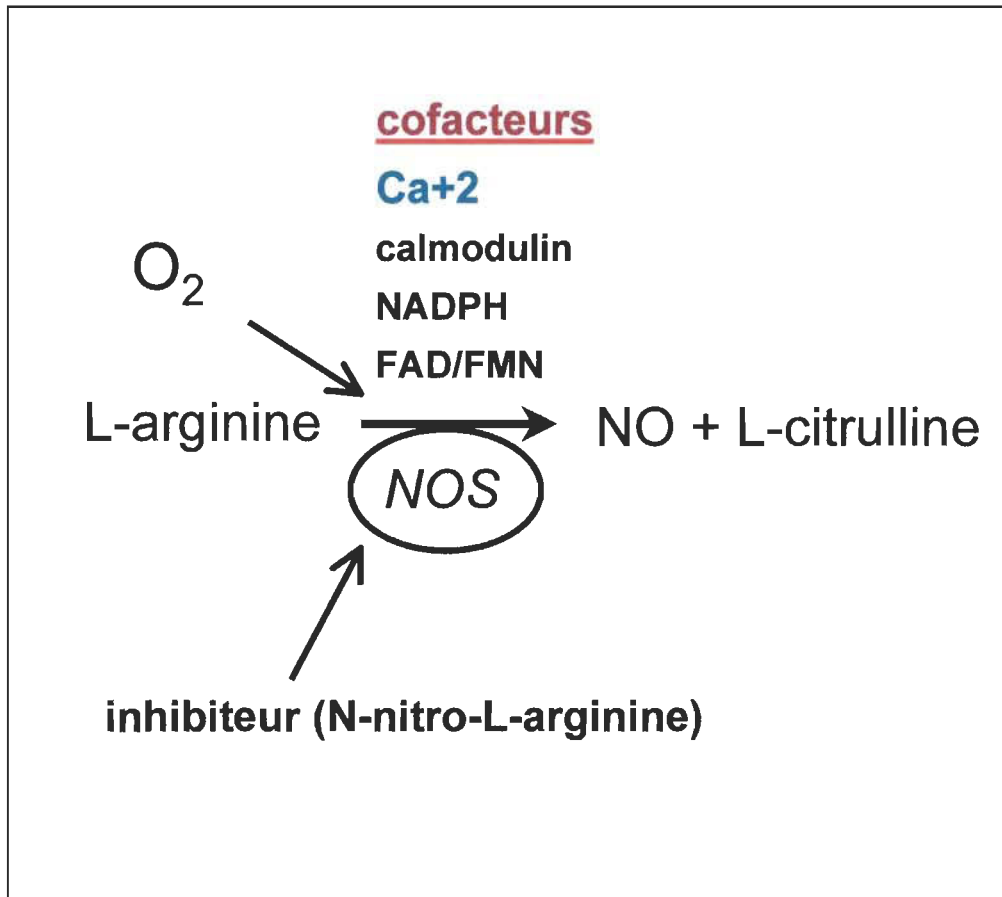


Figure 1. Formation de l'oxyde nitrique (NO) via la voie constitutive de l'oxyde nitrique synthase (NOS). La L-arginine, en présence d'oxygène et de cofacteurs spécifiques, est convertie en NO et L-citrulline par la NOS.

Trois isoformes de cette enzyme sont connus jusqu'à ce jour, soit le type I (oxyde nitrique synthase neuronal, nNOS), le type II (oxyde nitrique synthase inductive, iNOS) et le type III (oxyde nitrique synthase endothéliale, ecNOS). Les types I et III forment une classe de NOS dite de forme constitutive (cNOS). Les cNOS sont continuellement présentes dans la cellule et peuvent être activées par un influx de calcium ce qui résulte en la liaison du calcium à la calmoduline qui active ensuite l'enzyme cNOS. La réaction enzymatique requiert les cofacteurs suivants ; le calcium (Ca^{2+}), la calmoduline, le NADPH, la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et le tétrahydrobiopterine (BH_4) (figure1). On dit que ces enzymes sont calcium/calmoduline-NADPH dépendantes. De plus, la génération de NO est quantitativement limitée et s'étend sur une courte période de temps. On retrouve la NO synthase neuronale au niveau du cerveau dans les couches superficielles du cortex cérébral, du bulbe olfactif, du cervelet et dans l'hippocampe (figure 2). La seconde classe, de NO synthase, est la forme inductive et souvent désignée comme iNOS ou NOS-2. Dans plusieurs cellules, iNOS ne sera exprimée que suite à une stimulation induite par des stimuli immunologiques tels l'endotoxine bactérienne, les lipopolysaccharides et une variété de cytokines spécifiques. Bien que cytosolique, cette enzyme n'est pas calcium dépendante mais nécessite, comme la cNOS, la présence de cofacteurs dont la BH_4 et le NADPH. La production de NO, par la iNOS synthétisée, se fera en grande quantité sur une longue période de temps. Cependant, il est à noter que la iNOS est synthétisée de novo, donc la

transcription de l'ADN en ARNm et la synthèse protéique est un processus qui nécessite plusieurs heures. On retrouve la iNOS au niveau des cellules et des tissus incluant les cellules endothéliales, le muscle lisse vasculaire, les cellules astrogliales, la microglie et les macrophages (Pelligrino et coll., 1996).

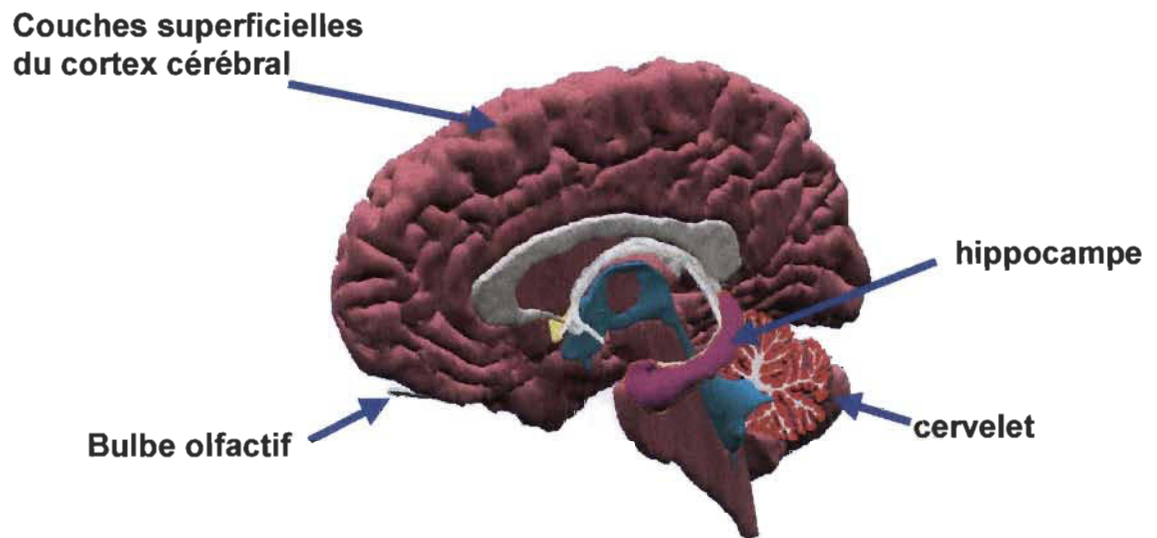


Figure 2. Localisation de la cNOS dans le cerveau. Coupe sagittale de cerveau. On peut voir les 4 principales régions où la cNOS est présente.

1.2 Rôles physiologiques du NO

1.2.1 Vasodilatation

Au niveau des vaisseaux, la réponse relaxante est liée à la stimulation de la guanylate cyclase (GC), par le NO, dans les cellules musculaires lisses (Rapoport et Murad, 1983) et à l'élévation du taux de GMP cyclique (Ignarro et coll., 1987). Le GMPc, en activant une protéine-kinase, stimule l'AMPc calcium-dépendante. Il en résulte une sortie de calcium à travers le sarcolemme du muscle vasculaire lisse.

1.2.2 Inhibition de l'agrégation plaquettaire

Les plaquettes contiennent aussi une guanylate-cyclase soluble et peuvent également synthétiser du GMPc. L'augmentation du GMPc est associée à une diminution de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires, en diminuant l'influx du Ca^{2+} entrant, induit par la thrombine (Mellion et coll., 1981). Par ailleurs, l'agrégation plaquettaire relargue de l'ATP pour stimuler la sécrétion de NO ce qui s'accompagne d'une vasodilatation endothélium-dépendante. Le relargage de NO peut alors entraîner un effet de *feed-back* négatif qui inhibe l'agrégation plaquettaire (Luscher et Vanhoutte, 1986).

1.2.3 Agent cytotoxique des macrophages

Le NO joue un rôle important dans les processus immunologiques et inflammatoires (Lemaire, 1994). En effet, la cytotoxicité des macrophages

activés est dépendante de la présence de la L-arginine (Hibbs et coll., 1987). Les macrophages activés par des agents tels que le lipopolysaccharide de la paroi bactérienne des Gram-, l'interféron γ , le cytochrome c et le *tumor necrosis factor* (Hibbs, 1988), synthétisent alors de la L-citrulline et du NO. Cette synthèse est empêchée par la L-NMMA. Le rôle du NO comme mécanisme effecteur dans la cytotoxicité des macrophages est démontré pour de nombreux micro-organismes.

Le NO peut être cytotoxique pour de nombreuses lignées cellulaires tumorales murines et humaines, mais il aurait un rôle probable dans la destruction de cellules normales. Il existe une surproduction de NO au cours du choc septique, ce qui suggère son implication potentielle dans la genèse des hypotensions sévères. Enfin, la réponse macrophagique immune vis-à-vis d'agents infectieux ou d'alloantigènes induit la synthèse de NO. Le NO peut ainsi exercer un effet supprimeur en inhibant la prolifération des lymphocytes (Lemaire, 1994).

1.2.4 Neurotransmission

Le NO est reconnu comme étant le premier membre d'une nouvelle classe de messagers biologiques. En tant que neurotransmetteur, les fonctions du NO diffèrent complètement de celles des neurotransmetteurs classiques, qui une fois synthétisés par une enzyme, sont stockés dans des vésicules au niveau de la terminaison présynaptique, puis relargués par exocytose dans la

fente synaptique lors d'un potentiel d'action, pour finalement se lier aux récepteurs de la membrane post-synaptique. Dans le cerveau, dans des conditions normales, de faibles quantités de NO sont continuellement produites dans les cellules endothéliales vasculaires et dans les neurones contenant l'oxyde nitrique synthase. L'oxyde nitrique ne semble pas être stocké dans de telles cellules, mais sa synthèse peut être rapidement augmentée en présence de stimuli spécifiques.

1.3 Régulation de la synthèse du NO par le récepteur NMDA

Les récepteurs au glutamate directement liés à un canal ionique ont été classés en trois groupes suivant l'agoniste "artificiel " qui est le plus efficace pour le stimuler. On distingue ainsi (1) les récepteurs AMPA stimulés préférentiellement par l'acide α -amino-3-hydroxy-5 methyl-4-isoxazole propionique (AMPA), (2) les récepteurs kainate dont l'agoniste sélectif est l'acide kainique et (3) les récepteurs NMDA qui sont excités préférentiellement par le N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Bien sûr, ces trois types de récepteurs sont sensibles au glutamate, mais moins qu'à leur agoniste respectif.

Le récepteur NMDA est un chémorécepteur, c'est-à-dire qu'il s'ouvre lorsqu'une molécule de médiateur s'y fixe. Le récepteur NMDA est de nature tout à fait particulière. Contrairement aux autres chémorécepteurs classiques, le récepteur NMDA nécessite une dépolarisation de la membrane pour que la molécule NMDA puisse agir. La réponse du récepteur NMDA à son agoniste préférentiel, le NMDA, est dépendante de la différence de potentiel

transmembranaire. Lorsque la membrane est au repos, un ion Mg^{++} fixé au sein du canal ionique du récepteur NMDA bloque le fonctionnement du récepteur. La dépolarisation de la membrane a pour effet de faire sortir l'ion Mg^{++} vers l'extérieur. Le récepteur NMDA, débarrassé de l'ion Mg^{++} , se comporte alors comme un chémorécepteur classique (Figure 3). Ce mécanisme a été démontré par l'équipe de Ascher en appliquant la technique du patch clamp. Ils ont démontré que lorsque le récepteur baigne dans un milieu dépourvu de Mg^{++} , l'adjonction de NMDA déclenche son ouverture, même lorsque le potentiel transmembranaire est proche de son niveau de repos. Mais en présence de Mg^{++} , les ouvertures élémentaires mesurées au potentiel de repos sont transformées en des flambées d'ouvertures et de fermetures très brèves. De plus, dans ces conditions, la probabilité d'ouverture du canal NMDA est réduite. Par contre, lorsque le potentiel de membrane est porté par exemple à +40 mV, la molécule de NMDA déclenche l'ouverture du canal de la même manière, que l'on soit en présence ou non d'ions Mg^{++} (Nowak et coll., 1984).

Une autre propriété remarquable du récepteur NMDA est qu'il ne peut être activé par le NMDA que s'il a fixé au préalable une molécule de glycine. Cependant, la concentration en glycine nécessaire pour obtenir cet effet est inférieure à celle présente dans le liquide céphalo-rachidien, ce qui nous porte à croire que les récepteurs NMDA du cerveau sont pourvus en permanence de la molécule nécessaire de glycine (Godaux, 1994).

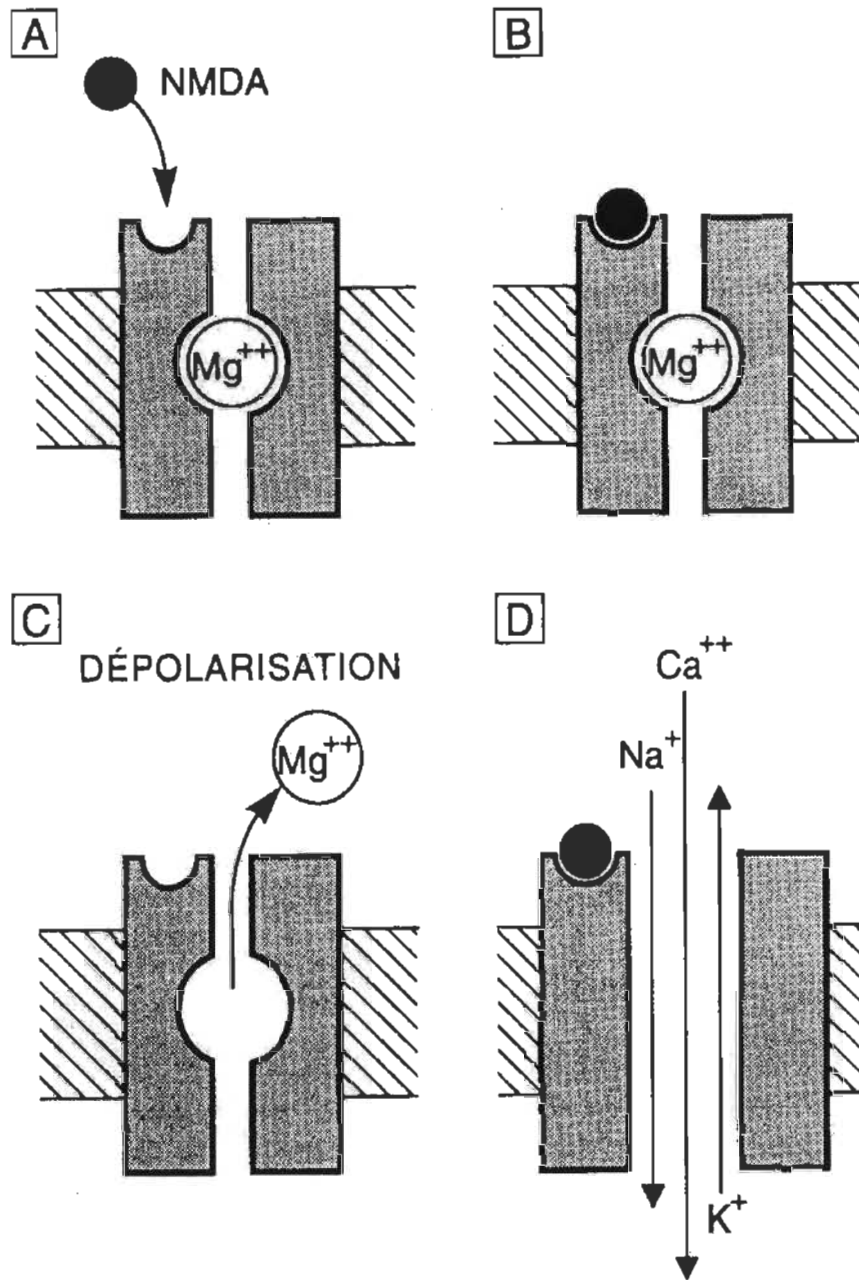


Figure 3. Schéma du fonctionnement du récepteur au glutamate de type NMDA. A, B. Lorsque la membrane est au repos, un ion Mg^{++} est fixé dans le canal ionique et bloque son fonctionnement. Dans ce cas, lorsque le NMDA se lie au site de fixation du glutamate, il ne déclenche pas l'ouverture du canal ionique. C. Sous l'influence d'une dépolarisation, l'ion Mg^{++} se retire du canal ionique. D. Lorsque le NMDA se fixe sur un récepteur «débloqué», il déclenche l'ouverture du canal ionique qui se laisse traverser par les ions Na^{+} , K^{+} et Ca^{++} . (Godaux, 1994)

La régulation de la synthèse du NO se fait par un relargage de glutamate dans la fente synaptique, suite à l'arrivée d'un potentiel d'action à la terminaison de l'élément présynaptique (figure 4). Le glutamate va se lier à son récepteur spécifique, en l'occurrence le NMDA et va ainsi l'activer. Une fois activé, le récepteur s'ouvre et permet ainsi le passage d'ions comme le K^+ , Na^+ et le Ca^{++} , selon leur gradient de concentration. Ainsi, l'entrée de Ca^{++} activera la NO synthase via la calmoduline et il y aura production de NO.

Le NO diffuse dans les cellules avoisinantes et exerce son effet principalement par stimulation de la guanylate cyclase (GC), bien que des effets GC-indépendants aient été identifiés (inhibition de l'aconitase, stimulation du canal K^+ , réaction ribosylation/nitrosylation, modulation d'oxydation/réduction). La capacité du NO d'influencer sa cible, GC inclus, provient de sa grande affinité pour les groupements hémiques ferreux et non-ferreux, ainsi que pour les résidus d'acides aminés des radicaux sulfhydryls spécifiques sur les protéines.

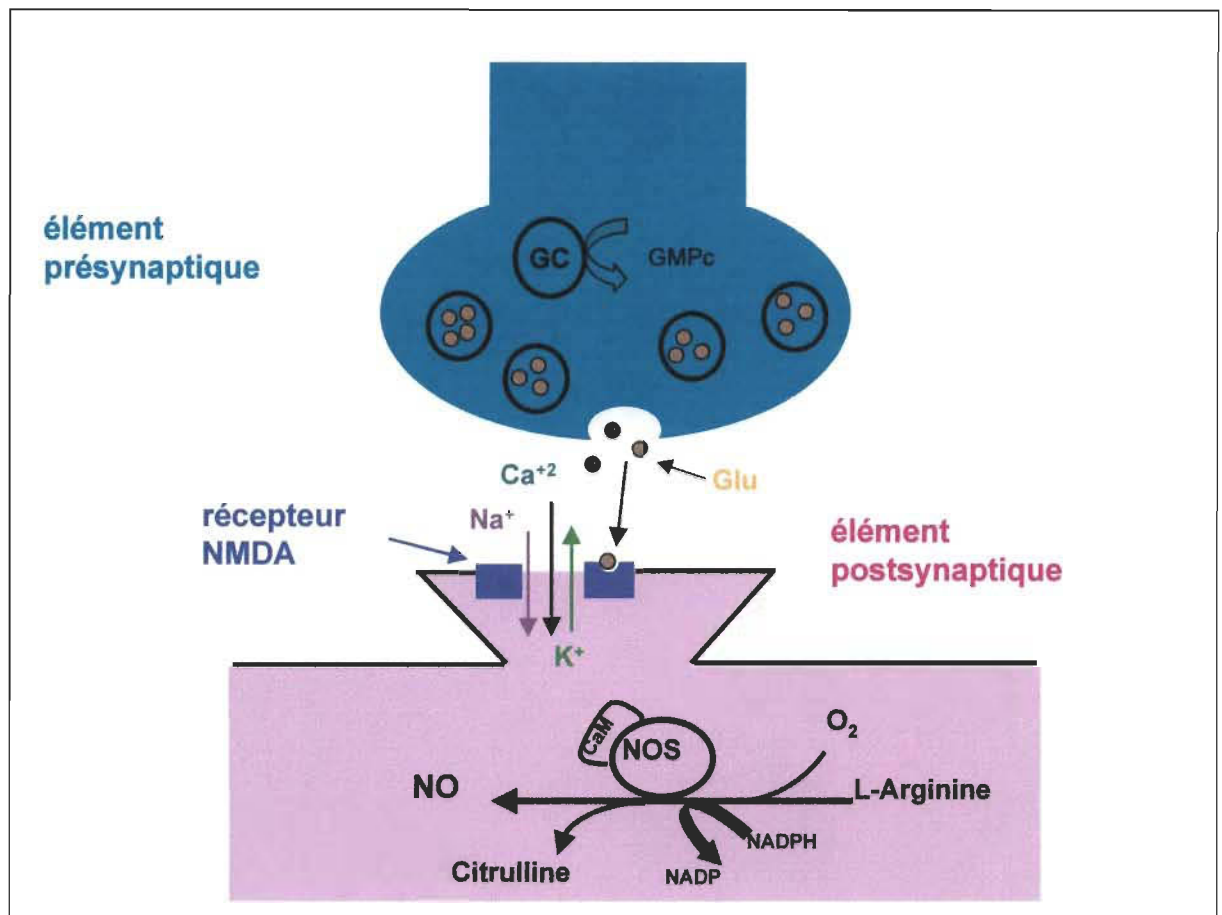


Figure 4. Régulation de la synthèse du NO. Suite à l'arrivée d'un potentiel d'action à la terminaison de l'élément présynaptique, il y a un relargage de glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate va se lier à son récepteur spécifique, soit le récepteur NMDA. Le récepteur activé s'ouvre et laisse entrer du calcium. Le calcium va activer, via la calmoduline la NO synthase et il y a production de NO.

1.4 Réactivité du NO

Depuis sa découverte, il a été démontré que le NO est impliqué dans de nombreuses fonctions de régulation, que ce soit du système cardio-vasculaire jusqu'à la modulation de la fonction neuronale (Moncada et coll., 1991). De plus, il a été démontré que le NO est impliqué dans les réponses anti-tumorale et anti-pathogène liées au système immunitaire. Bien que ces fonctions du NO soient bénéfiques dans le maintien de l'homéostasie physiologique proprement dite, le NO est aussi impliqué dans de nombreuses maladies. Il a été démontré que le NO participe dans un grand nombre de mécanismes physiopathologiques telles que l'arthrite dégénérative, l'athérosclérose, le cancer, le diabète, de nombreuses maladies neuronales dégénératives, l'apoplexie et l'infarctus du myocarde pour ne nommer que ceux-là (Gross et Wolin, 1995). Cependant, il y a un débat considérable sur la fonction exacte du NO dans de tels états pathologiques. Bien que le NO et ses dérivés puissent inhiber la fonction enzymatique, altérer l'ADN et induire la peroxydation lipidique; le NO possède des propriétés antioxydantes et l'habilité à protéger les cellules contre l'apoptose ainsi que les dommages induits par les cytokines. La confusion concernant l'implication du NO dans les lésions tissulaires est davantage compliquée par ses multiples facettes et souvent ses actions paradoxales dans les divers mécanismes cytotoxiques. La figure 5 représente les différents effets biologiques du NO. Le NO en lui-même n'est pas un agent cytotoxique puissant. Cependant, il peut rendre les cellules susceptibles à d'autres agents cytotoxiques tels que les métaux lourds, les agents alkyles, et

les radiations. D'un autre côté, le NO joue un rôle protecteur contre une panoplie d'agents qui induisent le stress oxydatif, tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'hydroperoxyde alkyle et le superoxyde. Le NO réagit avec plusieurs complexes métalliques redox, aussi sa réactivité varie d'un complexe à l'autre. Le NO réagit avec d'autres radicaux tels le superoxyde et les radicaux dérivés des lipides pour former des produits comme le peroxynitrite ($ONOO^-$) et les lipides peroxynitrés (Lipide- $ONONO$), lesquels peuvent réagir avec d'autres cibles biologiques pour influencer les différentes fonctions physiologiques et cellulaires. Le NO peut réagir avec l'oxygène pour former une variété de réactifs intermédiaires qui sont normalement associés au smog et à la fumée de cigarette. Ces espèces chimiques peuvent altérer des biomolécules importantes telles que les enzymes et l'ADN (Laval et coll., 1996). Par contre, le NO peut aussi neutraliser les oxydants associés au stress oxydatif et diminuer la toxicité médiée par les espèces réactives de l'oxygène (Wink et coll., 1994). Pour bien comprendre le labyrinthe des comportements divergents du NO, il est important de comprendre la chimie du NO dans le système biologique. Il faut tenir compte de l'endroit, du temps et de la quantité de NO présente dans certaines circonstances pour déterminer la réponse biologique. La biochimie du NO fournit un ensemble de réactions chimiques et une perspective qui permet une compréhension de la fonction du NO dépendant d'une situation biologique spécifique.

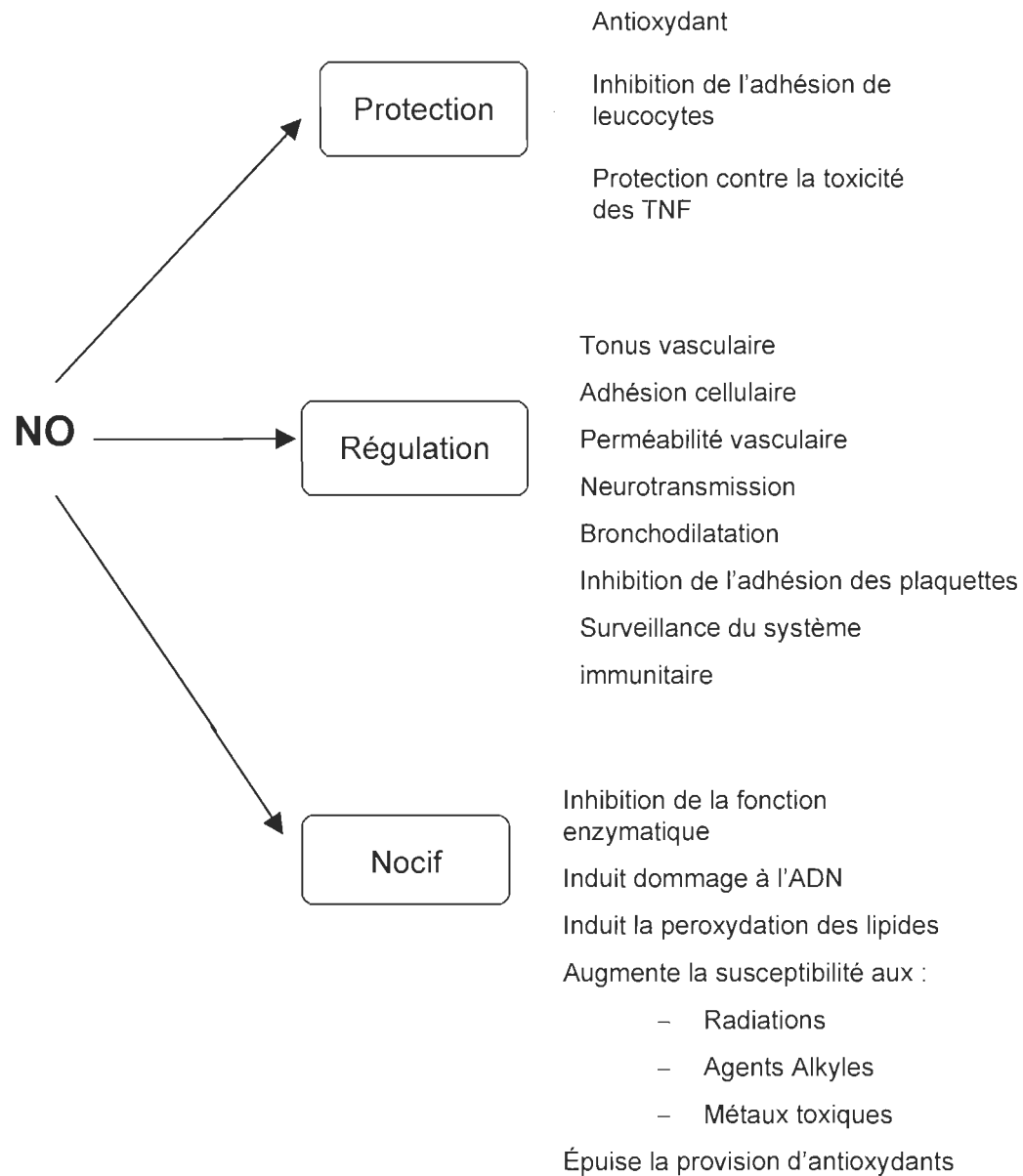


Figure 5. Différents effets biologiques de l'oxyde nitrique.

La biochimie du NO est divisée en deux catégories, soit directe et indirecte. Les effets directs sont définis comme étant les réactions qui sont assez rapides pour se produire entre le NO et une molécule biologique spécifique. Quant aux effets indirects, ils n'impliquent pas le NO, mais sont médiés plutôt par les espèces réactives de l'oxygène (RNOS) formées de la réaction du NO soit avec l'oxygène ou soit avec le superoxyde (figure 6). Les réactions des effets directs et indirects peuvent être aussi séparées sur une base de concentration locale de NO produit de façon endogène ou fournit de façon exogène. Les effets directs se produisent à faible concentration en NO ($< 1 \mu\text{M}$); tandis que les effets indirects du NO impliquent la formation de RNOS devenant significative à de grandes concentrations locales de NO ($> 1 \mu\text{M}$). Les effets indirects peuvent être sub-divisés en réactions de nitrosation, d'oxydation et de nitration. L'oxydation inclut l'enlèvement d'un ou deux électrons du substrat, ainsi que les réactions d'hydroxylation. La nitrosation se produit lorsqu'un équivalent de NO^+ est ajouté à une amine, un thiol ou un groupement aromatique hydroxy. Par exemple, les intermédiaires dans la réaction NO/O_2 convertissent les peptides thiol en peptides S-nitrosothiol. Pour terminer, la nitration des groupements aromatiques implique l'addition d'un équivalent de NO_2^+ . La formation de nitrotyrosine à partir des différents RNOS tel ONOO^- est un bon exemple de cette réaction.

Le classement par catégories des réactions chimiques du NO comme les réactions à effets directs ou indirects, tient compte de facteurs comme la

quantité et le temps durant lequel le NO est présent dans un environnement spécifique. *In vivo*, le NO est produit par l'enzyme NOS. Le type de cellules contenant la cNOS génère une faible quantité de NO et sur une courte période de temps. Ainsi, les effets directs du NO sont les réactions prédominantes et les effets indirects sont limités. En présence de iNOS, la production de NO est beaucoup plus grande et les effets indirects tels que les réactions de nitrosation, de nitration et d'oxydation se produisent. Il est clair que la source et le niveau de NO produit fournissent une indication à savoir : quelle réaction chimique est la plus probable de se produire dans des conditions biologiques spécifiques. Un autre facteur important à prendre en considération, c'est la distance entre la cible et la source génératrice de NO. Les cellules et les tissus près de la source de NO peuvent être la cible des réactions chimiques directes et indirectes. Les cellules situées plus loin de la source génératrice de NO ne peuvent subir que les seuls effets directs, parce que la concentration de NO diminue, ce qui résulte de sa diffusion et de sa consommation biologique. Les facteurs spatial et temporel sont donc importants lorsque l'on considère la réaction responsable d'un effet biologique spécifique.

Vu sa nature radicalaire, le NO est une molécule extrêmement instable d'une durée de vie très courte. Elle peut être rapidement oxydée sous forme d'anion ou être captée par les protéines à groupement prosthétique hémistique, telle l'hémoglobine ou encore par l'O₂ et ses dérivés, tel l'anion superoxyde. Cette forte affinité pour de tels groupements explique la très brève durée de vie biologique du NO (de l'ordre de quelques secondes) ainsi que son action

purement locale confinée aux voisinages immédiats de son lieu de synthèse et de sécrétion.

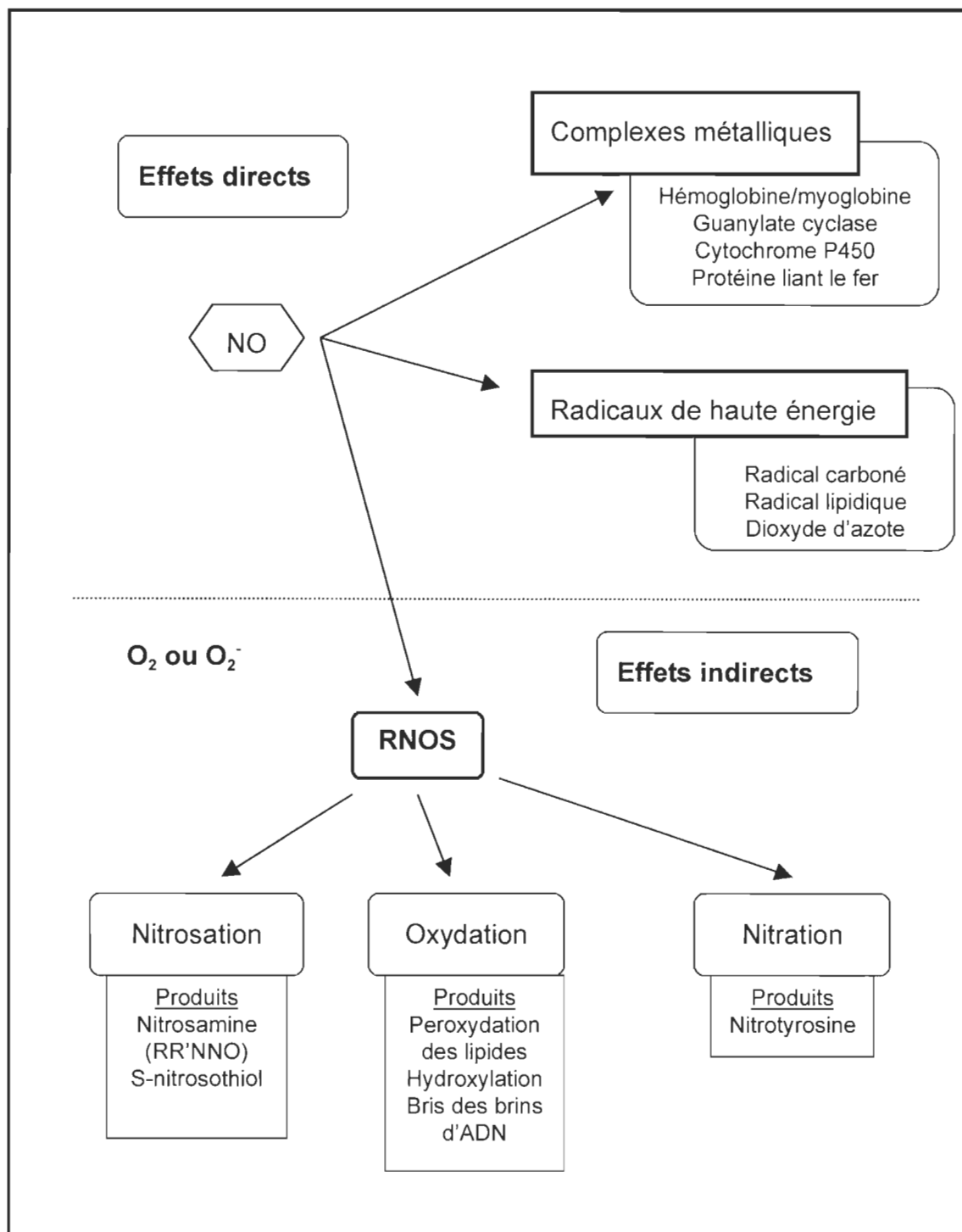


Figure 6. La chimie biologique du NO

La nature toxique du NO tient donc à sa grande affinité avec les atomes de fer de certaines enzymes, ce qui fait en sorte qu'en grande quantité, le NO peut perturber le fonctionnement de plusieurs métallo-enzymes essentielles à la production d'énergie et à la multiplication de la cellule. Malheureusement, ses caractéristiques rendent sa quantification difficile. Son implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques a encouragé les recherches sur les techniques permettant la détection et la mesure du NO produit dans les cellules et les tissus.

1.3 Les différentes méthodes de détection du NO

Depuis la découverte du NO, des milliers d'articles concernant la libération de l'oxyde nitrique et son influence sur des réactions reliées à une variété de processus biologiques ont été publiés (Kiechle et Malinski, 1993). Cependant, peu d'entre eux portent sur des études quantitatives du NO libéré. La présence de NO dans les systèmes biologiques est habituellement déduite sur la base d'effets physiologiques produits. On parle alors de méthodes indirectes pour détecter la production du NO. Les premières méthodes permettant de mettre en évidence la présence de NO ou de ses dérivés dans un système biologique se sont basées sur des dosages biologiques utilisant l'action du NO sur la guanylate cyclase. En effet, la nitrosation du groupe hémique de la guanylate cyclase provoque la multiplication par 50 de la vitesse de synthèse du GMP cyclique (cGMP) (Knowles et Moncada, 1992). Il est donc possible d'utiliser cette production accrue de cGMP ou ses conséquences

physiologiques pour déceler la présence de NO dans un système biologique (Lincoln et Cornwell, 1993). Trois techniques ont ainsi été mises au point : le dosage du GMPc (Heath et coll., 1992), la mesure de la relaxation des muscles lisses vasculaires (Vane, 1964) et la mesure de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP (Durante et coll., 1991). Ces différentes méthodes possèdent des degrés différents de spécificité.

Plus tard, des techniques instrumentales ont été utilisées. Les techniques instrumentales les plus couramment utilisées pour la détection du NO sont des méthodes spectroscopique et électroanalytique. La spectroscopie de masse et la chromatographie en phase gazeuse sont occasionnellement utilisées pour la détection du NO mais elles sont peu sensibles. Le tableau 1 résume les principales techniques utilisées.

Tableau 1

Principales méthodes de mesure directe du NO

Techniques de mesure	Sensibilité intrinsèque	Spécificité	commentaires
Chimiluminescence (réaction NO avec O ₃)	10 ⁻⁸ M	Très élevée	Sans O ₂ et DMSO Filtrer les précipités protéiques
RPE Marqueur de spin	4 X 10 ⁻⁶ M	Moyenne	Interfère avec autres radicaux
Complexe me-NO des métalloprotéines	4 X 10 ⁻⁶ M	Bonne	Sensibilité au pH alcalin et interprétation difficile
Spectroscopie (méthémoglobine 433 nm → 406 nm)	10 ⁻⁸ M	Moyenne	Interfère avec des composés nitrosylés et sensible au pH et oxydants
Ampérométrie	10 ⁻⁸ M	Très élevée	Calibration indispensable des électrodes et recouvrements

Certains chercheurs utilisent la méthode de mesure de l'ensemble des composés azotés oxydés d'un système biologique par réaction de diazotation. Cette technique de spectroscopie UV-visible consiste à traiter l'échantillon à étudier par un mélange d'acide chlorhydrique (2N) et d'acide sulfonique, puis à mesurer l'absorption à 548 nm d'un chromophore produit par addition de N-(1-naphtyl)éthylènediamine (réaction de Griess). Le signal est linéaire de 5×10^{-8} à 5×10^{-5} M et la sensibilité intrinsèque est de 10^{-6} M. Le traitement acide convertit les nitrites et les dérivés nitrosylés en NO. Pour obtenir une mesure de l'ensemble des composés azotés oxydés présents dans l'échantillon, il faut au préalable réduire les nitrates en nitrites. Cette technique n'est donc pas spécifique au NO et ne permet pas de détecter des quantités submicromolaires de NO. Cette méthode est mieux adaptée à la mesure des nitrites qu'à celle du NO (Ignarro et coll., 1987 ; Tracey et coll., 1990).

Cependant, la méthode par spectrophotométrie UV-visible qui est la plus largement utilisée pour la mesure du NO est l'oxydation de l'hémoglobine (Hb) réduite (Fe^{2+}) par le NO en Met hémoglobine (Fe^{3+}) qui peut être suivie par spectrométrie différentielle (Ignarro et coll., 1987 ; Kelm et coll., 1988). Les concentrations de NO sont déterminées à partir du rapport des absorbances mesurées à 401.5 nm et 411 nm ($\epsilon = 38.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La formation du complexe NO-hémoglobine (NO-Hb) provoque un déplacement caractéristique de la bande de Soret qui passe de 433 nm à 406 nm. L'oxydation de l'hémoglobine est rapide et permet de suivre directement la réaction de synthèse de NO (Feelisch et Kelm, 1991). Toutefois, cette méthode simple et sensible possède

une spécificité moyenne. En effet, elle permet la détection d'autres composés nitrosylés, de même qu'elle est sensible aux variations de pH et aux oxydants. De plus, les concentrations subnanomolaires de NO ne sont pas détectables par cette technique. Les méthodes spectrophotométriques, par la simplicité de leur mise en œuvre, sont bien adaptées à l'étude d'ensembles macroscopiques pour lesquels des données cinétiques ne sont pas nécessaires.

Une autre méthode, en l'occurrence la chimiluminescence, dont le principe s'explique par la production de lumière lors de la réaction du gaz NO avec l'ozone. Le NO est un gaz peu soluble dans l'eau et il est expulsé hors de la phase liquide des échantillons étudiés par barbotage d'un gaz inerte (hélium) sous pression réduite (Archer, 1993). Cette technique est très spécifique au NO, puisque peu de composés gazeux réagissent avec l'ozone pour produire de la lumière. Elle possède une sensibilité intrinsèque de 10^{-8} M et permet de faire des mesures en continu. Toutefois, il faut éviter la présence d'oxygène et de DMSO dans le système en plus du fait qu'il faut filtrer les précipités protéiques. Une autre technique de chimiluminescence consiste à mesurer, en présence de luminol, les peroxy-nitrites formés par la réaction de NO^+ avec $\text{O}_2^{\cdot-}$. Cette technique est peu sensible (10^{-7} M) avec une spécificité moyenne car le luminol est sensible à de nombreux oxydants.

On retrouve aussi la méthode par résonance paramagnétique électronique (RPE) qui utilise des marqueurs de spin (Arroyo et Kohno, 1991). Bien que le NO soit un gaz paramagnétique, il n'est pas directement détectable

par la RPE en raison du temps de relaxation très court de son électron non apparié. Aussi, il faut avoir recours à des marqueurs de spin qui forment avec le NO des composés plus stables, plus aisément décelables et quantifiables par la RPE. En outre, la formation NO-Hb peut-être mesurée par la RPE. C'est pourquoi l'hémoglobine est fréquemment utilisée comme piègeur de spin. Le spectre de RPE à 77 K de NO-Hb a une structure hyperfine caractéristique (différente de celle des composés formés lors de l'exposition de Hb à d'autres composés azotés tels que nitrites ou azides). Par contre, la technique est sensible aux pH alcalins et l'interprétation des spectres est délicate. Cette technique ne peut faire des mesures selon un mode continu et possède une sensibilité de 10^{-6} M et une spécificité moyenne ce qui est dû aux interférences avec d'autres radicaux (Cristol et coll., 1994).

Une nouvelle méthode a vu le jour en 1990, il s'agit de la technique d'ampérométrie. C'est la méthode directe la plus spécifique, permettant une résolution spatiale et temporelle. Elle est la plus avantageuse de par sa vitesse et sa sensibilité pour des mesures en temps réel *in situ*. Il est à noter que chacune des différentes méthodes de détection du NO mentionnées précédemment, possède ses avantages et ses inconvénients, c'est pourquoi lors du choix de la méthode à utiliser, il est important de prendre en compte à la fois de la quantité de NO attendue (NOS constitutive ou NOS inductive), des possibilités d'interactions biologiques dans les systèmes étudiés (production d'espèces réactives de l'oxygène par exemple) et de la nature du système à étudier (système *in vitro*, *in vivo* ou expérimentation clinique).

1.4 La méthode ampérométrique

Les méthodes électrochimiques sont caractérisées par un haut degré de sensibilité, de sélectivité et de précision grâce à l'utilisation d'électrodes très petites qui permettent une localisation précise. L'utilisation de l'électrochimie permet de faire des mesures en temps réel avec une résolution spatiale et temporelle. Il n'est donc pas nécessaire de faire des extractions ni de préconcentrations. De plus, les électrodes utilisées peuvent avoir une dimension très petite (0.5-35 μm de diamètre) et peuvent donc être directement insérées dans les préparations biologiques, à un endroit spécifique, tout en minimisant les dommages causés au tissu (Friedemann et coll., 1996). La technique d'ampérométrie pour la détection d'espèces électroactives, telles que l'oxyde nitrique, recèle de grands avantages comparativement aux méthodes spectroscopiques (UV/Vis, chimiluminescence). En effet, la sensibilité et la vitesse de détection permettent de détecter des espèces très réactives et ce, à de faibles concentrations dans le système.

1.5 L'électrode de détection du NO (historique)

La première électrode utilisée pour la détection du NO a été conçue selon le modèle de l'électrode à oxygène. En 1990, l'équipe de Shibuki a miniaturisé une électrode à oxygène utilisée pour mesurer la pression PO_2 dans les tissus neuronaux. Cette électrode est composée essentiellement d'une pipette de verre à laquelle on a scélé l'ouverture avec une fine membrane de caoutchouc (chloroprène) (figure 7). Seul un gaz de faible poids moléculaire tel

que l'oxygène diffuse rapidement à l'intérieur de la pipette à travers la membrane. Il est réduit à la surface d'une électrode de platine interne (cathode), laquelle est gardée à un voltage négatif contre une électrode d'argent (anode) à l'intérieur de la pipette. On peut donc détecter la réduction de l'oxygène par la technique ampérométrique si l'électrode de platine est gardée à un voltage de -0.9 V. Comme le NO possède un même potentiel de réduction, on peut le détecter par cette même électrode dans des conditions d'anaérobie pour que l'oxygène n'interfère pas dans le signal. Étant donné que, les études se font dans des conditions qui nécessitent de l'oxygène, l'utilisation de l'électrode est limitée. Par contre, l'oxyde nitrique possède un potentiel d'oxydation à 0.9 V, on peut alors détecter son oxydation par cette technique ampérométrique, en gardant l'électrode de platine à un voltage de 0.9 V, tout en éliminant l'interférence due à l'oxygène. C'est ce qu'a démontré Shibuki en détectant la libération de NO endogène correspondant à $8-58$ nM dans une coupe de cerveau de rat, suite à une stimulation électrique de la matière blanche, et ce avec une sensibilité située entre 3.5 et 106 pA/ μ M de NO. Cette électrode possède une limite de détection aussi faible que 10 nM ainsi qu'une linéarité du courant versus la concentration de NO jusqu'à 400 nM. La pointe de l'électrode est de $150-250$ μ m de diamètre, ce qui permet son insertion dans une coupe de cerveau de 400 μ m d'épaisseur. L'utilisation d'une électrode spécifique au NO est donc la seule méthode qui permet de détecter la libération locale et transitoire du NO endogène, provoquée par l'activation d'éléments neuronaux spécifiques dans le cerveau (Shibuki, 1990).

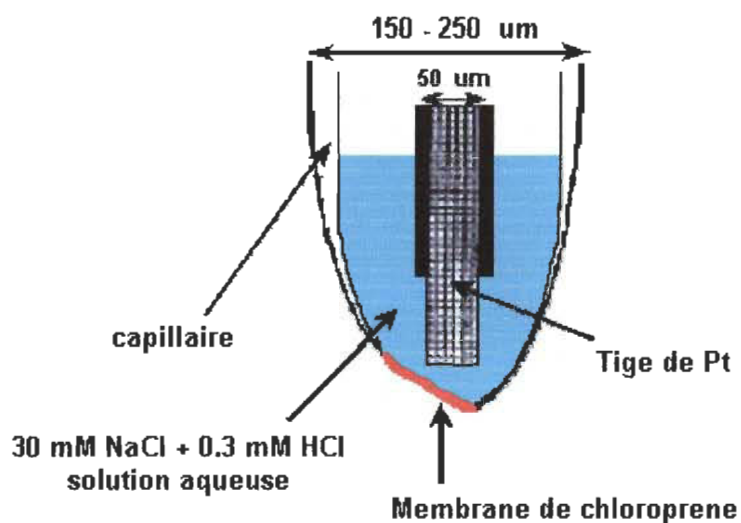
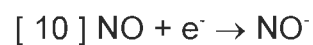
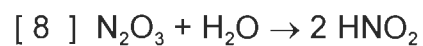
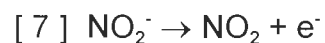
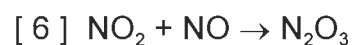
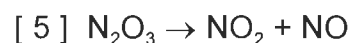
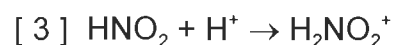
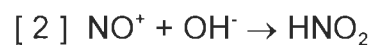
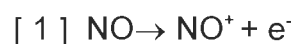


Figure 7. Schéma du microsenseur pour la détection du NO de type Clark développé par Shibuki.

Malgré la sensibilité de l'électrode, il y a plusieurs inconvénients qui peuvent limiter son utilisation dans des expériences chimiques et biologiques. Un des inconvénients est lié à la flexibilité limitée et la grosseur de l'électrode qui font en sorte que l'électrode ne peut être utilisée dans certains endroits spécifiques *in vivo* et *in situ*. Un second inconvénient est que son courant n'est pas linéaire pour des concentrations supérieures à 1 μM NO (Shibuki, 1990). Finalement, les effets de la rupture de la membrane et de sa saturation de courant sont observés lorsque l'électrode est exposée lors d'une expérience à des concentrations de NO plus grandes que 1 μM . Le deuxième et le troisième points résultent en partie du fait qu'une solution acide de nitrate et de nitrite se

des concentrations de NO plus grandes que 1 μM . Le deuxième et le troisième points résultent en partie du fait qu'une solution acide de nitrate et de nitrite se forme durant l'oxydation du NO à l'électrode. Une variété d'espèces d'oxydes de nitrogène peuvent être générée dans une solution acidifiée dans ces conditions selon les équations suivantes (Wink et coll., 1995) :



Le NO peut être formé ou utilisé dans ces réactions (éq. 1-11) lesquelles peuvent contribuer à l'instabilité et la déviation de la linéarité entre le courant et la concentration du NO au-dessus de 1 μM , qui est parfois observée avec ce type d'électrode. De plus, l'électrode possède un temps de réponse lent (1 seconde) et une instabilité du bruit de fond due à une fluctuation de la température (Le bruit de fond varie de façon proportionnelle à la température) (Bedioui et coll., 1996). Lors de l'utilisation de l'électrode à 37 °C, un très grand bruit de fond est enregistré. Finalement, l'utilisation de l'électrode nécessite un temps de 24-48 h de polarisation afin d'obtenir un courant de bruit de fond stable et une période de 1-2 h entre chacune des mesures (Pallini et coll., 1998). Par conséquent, la technique électrochimique de Shibuki n'est utile que pour des mesures de faible concentration en NO sur une courte période de temps.

D'autres électrodes de type Clark ont été rapportées dans la littérature, soit l'utilisation d'électrode de platine (Ichimori et coll., 1994 ; Tristani-Firouzi et coll., 1998) ou platine/or modifié avec des membranes tel le chloroprene/nitrocellulose/ silicone (Ischida et coll., 1996), poly(4, 4'-DHB) (Pallini et coll., 1998). Néanmoins, la principale limite de l'électrode de type Clark est le temps de réponse relativement long pour des applications biologiques.

C'est en 1992 que les membres de l'équipe de Mallinski et Taha ont développé une électrode porphyrinique pour la détection du NO dans un

microsystème. Cette nouvelle électrode est faite à base de fibres de carbone, qui sont mécaniquement résistantes et peuvent être miniaturisées pour des applications cellulaires (figure 8). On peut obtenir une fibre d'un diamètre aussi petit que $0.5\ \mu\text{m}$. Cette technique, comme celle de Shibuki, utilise l'oxydation électrochimique du NO.

En 1991, l'équipe de Mallinski a démontré que de grands conducteurs métalloporphyrines polymériques sont des bons catalyseurs pour l'oxydation électrochimique de certaines petites molécules. Ils utilisent ce grand courant généré à $0.63\ \text{V}$, durant l'oxydation électrochimique catalytique du NO, comme signal analytique. L'utilisation du recouvrement de porphyrine fournit une réponse stable pour des concentrations de $10\ \text{nM}$ à $200\ \mu\text{M}$ en NO. Contrairement à la situation de Shibuki, les équations 1 à 11 n'interfèrent pas dans le processus de détection. Cependant, puisque la surface de l'électrode est en contact direct avec le milieu, une variété de substances biologiques peut interférer avec la détection du NO, si bien que la réaction NO/O_2 n'est pas évaluée convenablement avec ce type d'électrode et soulève plusieurs questions à propos de cette méthode. Pour pallier à ce problème, ils ont recouvert l'électrode avec un film de nafion, un échangeur de cations polyacide perfluoriné afin de discriminer les nitrites (NO_2^-) du NO. La charge négative du nafion prévient la diffusion d'anions comme les nitrites à la surface porphyrinique tout en restant perméable au NO. L'équipe de Mallinski obtient donc une électrode plus spécifique avec une sensibilité de $2.05\ \text{nA}/\mu\text{M}$ et une

limite de détection de 10 nM. Ils ont effectué leur expérimentation dans une culture de cellules endothéliales (Malinski et Taha, 1992).

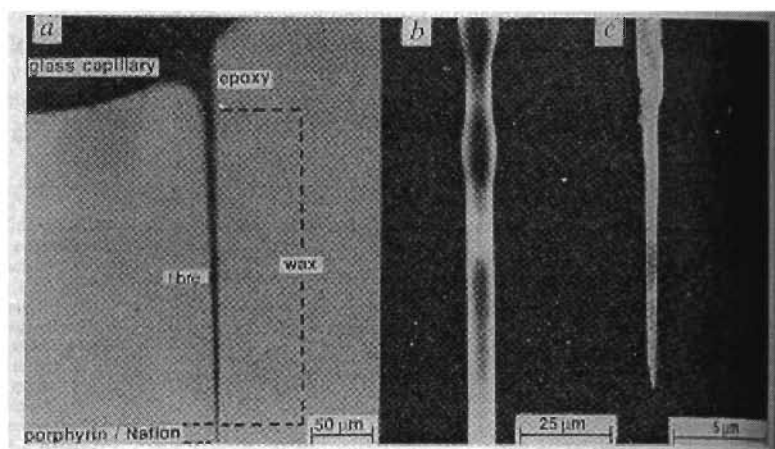


Figure 8. Schéma d'une microélectrode de carbone pour la détection du NO développé par Malinski et Taha; a, photographie microscopique de l'électrode; b, microscopie électronique de la partie de l'électrode recouverte d'une couche d'un mélange de cire-rosine; c, microscopie électronique du bout de la fibre recouverte de poly-TMHPP-Ni.

Cette nouvelle électrode fut par la suite beaucoup utilisée avec succès soit en solution (Lantoine et coll., 1995 ; Malinski et coll., 1996 ; Christodoulou et coll., 1996 ; Privat et coll., 1997) soit *in vivo* ou *in situ* sur des cellules endothéliales (Malinski et Taha, 1993 ; Malinski et coll., 1996), des plaquettes humaines (Malinski et coll., 1993b), des cultures cellulaires (Kanai et coll., 1995 ; Wink et coll., 1996), du tissu cérébral (Zhang et coll., 1996 ; Cespuglio et

coll., 1996 ; Rivot et coll., 1997 ; Burlet et Cespuglio, 1997 ; Canini et coll., 1997) des artères (Tschudi et coll., 1996 ; Tschudi et coll., 1996) et veines superficielles (Vallance et coll., 1995).

D'autre part, lors de l'utilisation de l'électrode de carbone, des études ont démontré que lors de l'usage de la porphyrine, l'ion métallique (nickel), n'est pas nécessaire pour l'augmentation du signal de l'électrode pour l'oxydation du NO. En effet, la porphyrine permettrait d'obtenir une plus grande réponse de surface. De plus, la porphyrine contribue à la diminution du potentiel redox du NO, ce qui permet de séparer la variété d'analytes qui peut interférer au niveau du signal. Donc, un film organique conducteur peut aussi augmenter la sensibilité de la fibre de carbone pour le NO (Wink et coll., 1995 ; Christodoulou et coll., 1996 ; Ciszewski et coll., 1996; Ciszewski et Milczarek, 1998). Par la suite, plusieurs chercheurs ont étudié l'efficacité d'autres types de recouvrements pour l'électrode de carbone capables d'augmenter la sensibilité et la sélectivité envers le NO. On retrouve donc différents recouvrements tels que : nafion/o-phénylènediamine (Friedemann et coll., 1996), le nafion/cellulose acétate (Pariante et coll., 1994), le N-méthylpolypyrrole avec hétéropolyanion de type Keggin/nafion (Fabre et coll., 1997), le nickel/phtalocyanine/nafion (Bedioui et coll., 1997) le NiTMHPP/nafion/AAO/polypyrrolium (Mitchell et Michaelis, 1998) le nafion/m-phénylènediamine / résacinal (Park et coll., 1998) et le NiTHMPP/ eugénol (Ciszewski et coll., 1998).

En somme, plusieurs types d'électrodes ont été rapportés dans la littérature. Les plus utilisées sont des électrodes faites à partir d'une fibre de carbone. Ils diffèrent par leur type de recouvrement qui les rend plus sélectives envers le NO, car une propriété très importante d'une électrode est sa discrimination envers d'autres substances susceptibles de venir interférer lors de la lecture du signal. Les substances reconnues comme pouvant augmenter le signal sont principalement l'acide ascorbique, la dopamine, les nitrites et les nitrates.

1.6 Objectifs du projet de maîtrise

La plupart des électrodes à NO utilisées ont une limitation majeure due à leur taille qui les rend moins précises pour certaines applications *in situ*. Le but du projet de maîtrise est donc de mettre au point un système de détection électrochimique à l'aide d'une électrode de carbone de 8 μm de diamètre, permettant d'obtenir un haut degré de précision pour la détection *in situ* du NO dans des coupes de cerveau de souris. Ceci permettra ultérieurement de faire des études beaucoup plus spécifiques. Nous allons tester deux nouveaux recouvrements, soit la phtalocyanine et l'o-phénylènediamine pour améliorer le signal de détection du NO. De plus, comme l'utilisation de l'électrode de carbone nécessite un recouvrement qui lui procure sa sélectivité, nous allons tester deux types de recouvrements, le nafion et l'eugénol, pour obtenir une bonne sélectivité de l'électrode pour le NO. Nous utiliserons le nitrite, l'acide ascorbique et la dopamine comme interférents biologiques. Une étude

comparative de ces différents recouvrements nous permettra de sélectionner la combinaison nous donnant une électrode efficace en vue de son utilisation dans des coupes de tissus. Ensuite, nous testerons l'utilisation de l'électrode en solution et sur des coupes d'hippocampe avec un donneur de NO, soit le nitroprusside de sodium (SNP). Par la suite, on fera l'étude de la libération endogène de NO dans les coupes. La libération endogène de NO sera produite par l'activation de la nNOS via celle du récepteur NMDA.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériels

2.1.1 Préparation des solutions

Les solutions de nitrite de sodium à 97 % [Oméga], d'acide ascorbique à 99.8 % [Sigma] et de dopamine [Sigma] ont été préparées dans une solution tampon de PBS à des concentrations de 20, 200 et 2 μ M respectivement, ce qui correspond aux concentrations physiologiques. Les solutions sont préparées fraîchement afin d'éviter leur dégradation et d'obtenir des réponses optimales. La solution de NO est préparée dans une fiole de 3 ml munie d'un bouchon contenant un septum. On incorpore une solution de PBS qu'on fait barboter à l'azote pendant 45 min afin d'en chasser tout l'oxygène. Par la suite, dans la fiole fermée, on fait barboter le NO gazeux pendant 30 minutes. On effectue les dilutions de NO en prenant la quantité de solution mère de NO avec une seringue de type gaz-tight.

2.1.2 Coupe d'hippocampe

Les coupes d'hippocampe ont été faites selon le protocole établi par l'équipe du docteur Guy Massicotte (Massicotte et coll., 1991). En résumé, les coupes ont été produites à l'aide d'un appareil de coupe [McIlwain tissue chopper, Mickle laboratory engineering co Ltd], à une épaisseur de 450 μm . La coupe est ensuite déposée dans une chambre d'électrophysiologie (figure 9). La solution physiologique utilisée est celle de Krebs (120 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgCl_2 , 1.5 mM CaCl_2 , 20 mM NaHCO_3 , 11 mM glucose). La coupe est maintenue à une température de 34 °C et en présence d'un mélange gazeux (carbogène), contenant 95% d'oxygène et 5% de CO_2 . Les coupes d'hippocampe sont gardées au repos pour une durée de 60 min, permettant ainsi leur récupération complète. Ensuite, les mesures sont effectuées en insérant l'électrode de carbone au niveau de la région CA1 de l'hippocampe (figure 10). L'électrode de référence est insérée à côté de la coupe dans la solution physiologique.

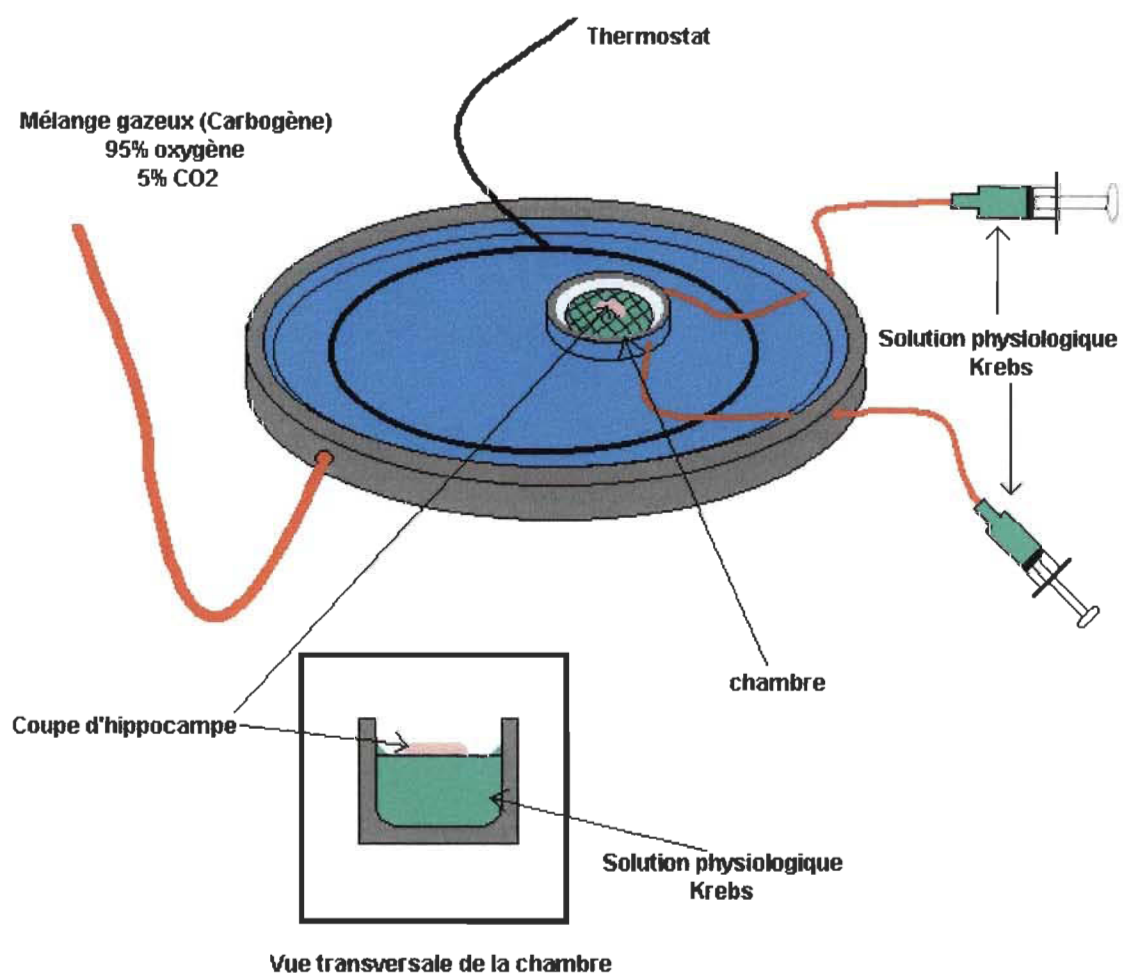


Figure 9. Représentation schématique de la chambre à électrophysiologie

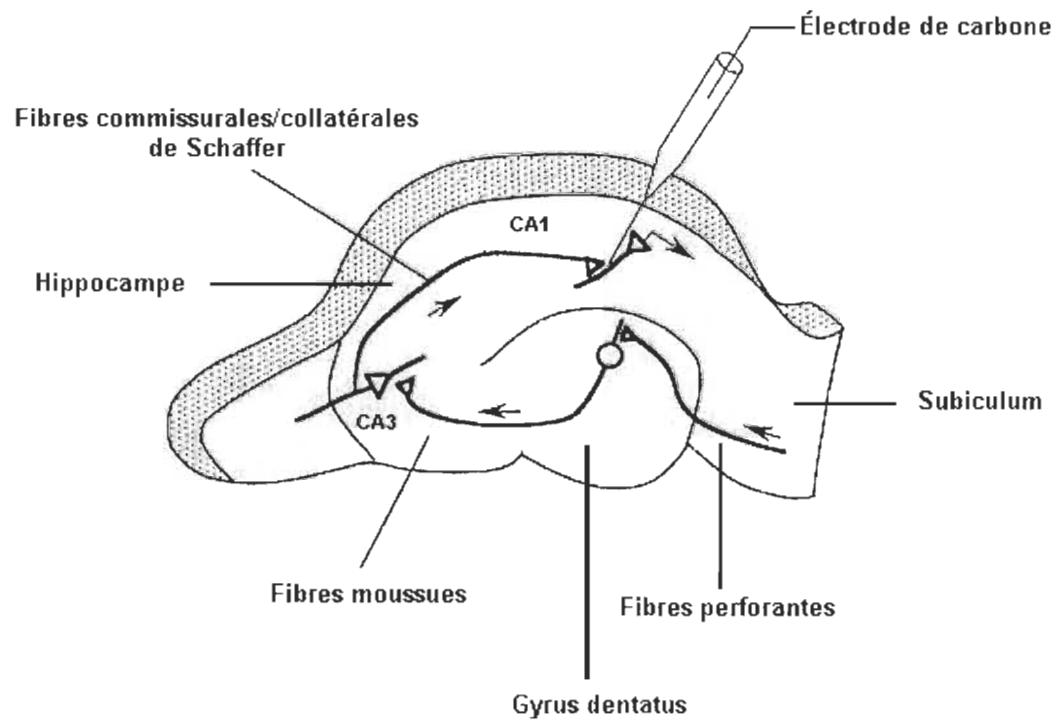


Figure 10. Représentation schématique de la région CA1 de l'hippocampe.

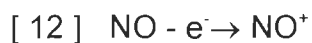
2.2 Méthodes

Les techniques électrochimiques détectent des composés redox par, oxydation de ceux-ci sur une électrode de travail positivement polarisée en solution. Le composé, en s'oxydant, donne un électron qui est capté par l'électrode de travail créant ainsi un courant. La détection de ce courant est à la base de cette méthode de mesure. Plusieurs composés d'intérêt biologique sont oxydables sous de telles conditions et sont par conséquent dits «électroactifs ». La voltamétrie implique donc l'exploration d'une étendue de potentiels et mesure un courant d'oxydation. Cette technique fournit des informations analytiques concernant le potentiel d'oxydation de composés oxydables (Gonon, 1995). En voltamétrie, on applique un petit potentiel à une électrode et on mesure le courant résultant de l'oxydation de l'espèce électroactive à la surface de l'électrode. Le courant faradique est dû aux processus d'oxydation et de réduction, tandis que le courant de charge est dû à la double couche électrique à la surface de l'électrode. On obtient une réduction du courant de charge par une diminution de la vitesse de balayage. Le fluide extracellulaire du cerveau est un bon support électrolytique. Sa résistance est faible, sa concentration ionique est suffisamment grande pour prévenir un courant de migration et son pH est bien tamponné.

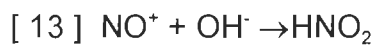
La technique électrochimique pour la détection du NO est basée sur son oxydation électrochimique sur une électrode. Comme le courant généré durant l'oxydation du NO est linéairement proportionnel à sa concentration, le courant

d'oxydation peut être utilisé comme un signal analytique. Généralement, l'oxydation de l'oxyde nitrique sur une électrode solide se produit selon un mécanisme électrochimique en 2 étapes :

1. Réaction électrochimique : Transfert d'un électron de la molécule de NO à l'électrode, ce qui résulte en la formation de l'ion nitrosonium.



2. Réaction chimique : l'ion nitrosonium est un acide de Lewis relativement fort et en présence des ions OH^- , est converti en nitrite (NO_2^-)



La vitesse de la réaction chimique 2 (équation [13]) augmente avec l'élévation du pH. Le potentiel d'oxydation du NO sur l'électrode, suite à un balayage de potentiels, résulte en un transfert de 2 électrons additionnels. Le nitrite est oxydé en nitrate (NO_3^-), produit final de l'oxydation électrochimique du NO (Malinski et coll., 1996).

2.2.1 Mesure électrochimique

Les différentes mesures ont été faites avec un appareil potentiostat/galvanostat model 273 EG & G PAR avec le logiciel "Electrochemical analyst system model 270". Nous avons utilisé la voltamétrie à balayage linéaire réglé de 0 à 1.5 V et une vitesse de balayage de 20 mV/s. L'électrode de référence était de type Ag/AgCl.

2.2.2 Fabrication de l'électrode de travail

L'électrode de travail est fabriquée à partir d'une fibre de carbone graphite de 8 μm de diamètre [Alfa AESAR] qu'on insère dans un capillaire de 1.1 à 1.2 mm de diamètre (figure 11). Les capillaires sont préalablement effilés avec un étireur de pipette [Narishige] à une extrémité afin de minimiser l'espace entre la fibre de carbone et le capillaire. On laisse dépasser la fibre de 500 μm et on la fixe à l'aide d'une colle epoxy-patch [The Dexter corporation]. On insère dans le capillaire une goutte de mercure pur à 99.9995%, de grade A.C.S. [Aldrich], puis une tige d'argent de 0.9 mm de diamètre [Radio-Shack]. Le mercure permet le contact entre le fil d'argent et la fibre de carbone. La tige d'argent possède à son extrémité une connexion en argent [Matteau électronique] qui permet la liaison à l'appareil de mesure. Les différentes électrodes identifiées dans la littérature sont faites avec une pâte d'argent pour assurer le contact entre la fibre de carbone et la tige d'argent. Toutefois,

l'utilisation du mercure assure un meilleur contact entre la fibre de carbone et la tige d'argent, ce que nous n'obtenions pas à tout coup avec l'utilisation de la pâte d'argent.

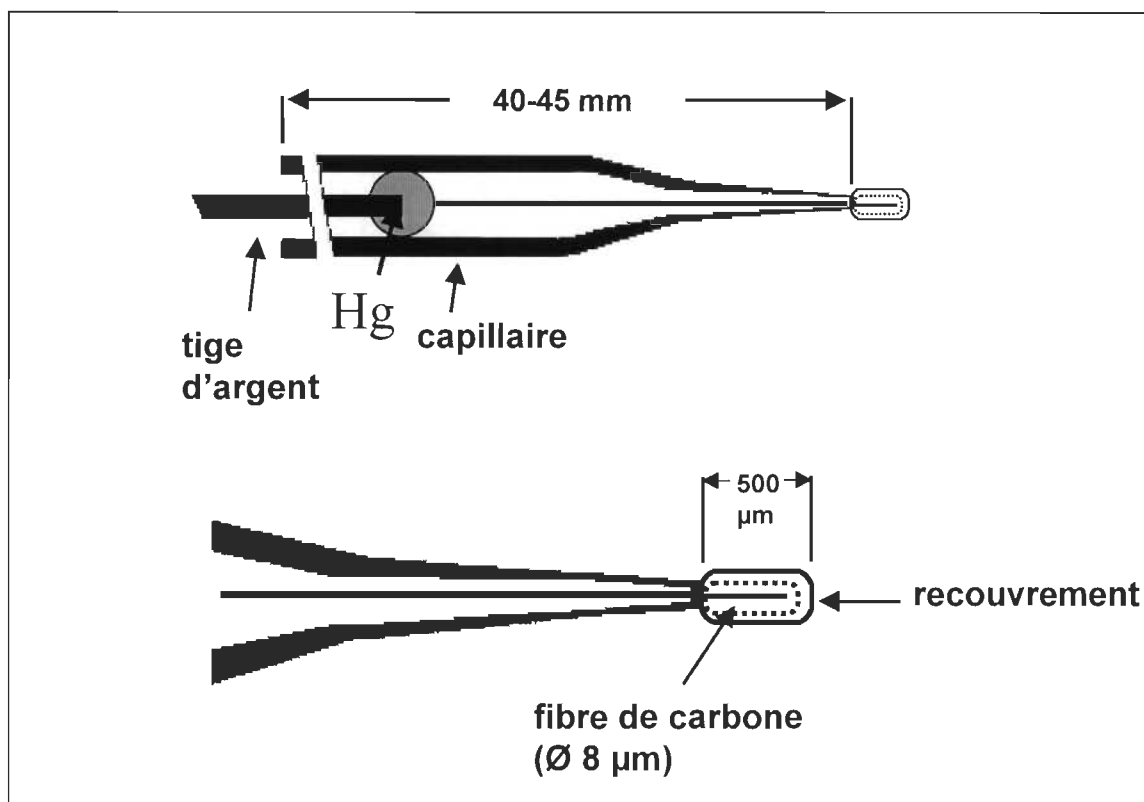


Figure 11. Fabrication de l'électrode de carbone. Une fibre de carbone de $8\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre est insérée dans un capillaire. On laisse dépasser la fibre de $500\text{ }\mu\text{m}$ de l'extrémité effilée. Le contact entre la fibre de carbone et la tige d'argent qui est reliée au potentiostat est assuré par une goutte de mercure.

2.2.3 Sublimation de la phtalocyanine

La phtalocyanine [Kodak] est déposée dans un petit creuset qui est chauffé pour la sublimation par une source de tension reliée à un relais régi par un thermocouple qui laisse passer ou non le courant pour atteindre ou maintenir une température donnée. Ce creuset est installé dans une chambre à sublimation étanche. Au-dessus du creuset, on installe un détecteur de changement de fréquence à quartz pour mesurer la quantité de substance sublimée. On y installe également l'électrode que l'on désire traiter. Ce système clos est relié à une pompe turbomoléculaire dont les pales mues par magnétisme, tournent à plus de 56 000 tours par minute. Cette pompe est elle-même reliée à une pompe mécanique standard.

Le vide créé par ces deux pompes peut être mesuré par le nombre de particules qui frappent un filament incandescent. Moins il y a de particules qui frappent le filament, plus la pression est faible. Après deux heures de fonctionnement, la pression interne est normalement plus petite que 1×10^{-6} mm de Hg. Ceci est amplement suffisant pour sublimer la phtalocyanine.

Nous avons déterminé qu'en portant le creuset à une température de 250 °C pendant 20 minutes, nous obtenions les conditions optimales.

2.2.4 Électrodéposition de l'ortho-phénylènediamine

L'électrodéposition de l'orthophénylènediamine (o-pD) [Sigma] se fait en plongeant l'électrode dans une solution de 5 mM d'o-pD dans un tampon PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) à pH 7.4 et contenant 100 µM d'acide ascorbique. Les solutions sont fraîchement préparées pour chacune des électrodépositions. Ensuite, on applique un potentiel de 0.9 Volts pendant 15 min en utilisant une électrode Ag/AgCl comme référence, le tout est fait sous agitation (Friedemann et coll., 1996). On applique une seule couche d'o-pD sur la fibre de carbone.

2.2.5 Électrodéposition du nafion

L'électrodéposition du nafion, résine échangeuse d'ions perfluorée, est basée sur les méthodes utilisées par Fabre et collaborateurs (1997) et Rivot et collaborateurs (1997). Le nafion, sodium 5 % p/p [Aldrich], est appliqué sur l'électrode par électrodéposition. On plonge l'électrode dans environ 1 ml de la solution de nafion puis par chronoampérométrie, on applique un potentiel de 3.4 Volts pendant 5 secondes. On fait sécher les électrodes au four à 55 °C, pendant 15 min entre chacune des couches. Il faut prendre soin d'agiter la solution avant chacune des électrodépositions, puisque celle-ci ne se fait pas sous agitation du fait de la faible quantité de solution utilisée. L'équipe de Friedemann (Friedemann et coll., 1996) a démontré que la méthode utilisant un simple trempage de l'électrode dans la solution de nafion suivi d'un séchage

à forte température (200 °C) est la plus efficace. Cependant, puisqu'on utilise du mercure dans nos électrodes, il est impossible d'utiliser ces températures à cause de l'expansion du mercure avec la chaleur.

2.2.6 Électrodéposition de l'eugénol

L'eugénol [Sigma] est appliqué par voltamétrie à balayage cyclique selon le protocole établi par l'équipe de Ciszewski (1998), avec des modifications afin d'optimiser les conditions pour l'utilisation de notre électrode. Nous avons donc utilisé une solution de 0.1 mM d'eugénol dans du tampon PBS. Nous avons fait un balayage de 0 à 1.0 V, à une vitesse de balayage de 100 mV/s. L'électrode de Ag/AgCl est utilisée comme référence. La préparation de la solution et l'application du recouvrement doivent se faire à l'obscurité.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Mon travail de maîtrise consistait à mettre au point une technique de détection de l'oxyde nitrique dans une coupe de cerveau. La première étape consistait en la fabrication de l'électrode. Ensuite, afin de rendre celle-ci sélective pour le NO nous avons testé deux recouvrements soit le nafion et l'eugénol. Puis, nous avons testé deux autres recouvrements afin d'augmenter la sensibilité de l'électrode envers le NO. Par la suite, nous avons testé l'électrode en solution avec un donneur de NO soit le nitroprusside de sodium (SNP) et, après, nous avons testé son efficacité dans une coupe de cerveau avec le SNP. Finalement, nous avons démontré que l'électrode était assez sensible pour détecter la libération endogène de NO, en stimulant la production de celui-ci par l'activation du récepteur NMDA.

3.1 Fabrication de l'électrode

Lors de la fabrication de l'électrode de fibre de carbone, nous avons débuté par l'utilisation de plusieurs fibres de 8 μm de diamètre, afin d'obtenir un signal intense nous permettant d'avoir une mesure qualitative du potentiel d'oxydation des composés utilisés. Nous avons appliqué, au début, une pâte d'argent afin d'assurer le contact entre les fibres et la tige d'argent. Cependant

nous n'obtenions pas systématiquement un bon contact pour chacune des électrodes. C'est pourquoi, nous avons changé par la suite la pâte d'argent pour le mercure, ce qui s'est avéré beaucoup plus efficace. Par contre, cela limite l'emploi de hautes températures pour l'application des recouvrements. C'est pour cela que, pour l'application de la phtalocyanine, nous avons sublimé la phtalocyanine sur des fibres nues et fabriqué l'électrode par la suite, sinon l'expansion du mercure dans les électrodes faisait éclater le verre à son extrémité effilée. Lors de ce projet de maîtrise, nous avons donc fabriqué une électrode de carbone avec une fibre de 8 μm de diamètre avec une longueur de 500 μm , dans le but d'obtenir une électrode très petite, permettant ainsi une localisation très précise et un dommage minimal causé au tissu.

3.2 Sensibilité et sélectivité de l'électrode

Comme l'utilisation d'électrode de carbone nécessite un recouvrement pour lui procurer une très grande sélectivité, nous avons testé deux recouvrements, un recouvrement de nafion qui est largement utilisé dans la littérature et un nouveau recouvrement, l'eugénol, utilisé par l'équipe de Ciszewski et Milczarek, 1998. De plus, nous avons testé l'o-pD et la phtalocyanine pour augmenter la sensibilité de l'électrode. Pour l'application des différents recouvrements, nous avons déterminé les paramètres nous permettant d'obtenir une réponse optimale envers le NO, tout en diminuant l'interférence causée par les substances biologiques que l'on retrouve au niveau du cerveau, soit l'acide ascorbique, le nitrite et la dopamine. Nous

avons utilisé des concentrations qui correspondent aux concentrations physiologiques.

3.2.1 Sensibilité de l'électrode

Les électrodes de carbone que nous avons recouvertes des différents recouvrements ont été testées pour leur sensibilité. Celle-ci a été vérifiée par l'établissement d'une courbe d'étalonnage du NO pour chacune des électrodes recouvertes des différentes substances. Le calibrage a été effectué par l'utilisation d'une solution mère de NO que nous avons préparée en faisant barboter du NO gazeux dans une solution de PBS. Nous avons fait des dilutions afin d'obtenir les différentes concentrations nécessaires. Les différentes lectures ont été obtenues par voltamétrie à balayage linéaire, de 0 à 1.5 V et une vitesse de balayage de 20 mV/s. Pour chacune des concentrations, nous avons pris l'intensité du courant du signal obtenue au voltage de 1.3 V, puis nous avons tracé le graphique d'intensité du courant en fonction de la concentration en NO. Dans la figure 12, nous présentons la courbe d'étalonnage pour les électrodes recouvertes des différents recouvrements testés à savoir le nafion, l'o-pD, la phtalocyanine et l'électrode de carbone sans recouvrement.

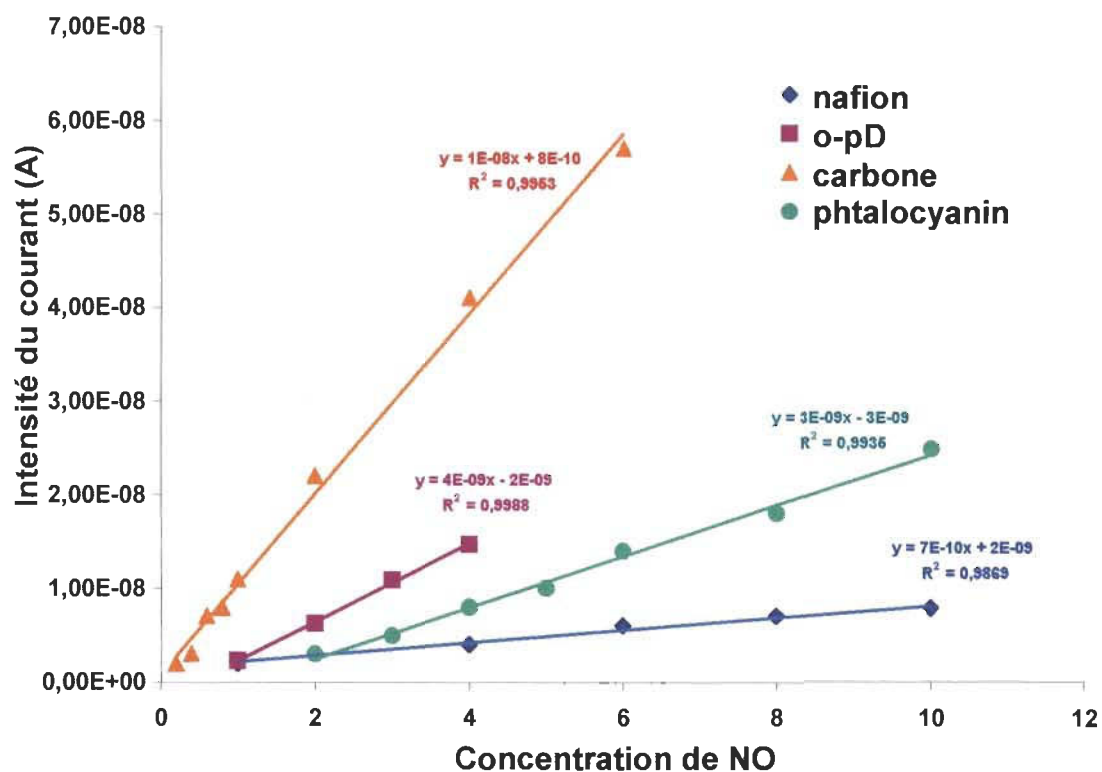


Figure 12. Courbe d'étalonnage des différentes électrodes testées. Les différentes concentrations de NO ont été obtenues par dilution d'une solution mère de NO gazeux à 2 mM. Les mesures ont été réalisées par voltamétrie à balayage linéaire de 0 à 1.5 V, 20 mM/s. Les intensités de courant ont été prises au potentiel de 1.3V.

3.2.2 Sélectivité de l'électrode

Afin de vérifier les interférences possibles lors de la lecture du signal obtenu au potentiel d'oxydation du NO, nous avons déterminé le profil de potentiel d'oxydation des substances susceptibles d'interférer avec le signal du NO en milieu biologique par voltamétrie à balayage linéaire,. Nous avons donc établi par le graphique d'intensité du courant (A) en fonction du potentiel (V) le profil de potentiel d'oxydation du NO, A.A., nitrite et DA (figure 13). Nous pouvons remarquer qu'au potentiel de 0.9 V, qui correspond au potentiel d'oxydation du NO, l'A.A. est le principal composé pouvant interférer de façon significative au niveau du signal. On peut voir que le nitrite possède sensiblement le même potentiel d'oxydation que le NO, mais qu'à concentration physiologique il n'interfère pas. La DA quant à elle, n'interfère pas. Nous avons vérifié à une concentration plus élevée de DA afin de déterminer son profil d'oxydation et nous avons obtenu un profil similaire à l'A.A., avec un plateau, mais qui commence à 0.4 V.

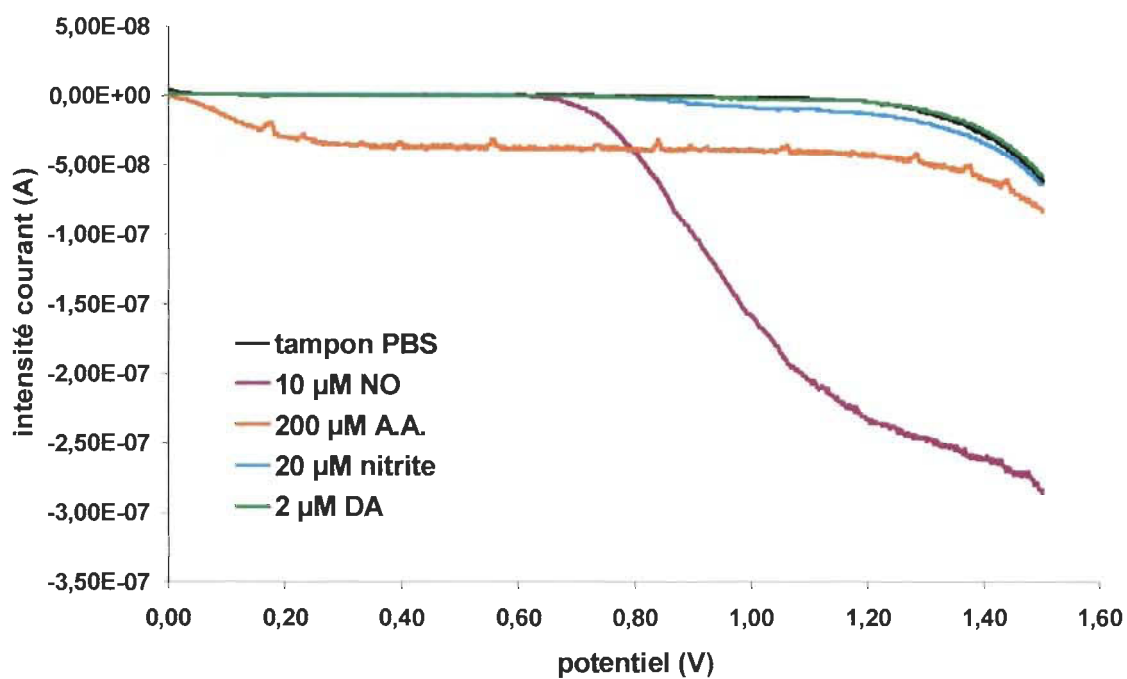


Figure 13. Graphique du profil d'oxydation des différentes substances utilisées.

Voltamétrie à balayage linéaire de 0 à 1.5 V, vitesse de balayage de 20 mV/s.

L'étude comparative des deux recouvrements testés pour la sélectivité de l'électrode est présentée dans la figure 14. On peut voir pour l'A.A., en prenant l'électrode de carbone comme référence, que l'eugénol possède la meilleure sélectivité. Par contre, si on regarde le nitrite et la DA, on peut remarquer que l'eugénol coupe complètement le signal, ce qu'on ne retrouve pas avec le recouvrement de nafion. Pour ce qui est du NO, l'utilisation des recouvrements diminue la sensibilité de façon similaire pour chacune des électrodes. Par contre, si on considère la sélectivité, il en ressort que l'électrode d'eugénol semble la plus efficace.

Cependant, même si les recouvrements rendent les électrodes sélectives pour le NO, on note une trop grande perte de la sensibilité pour faire nos études subséquentes. L'électrode de carbone sans recouvrement avec l'utilisation du voltage comme moyen sélectif s'est avérée être une meilleure alternative. Comme nous pouvons le voir à la figure 15, il est possible de distinguer le signal produit par le NO du signal produit par l'A.A. Nous pouvons par soustraction déterminer l'intensité du courant produit par l'oxydation du NO. Nous avons donc, pour les études subséquentes, utilisé cette méthode.

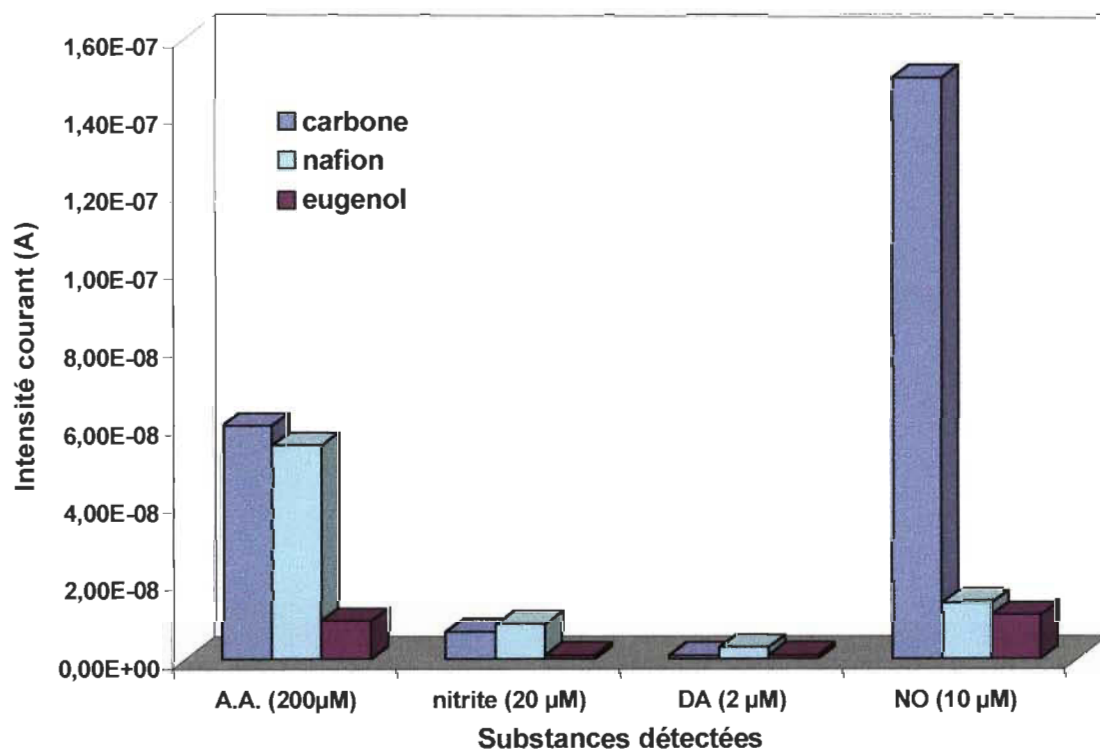


Figure 14 Étude comparative de la sélectivité du nafion et de l'eugénol. Les intensités de courant ont été prises à 1.2 V.

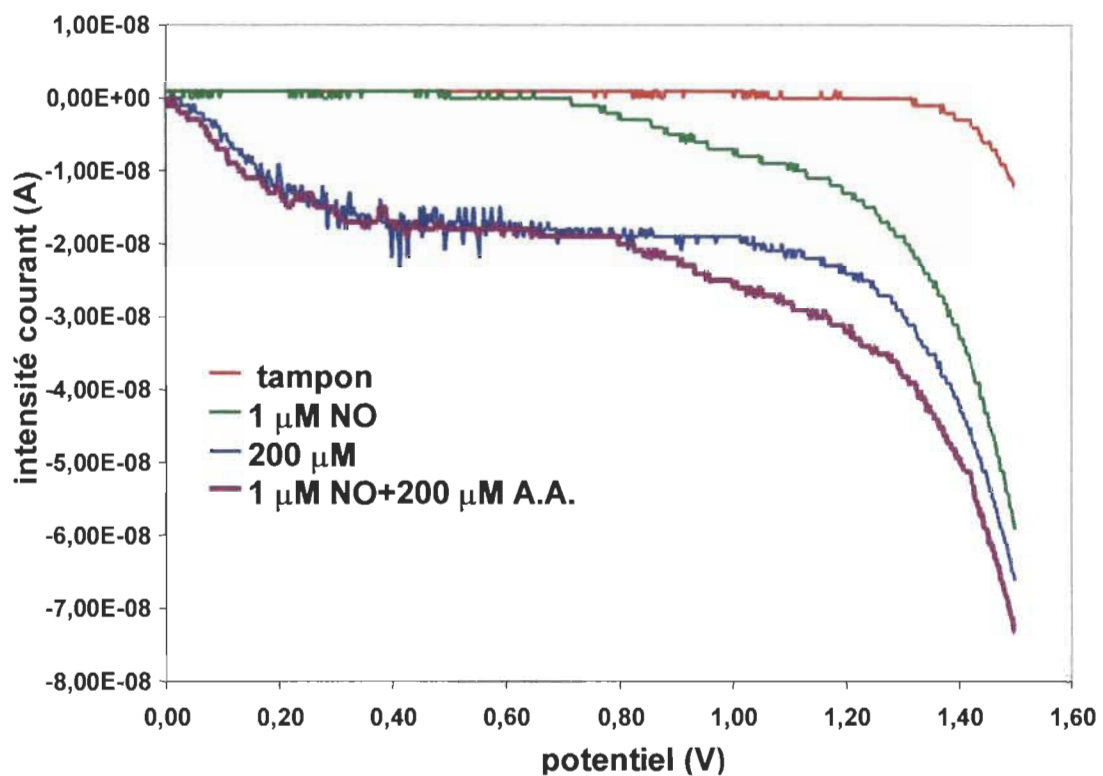


Figure 15. Profil du potentiel d'oxydation d'une solution de NO/A.A. Voltamétrie à balayage linéaire de 0 à 1.5 V et une vitesse de balayage de 20 mV/s.

3.3 Détection du NO libéré par le nitroprusside de sodium (SNP)

Le SNP, lors de sa dégradation, libère une molécule de NO. Nous avons d'abord testé la réponse de l'électrode avec le SNP en solution. Nous avons préparé une solution à 33 mM de SNP que nous avons illuminée avec une lampe de tungstène afin de permettre sa dégradation. La figure 16 nous permet de constater qu'il y a une libération graduelle de NO en fonction du temps. On peut noter que le profil du potentiel d'oxydation du NO correspond bien au profil obtenu avec une solution de NO gazeux.

Afin de déterminer si notre électrode était capable de détecter la génération de NO sur une coupe, la même expérience a été reprise, mais cette fois-ci en mesurant à l'intérieur d'une coupe d'hippocampe. Nous avons rajouté la solution de SNP dans le milieu physiologique où baigne la coupe. Le SNP est absorbé par la coupe et il y a une libération du NO à l'intérieur de celle-ci. Nous avons inséré notre électrode dans la coupe. Ensuite nous avons illuminé la chambre et nous avons pris nos lectures. La figure 17 représente les résultats obtenus.

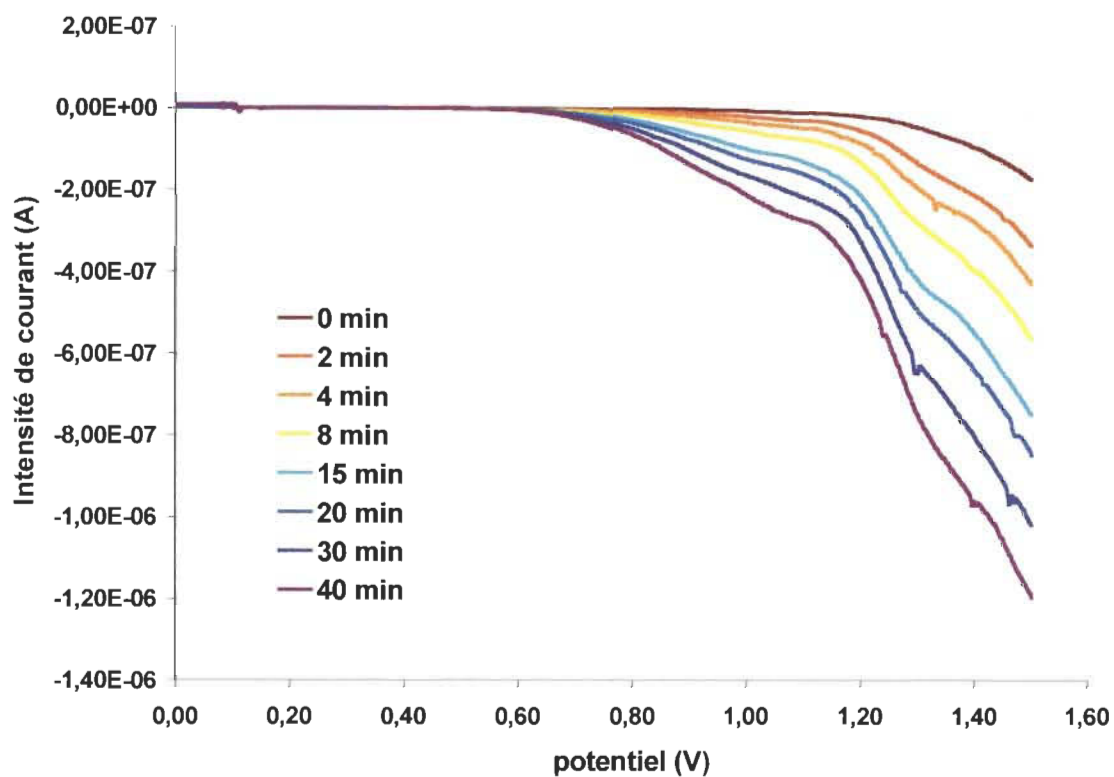


Figure 16. Profil de libération du NO par un donneur de NO (SNP) en solution.

Voltamétrie à balayage linéaire de 0 à 1.5 V et une vitesse de balayage de 20 mV/s. Électrode de référence Ag/AgCl.

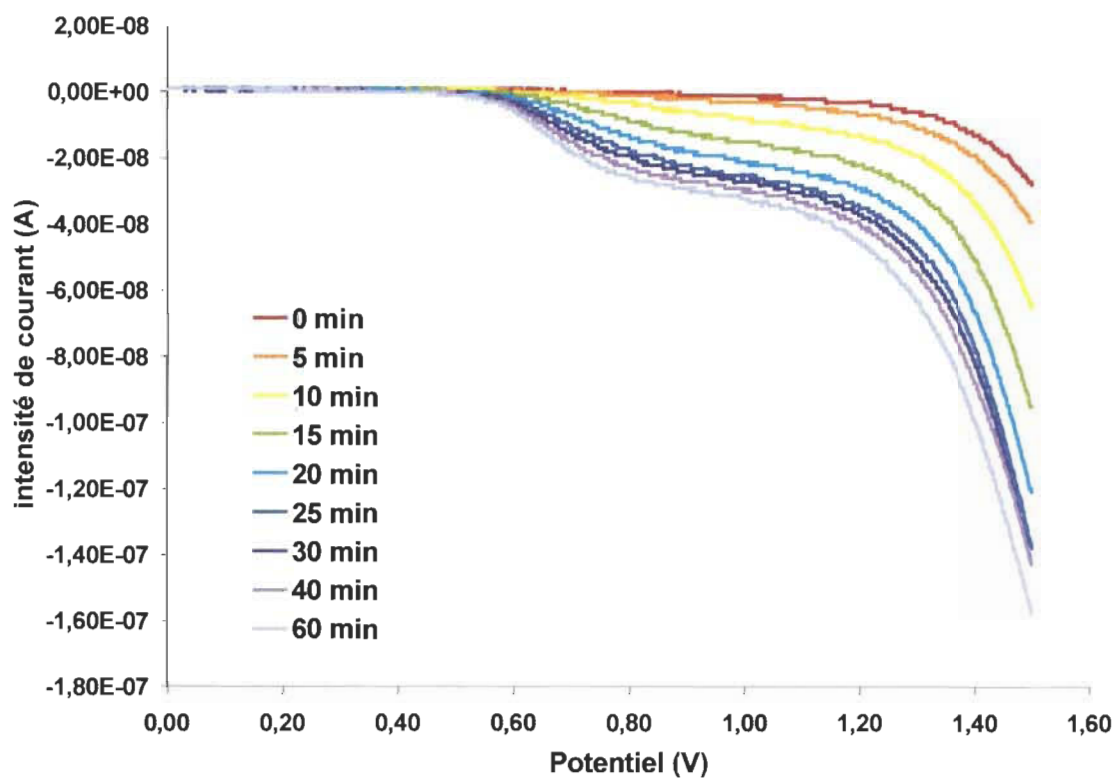


Figure 17. Profil de libération du NO par un donneur de NO (SNP) dans une coupe d'hippocampe. Voltamétrie à balayage linéaire de 0 à 1.5 V et une vitesse de balayage de 20 mV/s. Électrode de référence Ag/AgCl.

Cette étude est très importante puisque le temps de demi-vie du NO en milieu biologique est de l'ordre de secondes à cause de la présence de composés susceptibles de réagir rapidement avec le NO, comparativement à un temps de demi-vie de l'ordre de minutes pour le NO en solution.

Durant cette même étude (figure 17), nous avons observé que lors d'une variation de l'oxygénation, un signal particulier vers 1.4 V est obtenu. En effet, en l'absence d'oxygénation, on note une baisse rapide du signal, puis, lorsqu'il y a réoxygénation, le signal redevient apparent (figure 18).

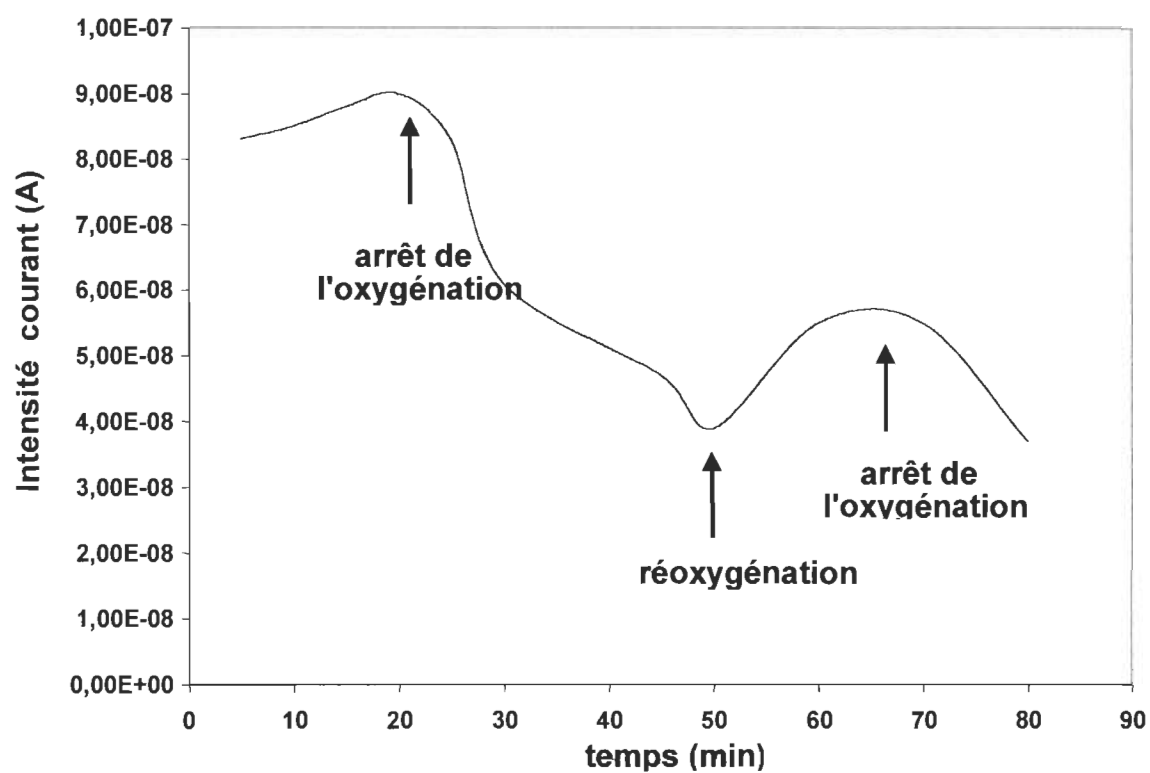


Figure 18. Effet de l'oxygénation lors de la libération du NO. Intensité de courant à 1.4 V.

3.4 Détection de NO libéré dans une coupe suite à l'activation au NMDA

Un des objectifs de ma maîtrise était de démontrer que le système utilisé était assez sensible pour détecter la libération endogène de NO. Pour cette étude nous avons utilisé un agoniste du récepteur au glutamate de type NMDA, le N-méthyl-D-aspartate. Comme démontré dans la figure 4, l'agoniste de ce récepteur permet entre autre une entrée de calcium qui va, via la calmoduline, activer la NOS et ainsi produire le NO. Suite à l'ajout du NMDA dans la solution physiologique où baigne la coupe, des mesures de la libération de NO en fonction du temps ont été effectuées (figure 19). Le graphique obtenu démontre bien que la libération endogène de NO suite à l'introduction du NMDA est similaire à la libération de NO obtenue par la dégradation du SNP. L'expérience a été reprise avec différentes concentrations en NMDA soit, 100, 200 et 500 μM . Ces expériences nous ont permis de constater qu'il y avait une libération rapide de NO pour des fortes concentrations de NMDA. Par contre nous avons aussi noté une dégradation des tissus.

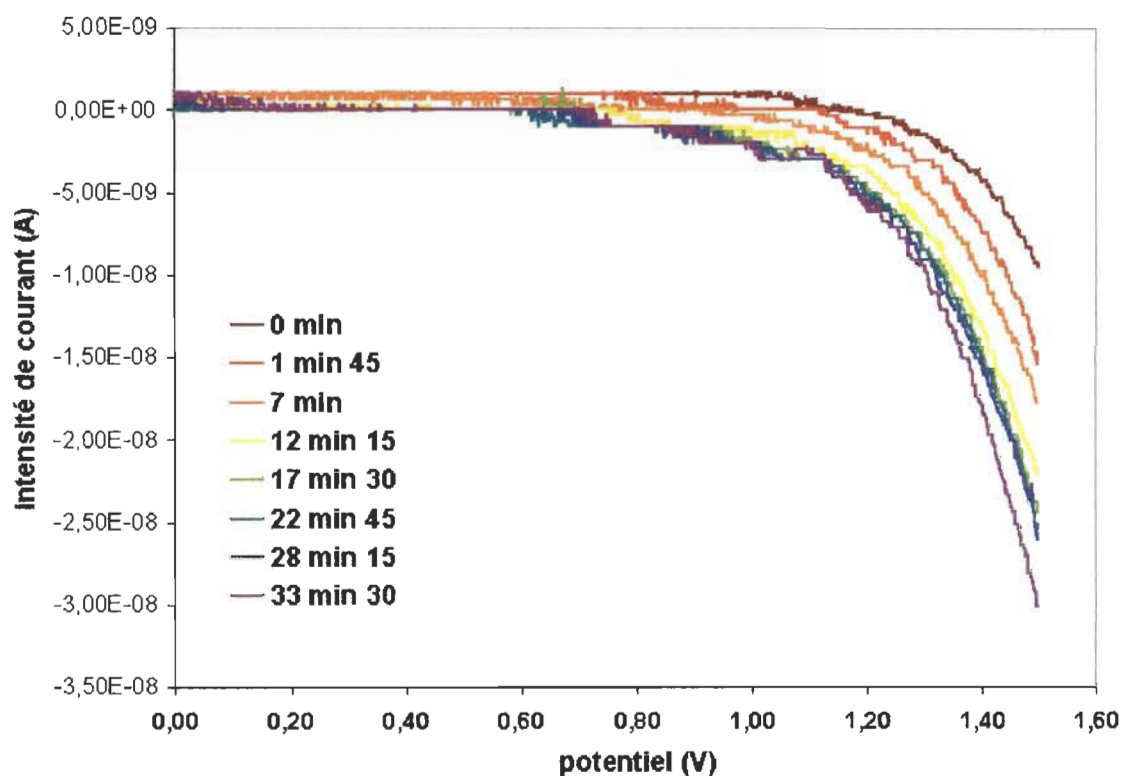


Figure 19. Profil de libération de NO endogène dans une coupe d'hippocampe suite à l'activation du récepteur NMDA. Voltamétrie à balayage linéaire de 0 à 1.5 V et une vitesse de balayage de 20 mV/s. Électrode de référence Ag/AgCl.

3.5 Effet de l'inhibiteur N-nitro-L-arginine sur la détection du NO

Pour s'assurer que le signal obtenu correspondait bien au NO, nous avons effectué un contrôle négatif. Nous avons repris l'expérience avec l'activation du récepteur NMDA, mais cette fois-ci en présence d'un inhibiteur de la NOS, le N-nitro-L-arginine qui est un analogue structural de la L-arginine. Expérimentalement, dès le début de l'incubation, nous avons ajouté l'inhibiteur afin de s'assurer qu'il ait le temps de pénétrer dans la cellule. Après la période d'incubation, nous avons, comme pour l'étude précédente, activé le récepteur NMDA, puis nous avons pris nos lectures. Le graphique obtenu (figure 20) démontre l'absence de signaux correspondant à l'oxydation du NO.

De plus, dans la figure 21, qui est identique à la figure 20, mais sur une échelle différente, on remarque en présence de l'inhibiteur, donc sans NO, l'apparition d'un signal au potentiel de 0.1 V. Ce signal n'est pas apparent lors de l'activation du récepteur en présence de NO.

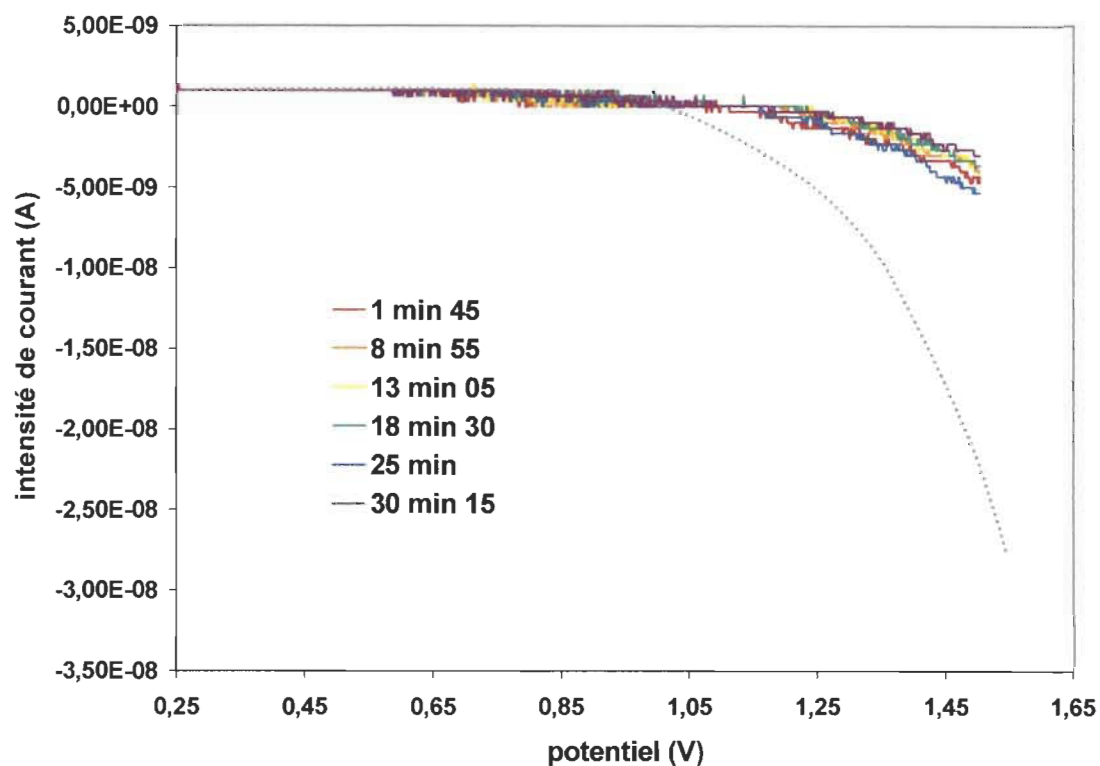


Figure 20. Effet de l'inhibiteur N-nitro-L-arginine sur la détection du NO. La courbe tracée en pointillée représente la libération de NO suite à l'activation du NMDA sans l'inhibiteur. Voltamétrie à balayage linéaire de 0 à 1.5 V et une vitesse de balayage de 20 mV/s. Électrode de référence Ag/AgCl.

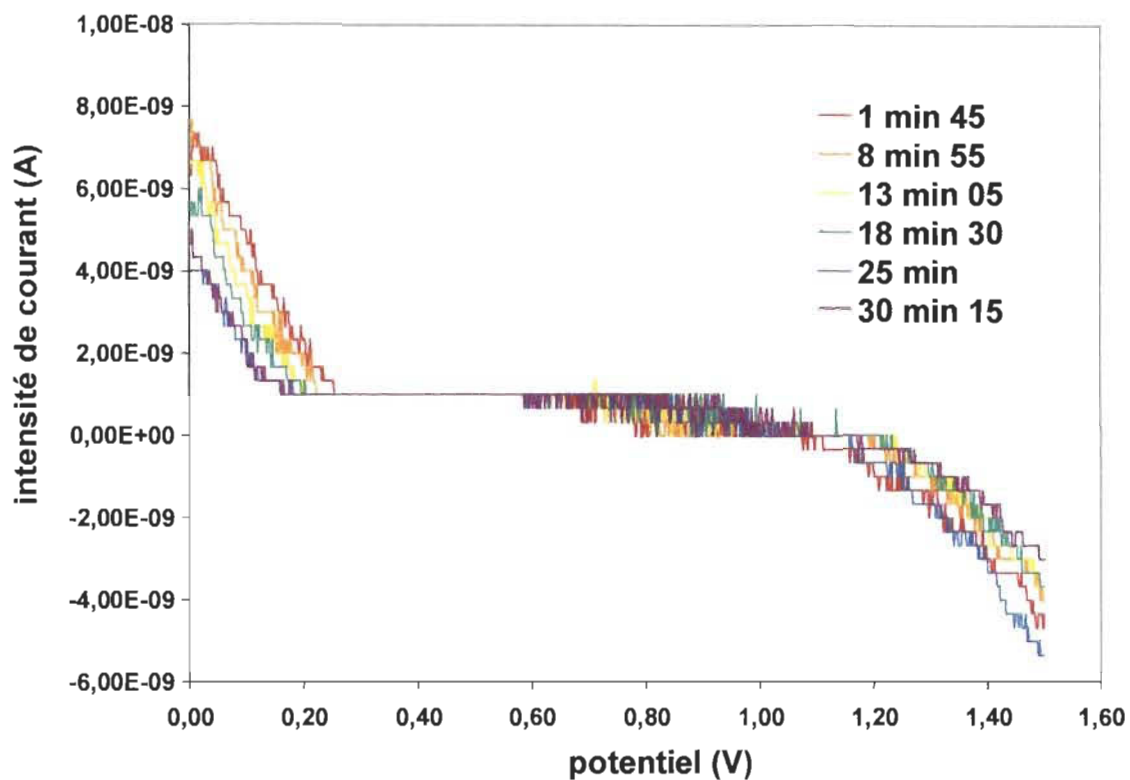


Figure 21. Effet de l'inhibiteur N-nitro-L-arginine sur la détection du NO.

Agrandissement de l'échelle du graphique de la figure 16.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 L'électrode de carbone

4.1.2 La sensibilité

L'étude sur la sensibilité de l'électrode fabriquée démontre qu'il est possible d'obtenir, avec une fibre de carbone de 8 μM de diamètre et 450 μm de long, une très grande sensibilité. En effet, la sensibilité obtenue est comparable à celle des électrodes décrites dans la littérature qui varient en diamètre ($\sim 30 \mu\text{m}$) et en longueur ($\sim 150\text{-}1000 \mu\text{m}$). Il est donc important lorsque nous utilisons un recouvrement, d'adapter les paramètres de la technique utilisée selon la surface de l'électrode utilisée. En effet, l'épaisseur de la couche du recouvrement modifie son comportement d'action.

Il est à noter que la réponse de l'électrode est directement proportionnelle à sa surface. Plus la surface de l'électrode en contact avec le milieu est grande, plus grand sera le signal capté. Nos études ont démontré une très bonne linéarité pour des concentrations de l'ordre du μM , ce qui est essentiel afin de faire notre étude sur la libération endogène de NO suite à l'activation de la nNOS dans une coupe de cerveau de souris, puisqu'une faible quantité de NO est produite. Par contre, l'utilisation des recouvrements pour

augmenter la sensibilité des électrodes ne nous a pas apporté les résultats attendus. Nous n'avons noté aucune augmentation de la sensibilité de l'électrode par rapport à l'électrode de carbone sans recouvrement. Comme l'épaisseur de la couche de recouvrement est importante comparativement au diamètre de l'électrode, une étude plus approfondie sur les paramètres expérimentaux serait peut-être nécessaire afin d'obtenir un meilleur rendement par rapport à l'électrode de carbone non-recouverte. De plus, il serait intéressant de tester un autre recouvrement couramment utilisé, le nickel(II) tetrakis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) porphyrin (poly-NiTHMPP). Une étude avec ce recouvrement pourrait apporter une amélioration au niveau de la sensibilité. Plusieurs études ont rapporté une augmentation de la sensibilité de l'électrode suite à l'ajout de ce recouvrement.

4.1.2 La sélectivité

Une des plus importantes caractéristiques à prendre en considération lors du choix de la méthode de détection du NO à utiliser est la sélectivité de celle-ci. En effet en tenant compte du milieu dans lequel l'étude se fera, nous pouvons déterminer les molécules qui causent les interférences. Lors de nos mesures, il est très important de s'assurer qu'aucune autre molécule ne vienne interférer avec le signal du NO pour ainsi fausser les résultats.

L'étude portant sur la sélectivité de l'électrode de carbone avec les recouvrements de nafion et de l'eugénol a démontré que l'eugénol est un recouvrement prometteur. Malgré une perte de la sensibilité en NO, ce qui est

retrouvée pour tous les recouvrements utilisés au niveau de la littérature, l'eugénol permet une sélectivité très élevée envers le nitrite et la dopamine. De plus, le signal de l'acide ascorbique est relativement très diminué. Nos résultats obtenus sont comparables à ceux de l'équipe de Ciszewski (1998). Les résultats obtenus avec le nafion ont été optimisés afin d'obtenir une sélectivité sans toutefois trop perdre en sensibilité. Selon la littérature, l'utilisation du nafion nécessite en moyenne une dizaine de couches afin d'obtenir la sélectivité recherchée (Friedemann et coll., 1996). Cependant, au cours de notre étude, l'application de ce nombre de couches diminuait la sensibilité de façon drastique. L'utilisation d'un autre recouvrement en plus de l'eugénol, pour augmenter la sensibilité, comme le poly-NiTHMPP, pourrait améliorer l'efficacité de l'électrode tout en permettant une grande sensibilité et l'obtention des résultats qui se rapprochent le plus de ceux cités dans la littérature.

Les différents travaux de recherche ayant recours à la technique électrochimique pour la détection du NO utilisent la voltamétrie différentielle pulsée. Ils utilisent un potentiel fixe (0.8-0.7 V) d'oxydation du NO. Il est donc primordial d'avoir recours à des recouvrements pour assurer la sélectivité de l'électrode, puisque comme nous l'avons démontré, plusieurs composés biologiques peuvent venir interférer dans le signal. Mais étant donné que les recouvrements diminuent la sensibilité, nous avons démontré qu'il était possible d'utiliser le voltage comme un moyen sélectif. En effet, avec la technique de voltamétrie à balayage de 0 à 1.5 V, il est possible de distinguer entre l'intensité du signal obtenue pour le NO et celle de l'acide ascorbique (ou

autres) par simple soustraction. Nous avons donc utilisé la technique de voltamétrie à balayage de 0 à 1.5 V pour faire la détection du NO dans nos expériences subséquentes. Les inconvénients de cette méthode sont, entre autre, un temps plus long pour prendre une lecture et une difficulté de prendre des points rapprochés dans le temps. En revanche, cette méthode présente une meilleure sélectivité.

4.2 Utilisation du SNP

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la vitesse de détection de l'électrode est importante puisque le temps de demi-vie du NO en milieu biologique est écourté comparativement au NO en solution. Nous avons donc voulu vérifier l'efficacité de notre électrode lors de la détection du NO en milieu biologique. Pour cette étude, nous avons utilisé un donneur de NO, le SNP. Ceci nous permet de déterminer un profil de libération de NO lors de la dégradation de la molécule. L'étude sur la coupe d'hippocampe nous a permis de prouver que notre électrode possédait une vitesse de détection du NO assez rapide en milieu biologique. Nous avons obtenu un signal similaire à celui obtenu par le SNP en solution. Nous avons détecté une libération graduelle de NO en fonction du temps et avec un même profil de potentiel d'oxydation.

Il y a un point très important à considérer lors de cette expérience. En effet, nous avons obtenu une variation de l'intensité du signal en fonction de l'oxygénation. Effectivement, lors de la libération continue de NO par le SNP,

une variation de l'oxygène entraîne une même variation dans le signal obtenu à 1.4 V. Il semblerait qu'un composé proviendrait de l'interaction du NO et d'un dérivé de l'oxygène produit *in vivo*. Cette variation du signal à 1.4 V n'est pas observée lorsque cette même expérience est effectuée *in vitro* en présence d'oxygène. Ce composé reste à être caractérisé et l'utilisation de l'électrode avec l'eugénol pourra être efficace pour la distinction du nitrite et des peroxydes. Ce phénomène pourrait nous aider à comprendre ce qui se passe lorsqu'il y a un afflux d'oxygène en présence de NO, dont entre autre le phénomène de réoxygénation lors d'ischémie. La caractérisation de ce composé, pourrait apporter des réponses à ce phénomène tant étudié qu'est l'ischémie. En effet, les différentes recherches effectuées sur l'ischémie, démontrent des contradictions quant au réel rôle du NO dans cette pathologie (Zang et coll., 1995).

4.3 Activation du récepteur NMDA

Bien que l'électrode soit fonctionnelle à la détection de NO en milieu biologique, il était intéressant de savoir si elle était capable de détecter la libération endogène de NO. Pour provoquer une libération endogène de NO, nous avons utilisé la voie de régulation du NO par l'ouverture du récepteur NMDA. Il a été démontré que l'application de NMDA sur des coupes d'hippocampe produit une dépolarisation avec une entrée de calcium, ce qui démontre une réponse du récepteur NMDA suite à l'activation par la molécule NMDA (Aszlely et coll., 1991). L'activation de ce récepteur provoque une entrée

de calcium qui va se fixer à la calmoduline et ainsi activer la nNOS. Nous avons alors testé l'électrode pour la détection de la libération du NO suite à l'activation de la nNOS. L'utilisation d'un agoniste du récepteur NMDA nous a permis de constater que notre électrode possède la sensibilité suffisante pour la détection de la libération endogène de NO. Nous avons obtenu des intensités de signal correspondant à des concentrations de l'ordre des μM de NO. Mais pour s'assurer que c'était bien le NO que nous détectons et non une autre molécule produite suite à l'activation du récepteur NMDA, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de la nNOS. L'inhibiteur, N-nitro-L-arginine, va agir spécifiquement sur l'enzyme nNOS et ainsi inhiber la production de NO. Les résultats obtenus avec la N-nitro-L-arginine démontrent bien que nous avons une détection du NO. En effet, nous n'avons obtenu aucun signal lors de l'activation du NMDA lorsqu'il y a ajout de N-nitro-L-arginine dans le milieu.

Un autre point fort intéressant ressortant de cette étude, qui a capté notre attention, est l'obtention d'un signal au potentiel de 0-0.2 V lors de l'inhibition de la production de NO endogène. Il est à noter qu'il y a une libération continue d'une faible quantité de NO de façon endogène dans le système biologique. On s'est rendu compte que nous étions en présence d'un composé qui semble inactivé par le NO. Cependant, ce phénomène soulève deux grandes interrogations à savoir : si le NO dégrade le composé en question ou si ce composé exerce un rôle protecteur vis à vis du NO. Des expériences plus poussées sont alors nécessaires afin de caractériser ce composé et de déterminer le rôle du NO dans sa régulation. Selon des études

menées par le groupe de Privat (1997), ce signal à 0.15 V correspondrait au potentiel d'oxydation de l'anion superoxyde. En effet, ils ont démontré, avec l'utilisation d'une électrode de carbone, que l'apparition d'un pic d'oxydation à 0.15 V est caractéristique de la réaction enzymatique qui produit l'anion superoxyde *in situ*. Des expériences plus spécifiques sont donc nécessaires afin de déterminer si ce composé correspond à l'anion super oxyde. Si cela s'avère être le cas, nos résultats pourraient peut-être corroborer les recherches effectuées par les équipes de Wink (1993) et Hogg (1993), suggérant que le NO joue un rôle au niveau de la protection des cellules contre les espèces réactives d'oxygène. Comme nous l'avons vu dans la réactivité du NO, celui-ci peut réagir avec l'anion superoxyde et le neutraliser, et de ce fait peut hypothétiquement inhiber la peroxydation des lipides (Rubanyi et Vanhoutte, 1986). Cependant, la réaction du NO avec l'anion superoxyde produit du peroxynitrite, un composé qui peut réagir avec d'autres cibles biologiques et ainsi causer des dommages qui peuvent perturber différentes fonctions physiologiques et cellulaires. Comme la technique de voltamétrie peut détecter à la fois la présence de NO et semble-t-il, l'anion superoxyde, il serait intéressant d'utiliser cette technique afin de mieux cerner le rôle du NO dans les physiopathologies des maladies neurodégénératives. En effet, notre système permet d'étudier le rôle possible du NO dans la neurotoxicité du glutamate lors des maladies neurodégénératives telles l'Alzheimer et la maladie d'Huntington (Choi et Rothman, 1988), si bien que la toxicité neuronale qu'on

attribue au glutamate serait peut-être reliée à la production de NO induite par l'activation du récepteur NMDA par le glutamate lui-même.

D'autre part, notre technique permet une localisation précise des mesures effectuées. De plus, les différentes régions de l'hippocampe ne répondent pas de la même façon face aux stress oxydatifs. On pourrait aller vérifier la production de NO dans les autres régions de l'hippocampe. Il sera intéressant de savoir quelle est la production de NO provoquée par le NMDA dans les régions que l'on sait résistantes aux stress oxydatifs.

La région CA1 de l'hippocampe est vulnérable au vieillissement prématuré. De plus, elle est la première région touchée par la maladie d'Alzheimer. Ce qui caractérise la maladie d'Alzheimer est la présence d'une protéine amyloïde que l'on croit responsable de la mort des neurones. Il sera intéressant, considérant l'hypothèse voulant que la protéine amyloïde génère un stress oxydatif, de comparer la réponse au NMDA en regard de la production de NO chez des souris transgéniques exprimant la protéine amyloïde humaine (Yankner, 1996), d'autant plus qu'il a été démontré que les neurones de l'hippocampe sont très résistants aux agressions oxydatives lors des vingt premiers jours suivant la naissance (Rong et Baudry, 1996). Il sera intéressant de voir si cette résistance aux dommages des neurones des nouveaux nés n'est pas en rapport avec une incapacité du NMDA à générer du NO. Cette problématique est particulièrement intéressante car elle permet de mieux cibler les causes cellulaires et moléculaires de la résistance des

neurones des nouveau-nés, ce qui pourrait nous permettre d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les maladies neurodégénératives.

CONCLUSION

La mesure du NO *in situ* fait l'objet d'études intenses depuis que le NO a été reconnu comme un médiateur intercellulaire commun à plusieurs processus physiologiques, telles la modulation de la transmission synaptique, la régulation de la pression vasculaire et sa participation dans les processus cytotoxiques. Un intérêt particulier qu'offre cette étude est la distribution spatiale et temporelle du NO au niveau des tissus aussi bien que ses changements de concentration. Ces paramètres caractérisent la façon dont agit le NO sur une cible particulière dans le système physiologique.

La distribution spatiale et temporelle du NO et son action dépendent de plusieurs facteurs : 1) les sources de production et de libération, c'est-à-dire la densité et la distribution de l'enzyme NOS aussi bien que la vitesse et la durée de la production enzymatique du NO ; 2) la réactivité du NO avec les autres molécules ; 3) la diffusion du NO à travers l'espace extracellulaire ou le système circulatoire. Jusqu'à présent, on connaît très peu de chose sur ces facteurs qui contrôlent la fonction du NO dans le système physiologique. L'élucidation de son mode d'action, de sa répartition dans l'organisme et de ses interactions avec les autres molécules biologiques, ouvrent de nouvelles fenêtres sur le rôle réel du NO ainsi que le traitement approprié pour les maladies neurodégénératives.

Mon principal objectif de recherche était de mettre au point une électrode de fibre de carbone de 8 μm de diamètre permettant d'obtenir une résolution spatiale et temporelle. Nous avons démontré que nous pouvions utiliser la technique de voltamétrie à balayage comme un moyen sélectif pour la détection de NO. L'utilisation du nitroprusside de sodium nous a permis d'évaluer la qualité du système de mesure utilisé, ce qui a permis de constater un effet de l'oxygène lors de la libération du NO. Nous avons démontré que l'électrode utilisée était suffisamment sensible pour la détection de la libération endogène de NO par l'activation de la NOS suite à l'activation du récepteur NMDA. L'observation importante qui découle de cette étude, est la formation d'un composé présent lorsqu'il y a inhibition de la production de NO. Ce composé qui semble être inactif en présence du NO reste à caractériser. Cependant, selon les travaux menés par l'équipe de Privat, le potentiel d'oxydation de ce composé correspondrait à l'anion superoxyde. Des expériences de contrôle pourraient venir confirmer la nature de ce composé.

Cette étude a permis de mettre au point une électrode de carbone capable de détecter la libération endogène de NO. Ceci permettra d'étudier sa distribution dans des coupes de tissus et nous éclaircir sur son rôle éventuel dans des processus neurodégénératifs.

BIBLIOGRAPHIE

Archer, S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB Journal* 1993 07: 349-360.

Arroyo, C. Kohno, M. Difficulties encountered in detection of nitric oxide by spin trapping technique. A cautionary note. *Free Radical Research Communication* 1991 14 : 145-155.

Asztely, F. Hanse, E. Wigstrom, H. and Gustafsson, B. Synaptic potentiation in the hippocampal CA1 region induced by application of N-methyl-D-aspartate. *Brain Research* 1991 558 :01 : 153-156.

Bedioui, F. Trevin, S. and Devynck, J. Chemically modified microelectrodes designed for the electrochemical détermination of nitrique oxyde in biological systems. *Electroanalysis* 1996 08:12:1085-1091.

Bedioui, F. Trevin, S. Devynck, J. Lantoine, F. Brunet, A. & Devynck, M.-A. Elaboration and use of nickel planar macrocyclic complex-based sensors for the direct electrochemical measurement of nitric oxide in biological media. *Biosensors & bioelectronics* 1997 12:03: 205-212.

- Burlet, S. and Cespuglio, R. Voltammetric detection of nitric oxide (NO) in the rat brain: its variations throughout the sleep-wake cycle. *Neuroscience letters* 1997 226:131-135.
- Canini, F. Bourdon, L. Cespuglio, R. Burguet, A. Voltametric assessment of brain nitric oxide during heatstroke in rats. *Neuroscience letters* 1997 231: 67-70.
- Cespuglio, R. Burlet, S. Marinesco, S. Robert, F. and Jouvet, M. Détection voltamétrique du NO cérébral chez le rat. Variation du signal à travers le cycle veille-sommeil. C.R.Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/life sciences 1996 319: 191-200.
- Choi, D.W. and Rothman, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Neuroscience* 1990 13 : 171-182.
- Christodoulou, D. Kudo, S. Cook, J.A. Krishna, M.C. Miles, A. and al. Electrochemical methods for detection of nitric oxide in *methods in enzymology*. Nitric oxide part A Sources and detection of NO; NO synthase Ed Lester Packer Academic Press 1996 268: 69-83.
- Ciszewski, A. Kubaszewski, E. and Lozynski, M. The role of nickel as central metal in conductive polymeric porphyrin film for electrocatalytic oxidation of nitric oxide. *Electroanalysis* 1996 08:03:293-295.

Ciszewski, A. Milczarek, G. Kubaszewski, E. and Lozynski, M. Oxidation of nitric oxide at a porphyrinic-based sensor new results from rotating disk experiments. *Electroanalysis* 1998 10:09: 628-632.

Ciszewski, A. and Milczarek, G. A new nafion-free bipolymeric sensor for selective and sensitive detection of nitric oxide. *Electroanalysis* 1998 10:11:791-793.

Cristol, J.-P., Guérin, M.-C., and Torreilles, J. Measurement of nitric oxide and biological systems. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences* 1994 317:549-60.

Durante, W. Schini, V.B. Scott-Burden, T. Junquero, D.C. Kroll, M.H. Vanhoutte, P.M. et al. Platelet inhibition by an L-arginine-derived substance released by IL-1 beta-treated vascular smooth muscle cells. *American Journal of physiology* 1991 261 : H2024-H2030.

Fabre, B. Bulet, S. Cespuglio, R. and Bidan, G. Voltammetric detection of NO in rat brain with an electronic conducting polymer and nafion bilayer-coated carbone fibre electrode. *Journal of electroanalytical chemistry* 1997 426: 75-83.

Feelisch, M. Kelm, M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochemical and biophysical Research Communication* 1991 180 : 286-293.

- Friedemann, M.N. Robinson, S.W. and Gerhard, G.A. O-phenylenediamine-modified carbon fiber electrodes for the detection of nitric oxide. *Analytical chemistry*. 1996 68: 15: 2621-2628.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 288 : 373-376.
- Godaux, E. Les neurones, les synapses et les fibres musculaires. Masson, Paris, 1994.
- Gonon, F. Monitoring dopamine and noradrenaline release in central and peripheral nervous systems with treated and untreated carbon-fiber electrodes. in A.boulton, G. Baker and RnN. Adams (eds) *Neuromethods: Voltammetric methods in brain systems*. Humana Press. 1995 27:153-177.
- Gross, S.S. Wolin, M.S. Nitric oxide : Pathophysiological mechanisms. *Annual review of physiology* 1995 57 :737-769.
- Heath, R. Bryant, B. Horton, J.K. Which cyclic GMP assay? In : Moncada S. Marletta, M.A. Hibbs, Jr. J.B. Higgs E.A. eds. *The biology of nitric oxide*, London and Chapel Hill : Portland Press 1992 01 : 98-102.
- Hibbs, J.B. Taintor, R.R. Vavrin, Z. L-arginine is requierd for expression of activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *Journal of immunology* 1987 138 :550-565.

- Hibbs, J.B. Taintor, R.R. Vavrin, Z. Bachlin, E.M. Nitric oxide : a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and biophysical research communication* 1988 157 :87-94.
- Hogg, N. Kalyanaraman, B. Joseph, J. Struck, A. and Parthasarathy, S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. *FEBS* 1993 334 : 170-174.
- Ichimori, K. Ishida, H. Fukahori, M. Nakazowa, H. and Murakami, E. Practical nitric oxide measurement employing a nitric oxide-selective electrode. *Review of Science Instrumental* 1994 65:08: 2714-2718.
- Ignarro, L.J. Buga, G.M. Wood, K.S. Byrns, R.E. Chaudhuri, G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and veins is nitric oxide. *Proceeding National Academy of science USA* 1987 84 : 9265-9269.
- Ishida, Y. Hashimoto, M. Fukushima, S. Masumura, S. Sasaki, T. Nakayama, K. Tamura, K. Murakami, E. Isokawa, S. and Momose, K. A nitric oxide-sensitive electrode : requirement of low oxygen concentration for detecting nitric oxide from the tissue. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 1996 35 :19-24.
- Johnson, J. and Ascher, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 1987 325 : 529-531.

- Kanai, A.J. Stauss, H.C. Tiuskey, G.A. Creus, A.L. and al. Shear stress induces ATP-independent transient nitric oxide release from vascular endothelial cells, measured directly with a porphyrinic microsensor. *Circulation Research*. 1995 77: 284-293.
- Kelm, M. Feelisch, M. Spahr, R. Piper, H-M. Noack, E. Schrader, J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochemical and biophysical Research Communication* 1988 154 : 236-244.
- Kiechle, F. and Malinski, T. Nitric oxide : biochemistry, pathophysiology and detection. *American journal of clinical pathology*. 1993 100 : 567-575.
- Knowles, R.G. Moncada, S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS* 1992 17 : 399-402.
- Koshland, D.E. jr. The molecule of the years. *Science* 1992 18 : 258 : 1861-1865.
- Lantoine, F. Trévin, S. Bedioui, F. and Devynck, J. Selective and sensitive electrochemical measurement of nitric oxide in aqueous solution : discussion and new results. *Journal of electroanalytical chemistry* 1995 392 :85-89.
- Laval, F. Wink, D.A. Laval, J. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity. Implication of inhibition of DNA repair proteins. *Review of physiological biochemical pharmacology* 1996 131 :175-191.

- Lemaire, G. NO et inflammation. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1994 6 :231-236.
- Lincoln, T.M. Cornwell, T.L. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB Journal* 1993 7 : 328-338.
- Luscher, T.F. Vanhoutte, P.M. Endothelium-dependent response to aggregating platelets and serotonin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1986 8 : 344-348.
- Malinski, T. Ciszewski, A. Bennett, J. and Fish, J.K. Characterization of conductive polymeric nickel (II) tetrakis-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl) porphyrin as an anodic material for electrocatalysis. *Journal of Electrochemical Society* 1991 138: 07: 2008-14.
- Malinski, T. and Taha, Z. Nitric oxide release from a single cell measured *in situ* by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 1992 358 :676-678.
- Malinski, T. Taha, Z. Grunfeld, S. Patton, S. and al. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored *in situ* by porphyrinic microsensors. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993 193:03: 1076-1082.
- Malinski, T. Radomski, M.W. Taha, Z. and Moncada, S. Direct electrochemical measurement of nitric oxide released from human platelets. *Biochemical and Biophysical research communication* 1993 194: 02: 960-965.
- Malinski, T. Mesáros, S. and Tomboulis, P. Nitric oxide measurement using electrochemical methods. *Methods in enzymology*. 1996 268:58-83.

Massicotte, G. Vanderklish, P. Lynch, G. and Baudry, M. Modulation of DL- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/quisqualate receptors by phospholipase A_2 : A necessary step in long-term potentiation? *Proceeding of National Academic of Science USA* 1991 88 : 1893-1897.

Mellion, B.T. Ignarro, L.J. Ohlstein, E.H. Pontecorvo, E.G. Hyman, A.L. Kodowitz, P.J. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3'-5' monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 1981 57 : 946-955.

Mitchell, K.M. and Michaelis, E.K. Multimembrane carbon fiber electrodes for physiological measurement of nitric oxide. *Electroanalysis* 1998 10:02: 81-88.

Moncada, S. Palmer, R.M.J. Higgs, E. A. Nitric oxide : Physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacological review* 1991 43 : 109-142.

Nowak, L. Bregetovski, P. Ascher, P. Herbert, A. and Prochiantz, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984 307 : 462-465.

Pallini, M. Curulli, A. Amine, A. and Palleschi, G. Amperometric nitric oxide sensors: a comparative study. *Electroanalysis* 1998 10:15:1010-1016.

- Palmer, R.M. J. Ferrige, A.G. and Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987 327 : 524-526.
- Pariente, F. Alonso, J.L. and Abruna, H.D. Chemically modified electrode for the selective and sensitive determination of nitric oxide (NO) in vitro and in biological systems. *Journal of electroanalytical chemistry*. 1994 379 : 191.
- Park, J.-K. Tran, P.H. Chao, J.K.T. Ghodadra, R. Rangarajan, R. and Thakor, N.V. In vivo nitric oxide sensor using non-conductive polymer-modified carbon fiber. *Biosensors & bioelectronics* 1998 13:1187-1195.
- Pelligrino, D.A., Baughman, V.L., Koenig, H.M. Nitric oxide and the brain. *Int. anesthesiol. Clin.* 1996 34 :04: 113-132.
- Privat, C. Trevin, S. Bedioui, F. and Devynck, J. Direct electrochemical characterization of superoxide anion production and its reactivity toward nitric oxide in solution. *Journal of electroanalytical chemistry* 1997 436: 261-265.
- Rapoport, R.M. Murad, F. Agonist induced endothelium dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circulation Research* 1983 52 :325-357.
- Rivot, J.-P. Barraud, J. Montécot, C. Jost, B. Besson, J.-M. Nitric oxide (NO): in vivo electrochemical monitoring in the dorsal horn of the spinal cord of the rat. *Brain research* 1997 773:66-75.

- Rubanyi, G.M. and Vanhoutte, P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *American journal of physiology* 1986 250 : H822-H827.
- Shibuki, K. An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain. *Neuroscience Research* 1990 09:69-76.
- Tracey, W.R. Linden, J. Peach, M.J. Johns, R.A. Comparaison of spectrophotometric and biological assays for nitric oxide and EDRF : non specificity of the diazotation reaction for NO and failure to detect EDRF. *Journal of pharmacological experiment therapy* 1990 252 : 922-928.
- Tristani-Firouzi, M. DeMaster, E.G. Quast,B.J. Nelson,D.P. and Archer, S.L. Utility of a nitric oxide electrode for monitoring the administration of nitric oxide in biologic systems. *Journal of laboratory clinical medicine* 1998 131:281-285.
- Tschudi, M.R. Barton, M. Bersinger, N.A. Moreau, P. and al. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *Journal of Clinical Investigations* 1996 98:04: 899-905.
- Tschudi, M.R. Mesaros, S. Lüscher, T.F. Malinski,T. Direct *in situ* measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 1996 27: 01: 32-35.

- Vallance, P. Patton, S. Bhagat, K. MacAllister, R. and al. Direct measurement of nitric oxide in human being. (short report) *Lancet* 1995 346: 153-54.
- Vane, J.R. The use of isolated organ for detecting active substances in the circulating blood. *British Journal of Pharmacological Chemotherapy* 1964 23 : 360-373.
- Wink, D.A. Hanbauer, I. Krishna, M. DeGraff, W. Gamson, J. and Mitchell, J.B. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proceeding of National Academic of science* 1993 90 : 9813-9817.
- Wink, D.A. Hanbauer, I. Laval, F. Cook, J.A. Krishna, M.C. Mitchell, J.B. Nitric oxide protects against the cytotoxic effects of reactive oxygen species. *Annual New-York Academy of Science* 1994 738 :265-278.
- Wink, D.A. Christodoulou, D. Ho, M. Krishna, M.C. Cook, J.A. Haut, H. Randolph, J.K. Sullivan, M. Coia, G. Murrar, R. and Meyer, T. A discussion of electrochemical techniques for the detection of nitric oxide. *Methods : a companion to Methods in enzymology* 1995 07 : 71-77.
- Wink, D.A. Cook, J.A. Pacelli, R. De graff, W. Gamson, J. Liebmann, J. Krishna, M.C. and Mitchell, J.B. The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity : a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Archives of biochemistry and biophysic* 1996 331:02:241-248.

Yankner, B.A. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease.

Neuron 1996 16 : 921-932.

Zhang,Z.G. Chopp,M. Bailey,F. and Malinski,T. Nitric oxide changes in the rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neurological sciences* 1995 128:22-27.