

50376
1991
134

66497

50376
1991
134

THESE

Présentée à l'Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres-
Artois pour obtenir le titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTE

Mention Physiologie Cellulaire

par

Franck FOURNIER



Expression fonctionnelle du mécanisme de libération
autocatalytique du calcium intracellulaire dans l'ovocyte
de Xénope suite à l'injection d'ARN messagers de
cerveau embryonnaire de Cobaye.

Facilitation par activation d'un récepteur purinergique exogène.

Soutenue en Février 1991 devant le jury composé de :

Mr le Pr. Jean Paul Rousseau
Mr le Pr. Pierre Guilbault
Mr le Pr. Joël Nargeot
Mr le Pr. Maurice Porchet
Mr le Pr. Bernard Dupuis
Mr le Pr. Gérard Brûlé

Président

Les recherches faisant l'objet de cette thèse ont été effectuées sous la responsabilité scientifique du Professeur Pierre Guilbault au laboratoire de physiologie cellulaire appartenant à l'U.F.R. DE BIOLOGIE à l'université des sciences et techniques de Lille Flandres-Artois (Université de Lille I).

Je dédie ce travail à mon frère Richard
ainsi qu'à mon fils Félix

AVANT - PROPOS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur Pierre GUILBAULT, responsable du laboratoire de physiologie cellulaire, pour la confiance qu'il m'a témoignée durant les quatre années passées dans son laboratoire. L'originalité de ses conceptions scientifiques et ses qualités humaines m'ont permis de mener à bien des projets non exploités jusqu'alors au sein de son équipe. Par ailleurs, sa pugnacité et sa jeunesse d'esprit ont largement contribué au développement matériel, financier et intellectuel de ces travaux.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait le Professeur Jean-paul Rousseau d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je l'en remercie chaleureusement et dorénavant et déjà, je lui suis très reconnaissant pour les critiques et suggestions qu'il voudra bien me formuler.

Je tiens également à exprimer ma parfaite reconnaissance au Professeur Maurice Porchet, responsable de l'unité associée CNRS 148 et à travers lui, à l'ensemble des membres de son laboratoire. En effet, c'est avec son assentiment bienveillant que nous avons pu profiter de ses installations ainsi que de la compétence de ses chercheurs. C'est donc avec les meilleurs sentiments que je le remercie d'avoir examiné ce manuscrit.

Je remercie vivement le Professeur Joel Nargeot, responsable du laboratoire d'électrophysiologie et de pharmacologie cellulaires au centre de recherche de biochimie macromoléculaire de Montpellier (U.P.R CNRS 8402) au sein duquel j'effectue cette année un stage de formation post-doctorale. Ses précieux conseils et ses nombreuses compétences dans le domaine de l'expression de canaux ioniques et de récepteurs membranaires m'ont permis d'apprécier nos résultats avec plus d'objectivité et de perspicacité. En outre, pionnier en France du développement de cette méthodologie d'expression fonctionnelle, ses suggestions et les rapports excellents que nous avons toujours entretenus ont été d'un grand intérêt en ce qui concerne l'interprétation de nos travaux. Enfin, je rends hommage ici à la patience et au bon vouloir dont il a fait montre à mon égard concernant la période un peu longue de transition correspondant à la rédaction de cette thèse effectuée dans son laboratoire.

Je remercie le professeur Gérard Brûlé d'avoir accepté de participer à la composition de ce jury. La plupart des travaux présentés dans cette thèse ne lui sont pas étrangers puisqu'ils ont été réalisés avec son concours; c'est pourquoi, ses commentaires sur les différents sujets abordés seront sans nul doute judicieux et constructifs.

J'exprime enfin toute ma gratitude au professeur Bernard Dupuis pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Par ailleurs, je suis convaincu que ses suggestions et ses commentaires experts dans le domaine de la pharmacologie des canaux ioniques permettront d'animer un débat intéressant pour tous.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	2
I - UTILISATION DE L'OVOCYTE DE XENOPE COMME VECTEUR D'EXPRESSION DE PROTEINES MEMBRANAIRES (CANAUX ET RECEPTEURS MEMBRANAIRES).....	2
II - UTILISATION DE L'INDEX CHLORE [ICl(Ca)] DANS L'EVALUATION ET L'ETUDE DES MODIFICATIONS DU CALCIUM LIBRE INTRACELLULAIRE DE L'OVOCYTE.....	17

MATERIELS ET METHODES	21
A - EXTRACTION DES ARN CELLULAIRES TOTAUX.....	22
A1- PRECAUTIONS.....	22
A2- ETAPES DU PROTOCOLE D'EXTRACTION.....	23
I) Etape d'homogénéisation (dénaturation du tissu).....	23
II) Ultracentrifugation.....	24
III) Précipitation des ARN.....	24
IV) Précipitation selective des ARN.....	25
B - PURIFICATION DES ARN MESSAGERS	25
I) Préparation de la colonne.....	25
II) Dépôt de l'échantillon.....	26
C - CONTROLE DE L'INTEGRITE DES ARN MESSAGERS PURIFIES.....	26
D - MICROINJECTION DES OVOCYTES.....	27
I) Préparation des ovocytes.....	27
II) Microinjection des ovocytes.....	27
E - MESURES ELECTROPHYSIOLOGIQUES.....	29
F - DOSAGE DES PHOSPHOINOSITIDES (INSP ₃).....	32

RESULTATS.....	34
I - MISE EN EVIDENCE D'UN MECANISME DE LIBERATION AUTOCATALYTIQUE DE CALCIUM INTRACELLULAIRE (CALCIUM INDUCED CALCIUM RELEASE) EXPRIME DANS L'OVOCYTE DE XENOPE A PARTIR D'ARN _m DE CERVEAU DE COBAYE EMBRYONNAIRE.....	34
A - Définition des conditions de référence sur les ovocytes témoins non injectés (propriétés natives de l'ovocyte). Mise en évidence de la composante de courant de chlore transitoire dépendante de l'entrée de calcium (T ₁).....	34
B - Cas des ovocytes injectés exprimant des ARN de cerveau de cobaye. Mise en évidence d'une deuxième composante T ₂ surnuméraire.....	35
C - Relation entre l'activité des canaux calciques et la présence des	

deux composantes T_1 et T_2	36
D - Rôle des stocks intracellulaires de calcium dans le développement de la composante T_2 . Mise en évidence d'un mécanisme de calcium induced calcium release.....	37
E - Conclusion-Discussion.....	38
II - EXPRESSION DU MECANISME DE CALCIUM INDUCED CALCIUM RELEASE - MISE EN EVIDENCE D'UNE SPECIFICITE TISSULAIRE.....	39
1 - Expression du mécanisme de calcium induced calcium-release dans l'ovocyte de xénope à partir d'ARN de fibres musculaires cardiaques de $\mu m70$ vertébrés.....	39
2 - Cas des autres structures musculaires (fibres lisses et fibres squelettiques).....	41
III - LES RECEPTEURS PURINERGIQUES - PRESENTATION GENERALE.....	46
IV - EXPRESSION DU RECEPTEUR PURINERGIQUE DE TYPE P2 DANS L'OVOCYTE DE XENOPE SUITE A L'INJECTION D'ARN _m DE CERVEAU DE COBAYE EMBRYONNAIRE.....	49
A) - CARACTERISATION DANS L'OVOCYTE D'UNE REPOSE PURINERGIQUE METABOTROPIQUE ASSOCIEE A LA STIMULATION DU METABOLISME DES PHOSPHOINOSITIDES.....	49
B) SENSIBILISATION DU PHENOMENE DE CALCIUM INDUCED CALCIUM RELEASE PAR ACTIVATION DU RECEPTEUR PURINERGIQUE.....	52
V - MECANISME IMPLIQUE DANS LA FACILITATION DU PHENOMENE DE CALCIUM INDUCED CALCIUM RELEASE SUITE A L'ACTIVATION DU RECEPTEUR PURINERGIQUE. MISE EN EVIDENCE DU ROLE SIMULTANE DE LA PROTEINE KINASE C DANS LA POTENTIALISATION DE L'ACTIVITE DES CANAUX CALCIQUES ET DANS L'APPARITION DE LA COMPOSANTE T_2	54
A - Déclenchement de la composante T_2 suite à l'activation par l'ester de phorbol PMA de la protéine kinase C dans les ovocytes exprimant des ARN de cerveau de cobaye.....	54
B - Déclenchement de la composante T_2 suite à la potentialisation de l'influx de calcium induite par l'augmentation de la concentration externe de calcium.....	55
C - Effet de l'inhibiteur de l'activité de la protéine kinase C (H7) sur la composante T_2 induite lors de l'activation du récepteur purinergique exogène dans l'ovocyte de xénope.....	56
D - Conclusion-Discussion.....	56
- Activation de la protéine kinase C et développement de la composante T_2 ...	56
- Modulation de l'activité des canaux calciques de neurones par la protéine kinase C.....	58

VI - SENSIBILISATION DU PHENOMENE DE CALCIUM INDUCED CALCIUM RELEASE PAR ACTIVATION D'AUTRES RECEPTEURS METABOTROPIQUES (LIES A L'ACTIVITE DE LA PHOSPHOLIPASE C) EXPRIMES A PARTIR D'ARNm DE CERVEAU DE MAMMI- FERES.....	60
---	----

DISCUSSION.....	63
-----------------	----

Le mécanisme de calcium induced calcium release.....	63
La réponse purinergique exprimée dans l'ovocyte.....	64
Role de l'ATP extracellulaire en tant que neurotransmetteur.....	66
Conclusion.....	68

BIBLIOGRAPHIE.....	71
--------------------	----

RESUME

L'ovocyte de xénope immature a été utilisé à la fois comme vecteur d'expression d'ARN messagers et comme modèle de détection et d'étude des principaux mécanismes intervenant dans la modification du calcium libre intracytosolique. En particulier, nos résultats ont permis de mettre en évidence l'expression, à partir d'ARNm de cerveau de cobaye, d'un phénomène de libération autocatalytique de calcium à partir de réserves intracellulaires (phénomène de Ca induced Ca release: CICR). Ce système de mobilisation du Ca est stimulé par l'entrée de Ca s'effectuant par les canaux calciques exogènes voltage-dépendants et se comporte donc comme un relai amplificateur entraînant une augmentation importante et transitoire de la concentration interne de calcium. En outre, nos résultats amènent à conclure que l'expression de ce mécanisme de CICR n'est effective qu'à partir de préparations d'ARNm de cerveau ou de coeur de cobaye. Par ailleurs, d'autres types de préparations (fibres musculaires squelettiques de crustacés et myomètre de ratte gestante), pourtant connues pour engendrer l'expression de canaux calciques dans la membrane ovocytaire, ne permettent en aucun cas de visualiser la présence d'un tel mécanisme suggérant ainsi une certaine hétérogénéité dans la répartition tissulaire de ce phénomène.

Dans un deuxième temps, il est démontré que l'activation d'un récepteur métabotrope comme le récepteur purinergique de type P2Y, couplé à la phospholipase C et occasionnant une production accrue d'InsP₃ et de diacylglycérol, entraîne une sensibilisation significative du mécanisme de Ca induced Ca release exogène. Cette facilitation semble s'effectuer par le biais d'une potentialisation de l'influx de calcium (facteur déclenchant) et ceci grâce vraisemblablement à une phosphorylation des canaux calciques induite suite à l'activation de la protéine kinase C (PKC) par le diacylglycérol. Cette idée est renforcée par le fait que d'autres types de récepteurs métabotropiques transplantés (récepteur glutamate et récepteur acétylcholine), connus pour également stimuler le courant entrant de Ca exogène dans l'ovocyte grâce à l'activation de la PKC, induisent, lorsqu'ils sont sollicités par leurs agonistes respectifs des réponses similaires à celle du récepteur purinergique et correspondant aussi à une sensibilisation du mécanisme de CICR.

Il est proposé finalement que ces différentes entités protéiques exprimées dans l'ovocyte (mécanisme de CICR, récepteur purinergique et canaux calciques) pourraient constituer, *in situ*, un système cellulaire intégré participant notamment à la stimulation de la libération de neurotransmetteurs; ce qui permettrait d'augmenter l'efficacité synaptique au niveau central.

MOTS-CLES Ovocyte de xénope, ARN messagers, courant de chlore calcium dépendant, mécanisme de calcium induced calcium release, stocks de calcium intracellulaires, courant calcique, récepteur purinergique, récepteurs métabotropiques, protéine kinase C, InsP₃

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I - UTILISATION DE L'OVOCYTE DE XENOPE COMME VECTEUR D'EXPRESSION DE PROTEINES MEMBRANAIRES (CANAUX ET RECEPTEURS MEMBRANAIRES).

Les protéines de la membrane plasmique des cellules eucaryotes remplissent un double rôle :

- Catalyse des mouvements transmembranaires de substrats métaboliques et d'ions. Le contrôle des concentrations ioniques cytosoliques s'effectue grâce à l'action concertée d'un grand nombre de protéines agissant au niveau de la membrane plasmique et des membranes d'organelles intracellulaires (canaux ioniques, ATPases, antiports...)

- Réception de signaux provenant du milieu extracellulaire et transmission de ces signaux dans la membrane plasmique elle-même ou dans l'espace cytoplasmique. Ces signaux extracellulaires peuvent être représentés par différentes entités : des neurotransmetteurs, des peptides modulateurs, des hormones, des substrats cellulaires et des contacts cellule-cellule.

Un grand nombre de techniques sont maintenant disponibles pour étudier les mécanismes impliqués dans le transport membranaire ou dans la perception et la transduction de signaux : purification biochimique, reconstitution dans des membranes artificielles, modification chimique, méthodes immunochimiques et électrophysiologiques).

Toutefois, à ce jour, aucun mécanisme de transport catalysé par des protéines membranaires n'est encore élucidé précisément au niveau moléculaire. Pourtant, récemment, de nouveaux moyens d'investigation puissants ont été fournis par les méthodes de biologie moléculaire ce qui va sans nul doute contribuer à ouvrir de nouvelles perspectives dans la détermination des fonctions remplies par ces protéines membranaires. En effet, la mise à disposition d'un grand nombre de séquences de cDNA spécifiant récepteurs et protéines de transport membranaire a fourni de précieux renseignements sur la structure de ces protéines et sur leur évolution comparée. En vue de spéculer au mieux sur

l'implication des motifs structuraux d'une protéine dans son activité, celles-ci doivent impérativement être exprimées et caractérisées d'un point de vue fonctionnel.

La biosynthèse normale de protéines membranaires nécessite la succession de plusieurs étapes complexes :

- La translocation des chaînes polypeptidiques vers le réticulum endoplasmique
- L'ancrage correct dans la membrane plasmique.
- L'assemblage des différentes sous-unités constitutives.
- Les modifications post traductionnelles (incorporation des copules glucidiques) s'opérant dans l'appareil de golgi.
- Le positionnement final de ces protéines dans la membrane plasmique.

Du fait de cette complexité, il s'avère difficile de mener à bien la synthèse de protéines membranaires fonctionnelles d'eucaryote en système acellulaire ou dans un vecteur d'expression procaryotique. L'expression fonctionnelle de protéines membranaires eucaryotiques requiert donc plutôt l'utilisation de cellules-hôtes elles-mêmes eucaryotes.

Le cDNA peut être exprimé dans des cellules eucaryotes au moyen de transfections stables ou transitoires ou encore par microinjection dans le noyau cellulaire. En outre, ce cDNA peut être transcrit *in vitro* et l'ARNm résultant transféré dans le cytoplasme de ces cellules. L'expression fonctionnelle apporte des informations à la fois sur l'identité même des séquences de cDNA clonées mais aussi sur les propriétés fonctionnelles intrinsèques des protéines correspondantes. Par ailleurs, les séquences des cDNA peuvent être modifiées (mutagenèse dirigée) et l'étude des perturbations d'activité observées après expression de la protéine mutée permet d'apprécier l'implication fonctionnelle du motif structural en question. Enfin, l'expression fonctionnelle de protéines peut être entreprise par introduction directe dans une cellule-hôte de mRNA cellulaires totaux isolés à partir de tissus. Cette technique permet:

- la caractérisation et la purification partielle de populations de mRNA codant pour la protéine membranaire dont il est possible de détecter l'activité;
- de fournir une méthode de criblage (selection des clones de cDNA) directe et fiable : clonage fonctionnel par expression;
- la mise en évidence des propriétés d'une protéine membranaire dans une cellule-hôte parfois plus accessible à l'expérimentation et l'étude de sa biosynthèse ou de sa modulation par les seconds messagers.
- la comparaison de protéines membranaires à différents stades de développement à l'intérieur d'une même espèce ou entre espèces différentes (ontogénèse de récepteurs...).

La cellule la plus fréquemment utilisée pour l'expression fonctionnelle de protéines membranaires à partir d'ARNm est l'ovocyte de *Xenopus laevis*.

Dans ce chapitre, nous nous attacherons à déterminer les caractéristiques de ce vecteur d'expression et de recombinaison. Dans cette optique, nous essaierons de circonscrire le champ d'application de ce système et de souligner ses limites d'utilisation

L'ovocyte de *Xenopus* immature (stade V et VI de la classification de DUMONT, 1972) est utilisé depuis de nombreuses années comme vecteur d'expression de protéines membranaires. En effet, l'injection intracytoplasmique d'ARN messagers provenant de types cellulaires aussi variés que les neurones de vertébrés, les fibres musculaires cardiaques ou les cellules endocrines excitables conduit à la recombinaison fonctionnelle de canaux ioniques et de récepteurs s'insérant dans le système membranaire ovocytaire. Le "montage artificiel" de ces "transporteurs moléculaires" confère à l'ovocyte receveur de nouvelles caractéristiques dites acquises que l'on peut détecter et ensuite étudier au moyen de techniques électrophysiologiques, biochimiques, biophysiques ou immunologiques. Bien singulièrement pourtant, l'avènement de cette technique n'est que très récent et il concorde avec le besoin impératif et croissant des biologistes moléculaires de confirmer et d'accréditer la fiabilité fonctionnelle des clones recombinants de cDNA préalablement isolés grâce aux techniques consacrées de "screening" et spécifiant certains récepteurs et canaux membranaires (immunoscreening, hybridation avec oligonucléotides synthétiques ...). Par ailleurs, l'intéressante possibilité d'investigation au niveau cellulaire et moléculaire

offerte par l'ovocyte concernant certains mécanismes physiologiques intégrés comme , entre autre, l'implication du métabolisme des phosphoinositides dans la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire n'est certes pas étrangère à l'essor grandissant de cette technique de réimplantation de récepteurs membranaires.

L'expression de protéines exogènes dans l'ovocyte de Xénope suite à l'injection d'ARNm dans le cytoplasme ou de cDNA dans le noyau a été démontrée pour la première fois par GURDON et coll., (1971). L'ovocyte transcrit et traduit efficacement l'information génétique "injectée" et globalement la maturation post-traductionnelle des protéines exogènes est correctement réalisée (processing, empaquetage, glycosylation, phosphorylation et localisation subcellulaire finale). Ce n'est qu'en 1981, qu'il a pu être démontré que des protéines exogènes de membrane plasmique pouvaient être également exprimées dans ce système. En effet, suite à l'injection de mRNA d'organe électrique de *Torpedo marmorata*, SUMIKAWA et coll., (1981) ont mis en évidence la présence d'un récepteur spécifique à l' α bungarotoxine nouvellement exprimé dans la membrane ovocytaire . Ces mêmes auteurs ont démontré quelques temps après que ce site représente effectivement un canal ionique fonctionnel dont l'ouverture est conditionnée par l'acetylcholine. A la suite de cette découverte, la technique fut rapidement appliquée à d'autres protéines membranaires. Les tableaux 1 et 2 énumèrent de manière non exhaustive l'ensemble des protéines membranaires ayant été exprimées jusqu'à ce jour dans l'ovocyte de Xénope à partir soit d'ARNm totaux isolés de différents tissus (tableau 1) soit de cDNA clonés (tableau 2)

Les avantages que l'on peut tirer de l'expression de cDNA ou d'ARNm dans le système ovocyte par rapport à la transfection dans les cellules somatiques, en particulier lors de méthodologies faisant appel à des techniques électrophysiologiques sont:

- la manipulation simple des cellules parfaitement identifiables après transfert du matériel génétique;
- la forte proportion d'ovocytes (>98%) exprimant l'information génétique après son transfert;
- la possibilité de contrôler l'environnement direct des ovocytes par simple perfusion externe;
- le contrôle strict du potentiel de membrane.

Ion channels

- Na⁺
- Ca²⁺
- K⁺
- Cl⁻
- K⁺ (ATP-regulated)
- Na⁺ (amiloride-sensitive)
- GABA receptor channel
- Glycine receptor channel
- Acetylcholine receptor channel
- Glutamate receptor channel
(kainate or quisqualate)
- Glutamate receptor channel (NMDA)

Receptors acting via IP₃

- Serotonin (5HT_{1c}, 5HT₂)
- Angiotensin (type II)
- Neurotensin
- Substance P
- Substance K
- Neurokinin (type A)
- Quisqualate
- Vasopressin (V1, V2)
- Acetylcholine (M1, M3)
- Cholecystokinin
- Bombesin
- Gastrin-releasing peptide
- Gonadotrophin-releasing hormone
- Thyrotropin-releasing hormone
- Noradrenaline
- Dopamine

Other proteins

- Light (rhodopsin)
- Odorant mixture
- Adrenergic receptors (β 1, β 2)
- Fe receptors
- Interferon (γ)
- IgE receptor
- G-proteins (G_i, G_o)
- Cyclase (cAMP)
- Gap junction
- Semliki Forest virus envelope protein

Carriers

- Na⁺-Ca²⁺
- Na⁺-glucose
- Na⁺-iodide
- Na⁺-neurotransmitters
- Na⁺-amino acid
- Amino acid (Na⁺-independent)
- Anion-exchanger (band 3)

Tableau 1 : Énumération des protéines de membrane plasmique ayant été exprimées dans l'ovocyte de xénope suite à l'injection de préparations d'ARN messagers cellulaires totaux. D'après SIGEL, 1990.

Receptors

- Substance K receptor
- Substance P receptor
- Adrenergic receptors ($\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$)
- Muscarinic receptors (I.II.III.IV)
- Thyroid-stimulating hormone
- Serotonin ($5HT_{1c}$)
- Serotonin ($5HT_2$)
- Mas-oncogene (angiotensin)
- NGF receptors
- Low density lipoprotein receptor
- Rhodopsin
- Atrial natriuretic peptide clearance receptor

Channels

- Na⁺ channel
- K⁺ channel
- K⁺ channel (A-type)
- Ca²⁺ channel (L-type)
- Acetylcholine receptor channel
(skeletal muscle, electroplax)
(brain)
- GABA receptor channel
- Glycine receptor channel
- Kainate receptor channel
- Connexins (gap junctions)

Transport proteins

- Na.K-ATPase
- Na⁺-glucose cotransport
- Glucose carrier
- Anion-exchanger (band 3)

Tableau 2 : Enumération des protéines de membrane plasmique clonées ayant été exprimées dans l'ovocyte de xénope. D'après SIGEL, 1990.

La faible densité de canaux, de systèmes de transports et de récepteurs dans la membrane ovocytaire native facilite considérablement la détection de protéines membranaires exogènes transplantées. En effet, l'ovocyte défollicularisé possède seulement dans sa membrane:

- une Na/K ATPase
- un transporteur d'acides aminés dépendant du sodium
- différents transporteurs glucose
- une conductance calcique endogène assez faible sensible au potentiel membranaire
- d'autres conductances voltage dépendantes présentant des caractéristiques d'activation assez originales (canaux calciques activés en hyperpolarisation)
- des canaux de stretch (canaux activés lors de contraintes mécaniques)

L'emploi de l'ovocyte peut néanmoins présenter certains inconvénients :

- la variation en fonction des saisons, observée dans certains laboratoires, de la qualité des lots d'ovocytes;
- une période d'expression relativement courte (10 à 15 jours maximum) comparée aux procédés de transfections stables dans les cellules somatiques;
- le petit nombre de cellules pouvant être manipulé en une seule expérience.

Les procédés expérimentaux utilisés dans le cadre de l'expression fonctionnelle de protéines membranaires dans l'ovocyte de Xénope sont illustrés dans la figure 1. L'ARN total, extrait de cultures cellulaires ou de tissus intacts, est, dans la plupart des cas, suffisant à lui seul pour obtenir un signal fonctionnel détectable dans l'ovocyte après injection. Néanmoins, l'utilisation de préparations purifiées d'ARN messagers (poly A+ mRNA) s'avère plus intéressante à la fois pour des raisons purement pratiques (utilisation de concentrations plus faibles d'ARN) mais aussi pour améliorer la rentabilité en augmentant l'importance du signal exprimé dans l'ovocyte.

Dans le cas d'expression à partir de cDNA, deux alternatives sont possibles : soit l'injection directe du cDNA dans le noyau ovocytaire, soit la transcription préalable du cDNA en ARN puis "capping" et polyadénylation avant injection et expression (figure 1).

Xenopus oocyte

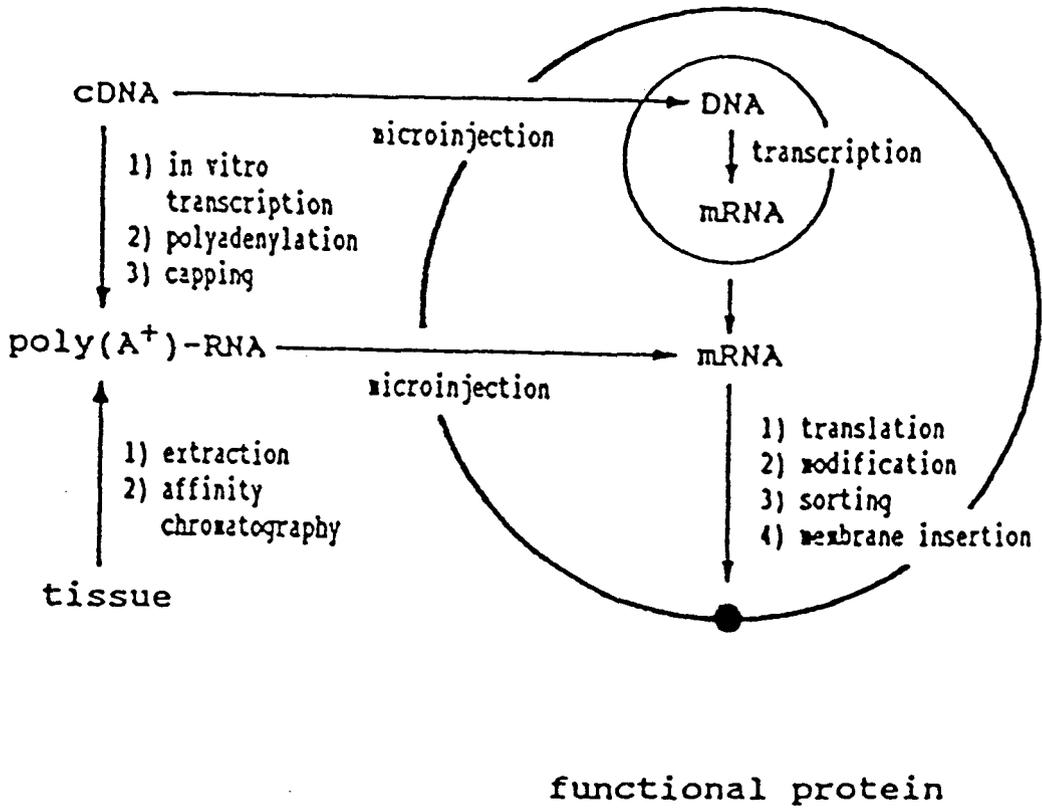


Figure 1 : Schéma illustrant les protocoles expérimentaux généraux utilisés pour l'expression fonctionnelle de protéines membranaires dans l'ovocyte de xénope. L'expression peut être obtenue soit à partir d'ARNm polyA+, soit à partir de cDNA

Dans l'optique d'étudier au mieux l'activité d'une protéine nouvellement exprimée dans le système ovocytaire, il convient de s'assurer si les propriétés endogènes de l'ovocyte (récepteurs et canaux endogènes) ne sont pas susceptibles d'interférer avec le fonctionnement de cette protéine exogène néoformée. En d'autres termes, il convient de pouvoir visualiser facilement l'expression d'une protéine exogène sans que son activité ne soit en rien parasitée par le fonctionnement de protéines similaires propres à la membrane ovocytaire. Pour ce faire, certaines expériences de contrôle sont parfois effectuées afin de s'affranchir des réponses endogènes ou de les évaluer quantitativement. En particulier, l'emploi d'inhibiteurs de transcription comme l'acinomycine D, permet d'exclure la possibilité d'activation d'un gène endogène suite à l'introduction d'ARNm dans l'ovocyte. Néanmoins, l'ovocyte possède un grand nombre d'ARNm non traduits et cette fois, aucune expérience de contrôle, ne permet d'exclure l'activation de ces ARN endogènes et leur contribution dans l'élaboration d'une structure hétéromérique fonctionnelle. Pourtant certains arguments tirés de différentes observations expérimentales réfutent quelque peu cette dernière possibilité:

- les protéines membranaires exprimées sont toujours présentes dans le tissu d'origine à partir duquel ont été isolés les ARN, par ailleurs, l'expression n'est observée que si le tissu d'origine constitue une source riche en ARNm particuliers;

- les propriétés des protéines exogènes s'apparentent généralement à celles observées sur le tissu d'origine (exemple: expression du récepteur Ach de plaques électriques de torpille);

- dans bon nombre de cas où les cDNA spécifiant des protéines fonctionnelles ont été modifiés (mutagenèse dirigée), les altérations de l'activité consécutives sont, dans la plupart des cas, en rapport direct avec le succès de l'expression.

En dépit de ces observations circonstanciées, aucun résultat n'a pu permettre d'évaluer la possibilité d'activation d'ARN endogènes ou la participation du système ovocytaire dans la structure d'une protéine exogène exprimée après injection d'ARNm.

D'une manière générale, on peut estimer le nombre de molécules protéiques exprimées dans la membrane ovocytaire à $5 \cdot 10^8$ au maximum à partir d'acides nucléiques purs et à un maximum de 10^7 copies par cellule à partir de préparations d'ARNm totaux ; ces taux d'expression relativement faibles peuvent se révéler comme des facteurs limitant la détection structurale ou fonctionnelle de ces protéines.

La confirmation "structurale" ou biochimique de l'expression de nouvelles protéines membranaires peut être apportée de différentes manières:

- immunoprécipitation des protéines marquées;
- après chromatographie d'affinité;
- techniques de "binding" avec l'utilisation de ligands à radioactivité spécifique élevée.

La détection fonctionnelle de récepteurs couplés à la production de seconds messagers est, quant à elle, rendue plus facile du fait de l'amplification du signal consécutif à l'activation de ces récepteurs. Néanmoins, cette détection nécessite l'intervention d'un certain nombre de facteurs intégrés dans la chaîne d'événements impliqués dans la production du second messager et finalement dans l'activation d'effecteurs cellulaires responsables de la réponse. La plupart du temps, ces facteurs sont d'emblée présents naturellement dans l'ovocyte et /ou ils sont coexprimés avec le récepteur. Ainsi, à titre d'exemple, il a pu être démontré que les récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques humains exprimés dans l'ovocyte interagissent avec une protéine G endogène de type G_s (KOBILKA et coll., 1987).

L'ovocyte s'est avéré particulièrement adapté pour la détection de récepteurs transplantés activant la voie $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3/\text{calcium}$ et dans ce cas de figure, c'est le système endogène de l'ovocyte qui est mis à contribution pour engendrer la propagation du message induit par le récepteur activé. Tous ces récepteurs déclenchent, après une phase de latence de plusieurs secondes, une réponse s'apparentant à un courant oscillant similaire à celui produit par l'activation du récepteur muscarinique endogène (DASCAL et LANDAU, 1980). Des réponses comparables peuvent être obtenues également après microinjection de calcium ou d' $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ dans l'ovocyte (GILLO et coll., 1987) et, par ailleurs, ces réponses sont abolies par injection préalable d'EGTA. Ainsi, ces récepteurs semblent impliquer la chaîne d'événements suivante : récepteur - protéine G - phospholipase C - $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - libération de Ca à partir de

compartiments cytosoliques endogènes . Le calcium ainsi libéré suite à l'activation de ces récepteur peut être à tout moment mesuré grâce à l'activation d'un courant endogène de chlore calcium-dépendant. Les variations de calcium cytosolique peuvent aussi être appréciées par la méthode de microfluorométrie au fura 2, par photoluminescence avec l'aequorine ou par mesure de l'efflux de calcium radioactif (^{45}Ca). En outre, la production d'Ins(1,4,5) P_3 induite par la fixation du ligand peut être directement mesurée et dosée à partir d'un nombre restreint d'ovocytes. En tout état de cause, puisque seul le cDNA ou l'ARNm pur codant pour un récepteur (exemple :récepteur 5 HT $_{1C}$) est capable de générer ce courant de chlore oscillant, il peut être conclu que la chaîne d'événements en aval de l'activation du récepteur est propre à l'ovocyte lui-même. Ainsi, dans ce cas, il y a complémentarité entre le récepteur exprimé et le mode de transduction endogène.

Les courants ioniques nouvellement exprimés sont enregistrés en utilisant la technique de potentiel imposé dans la configuration cellule entière (technique de double microélectrode) ou courant unitaire (technique de patch clamp, HAMILL, 1981). La première méthode est particulièrement sensible puisque il est estimé que l'expression de seulement 5000 canaux ioniques est suffisante pour produire un signal détectable significatif si l'on considère l'amplitude du courant unitaire de lpA et une probabilité d'ouverture proche de 1 (SIGEL, 1990) . Par contre, la détection de signaux en courant unitaire nécessite un taux d'expression élevé (10^6 canaux/ovocyte pour avoir une chance de trouver un canal sous une pipette d'enregistrement couvrant $4\mu\text{m}^2$ dans une surface ovocytaire totale de $2 \cdot 10^7 \mu\text{m}^2$).

L'expression de protéines membranaires à partir de préparations d'ARNm tissulaires totaux a permis d'appréhender ou d'approfondir des thèmes généraux aussi variés que :

- le rôle des modifications post traductionnelle dans l'établissement de l'activité de ces protéines;
- L'ontogénèse de canaux ou de récepteurs à l'intérieur d'un même tissu;
- la régulation de ces protéines membranaires par les seconds messagers et les effecteurs intracellulaires.

Ceci a été facilité par le fait que les mRNA sont exprimés dans un environnement hétérologue simple ou un bon nombre de facteurs expérimentaux sont mieux contrôlés que dans le tissu d'origine.

Dès lors qu'une protéine fonctionnelle peut être détectée à partir d'ARNm totaux, ceux-ci peuvent être fractionnés par différentes méthodes (gradient de densité, électrophorèse préparative) afin de déterminer et de caractériser les populations d'ARNm responsables de l'activité de cette protéine. Cette procédure n'est valable que si l'activité de la protéine en question n'est dépendante que d'ARNm présentant des tailles relativement proches. En effet, dans certains cas le fractionnement peut conduire à la perte totale de la fonction étudiée (par exemple si un ARNm de faible poids moléculaire est essentiel pour le maintien du fonctionnement d'un canal ou d'un récepteur).

Dans le cas idéal, la détermination d'une population active d'ARNm peut servir de point de départ pour la production d'une banque de cDNA. Le fractionnement selon la taille peut également apporter des renseignements sur l'existence d'isoformes de protéines membranaires spécifiant une fonction. Par ailleurs, grâce à la conjonction de différentes combinaisons de fractions de mRNA, il est possible d'évaluer le rôle de différentes sous unités dans l'activité globale de la protéine transplantée. A titre d'exemple, l'inactivation du canal sodique de cerveau de rat pourrait être intimement liée à la présence d'une protéine codée par un ARNm de faible poids moléculaire (STÜHMER, 1989; GOLDIN et coll., 1986).

L'ampleur d'un signal fonctionnel obtenu après expression dépend en fait du taux de mRNA spécifiques injecté. Cette propriété a été utilisée pour quantifier certaines populations de mRNA présentes dans différents tissus et spécifiant la même fonction. Plusieurs types d'informations (pour revue voir SIGEL, 1990) ont pu être retirées de ce genre d'expériences concernant entre autres:

- l'ontogénèse des récepteurs GABA et glycine et leur distribution dans le cerveau de rat;
- les variations du taux d'ARNm de récepteur nicotinique et du canal sodique survenant après dénervation du muscle squelettique de chat;

- l'implication des variations du taux d'ARNm dans les processus de désensibilisation du récepteur TRH;

- la variation du taux de mRNA spécifiant le canal potassique en fonction de l'imprégnation oestrogénique du myomètre de ratte.

L'utilisation de l'expression fonctionnelle dans un système hétérologue tel que l'ovocyte apparaît donc bien adaptée pour quantifier une espèce donnée de mRNA ; particulièrement dans les cas où le cDNA codant pour la protéine étudiée n'est pas encore disponible.

Néanmoins, ce type d'approche peut souffrir de quelques inconvénients:

- l'isolement de l'ARN peut varier quantitativement même à partir de fragments dérivant d'un même tissu;

- les isoformes protéiques natives ne sont pas automatiquement différenciées;

- l'origine cellulaire de mRNA isolé n'est pas connue.

D'autres techniques qui, comme l'hybridation *in situ* ou le northern blot plus sensibles et plus résolutive pour la quantification et la localisation d'ARNm spécifiques, peuvent alors être utilisées.

La densité des récepteurs et canaux est relativement faible par rapport à l'ensemble des protéines membranaires dans le système nerveux central. Ceci rend difficilement applicables les méthodes de purification biochimique et donc les approches conventionnelles de clonage (qui dépendent soit de la connaissance partielle de la séquence primaire en acides aminés d'une protéine ou de l'existence d'un anticorps hautement spécifique).

Le clonage par test fonctionnel se présente alors comme une alternative de choix. Il a été utilisé pour la première fois par NUMA et coll. ,(1987) et, depuis lors, ce type d'investigation a été repris pour entreprendre le clonage de diverses protéines de membrane plasmique (tableau 3). La stratégie d'un clonage fonctionnel par expression est illustré à la figure 2.

L'expression fonctionnelle obtenue à partir d'ARNm total isolé à partir d'une source donnée confirme la présence d'un mRNA spécifiant la protéine en ques-

Plasma membrane proteins cloned with the help of the functional assay in the *Xenopus* oocyte (functional expression cloning)

Membrane protein

Na⁺-glucose cotransporter
Serotonin receptor (5HT_{1c})
Substance K receptor
Substance P receptor
K⁺ channel (kidney)
K⁺ channel (brain delayed rectifier)
Kainate receptor channel

Tableau 3 : Protéines de membrane plasmique clonées par expression fonctionnelle dans l'ovocyte.

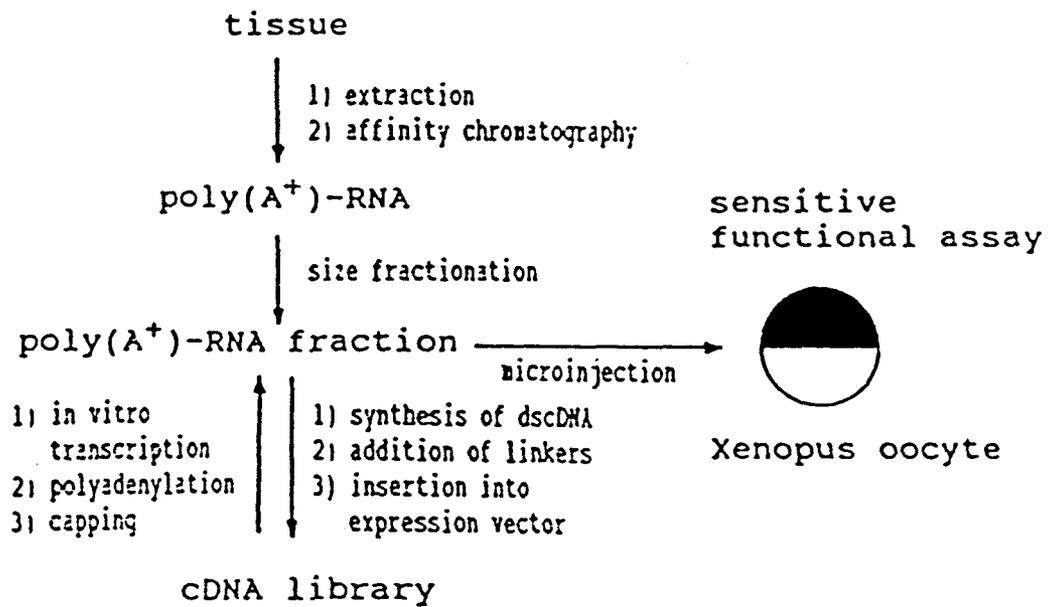


Figure 2 : Schéma illustrant la méthodologie générale employée pour le clonage par expression fonctionnelle. Le clone positif déclenchant une réponse fonctionnelle dans l'ovocyte est identifié par subdivision progressive de la banque de cDNA. ds-cDNA: double stranded cDNA.

tion. Le RNA peut être ensuite fractionné et après action de la reverse transcriptase, une banque de cDNA peut être générée. Cette banque est ensuite transcrite en poly A+ mRNA et exprimée en totalité ou par partie dans l'ovocyte. Consécutivement, l'apparition dans l'ovocyte de la fonction recherchée confirme la présence d'un clone positif possédant un cDNA complet (full length) induisant la protéine. Le clone peut ensuite être isolé et identifié par division successive de la banque et expression dans l'ovocyte.

Plusieurs artifices pratiques sont parfois aménagés pour faciliter la production de la banque de cDNA et augmenter la probabilité de détection fonctionnelle d'un signal induit par cette banque .

1) fractionnement en fonction de la taille des ARN par électrophorèse préparative. Cette étape aboutit à un enrichissement important en une population donnée d'ARN qui sert ensuite à la production de la banque.

2) clonage unidirectionnel utilisé en conjonction avec un test électrophysiologique sensible (exemple du clonage du récepteur kainate (HOLLMANN et coll., 1990).

3) utilisation d'un signal naturellement amplifié par l'ovocyte et sa machinerie intracellulaire (exemple : détection de récepteurs liés à la production d'Ins(1,4,5)P₃)

Le clonage direct par expression fonctionnelle présente l'intérêt, par rapport aux autres techniques classiques, d'éviter d'isoler et de séquencer un "faux clone positif" que l'on pourrait obtenir à cause d'une réaction croisée quand sont utilisées des sondes immunologiques ou oligonucléotiques comme outil de criblage. De plus, grâce à cette méthode, les clones obtenus possèdent un cDNA complet puisque la protéine correspondante exprimée est biologiquement active dans le vecteur de reconstitution ovocytaire. Néanmoins, cette technique ne s'adresse qu'à des protéines dont l'activité n'est supportée que par une seule sous unité et dans les autres cas , d'autres stratégies plus complexes doivent être mises en oeuvre pour réaliser ce clonage par expression directe.

D'autres méthodologies de clonage , cette fois indirectes, sont utilisées de temps à autre tout en conservant les tests fonctionnels comme procédé de "screening". Le clonage indirect par expression fonctionnelle fait appel à l'utilisation d'oligonucléotides antisens (complémentaire de l'ARN) inhibant l'expression d'une protéine donnée dans l'ovocyte. Cette stratégie a, par exemple, été mise en oeuvre par LUBBERT et coll., (1987) pour cloner le récepteur 5 HT_{1C} à partir d'une tumeur de plexus choroïde de souris.

Pour conclure sur ce chapitre concernant l'expression d'ARNm, il convient d'énumérer certaines limites inhérentes à ce type d'approche:

1) la protéine membranaire recherchée peut n'être exprimée qu'à faible taux, à cause de la faible abondance d'ARNm spécifiques dans le tissu d'origine. Parfois, les taux d'expression de protéines sont comparables dans la cellule d'origine mais différents dans le vecteur d'expression . Les motifs responsables de ces divergences ne sont pas clairs. La stabilité du RNA durant l'isolement, durant le stockage ou après l'injection dans l'ovocyte, de même que l'efficacité de traduction du RNA dans le cytoplasme ovocytaire peuvent varier selon le type d'ARN étudié. Par ailleurs, certains polypeptides peuvent maturer différemment dans l'ovocyte empêchant ainsi leur incorporation dans la membrane plasmique de l'ovocyte;

2) Une fois l'expression fonctionnelle obtenue, l'origine cellulaire de la protéine considérée n'est pas toujours définie puisque le tissu à partir duquel est isolé l'ARN est constitué de différents types cellulaires;

3) Des protéines originaires de différentes cellules sont susceptibles de contracter entre elles des relations anormales lorsqu'elles se retrouvent colocalisées dans la même cellule lors de l'expression fonctionnelle.

Les techniques classiques de criblage (avec oligonucléotides ou avec Anticorps) peuvent conduire comme cela a déjà été mentionné à la sélection de "faux clones positifs". La confirmation de l'identité d'une protéine en utilisant en particulier un test fonctionnel constitue une étape primordiale après l'établissement de la séquence de cDNA . L'ovocyte de Xénope a servi ainsi de test d'activité pour un grand nombre de protéines membranaires clonées (cf.

tableau 2). Cette approche permet de définir la structure minimale d'une protéine responsable de son activité (exemple la sous unité α du canal sodique de cerveau de rat). Par ailleurs, elle rend compte du rôle des autres sous-unités (régulation, modulation) associées à cette structure minimale.

Dans le cas du canal calcique dihydropyridine - sensible (type L) de coeur de lapin, le clone de la sous unité α est, à lui seul, suffisant pour induire dans l'ovocyte l'expression d'un courant baryum modulé par les dihydropyridines et s'écoulant à travers des canaux calciques (MIKAMI et coll., 1989). En outre, la co-expression de $\alpha 1$ avec la sous unité $\alpha 2$, une autre sous unité de haut poids moléculaire constitutive du canal calcique clonée à partir de muscle squelettique de lapin induit une potentialisation globale du courant ionique détectable au niveau de la surface membranaire ovocytaire. Ce mécanisme de stimulation dans le cas de coexpression $\alpha 1/\alpha 2$ n'est pas encore élucidé. Il n'est pas possible, à l'heure actuelle, en l'état des travaux, d'exclure la possibilité d'association hétérogène" entre les sous unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ d'une part et des peptides endogènes (propres à l'ovocyte) d'autre part pouvant conduire à des modalités de régulation extravagantes.

Il est tout de même permis de penser que dans un futur proche, le clonage des sous unités de petite taille du canal calcique et leur coexpression avec les autres sous unités pourrait clarifier la situation concernant les relations structure/activité de ce canal.

Dans le cas de protéines multi-hétéromériques (plusieurs sous-unités différentes), la manipulation génétique la plus simple ne faisant pas appel à la modification de cDNA, est la constitution de formes hybrides chimériques et la détection des modifications fonctionnelles induites par les différentes combinaisons d'association de sous unités. Cette approche est particulièrement intéressante lorsque deux espèces expriment deux formes de protéines multimériques différant selon leur activité. Dans ce cas, il est possible d'identifier la sous-unité responsable de cette différence à l'intérieur du complexe protéique .

Le vecteur d'expression ovocytaire a également été utilisé pour étudier certains aspects propres à la biosynthèse de protéines membranaires. En premier lieu, il a permis de mieux cerner le rôle de la glycosylation dans l'expression fonctionnelle de protéines de surface. De plus, différentes investigations dans ce domaine indiquent que les perturbations des mécanismes de glycosylation présentent des effets différentiels sur les protéines membranaires exprimées. Ainsi, il a été rapporté que l'inhibition de la N-glycosylation sur le core protéique par la tunicamycine prévient l'apparition de canaux sodiques et de récepteurs GABA fonctionnels dans la membrane ovocytaire (SIGEL, 1990). A l'opposé, la tunicamycine s'avère inefficace sur l'expression d'autres types de canaux ou de récepteurs (canaux potassiques, récepteur - canal kaïnate).

Par ailleurs, il semble plus que probable que les protéines membranaires insérées dans la membrane plasmique de l'ovocyte soient orientées correctement puisque l'application interne (injection intracytoplasmique) de neurotransmetteurs comme par exemple l'ATP ne déclenche aucune réponse dans l'ovocyte injecté avec des ARNm de cerveau de cobaye démontrant ainsi que le site de fixation des agonistes du récepteur purinergique est bien situé à la face externe de la membrane (FOURNIER et coll., 1990)

Ces processus de biosynthèse aboutissent finalement à l'insertion des protéines dans la membrane plasmique. Néanmoins, leur répartition dans cette membrane ne s'effectue pas de manière anarchique; en effet, certaines publications révèlent l'existence de regroupements asymétriques des récepteurs exprimés. Ainsi, les récepteurs muscariniques et TRH transplantés dans l'ovocyte et tous deux liés à la production d'Ins(1,4,5)P₃ se retrouvent préférentiellement localisés au niveau du pôle animal. Ces expériences ont été conduites en appliquant localement les agonistes respectifs en différents points de la surface cellulaire de l'ovocyte et en comparant, grâce à l'emploi de techniques électrophysiologiques, l'ampleur des réponses obtenues. Par ailleurs, l'injection d'Ins(1,4,5)P₃ déclenche, elle même, des réponses de plus grande amplitude au pôle animal qu'au pôle végétatif. Actuellement, l'étude des mécanismes intimes impliqués dans la compartimentation cellulaire des récepteurs et de leur mode de transduction n'est encore qu'à l'état d'ébauche. L'utilisation du système d'expression hétérologue ovocytaire devrait également s'imposer comme une des méthodes les plus adaptées pour investir ces événements post - traductionnels.

L'étude *in situ* des récepteurs du système nerveux central reste problématique à cause de l'impossibilité de contrôle de l'environnement immédiat des récepteurs étudiés. En effet, la trop lente diffusion, les phénomènes de reprise par endocytose, les mécanismes naturels de dégradation des neurotransmetteurs ainsi que la possibilité d'interférence occasionnée par la présence d'agonistes et de modulateurs endogènes compromettent fortement les résultats d'analyses pharmacologiques sur tissu intact. C'est ainsi que l'ovocyte s'affirme comme un modèle de choix pour ce type d'étude puisqu'en effet, la reprise, le relargage et la dégradation sont dans ce cas pratiquement inexistantes. De plus, l'ovocyte est un système assez sensible pour détecter de faibles différences quant aux propriétés des différents récepteurs exprimés ce qui le rend utilisable pour la caractérisation de nouveaux agonistes ou antagonistes pharmacologiques agissant soit sur des sites de fixation soit sur des sites modulateurs associés aux récepteurs.

De par la taille de l'ovocyte, le milieu intracellulaire peut facilement être modifié et contrôlé permettant ainsi une approche fiable de la régulation du fonctionnement des canaux ou des récepteurs membranaires exogènes exprimés. Ainsi, il devient possible, par simple microinjection de seconds messagers (Ins(1,4,5)P₃, Ins(1,3,4,5)P₄, AMPc, GMPc, phorbol ester, calcium), ou d'agents modulant leur métabolisme, de caractériser les modalités du mécanisme de transduction d'un récepteur membranaire exogène.

Récemment, de nouvelles techniques d'investigation ont pu être appliquées à l'étude des récepteurs membranaires exprimés dans l'ovocyte; ce sont, entre autres: la technique de mesure de calcium intracellulaire par utilisation du fura-2 ou de l'aequorine, les mesures de flux de ⁴⁵Ca, la technique d'enregistrement de courants unitaires en patch clamp. Ces nouvelles voies accroissent sans nul doute les possibilités d'analyse de récepteurs sur le plan fonctionnel et pharmacologique.

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse a été obtenu en mettant à profit certaines des propriétés énumérées ci - dessus concernant l'utilisation de l'ovocyte de Xénope. Deux potentialités essentielles de cette cellule ont été exploitées:

- l'utilisation de l'ovocyte comme vecteur d'expression d'ARN messagers;
- l'exploitation des propriétés intrinsèques de l'ovocyte pour suivre l'évolution et l'effet de la production de seconds messagers (voie des phosphoinositides) suite à l'activation de récepteurs membranaires.

L'étude entreprise a abouti :

1°) à mettre en évidence l'expression spontanée d'un processus de "Ca induced Ca release" à partir des ARN de cerveau de cobaye;

2°) à démontrer que le phénomène de "Ca induced Ca release" néoformé est sensibilisé suite à l'activation de récepteurs métabotropiques exogènes (récepteurs liés à la production d'Ins(1,4,5)P₃ et de diacylglycérol comme par exemple celle du récepteur purinergique de type P₂Y);

3°) à constater une certaine spécificité tissulaire du phénomène de "Ca induced Ca release";

4°) à établir le lien entre le métabolisme des phosphoinositides et le phénomène de "Ca induced Ca release".

II - UTILISATION DE L'INDEX CHLORE [ICl(Ca)] DANS L'EVALUATION ET L'ETUDE DES MODIFICATIONS DU CALCIUM LIBRE INTRACELLULAIRE DE L'OVOCYTE

Dans les conditions natives (ovocyte contrôle, non injecté), la principale conductance arborée par l'ovocyte est une conductance chlore strictement dépendante de l'activité interne de calcium (MILEDI et coll., 1982).

Cette conductance reflète l'activité d'un grand nombre de canaux chlore présents naturellement dans la membrane ovocytaire. De plus, elle ne présente aucune voltage dépendance intrinsèque et elle est détectable dans les conditions physiologiques normales (ND 96).

L'augmentation de la concentration de calcium libre cytosolique dans l'ovocyte induit un courant de chlore de sens entrant lorsque la cellule est polarisée en deçà du potentiel d'équilibre aux ions chlorure et de sens sortant lorsque le potentiel imposé est amené au delà de ce potentiel d'équilibre. A - 25 mV, l'augmentation du calcium cytosolique ne déclenche aucun courant de chlore détectable puisque cette valeur correspond exactement au potentiel d'inversion du courant de chlore (E rev.) dans les conditions physiologiques normales (figure 3).

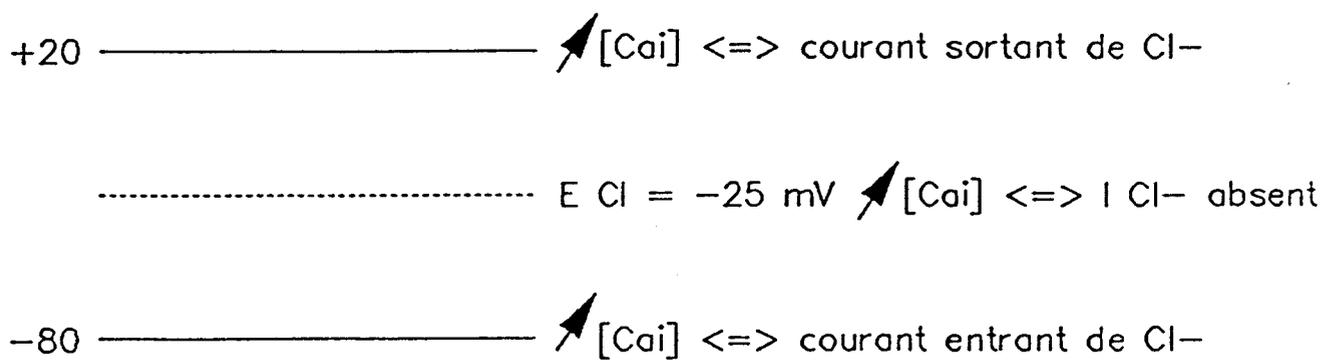


Figure 3 : Schéma illustrant le sens du courant de chlore $I_{Cl}(Ca)$ en fonction du potentiel de membrane imposé (à gauche, en millivolts) et lors d'une augmentation du calcium libre dans le cytosol de l'ovocyte.

L'augmentation du calcium intracellulaire peut survenir de différentes manières (figure 4):

- soit par libération de calcium à partir des réserves intracellulaires (par exemple: le relargage induit par l'Ins(1,4,5)P₃);
- soit par entrée de calcium à travers des canaux calciques voltage dépendants ou récepteur dépendants présents dans la membrane plasmique ovocytaire.

Dans ces deux cas de figure et surtout si les cinétiques sont distinctes, les modifications du calcium intracellulaire résultantes sont suivies par l'évolution du courant de chlore ICl(Ca) à un potentiel de membrane donné. Dans le cas où ces deux modalités d'élévation du calcium cytoplasmique ne peuvent être distinguées d'un point de vue cinétique, des méthodes pharmacologiques pourront être employées (inhibition de l'une des composantes). Plus précisément encore et comme l'illustre la figure 5, la libération de calcium par les réserves cytoplasmiques peut provenir :

- soit de la stimulation de réserves calciques sensibles à l'Ins(1,4,5)P₃ [Ins(1,4,5)P₃ induced calcium release];
- soit de la stimulation de réserves calciques sensibles au calcium lui même (calcium-induced-calcium release).

Dans ce cas, les modifications induites, en ce qui concerne le calcium intracellulaire, peuvent également être suivies par le décours du courant de chlore.

Selon de nombreux auteurs (pour revue voir BERRIDGE, 1989), ces deux modalités de libération du Ca intracellulaire s'effectueraient à partir de stocks internes complètement distincts: stocks InsP₃ sensibles et stocks InsP₃ insensibles. En outre, ces réserves posséderaient chacune leurs propres caractéristiques de remplissage, de relargage et de répartition.

Cette notion nouvelle est relativement importante puisque c'est la répartition spatiale; c'est à dire la compartimentation de ces deux types de stocks ainsi que les interactions réciproques qu'ils peuvent contracter (transfert de

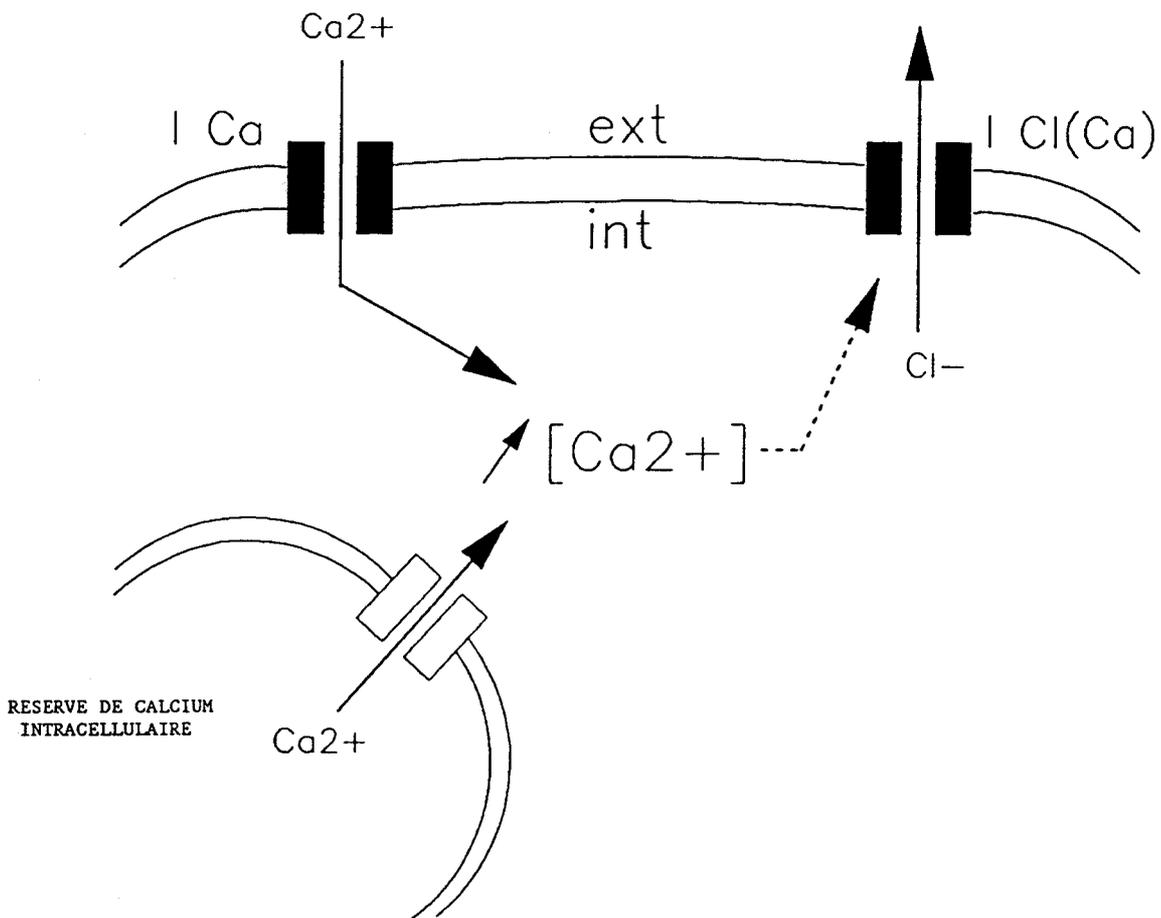


Figure 4 : Illustration schématique des deux modalités principales conduisant à l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire dans l'ovocyte:

- Entrée de calcium dans la cellule via des canaux ou des récepteurs de la membrane plasmique.
- Libération de calcium à partir de réserves intracellulaires (réticulum endoplasmique).

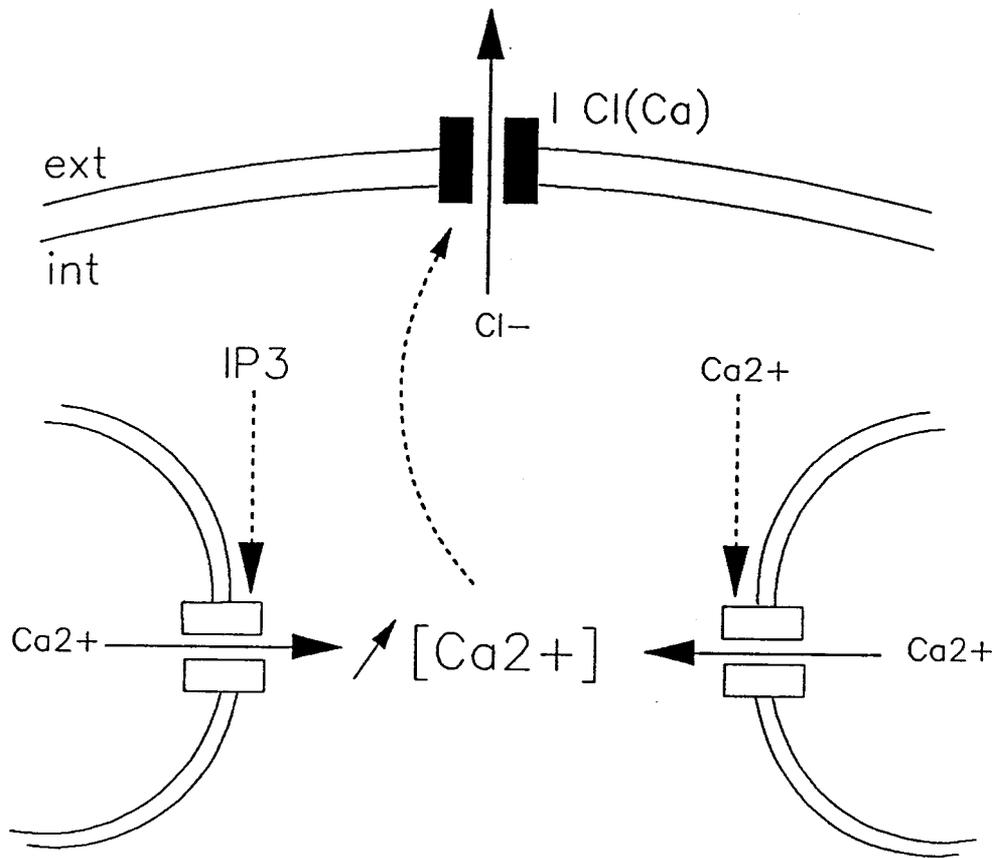


Figure 5 : Représentation schématique des deux modes principaux de libération de calcium par les stocks intracellulaires:

- Libération de calcium induite par l'InsP₃ à partir de stocks InsP₃ sensibles
- Libération de calcium induite par le Ca lui même (mécanisme de Ca induced Ca release) à partir de stocks InsP₃ insensibles.

calcium d'un stock à l'autre), qui permettrait de moduler la nature et l'enveloppe du signal calcique intracellulaire conduisant, de fait, à l'organisation précise et ciblée de l'effet cellulaire qui s'en suit.

En ce qui concerne l'ovocyte de xénope, l'existence de ces deux types de stocks distincts (pour revue voir PETERSEN, 1990) est fortement soupçonnée et des interactions entre eux, favorisées par le GDP et peut être par l'InsP₄, ont déjà été décrites par certains auteurs (SEALFON et coll., 1990). Il semble que les stocks InsP₃ insensibles pourraient amplifier et participer à la propagation, sous la forme de vagues calciques successives, du signal induit principalement par la libération de calcium par les stocks InsP₃ sensibles consécutive à l'activation de récepteurs membranaires (récepteurs de neurotransmetteurs, BERRIDGE, 1989).

En outre, l'entrée de calcium (provenant du milieu extracellulaire) à travers la membrane plasmique peut également s'effectuer selon diverses modalités (FIGURE 6) :

- entrée s'effectuant par des canaux perméants au calcium et dont l'ouverture est conditionnée par un ligand appliqué en externe (receptor operating channels : ROC);

- entrée s'effectuant par des canaux calciques sous la dépendance de la production de seconds messagers particuliers comme par exemple l'entrée de calcium induite par l'Ins(1,4,5)P₃ démontrée par SNYDER et coll., 1989. (second messenger operating channels : SMOC);

- entrée de calcium s'effectuant à travers des canaux calciques sensibles aux variations de potentiel membranaire (voltage operating channels : VOC). De nouveau, l'index chlore peut être utilisé pour déterminer les caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques de ces trois catégories de canaux.

La dépendance de cette conductance chlore vis à vis du calcium intracellulaire a été démontrée de plusieurs façons . D'une part, l'injection intraovocytaire directe de calcium déclenche cette activité chlore (DASCAL, 1987); d'autre part, ce courant de chlore, lorsqu'il est déclenché selon une des modalités précédemment décrites, est aboli par l'injection interne d'EGTA. Jusqu'à lors, les enregistrements effectués en patch-clamp dans la configura-

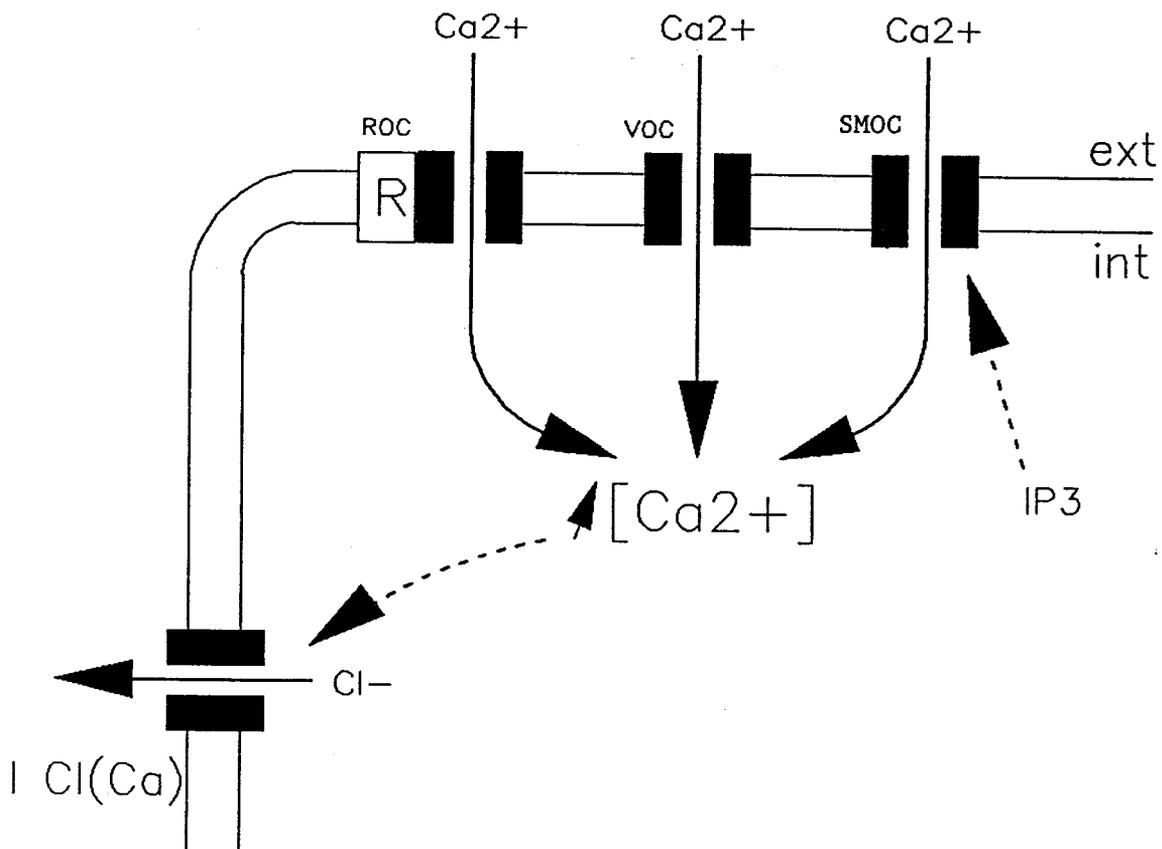


Figure 6 : Représentation schématique des différentes modalités d'entrée de Ca à travers la membrane plasmique de l'ovocyte:

- Entrée s'effectuant à travers un canal directement associé à un récepteur membranaire.
- Entrée s'effectuant à travers un canal calcique voltage dépendant.
- Entrée s'effectuant à travers un canal calcique activé par un second messager intracellulaire.

tion de courant unitaire n'ont permis de dégager qu'une seule conductance chlore (OOSAWA et YAMAGISHI, 1989). A priori, le fait que la conductance décelée soit relativement faible (3,5 pS) semble indiquer qu'un grand nombre de ces canaux soient présents au niveau de la membrane plasmique des ovocytes natifs puisque les courants macroscopiques [ICl(Ca)] enregistrés sur cellule entière sont relativement amples (entre 50 et 500 nA).

Enfin, cette conductance chlore peut être caractérisée pharmacologiquement, puisqu'elle est sensible aux inhibiteurs classiques comme le 9 Anthracène carboxylique (9AC), le DIDS et le SITS et l'acide niflumique (BERTRAG, 1987; WHITE et coll., 1990).

Cette propriété intrinsèque (présence d'un courant de chlore calcium dépendant) de l'ovocyte a été largement exploitée dans l'expression des résultats concernant l'étude des signaux calciques induits par l'activation du récepteur purinergique et par le mécanisme de Ca induced Ca-release transplantés après injection d'ARN.

Bien que cette évaluation de la variation du calcium interne par la mesure de ICl(Ca) interposée soit moins sensible que la technique de microfluorométrie au Fura 2, elle présente l'avantage d'être plus simple à mettre en oeuvre et plus directe pour l'exploitation des résultats.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

Le protocole expérimental permettant d'accéder à la mise en évidence et à l'étude des protagonistes (système de relargage intracellulaire, canaux calciques, récepteur purinergique...) intervenant dans le développement de la réponse purinergique et du mécanisme de Ca induced Ca release transplantés dans l'ovocyte nécessite les étapes suivantes:

_ EXTRACTION ET PURIFICATION DES ARN _

- 1) Choix et prélèvement du tissu
- 2) Extraction des ARN cellulaires totaux
- 3) Purification des ARN messagers (Poly A+ mRNA)
- 4) Contrôle qualitatif des ARN (électrophorèse et traduction in vitro)

_ MICROINJECTION DES OVOCYTES _

- 1) Maintenance et traitement des xénopes
- 2) Prélèvement et défollicularisation des ovocytes
- 3) Microinjection de l'ARN dans les ovocytes
- 4) Culture et maintien en survie des ovocytes

_ DETECTION DES SIGNAUX EXPRIMES _

- 1) Tests électrophysiologiques (suivi des variations de calcium intracellulaire grâce à l'index chlore)
- 2) Tests pharmacologiques (extra et intracellulaire)
- 3) Dosage des phosphoinositides (Ins(1,4,5)P₃)

_ ACQUISITION ET TRAITEMENT DES DONNEES _

A - EXTRACTION DES ARN CELLULAIRES TOTAUX

A1- PRECAUTIONS

Le principal inconvénient rencontré lors de l'extraction d'ARN est la contamination endogène et exogène par les ribonucléases . Les RNAses sont en effet la cause majeure de la dégradation de l'ARN et ces enzymes sont très résistantes et facilement renaturables. La mise au point de la technique d'extraction de l'ARN messenger a constitué une étape essentielle du travail présenté dans cette thèse.

Un ensemble de précautions visant à enrayer l'action de ces RNAses lors de la purification de ARN doivent impérativement être prises:

- toute la verrerie servant à l'extraction des ARN ne doit être employée qu'à cet effet. Par ailleurs, avant chaque extraction, elle doit être traitée à 250°C pendant 12 H. Quand cela est possible, il est préférable d'utiliser des récipients stériles et à usage unique à la place de la verrerie traditionnelle;

- les plastiques (cônes et tubes épendorfs) sont traités pendant 12 heures au diéthylpyrocarbonate 0,1% (DEPC) un puissant inhibiteur des RNAses. Néanmoins, le DEPC réagit avec les résidus adénine du RNA provoquant une inhibition de la traduction in vitro, aussi, il est important d'éliminer ce composé en autoclavant ces plastiques traités à 120°C pendant 20 mm;

- L'isolement des ARN s'effectue constamment avec des gants pour éviter les contaminations par des RNAses exogènes (amenées par l'expérimentateur);

- Dans la mesure du possible, toutes les solutions sont traitées au DEPC 0,1% et ensuite autoclavées. Les tampons contenant du Tris ne peuvent être traités au DEPC;

- L'eau utilisée pour la confection des tampons et pour la dissolution des ARN est une eau pour préparation injectable. Il s'agit d'une eau pyrolysée à 900°C et donc complètement décontaminée en RNAses;

- La qualité de tous les produits utilisés est strictement contrôlée.

Plusieurs techniques d'extraction d'ARN peuvent être utilisées et le choix de l'une d'elles est dicté par la teneur du tissu en RNAses.

La technique employée, inspirée de la méthode standard de CHIRGWIN et coll. (1979), s'est avérée la plus quantitative et la plus compatible avec les impératifs d'une expression *in ovo*. De plus, cette technique a toujours fourni de bons résultats quel que soit le tissu utilisé (cerveau de mammifère, fibres musculaires squelettiques d'invertébré, muscles lisses et muscles cardiaques de vertébré...).

A2- ETAPES DU PROTOCOLE D'EXTRACTION.

I) Etape d'homogénéisation (dénaturation du tissu).

Après le sacrifice de l'animal, les organes sont prélevés le plus rapidement possible et rincés succinctement dans une solution physiologique stérile (Tyrode). Ils sont ensuite plongés dans une solution dénaturante (10 ml/g de tissu) d'isothiocyanate de guanidium (tampon GT) avant d'être homogénéisés, à température ambiante, à l'aide d'un polytron (30 s à pleine vitesse).

Composition du tampon GT

Isothiocyanate de guanidium (FLUKA) : 4M
Citrates de sodium (SIGMA) : 25 mM; pH 7,2
N lauryl sarcosine de sodium (SIGMA) : 0,5%
β mercaptoéthanol (SIGMA) : 0,1 M

L'isothiocyanate de guanidium à forte concentration est un puissant dénaturant de protéines. Le pouvoir dénaturant est renforcé par l'action du sarcosyl (un détergent) et du β mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures. De plus, l'isothiocyanate de guanidium est particulièrement efficace dans l'inhibition des ribonucléases libérées lors de la lyse cellulaire.

Afin d'éliminer l'insoluble, l'homogénat est centrifugé pendant 5 mn à 8000 g, à une température de 20 °C.

II) Ultracentrifugation

Pour 5 ml d'homogénat, il est ajouté 2 g de chlorure de césium solide. Cette étape permet d'éviter la formation d'occlusions induites par les mucopolysaccharides et les glycosaminoglycanes dans le gradient au cours de la centrifugation. Après dissolution complète du chlorure de césium, l'homogénat est déposé sur un coussin de chlorure de césium (1/4 de tube).

Composition de la solution de chlorure de césium

Chlorure de césium (SIGMA) : 5,7 M (densité : 1,707 g/ml)

EDTA (SIGMA) : 0,1 M; pH 7,5

L'ensemble est centrifugé pendant 18 h à 148 500 g à 20 °C (SW40 Ti) Au cours de la centrifugation, un gradient ionique s'établit conduisant à la formation d'un gradient de densité. Les ARN présentant une densité de 1,9 sont séparés des autres macromolécules et sédimentent dans le fond du tube.

III) Précipitation des ARN.

Après centrifugation, le surnageant est soigneusement écarté et l'ARN culotté est lavé deux fois avec de l'éthanol 75%. Le culot partiellement séché est ensuite solubilisé dans un tampon de reprise stérile.

Composition du tampon de reprise

Tris-HCl (SIGMA) : 10 mM; pH 7,5

EDTA (SIGMA) : 1 mM

Il est ajouté ensuite 1/10^e de volume d'Acétate de sodium (pH 5,2) stérile et 2,5 volumes d'éthanol absolu (conservé à une température de -20 °C). Après

agitation, l'ARN est précipité pendant 12 h à -20 °C.

Ultérieurement, le précipité d'ARN est récupéré par centrifugation à 12000 g pendant 20 mn à 0 °C .

IV) Précipitation sélective des ARN

L'ARN peut être précipité sélectivement dans des tampons à fortes concentrations ioniques. En effet, dans ces conditions, les ARN de faible poids moléculaire (ARN 5S et ARN de transfert) et l'ADN restent solubles. Après la première précipitation, les ARN sont repris dans l'eau stérile et sont reprécipités pendant 12 heures à -20 °C dans une solution de chlorure de lithium 4 M. L'ARN précipité est ensuite centrifugé à 12000 g pendant 30 mn à 0 °C . Le culot ainsi obtenu est lavé 2 fois à l'éthanol 75% avant d'être asséché sous un jet d'azote gazeux stérile. Finalement, l'ARN cellulaire total extrait est repris dans l'eau stérile à une concentration finale de 5 mg/ml et aliquoté en échantillons de 5 ul.

Les rendements obtenus par l'emploi de cette technique avoisinent 1,5 mg d'ARN par gramme de tissu frais et le rapport de densité optique 260/280 est compris entre 1,75 et 1,95 , démontrant ainsi une faible contamination protéique .

B - PURIFICATION DES ARN MESSAGERS

Les ARN messagers (poly A+ mRNA) sont purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne d'oligo-dT cellulose (AVIV et LEDER 1972).

I) Préparation de la colonne

0,1 g de résine (PHARMACIA-LKB) sont mis en suspension dans un tampon de reprise (tampon d'éluion). Après avoir été traitée avec NaOH 0.1 N la cellulose est déposée sur une colonne et rincée plusieurs fois avec le tampon de fixation pour l'équilibrer à 0.5 M NaCl.

Composition du tampon d'éluion

Composition du tampon de fixation

TRIS-HCL : 10 mM pH 7,5
EDTA : 1mM

TRIS-HCL : 10 mM pH 7,5
EDTA : 1 mM
NaCl : 0,5 M

II) Dépôt de l'échantillon

L'ARN dissout dans l'eau est dénaturé à 70 °C pendant 3 mn et refroidi rapidement dans la glace . La concentration de l'échantillon est ajustée à 0,5 M NaCl. Par la suite, l'ARN est déposé sur la colonne et il est recyclé pendant 1 h en circuit fermé.

Les ARN poly A- sont élués par rupture du cycle et par un rinçage abondant de la colonne avec le tampon de fixation .

Les ARN messagers poly A+ retenus par la colonne sont, quant à eux, élués avec quatre volumes de colonne de tampon d'éluion (faible force ionique). Les ARNm ainsi obtenus sont précipités pendant 12 h à -20 °C dans l'éthanol en présence d'une solution d'acétate de sodium 0,3 M pH 5,2.

La récupération des poly A+ s'effectue par centrifugation à 12 000 g pendant 30 mn à la température de 0°C . Ils sont ensuite lavés 2 fois à l'éthanol 75% , séchés sous jet d'azote gazeux stérile et repris finalement dans l'eau stérile à une concentration finale de 1 mg/ml avant d'être aliquotés en échantillons de 3 ul et stockés à - 80 °C .

L'ensemble de la manipulation est suivi en continu par la mesure de la densité optique à 254 nm, ce qui permet d'apprécier la qualité du profil d'éluion des ARNm.

C - CONTROLE DE L'INTEGRITE DES ARN MESSAGERS PURIFIES.

L'intégrité de préparation d'ARN messagers a été évaluée systématiquement par l'utilisation de deux méthodes de contrôle ;

1) Des ARN totaux et les ARN poly A+ sont soumis à une électrophorèse dénaturante en gel d'agarose 1% en présence d'hydroxyméthylmercure 10 mM (5 V/cm pendant 2 heures).

Cette technique permet de séparer les ARN essentiellement en fonction de leur taille et la présence d'ARN de haut poids moléculaire (> 28 S) non dégradés

atteste de la validité du protocole d'extraction .

2) Le second contrôle consiste en une traduction des ARN en système acellulaire (lysate de réticulocytes de lapin - AMERSHAM NY90) en présence de méthionine ^{35}S . Les peptides obtenus sont séparés ensuite par électrophorèse SDS PAGE (5 - 15%) et révélés en fluorographie. Seules les préparations d'ARNm générant la présence de peptides traduits de plus de 100 Kdaltons sont utilisées pour l'injection dans l'ovocyte de Xénope .

D - MICROINJECTION DES OVOCYTES.

I) Préparation des ovocytes.

Les femelles adultes de Xénope sont obtenues à l'élevage de Lavalette de Montpellier; elles sont maintenues dans une eau régulièrement renouvelée et nourries une fois par semaine avec du coeur de boeuf.

Pour le prélèvement des ovocytes, l'animal est anesthésié durant 30 mn dans un bain à 0,15 % de tricaine méthane sulphonate (MS 222 SIGMA) . L'animal endormi est positionné sur le dos et les plans cutané et musculaire sont incisés dans la région iliaque permettant un accès direct à l'ovaire. Des lobes ovariens sont prélevés et transférés dans un milieu physiologique de Barth modifié

Composition du milieu de Barth

NaCl : 88 mM

KCl : 1 mM

NaHCO₃ : 2,4 mM

MgSO₄ : 0,82 mM

CaCl₂ : 0,41 mM

Ca(NO₃)₂ : 0,33 mM

HEPES : 10 mM pH 7,4 (NaOH)

Les ovocytes sont ensuite individualisés manuellement et seuls les ovocytes de stades V et VI (diamètre > 1 mm) sont sélectionnés . A ce niveau, l'ovocyte est recouvert d'une membrane vitelline accolée à la membrane plasmique, d'une couche de cellules folliculaires et de la thèque (couche fibreuse renfermant des vaisseaux sanguins) . Pour faciliter les travaux d'injection et d'implantation de microélectrodes (test électrophysiologique) d'une part et pour s'affranchir des interactions électriques et métaboliques ovocyte-cellules folliculaires d'autre part, les ovocytes sont débarrassés de leur thèque et des cellules folliculaires par un procédé enzymatique (figure 7).

La défollicularisation des ovocytes est réalisée par un traitement à la collagénase (BOEHRINGER) à la concentration de 1,5 mg/ml, pendant 2 heures, à température ambiante et dans un milieu dépourvu de calcium.

Les ovocytes non lésés, fraîchement dissociés sont abondamment rincés, transférés dans un milieu de Barth stérile additionné de gentamycine (50 ug/ml). Avant d'être injectés les ovocytes, une nouvelle fois sélectionnés sont laissés au repos pendant 12 heures.

II) Microinjection des ovocytes.

Les ovocytes défolliculés sont injectés au niveau équatorial à l'aide d'une micropipette de verre (préalablement traitée à 200°C) dont le diamètre n'excède guère 15 um reliée à un système d'injection automatique de marque INJECT MATIC (Genève Suisse). Grâce à cet appareil, les volumes injectés sont précis et standardisés. Une contre pression est appliquée en permanence afin de prévenir la remontée par capillarité du milieu (Barth) dans la pipette. Des aliquots d'environ 50 nl d'ARN totaux ou poly A+ sont injectés par cellule. Des ovocytes injectés avec de l'eau stérile ou non injectés servent de témoins. Toutes les cellules injectées sont ensuite incubées pour une période de 2 à 6 jours dans la solution stérile de Barth modifiée additionnée de théophylline (0,5 mM), de pyruvate de sodium (2,5 mM), de pénicilline (100 U/ml), de streptomycine (100 ug/ml) et de gentamycine (50ug/ml) pH 7,4. Le milieu d'incubation est renouvelé chaque jour.

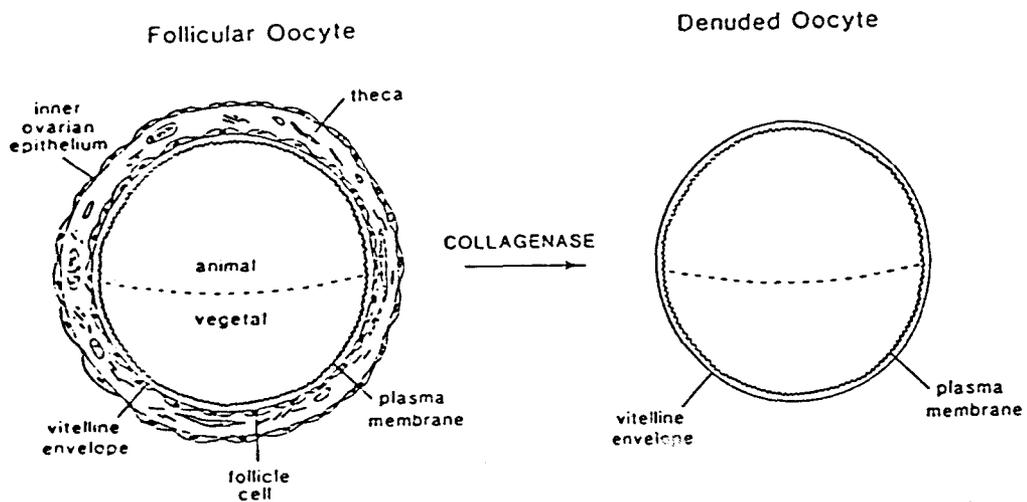


Figure 7 : Représentation schématique de l'ovocyte de xénope dans le tissu folliculaire (à gauche), et après défollicularisation (à droite); d'après SNUTCH, (1988).

E - MESURES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

La détection de l'expression de récepteurs et de canaux s'effectue à l'aide de la technique classique de double microélectrode en configuration de voltage imposé (FINKEL et GAGE, 1984) . Cette technique consiste à stimuler l'ovocyte en lui appliquant de part et d'autre de sa membrane une différence de potentiel constante pendant un temps déterminé. L'enregistrement simultané du courant délivré par l'amplificateur, chargé de maintenir ce potentiel, correspond au courant transmembranaire. Le schéma électrique du montage utilisé est présenté à la figure 8.

Le potentiel de membrane est mesuré à l'aide de deux microélectrodes : l'une de référence au contact du milieu extracellulaire, l'autre implantée dans l'ovocyte. Chaque électrode mesure un potentiel par rapport au potentiel de terre et ceci par l'intermédiaire d'un adaptateur d'impédance . La différence entre ces deux potentiels correspondant au potentiel transmembranaire est évaluée grâce à un amplificateur opérationnel monté de telle manière que le gain en tension soit de 1. Dans les conditions de potentiel imposé, ce potentiel de membrane est, à chaque instant, comparé au potentiel que l'on désire imposer et ceci par l'intermédiaire d'un autre amplificateur monté en contre réaction totale . Le courant débité par cet amplificateur , correspondant au courant membranaire global, est mesuré par l'intermédiaire de la chute de tension qu'il provoque aux bornes d'une résistance de valeur connue et placée entre le milieu extracellulaire et le potentiel de terre. Pour nos expériences, nous avons utilisé un amplificateur avec une tension de sortie de ± 130 V. Il s'agit d'un appareil commercialisé par la société DAGAN INSTRUMENTS (TEV 200) et spécialement conçu pour la mesure de courant membranaire sur ovocyte de Xénope. Il possède un gain variable et permet, en théorie, d'enregistrer des courants membranaires présentant une amplitude de l'ordre 10 mA (valeur 1000 fois supérieure à l'amplitude maximale du courant membranaire global enregistré dans les conditions physiologiques normales. Ainsi, dans les conditions d'utilisation habituelles, le potentiel de membrane lu par la microélectrode de potentiel intracellulaire correspond très fidèlement à la valeur du potentiel imposé par l'expérimentateur . De plus, la gamme de voltage en sortie de l'amplificateur est assez élevée pour éviter la saturation de l'amplitude du courant capacitif, permettant de fait, une imposition rapide du créneau de potentiel.

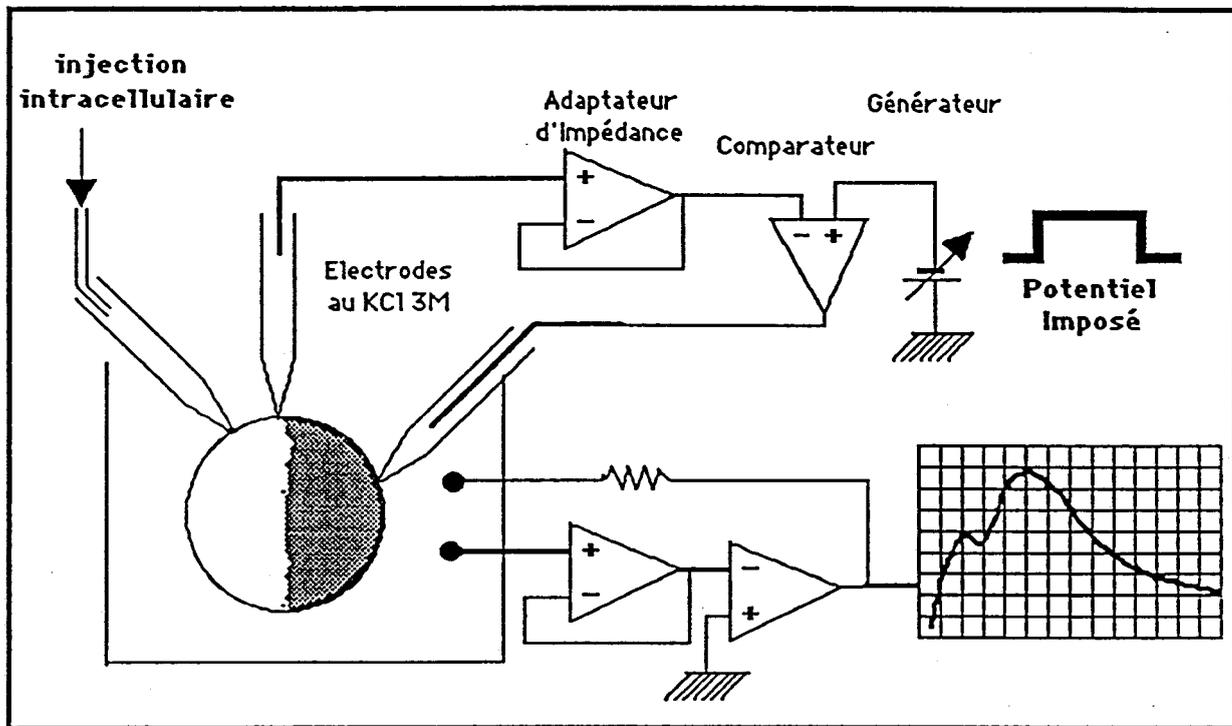


Figure 8 : Schéma synoptique du montage électrophysiologique utilisé pour la détection fonctionnelle de canaux et de récepteurs membranaires dans l'ovocyte de xénope.

- le milieu BaMS. L'enregistrement du courant transitant par les canaux calciques nécessite la substitution du calcium par le barium et du chlore par l'anion imperméant méthanesulfonate. La constitution de ce milieu s'établit comme suit :

- Ba(OH)₂ : 40 mM
- KOH : 2 mM
- TEA(OH) : 50 mM
- HEPES : 5 mM ph 7,3 (avec l'acide méthanesulfonique)

Le tétraéthylamonium (TEA) permet d'inhiber le courant dynamique sortant de K⁺ (antagonisant la visualisation du courant entrant par les canaux calciques). L'intérêt de ce milieu est de permettre l'enregistrement d'un seul courant dynamique activé lors de dépolarisation qui est un courant entrant porté par les ions barium et transitant par les canaux calciques. Nonobstant l'amplitude, ce courant correspond au courant qui, dans les conditions normales (en milieu ND 96) est porté par les ions Ca²⁺. De plus, ce courant porté par les ions baryum ne déclenche pas les mécanismes liés à l'entrée des ions calcium (courant de calcium dépendant) et reflète donc l'activité des canaux calciques.

L'application de substances chimiques "en interne" s'effectue par microinjection intracytosolique de l'ovocyte (figure 4). Ceci est réalisé grâce à une micropipette de verre (diamètre de 4 à 8 um) reliée à une pompe à pression automatique permettant une calibration précise des volumes injectés (INJECT MATIC). La concentration finale du produit injecté est estimée en considérant que le volume d'un ovocyte est de 1 ul et que la quantité injectée correspond à environ 1% du volume de la cellule. Toutes les substances injectées sont solubilisées dans 10 mM HEPES-KOH (pH 7). Dans certains cas particuliers, deux micropipettes d'injection peuvent être utilisées en simultané. Dans ce cas, l'ovocyte est empalé par 4 micropipettes au total : 2 micropipettes d'injection de substances et 2 micropipettes pour l'enregistrement de courant en potentiel imposé.

Les expérimentations sont gérées avec un micro ordinateur de type IBM PC "interfacé" avec une carte de stimulation-acquisition tecmar TM40 (Axon Instrument, USA). Le logiciel pCLAMP (Axon) est utilisé pour la stimulation et l'acquisition des données (CLAMPEX). Les données ainsi digitalisées sont analysées extemporanément par CLAMPAN et CLAMPFIT, les deux modules d'exploitation de pCLAMP.

Un oscilloscope de contrôle et un enregistreur papier moontrace (SEFRAM) sont utilisés lors des expérimentations.

F - DOSAGE DES PHOSPHOINOSITIDES (INSP₃)

Dans certaines expérimentations (caractérisation du récepteur purinergique), la production d'InsP₃ a été déterminée suite à l'activation de récepteurs membranaires implantés dans l'ovocyte après injection d'ARN messagers. Pour évaluer le taux d'InsP₃, 40 à 50 ovocytes injectés sont préalablement incubés pendant 24 h à température ambiante avec 10 µCi/ml de myo-(2-³H)-inositol additionné dans le milieu de Barth. Après plusieurs lavages, les cellules sont traitées pendant 20 mn avec 10mM de LiCl. Elles sont ensuite stimulées pendant 2 mn avec une concentration déterminée d'agonistes (ATP ou ACh). Des ovocytes injectés n'ayant subi aucune stimulation servent de contrôle. La réaction est stoppée par addition d'acide perchlorique à une concentration de 0,5 M suivie d'une homogénéisation immédiate. Par la suite, les extraits cellulaires sont neutralisés avec une solution de 1,5 M KOH dans 75 mM d'HEPES. Ils sont ensuite appliqués sur une colonne d'échange d'anions de type DOWEX AG 1X8 (forme formiate). Une élution "en step" est réalisée en utilisant de l'acide formique 0,1 M et des concentrations croissantes de formiate d'ammonium. La radioactivité de la fraction éluee entre 0,4 et 1 M de formiate d'ammonium contenant l'InsP₃ radioactif est comptée dans un compteur à scintillation liquide (BECKMAN).

Les substances chimiques utilisées (provenant toutes de Sigma Chemicals sauf si une autre provenance est mentionnée) sont :

- adénosine (A), adénosine 5'-monophosphate (AMP), adénosine 5'-diphosphate (ADP), adénosine 5'-triphosphate (ATP), adénosine 5'-(γ -thio)triphosphate (ATP γ S) de Fluka; α,β méthylène adénosine 5'-triphosphate (Me ATP); basilen blue E-3G et cibacron blue 3GA (reactive blue 2: RB2); collagénase de Boehringer Mannheim; inosine 5'-triphosphate (ITP), uridine 5'-triphosphate (UTP), guanosine 5'-triphosphate (GTP); 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-méthylpipérazine (H₇); phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA); D-myo-inositol (1,4,5) trisphosphate (InsP₃); D-myo-inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphate (InsP₄) de boehringer Mannheim; guanosine 5'-o-(2-thiodiphosphate) (GDP β s); guanosine -5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTP γ s), rouge de ruthénium, acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque 8-(diéthylamino) octyl ester (TMB-8); 1,3,7-triméthylxanthine (caféine); acide éthylène glycol bis-(β -aminoethyl ether)-N, N'-tétracétique (EGTA); chlorure de cadmium (CdCl₂); sulfate de néomycine, acide 4-acétamido 4-isothiocyanato stilbène disulfonique (SITS) et acide 9-anthroïque (9AC)

RESULTATS

RESULTATS

I - MISE EN EVIDENCE D'UN MECANISME DE LIBERATION AUTOCATALYTIQUE DE CALCIUM INTRACELLULAIRE (CALCIUM INDUCED CALCIUM RELEASE) EXPRIME DANS L'OVOCYTE DE XENOPE A PARTIR D'ARN_m DE CERVEAU DE COBAYE EMBRYONNAIRE.

Cette étude a été réalisée avec des lots d'ovocytes provenant d'un même animal et la variabilité des résultats est exprimée comme l'erreur standard par rapport à la moyenne avec n indiquant le nombre de cellules contribuant au calcul de la moyenne.

A - Définition des conditions de référence sur les ovocytes témoins non injectés (propriétés natives de l'ovocyte). Mise en évidence de la composante de courant de chlore transitoire dépendante de l'entrée de calcium (T_1).

En condition de voltage imposé, la dépolarisation d'un ovocyte témoin (ovocyte non injecté) amenant le potentiel membranaire à +20 mV à partir d'un potentiel de départ maintenu, "Holding potential", ou HP, de -100 mV, en milieu ionique normal (ND96), déclenche un courant transitoire sortant (T_1) d'une amplitude moyenne de 130 ± 38 nA (n=18, figure 9). Le temps moyen pour atteindre la valeur maximale de ce courant est de 185 ± 40 ms (n=18). Comme cela a été largement mentionné précédemment (voir introduction), ce courant est porté par les ions chlorure et il est dépendant de l'entrée de calcium s'effectuant à travers les canaux calciques endogènes sensibles au potentiel membranaire (MILEDI, 1982; BARISH, 1983). Ceci est confirmé dans la figure 9 dévoilant que ce courant contrôle $ICl(Ca)$ est complètement aboli par l'application externe de cadmium (300 μ M), un antagoniste inorganique traditionnel des canaux calciques. Pour apprécier directement l'activité des canaux calciques soutendant l'apparition de $ICl(Ca)$, les ions chlorure sont supprimés du milieu externe et les ions baryum (40mM), remplaçant le calcium, sont utilisés comme porteurs de charges (voir matériel et méthodes). Dans ces conditions, et comme le montre la figure 9, une ample dépolarisation (de -100 à +20 mV) appliquée sur un ovocyte témoin engendre un courant entrant de baryum s'inactivant relativement lentement de manière monophasique et dont l'amplitude n'excède pas 15 nA. Tout comme le courant $ICl(Ca)$ enregistré en ND96, le courant endogène de baryum est totalement bloqué par le cadmium à la concentration de 300 μ M (figure 9).

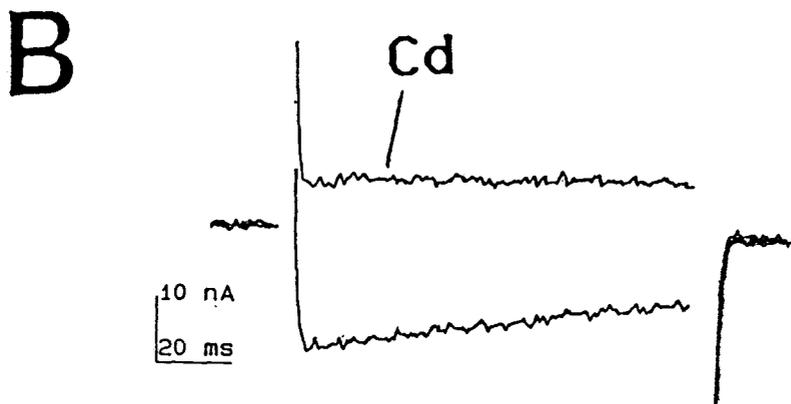
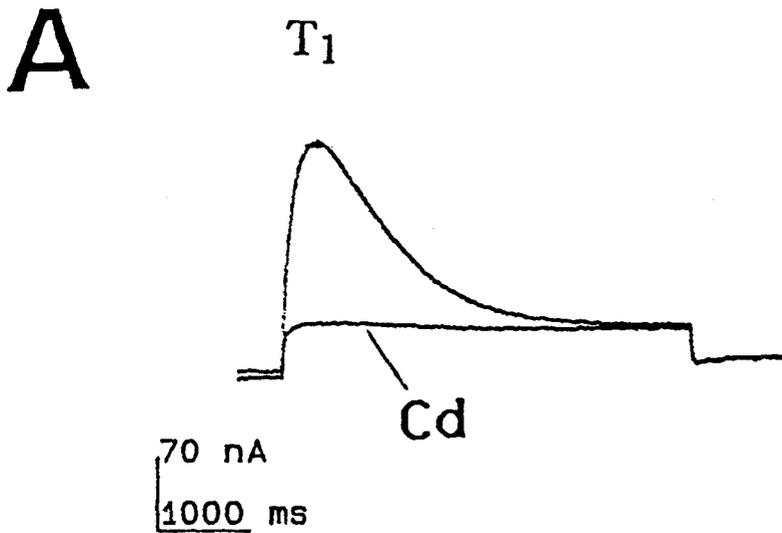


Figure 9 : Courants endogènes typiques de l'ovocyte de xénope témoin activés à +20mV à partir d'un HP de -100mV.

A - Courant sortant de chlore $ICl(Ca)$ enregistré en conditions physiologiques normales (ND96). Une seule composante transitoire T_1 n'est observée.

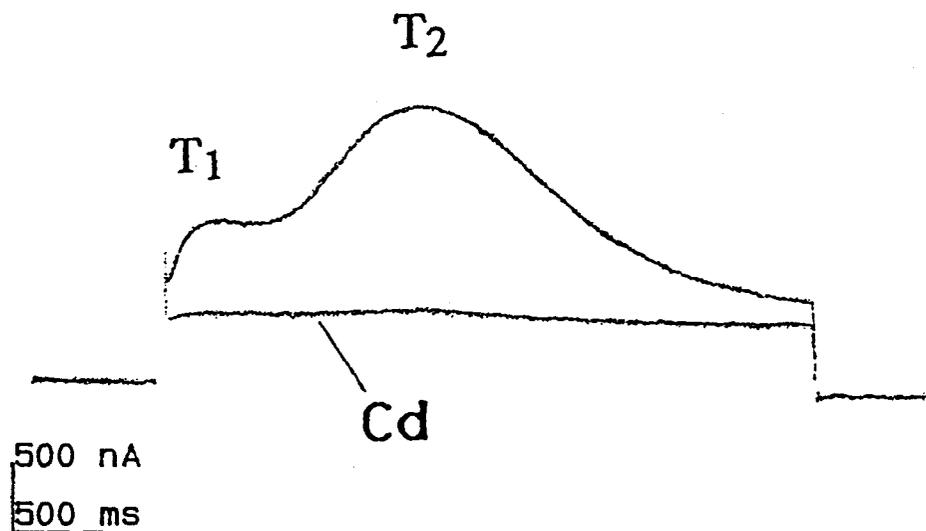
B - Courant entrant de baryum IBa enregistré avec 40mM de Ba externe (BaMS 40).

les deux courants sont totalement abolis lors d'une application externe de cadmium (concentration: 300uM).

B - Cas des ovocytes injectés exprimant des ARN de cerveau de cobaye. Mise en évidence d'une deuxième composante T_2 surnuméraire.

Dans les ovocytes injectés avec l'ARN de cerveau de cobaye embryonnaire, ce courant de chlore $ICl(Ca)$ est amplifié de manière très significative et, par ailleurs, comme l'illustre la figure 10, ce courant exogène peut se manifester sous la forme de deux composantes parfaitement distinctes (T_1 et T_2). La deuxième composante T_2 est également de nature chlore puisqu'elle totalement bloquée par le 9 Anthracène carboxylique (9AC), un puissant inhibiteur des conductances chlore (résultat non illustré, $n=8$). Les deux composantes transitoires tirent leur origine d'une entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire puisque la suppression du calcium externe (OCa/Ba 1,8 mM; résultat non illustré) d'une part et l'application extracellulaire de cadmium (figure 10) d'autre part, engendre une inhibition quasi-complète de T_1 et de T_2 . Les amplitudes moyennes sont de 702 ± 76 nA ($n=22$) pour T_1 et de 893 ± 123 nA ($n=22$) pour T_2 et les temps au pic de 257 ± 44 ms ($n=22$) et de 1124 ± 97 ms ($n=22$) respectivement. La seconde composante transitoire T_2 n'est jamais retrouvée sur les ovocytes contrôles non injectés, ce qui inciterait à penser que les ARNm de cerveau embryonnaire de cobaye spécifient un nouveau processus dans l'ovocyte engendrant une augmentation du Ca intracellulaire après leur injection. Comme cela a été récemment rapporté, la potentialisation de $ICl(Ca)$ peut être, sans conteste, attribuée à l'expression de canaux calciques dans l'ovocyte à partir des ARN de cerveau de mammifère (LEONARD et coll., 1987) entraînant par conséquent une augmentation de la conductance calcique globale. L'activité des canaux calciques exogènes (responsable du développement de $ICl(Ca)$) est mis en évidence en utilisant la solution de méthanesulfonate de baryum (figure 10). L'amplitude moyenne de IBa est de 83 ± 16 nA ($n = 16$) pour une dépolarisation de - 80 à + 20 mV. En accord avec d'autres travaux réalisés sur des ovocytes injectés avec des ARN de cerveau de mammifère ce courant de baryum est insensible aux antagonistes calciques organiques de types dihydropyridines (LEONARD et coll., 1987), de même qu'à l' ω conotoxine. Toutefois, la figure 10 révèle que ce courant IBa est complètement inhibé par le cadmium à la concentration de 300 μ M. Ce courant IBa se manifeste sous la forme d'une seule phase de courant entrant s'inactivant lentement de manière monoexponentielle. En effet, aucune composante surnuméraire ne peut être mise en évidence pour ce courant exogène IBa même lorsque le courant $ICl(Ca)$, enregistré dans les conditions physiologiques normales (ND96) et sur la même cellule, présente pour sa part les deux compo-

A



B

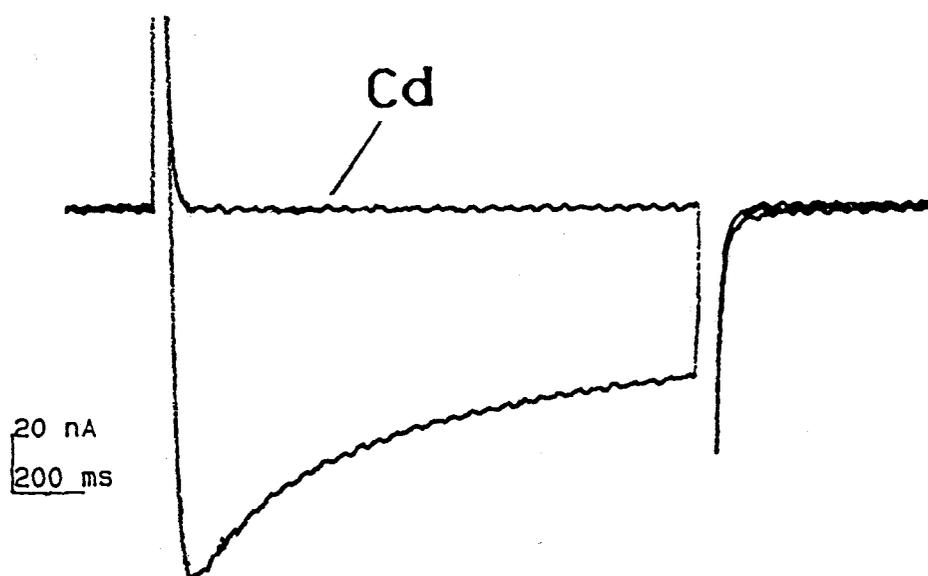


Figure 10 : Courants exogènes activés à +20mV (HP de -100mV) typiques de l'ovocyte de xénope injecté avec des ARN de cerveau de cobaye embryonnaire.

A - Courant sortant de chlore ICl(Ca). Présence de 2 composantes transitoires T₁ et T₂ totalement inhibées par 300uM de Cadmium.

B - Courant entrant de baryum IBa exogène et son inhibition par le cadmium à la concentration de 300uM (noter la différence d'amplitude et de cinétique par rapport à l'ovocyte non injecté)

L'effet du cadmium sur ICl(Ca) et IBa est équivalent à l'effet induit par la suppression du calcium extracellulaire.

santes distinctes T_1 et T_2 .

A la lueur de ces résultats, il semble raisonnable de suggérer que, bien que les mécanismes impliqués dans le développement de T_1 et T_2 puissent être différents, ces deux composantes de courant de chlore se manifestant sur les ovocytes injectés semblent être générées suite à l'entrée de calcium s'effectuant à travers les canaux calciques voltage-dépendants nouvellement exprimé dans l'ovocyte.

C - Relation entre l'activité des canaux calciques et la présence des deux composantes T_1 et T_2 .

Dans le but d'établir la relation étroite existant entre ces deux composantes T_1 et T_2 d'une part et le courant entrant de calcium d'autre part, les propriétés de voltage dépendance de chaque type de courant ont été examinées. Cette étude a été réalisée sur des lots d'ovocytes injectés dans lesquels T_1 et T_2 présentent une amplitude stable en fonction du temps.

les relations courant-potentiel des composantes T_1 et T_2 sont comparées à la relation courant-potentiel de Iba enregistré sur le même ovocyte (figure 11). Nonobstant la différence d'amplitude, Les composantes de courant sortant T_1 et T_2 présentent entre elles, les mêmes caractéristiques de voltage-dépendance (même allure, même seuil et même pic). De plus, le profil "en cloche" de ces deux courbes (T_1 et T_2) est parfaitement symétrique à l'aspect de la courbe courant potentiel de Iba (même seuil d'activation : - 25 mV; et potentiels de pics de courants identiques : + 20mV).

Ces derniers résultats confirment sans ambiguïté le rapport strict s'établissant entre l'entrée de calcium à travers les canaux calciques voltage dépendants et le développement des deux composantes sortantes de courant de chlore T_1 et T_2 .

Comme cela a déjà été établi précédemment, en ce qui concerne l'expression de canaux calciques à partir d'ARN de cerveau de rat, une seule composante de courant baryum ne peut être détectée en fonction du potentiel. Dans des conditions en tous points identiques, nos résultats tirés de l'expression d'ARN de cerveau de cobaye vont tout à fait dans le même sens puisque, dans ce cas également, seul un type de courant baryum n'est visualisé. Il peut être donc déduit que les deux composantes exogènes T_1 et T_2 ne proviennent que d'une seule phase d'entrée de Ca^{2+} s'effectuant à travers un seul type de canal calcique voltage-dépendant. L'injection intracellulaire d'EGTA (concentration

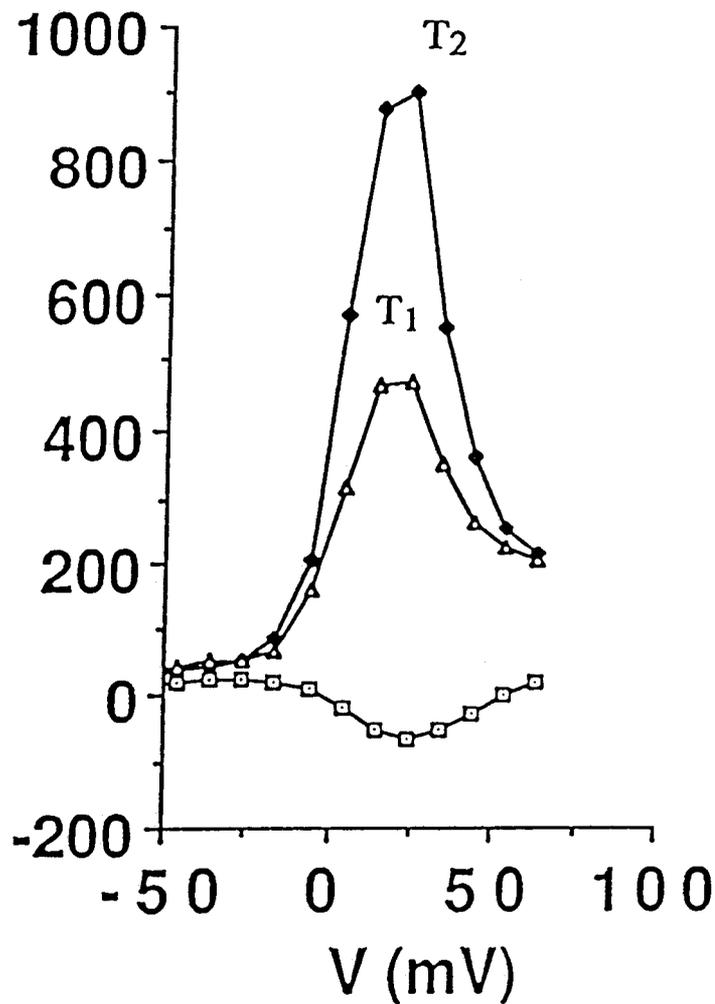
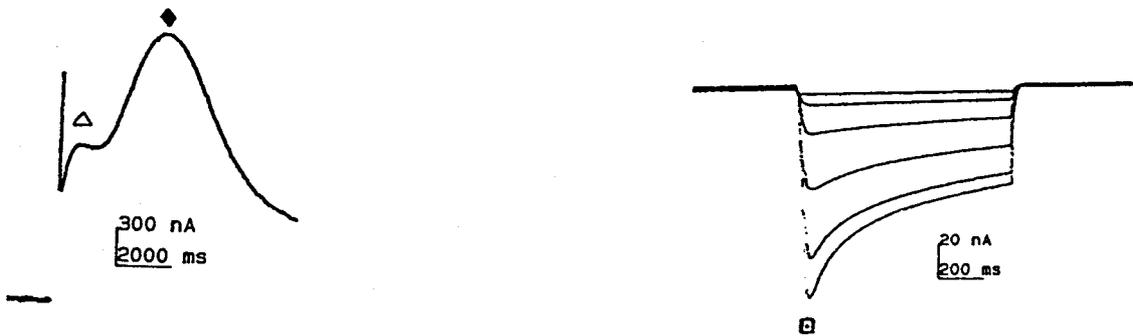


Figure 11 : Relations courant-potential des composantes T_1 et T_2 comparée à celle de IBA. Ces courbes sont établies en portant l'amplitude maximale du courant en fonction du potentiel imposé. Noter la symétrie entre T_1/T_2 et IBA (même seuil, même pic). Les deux insets illustrent :

- à gauche, le courant $I_{Cl}(Ca)$ et ses deux composantes. (Δ) représente le maximum d'amplitude pour T_1 et (\blacklozenge) représente le maximum pour T_2 .
- à droite, la famille de tracés du courant exogène IBA pur (\blacksquare , représente le pic de courant), les courants insensibles au cadmium (300 μ M) ayant été soustraits.

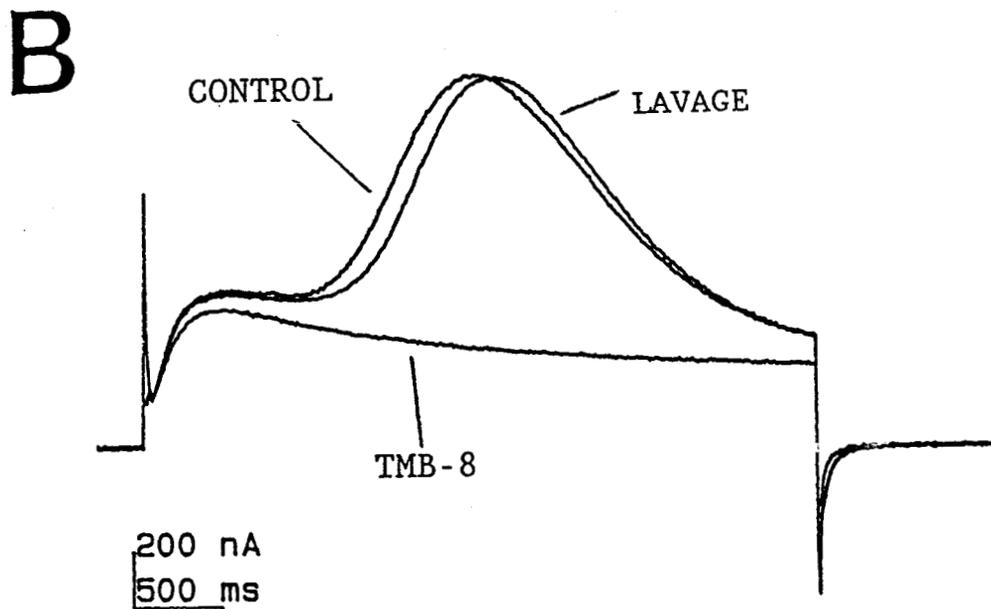
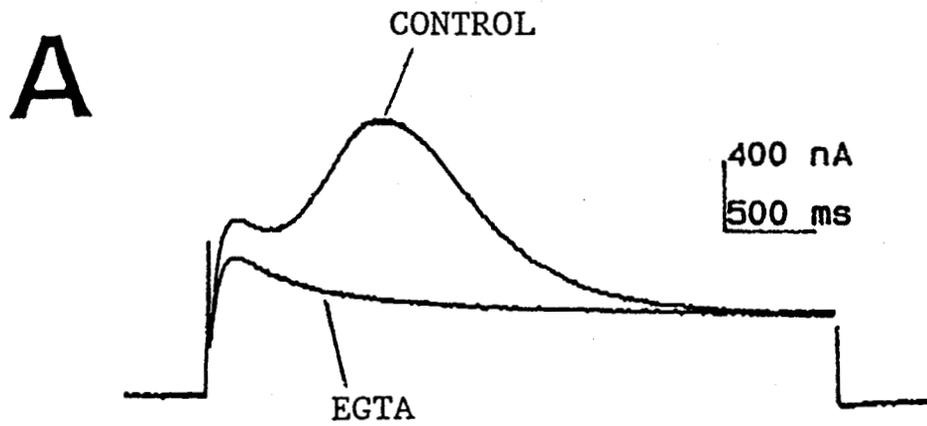


Figure 12 : Effet de l'EGTA intracellulaire (0.2mM) et du TMB-8 extracellulaire (100uM) sur les 2 composantes de la réponse chlore spontanée d'un oocyte injecté avec des ARN de cerveau.

A - Effet de l'EGTA: Inhibition partielle de T_1 et totale de T_2 .

B - Effet du TMB-8 : Inhibition réversible de T_2 ("wash" complet).

finale: 0,2 mM) entraîne une réduction partielle de l'amplitude de T_1 ($62 \pm 9\%$ du contrôle, $n= 8$) et, par contre, une inhibition totale de T_2 (figure 12). De fait, ce dernier résultat semble indiquer que la composante T_2 est plus sensible aux variations intracellulaires de calcium que la composante T_1 .

A la suite de ces différents résultats, il peut être suggéré que T_1 est produite directement par l'entrée de calcium dans l'ovocyte alors que T_2 semble plutôt résulter d'un effet différé dans le temps de cette même entrée de calcium par les canaux calciques voltage dépendants.

D - Rôle des stocks intracellulaires de calcium dans le développement de la composante T_2 . Mise en évidence d'un mécanisme de calcium induced calcium release.

En vue de déterminer plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement de T_2 , nous avons orienté nos investigations sur la détermination du rôle des stocks intracellulaires de calcium. Pour ce faire, des composés tels que le TMB-8 ou la caféïne, connus pour interagir avec l'activité de ces stocks calciques internes, ont été utilisés (MALAGODI et coll., 1974). En l'occurrence le TMB-8 à la concentration de 100 μ M (ou la caféïne) provoque l'inhibition complète et parfaitement réversible de la composante T_2 sans pour autant modifier notablement l'amplitude de T_1 (figure 12). Ceci démontre qu'en plus du calcium externe, la participation des réserves intracellulaires de calcium semble essentielle pour l'apparition de la composante T_2 se manifestant dans les ovocytes injectés.

Un des mécanismes possibles, pouvant rendre compte à la fois d'une dépendance vis à vis du calcium externe et d'un effet différé de ce calcium, est le phénomène de "calcium induced calcium release" (CICR). De récents travaux ont démontré que le rouge de ruthénium et la ryanodine antagonisent la libération de calcium s'effectuant à partir de vésicules de réticulum sarcoplasmique de fibres musculaires striées squelettiques. Par ailleurs, ces substances bloquent l'activité du canal activé par le calcium isolé et reconstitué dans des bicouches lipidiques artificielles (Pallade, 1987). Naturellement, la question posée a été de savoir si ces substances s'avéraient efficaces et pouvaient moduler la composante T_2 induite par le calcium entrant dans l'ovocyte injecté. La réponse est sans ambiguïté puisque sur les ovocytes exprimant cette composante T_2 , l'injection intracellulaire de rouge de ruthénium (concentration finale 10 μ M, figure 13) et de ryanodine (concentration finale 15 μ M, résultat non illustré) entraînent une inhibition spécifique de cette

finale: 0,2 mM) entraîne une réduction partielle de l'amplitude de T_1 ($62 \pm 9\%$ du contrôle, $n=8$) et, par contre, une inhibition totale de T_2 (figure 12). De fait, ce dernier résultat semble indiquer que la composante T_2 est plus sensible aux variations intracellulaires de calcium que la composante T_1 . A la suite de ces différents résultats, il peut être suggéré que T_1 est produite directement par l'entrée de calcium dans l'ovocyte alors que T_2 semble plutôt résulter d'un effet différé dans le temps de cette même entrée de calcium par les canaux calciques voltage dépendants.

D - Rôle des stocks intracellulaires de calcium dans le développement de la composante T_2 . Mise en évidence d'un mécanisme de calcium induced calcium release.

En vue de déterminer plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement de T_2 , nous avons orienté nos investigations sur la détermination du rôle des stocks intracellulaires de calcium. Pour ce faire, des composés tels que le TMB-8 ou la caféine, connus pour interagir avec l'activité de ces stocks calciques internes, ont été utilisés (MALAGODI et coll., 1974). En l'occurrence le TMB-8 à la concentration de 100 μ M (ou la caféine) provoque l'inhibition complète et parfaitement réversible de la composante T_2 sans pour autant modifier notablement l'amplitude de T_1 (figure 12). Ceci démontre qu'en plus du calcium externe, la participation des réserves intracellulaires de calcium semble essentielle pour l'apparition de la composante T_2 se manifestant dans les ovocytes injectés.

Un des mécanismes possibles, pouvant rendre compte à la fois d'une dépendance vis à vis du calcium externe et d'un effet différé de ce calcium, est le phénomène de "calcium induced calcium release" (CICR). De récents travaux ont démontré que le rouge de ruthénium et la ryanodine antagonisent la libération de calcium s'effectuant à partir de vésicules de réticulum sarcoplasmique de fibres musculaires striées squelettiques. Par ailleurs, ces substances bloquent l'activité du canal activé par le calcium isolé et reconstitué dans des bicouches lipidiques artificielles (Pallade, 1987). Naturellement, la question posée a été de savoir si ces substances s'avéraient efficaces et pouvaient moduler la composante T_2 induite par le calcium entrant dans l'ovocyte injecté. La réponse est sans ambiguïté puisque sur les ovocytes exprimant cette composante T_2 , l'injection intracellulaire de rouge de ruthénium (concentration finale 10 μ M, figure 13) et de ryanodine (concentration finale 15 μ M, résultat non illustré) entraînent une inhibition spécifique de cette

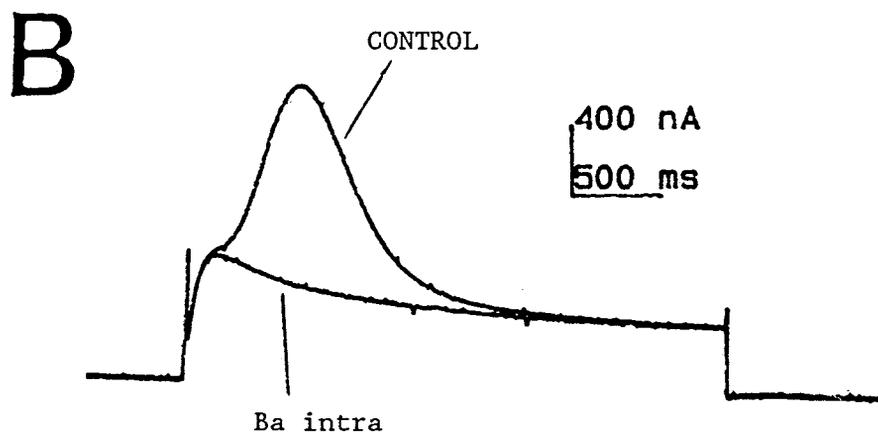
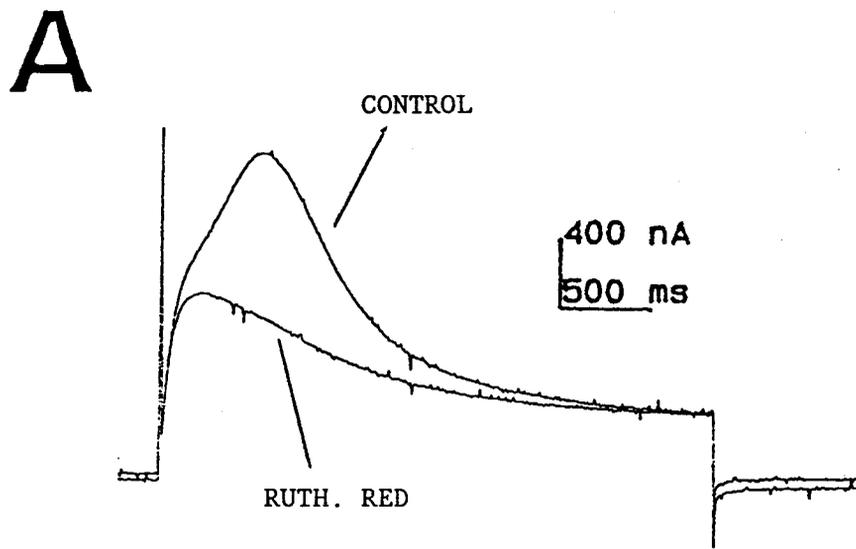


Figure 13 : Effet spécifique de 2 inhibiteurs connus du mécanisme de Ca induced Ca release sur la composante de chlore Ca dépendante T_2 .

A - Injection intracellulaire de Rouge de Ruthénium (concentration finale: 10 μ M).

B - Injection intracellulaire de 250 picomoles de BaCl₂

composante T_2 sans affecter la première composante T_1 ($n = 10$). De plus, ces substances n'altèrent ni l'amplitude, ni le décours du courant entrant de baryum démontrant ainsi que l'effet inhibiteur observé n'est pas lié à une modification de l'entrée de calcium ($n=3$, figure 14).

Par ailleurs, ces résultats ont été étayés par de récentes publications. En effet, il a été rapporté par certains auteurs (GILLO et coll., 1989) que l'injection intracellulaire de $BaCl_2$, un inhibiteur du phénomène de CICR du réticulum sarcoplasmique (PALADE, 1987) inhibe spécifiquement la composante T_2 induite sur des ovocytes injectés avec des ARNm de cerveau de rat nouveau né. Ces expériences ont été reproduites et sont illustrées à la figure 13. Elles montrent que l'injection intraovocytaire de 250 pmoles de $BaCl_2$ conduit au blocage de T_2 . En contrôle, l'injection de 250 pmoles de KCl est sans effet montrant que cette inhibition de T_2 est spécifique des ions Baryum. Enfin et comme avec le rouge de ruthénium, cette injection de $BaCl_2$ ne modifie en rien la première composante T_1 .

E - Conclusion-Discussion

En conclusion, tous ces résultats accumulés concernant l'ovocyte injecté permettent de proposer un modèle selon lequel T_1 est directement engendré par l'entrée de calcium s'effectuant à travers les canaux calciques voltage dépendants alors que la composante T_2 est, quant à elle, induite par un phénomène de CICR asservi à cette même entrée de calcium par les canaux calciques (figure 15).

La composante T_2 n'est retrouvée uniquement qu'au niveau des ovocytes injectés avec des ARN de cerveau de cobaye. Il peut donc être envisagé, à leur propos deux possibilités:

- soit cette deuxième composante T_2 dérive de l'implantation dans la membrane d'une nouvelle conductance chlore du fait de la synthèse d'une nouvelle population de canaux chlore induite par l'ARN injecté;
- soit T_2 résulte d'un mécanisme provoquant une deuxième activation du courant de chlore endogène suite à une augmentation du calcium cytosolique;

La technique de patch clamp dans la configuration d'enregistrement de courant unitaire a permis de démontrer qu'il n'existait qu'une seule conductance unitaire (3.5 pS) pour le courant chlore dans l'ovocyte injecté (OOSAWA et YAMAGISHI, 1989; TAKAHASHI, 1987). Ceci permet de penser qu'en fait, les deux composantes T_1 et T_2 ne sont issues que de l'activation d'un seul type de

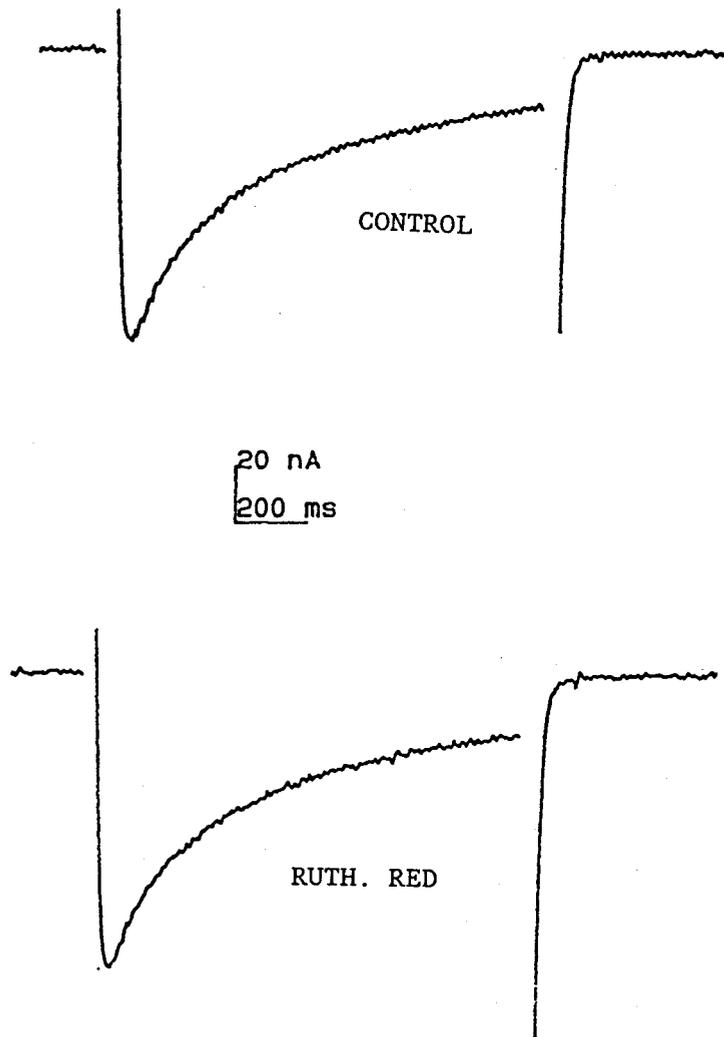


Figure 14 : Figure illustrant que le Rouge de ruthénium ($10\mu\text{M}$ intracellulaire) n'affecte pas le courant I_{Ba}

canaux chlore (canaux endogènes). Ainsi, ces deux composantes sembleraient produites plutôt par deux mécanismes distincts d'élévation de calcium intracellulaire.

L'étroite relation entre les deux composantes chlore et l'activité des canaux calciques voltage dépendants exogènes suggère donc bien que T_1 est directement produite par l'entrée de calcium dans l'ovocyte alors que T_2 résulte d'un effet différé de cette même entrée de calcium attribuée, selon nos résultats à un mécanisme de calcium induced calcium release (figure 15). L'existence de ce processus cellulaire d'augmentation du calcium cytosolique est confirmé par les expériences d'inhibition sélective de ce mécanisme réalisées avec le rouge de ruthénium, la ryanodine ou l'injection de baryum intracellulaire. Ces résultats démontrent que l'ovocyte de xénope est également capable d'exprimer des protéines appartenant au système de membranes intracellulaires et intervenant dans la modulation de l'homéostasie calcique cellulaire.

II - EXPRESSION DU MECANISME DE CALCIUM INDUCED CALCIUM RELEASE - MISE EN EVIDENCE D'UNE SPECIFICITE TISSULAIRE.

1 - Expression du mécanisme de calcium induced calcium-release dans l'ovocyte de xénope à partir d'ARN de fibres musculaires cardiaques de vertébrés.

La présence de ce mécanisme de CICR a été recherchée sur d'autres types de tissus excitables (fibres musculaires cardiaques, lisses et squelettiques) en utilisant le vecteur d'expression ovocytaire comme test fonctionnel de détection. Cette recherche systématique s'est effectuée en utilisant des préparations d'ARNm provenant de tissus reconnus pour induire naturellement dans l'ovocyte l'expression de courants calciques détectables, de grande amplitude et au moins partiellement caractérisés d'un point de vue pharmacologique et électrophysiologique, ceci afin de se placer dans les conditions optimales de détection d'un éventuel mécanisme de CICR relié à une entrée de calcium (pour revue, voir SIGEL, 1990).

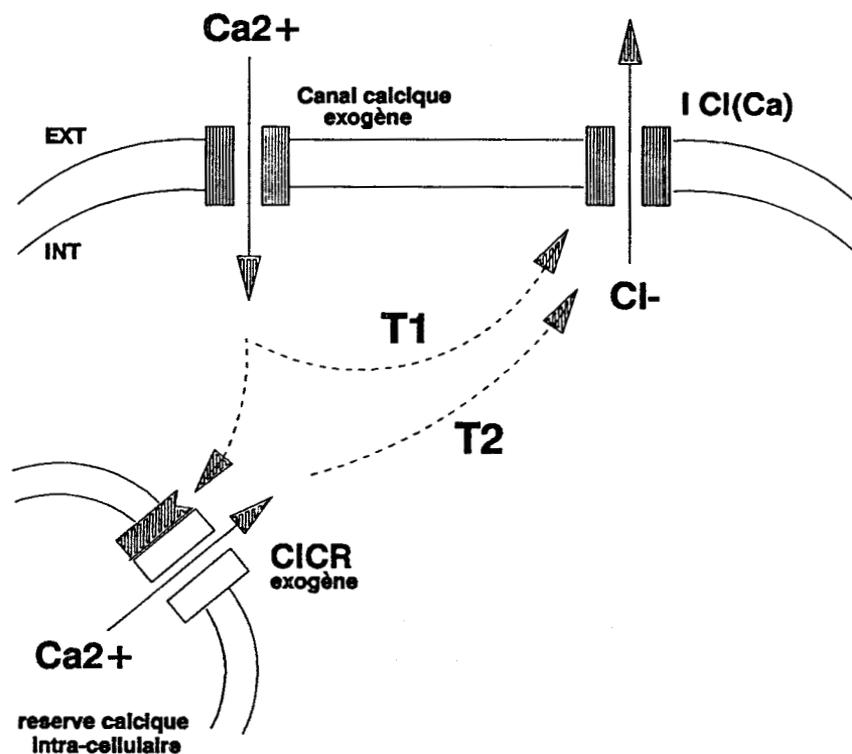


Figure 15 : Schéma illustrant les mécanismes à l'origine des composantes de courant de chlore T_1 et T_2 dans l'ovocyte injecté. La composante T_1 dépend directement de l'entrée de Ca par les canaux calciques voltage dépendant exogènes transplantés dans l'ovocyte. La composante T_2 tire son origine de l'activation d'un mécanisme de Ca induced Ca release (CICR), lui même exogène et stimulé par l'entrée de calcium par les canaux calciques.

L'injection d'ARNm extrait de coeur de rat ou de cobaye conduit à l'expression fonctionnelle d'une seule composante de courant baryum de type L s'inactivant de manière monophasique (figure 16) . Il s'agit d'un courant d'amplitude importante, maintenu, à haut seuil de potentiel d'activation et il est modulé comme le montre cette même figure par les dihydropyridines (DHP) et la phosphorylation dépendante de l'AMPc. La caractérisation électrophysiologique et pharmacologique de ce courant de baryum a révélé une grande similitude entre ce courant exogène exprimé dans l'ovocyte et celui enregistré sur les myocytes ventriculaires (LORY et coll. 1990; MOORMAN et coll., 1987). La présence de ce courant IBa, arborant de telles caractéristiques, rend idéales les possibilités de détection d'un éventuel phénomène de CICR, d'autant que ce mécanisme est naturellement présent dans les cellules natives (myocytes cardiaques; NAKAI et coll., 1990).

D'ailleurs, dans les conditions physiologiques normales (en milieu ND96), la dépolarisation à +20mV d'un ovocyte injecté avec des ARNm de coeur de cobaye produit un courant sortant de chlore calcium-dépendant (sensible à la 9AC) présentant non seulement une première composante précoce T_1 d'amplitude élevée (attestant de la synthèse de canaux calciques), mais aussi la fameuse deuxième composante T_2 retardée similaire à celle observée sur des ovocytes exprimant les ARNm de cerveau de rat (figure 16). La sensibilité aux DHP des canaux calciques cardiaques exprimés fournit un outil supplémentaire de choix pour confirmer que la composante T_2 néoformée après injection des ARNm cardiaques dépend effectivement de l'entrée de calcium par les canaux calciques voltage-dépendants. En effet, comme l'illustre la figure 16, l'application externe de nifédipine, une DHP antagoniste, à la concentration de 5 μ M, inhibe comme attendu la composante T_1 mais aussi la seconde composante T_2 , suggérant, de fait, que T_2 représente bien un effet différé de l'entrée de calcium (phénomène de CICR, figure 16). Cette composante T_2 "cardiaque" est, elle aussi, sensible au calcium externe et par ailleurs, elle est complètement abolie par le TMB-8 (résultat non illustré), par le baryum intracellulaire (résultat non illustré) et enfin par le rouge de ruthénium (concentration intraovocytaire 10 μ M, n=3, figure 16).

Ce résultat démontre sans équivoque que le processus de CICR peut également être exprimé dans l'ovocyte à partir d'ARNm de coeur de cobaye.

L'existence de ce processus de CICR dans les myocytes cardiaques est tout à fait essentielle dans la mise en oeuvre du couplage entre l'excitation

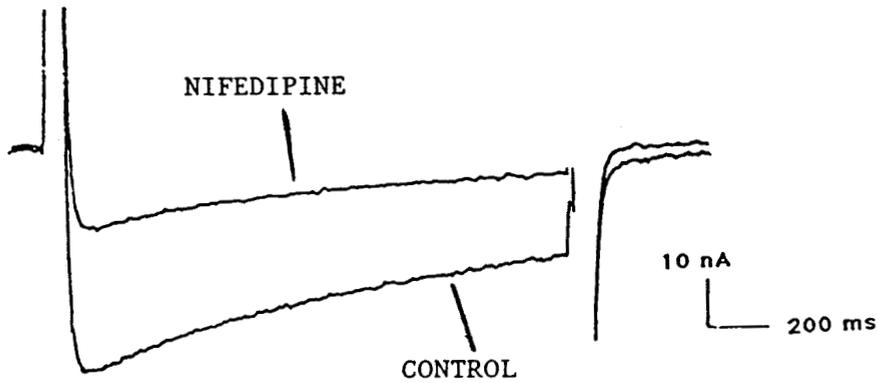
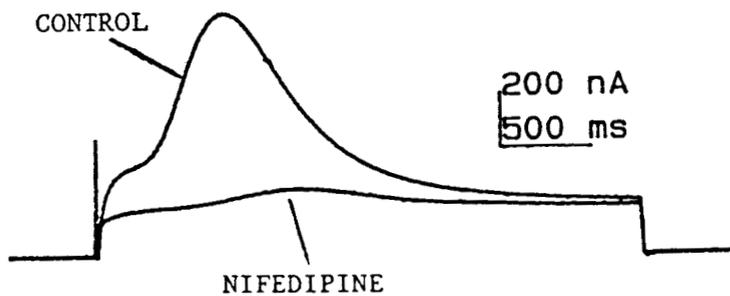
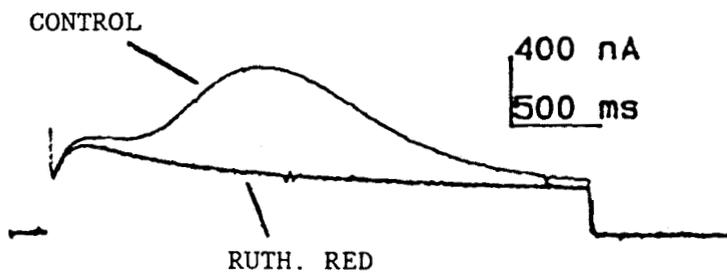
A**B****C**

Figure 16 : Expression du mécanisme de CICR à partir d'ARNm de coeur de cobaye dans l'ovocyte.

A - Courant de Baryum activé dans l'ovocyte par une dépolarisation de -80 à $+10$ mV en milieu BaMS 40. ce courant est partiellement inhibé par la nifédipine(5 μ M), une dihydropyridine antagoniste spécifique des canaux calciques de type L.

B - Le courant $ICl(Ca)$ correspondant présente distinctement les 2 composantes T_1 et T_2 suggérant l'expression du mécanisme de CICR. L'application externe de nifédipine (5 μ M) entraîne l'inhibition simultanée des 2 composantes.

C - Effet différentiel du Rouge de Ruthénium (10 μ M intracellulaire) sur $ICl(Ca)$. L'inhibition se manifeste de manière spécifique sur la composante T_2 .

cellulaire (dépolariation) et la réponse finale c'est à dire la contraction de la cellule cardiaque. En effet, dans ces cellules, il a été récemment montré, grâce à des expériences de réimplantation de canaux calciques de type L dans les myotubes de souris dysgéniques (vecteur d'expression du cDNA cloné du canal calcique) que le développement de la contraction est intimement lié à la présence de ce mécanisme de CICR intracellulaire (contraction dépendante de calcium externe et sensible à la caféine, TANABE et coll., 1990 a). A l'inverse, des expériences similaires montrent que pour les fibres musculaires squelettiques, c'est la fonction "voltage sensor" du canal calcique (sous unité α_1) connectée au système de libération de calcium du réticulum sarcoplasmique qui joue un rôle prépondérant dans le développement de la contraction musculaire (contraction voltage-dépendante et calcium externe indépendante, TANABE et coll., 1990 b).

2 - Cas des autres structures musculaires (fibres lisses et fibres squelettiques).

D'autres types de fibres musculaires peuvent générer des préparations d'ARNm totaux capables d'induire dans l'ovocyte l'expression de canaux calciques voltage dépendants. Ainsi, il a pu être mis en évidence dans notre laboratoire l'expression de canaux calciques à partir d'ARNm provenant des tissus suivants:

- Myomètre de ratte gestante de 18 jours (fin de gestation);
- Fibres musculaires squelettiques de la patte locomotrice de crustacé (*carcinus maenas*).

Les résultats concernant la caractérisation des canaux calciques provenant de ces deux types de tissus sont illustrés par les deux publications suivantes.

PUBLICATION N° 1.

EXPRESSION OF Ba CURRENTS IN XENOPUS OOCYTE INJECTED WITH PREGNANT RAT MYOMETRIUM mRNA.

FOURNIER, F., HONORE, E., BRULE, G., MIRONNEAU, J. and GUILBAULT, P.

European Journal of Physiology. Pflügers Arch. (1989), 413, 682-684.

Short communication

Expression of Ba currents in *Xenopus* oocyte injected with pregnant rat myometrium mRNA

F. Fournier¹, E. Honoré¹, G. Brûlé¹, J. Mironneau², and P. Guilbault¹

¹ Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

² Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université de Bordeaux II, IBCN-CNRS, 1 rue Camille Saint-Saëns, F-33077 Bordeaux, France

Abstract : Using the single electrode voltage-clamp technique, stage V and VI *Xenopus* oocytes showed a Ba inward current (endogenous IBa) with a peak amplitude of -15 ± 2 nA in a Cl and Na-free Ba methane sulphonate medium. When oocytes were injected with pregnant rat (18 days gestation) myometrium mRNA, an additional component of Ba current could be detected (exogenous IBa). This inward current could be distinguished from the native IBa by several means : i) peak amplitude (-75 ± 3 nA) ; ii) activation voltage threshold ; iii) steady-state inactivation parameter ; iv) sensitivity to dihydropyridines. The features of the exogenous IBa were compared to those of the inward Ca channel current recorded with the tight-seal patch-clamp technique in single myometrial cells maintained in primary culture.

Key words : Ba current, mRNA, oocyte, myometrium.

Introduction

Functional voltage-operated channels can be expressed in *Xenopus* oocytes after injection of poly (A)⁺ RNA extracted from various tissues (1-4). Previous work has shown that mRNA from uterus can be used to express gap-junctions proteins and voltage-dependent K current (5, 6). We have used the *Xenopus* oocyte translation system (7) to detect mRNA (messenger RNA) coding for Ca channels in uterine smooth muscle. The properties of these Ca channels are compared to those of isolated myometrial cells maintained in primary culture.

Methods

Preparation of poly (A)⁺ mRNA. Myometrium poly (A)⁺ from pregnant rat (18 days gestation) were extracted by homogenization in a guanidine-thiocyanate medium, ultracentrifugation on a 5.7 M CsCl cushion, phenol/chloroform extraction, ethanol precipitation and oligo (dT)-cellulose chromatography (8). The integrity of the mRNA population was confirmed by reticulocyte lysate translation in the presence of (³⁵S) methionine and SDS polyacrylamide gel electrophoresis to demonstrate that polypeptides up to 100 KDa were abundantly produced.

Preparation and injection of *Xenopus* oocytes. Adult female *Xenopus laevis* were anesthetized in cold 0.15% MS 222 (tricaine methane sulphonate) and oocytes were surgically removed. Following treatment with collagenase-dispase (Boehringer, Mannheim, FRG) at 2 mg.ml⁻¹ for 2 hours in a Ca-free saline solution, healthy denuded oocytes stage V and VI (9) were microinjected with about 50 ng

of myometrial poly (A)⁺. Oocytes injected with physiological solution served as controls. Oocytes were then incubated for up to 5 days at 20°C in a modified Barth's solution containing (mM) : NaCl 88, KCl 1, CaCl₂ 0.41, Ca(NO₃)₂ 0.33, MgSO₄ 0.82, NaHCO₃ 2.4, pyruvate 2.5, theophyllin 0.5, Hepes NaOH 10, pH 7.4. Penicillin and streptomycin were added at 100 U/ml and 100 µg/ml, respectively.

Stimulation, recording and data acquisition. Membrane currents were recorded with a modified single-electrode voltage clamp system (DAGAN 8100-1, Minneapolis, USA). The microelectrodes were filled with 3 M KCl and their resistance ranged from 0.2- to 0.4 Mohms. In the switched mode, the function of the microelectrode alternates between current passing and voltage recording at high frequency. The voltage is measured only when the discontinuous or chopped current is zero, yielding an accurate measurement of membrane potential. The fidelity of recordings was ensured by continually monitoring the head-stage voltage. The procedure was to select a cycling frequency at which the head-stage voltage after current passing returned to true baseline. Cycling frequencies in the range 8-12 KHz were normally possible. Time to reach steady voltage clamp and time to peak inward current for a 90 mV depolarization step were measured to be respectively 15.0 ± 0.3 ms and 29.7 ± 0.6 ms (n = 12). Ba currents were measured in a Cl and Na-free, Ba methane sulphonate solution (BaMs) containing (mM) : Ba(OH)₂ 40, N methyl D glucamine 50, KOH 2, 4-aminopyridin^e 5, TEA-OH 50, MOPS 5, pH 7.2 (titrated with methane sulphonic acid). Experiments were performed at room temperature. Voltage pulses and current traces were simultaneously generated and sampled on line with an IBM PC personal computer. Endogenous (control oocytes) and exogenous (injected oocytes) inward Ba currents were recorded on the same batch of oocytes and experiments were run in parallel.

Isolated myometrial cells. The enzymatic dispersion procedure for isolating single rat myometrial cells and the method of short-term primary culture used in this study were identical to those described previously (10). The whole-cell recordings were performed with fire-polished patch pipettes. Pipettes were connected to the head-stage of a patch-clamp amplifier (List LM/EPC7, Darmstadt, FRG). The data were filtered with a 8-Pole Bessel filter (Frequency Devices, Haverill, USA) at 1 KHz and analyzed with a Plessey VS1 microcomputer. The composition of the external solution was (mM) : BaCl₂ 40, NaCl 76, MgCl₂ 0.24, CsCl 5.6, glucose 11, Tris HCl 8.3, pH 7.4. The composition of the pipette solution was (mM) : CsCl 130, EGTA 10, Cs-oxaloacetate 5, Cs-succinate 5, Cs-pyruvate 5, Hepes CsOH 10, pH 7.4. Experiments were performed

Reprint requests to Dr P. Guilbault

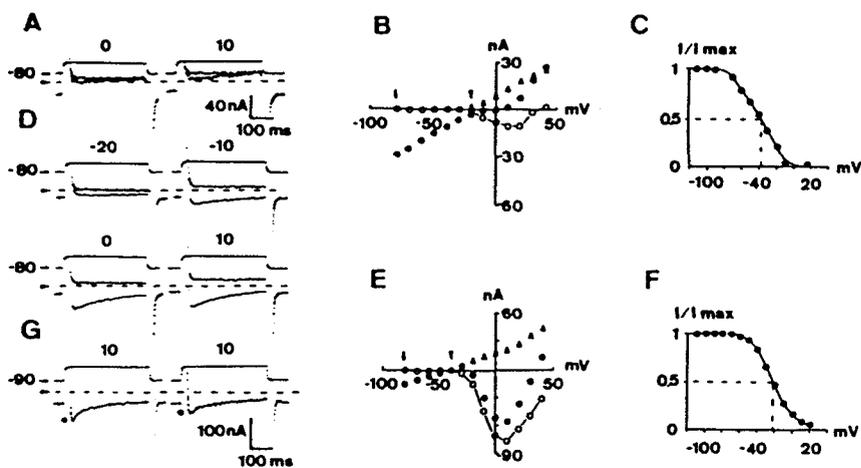


Fig. 1 : (A) Ba currents recorded in control oocytes for various depolarizations steps in BaMs medium (40 mM Ba). The upper traces represent the membrane potentials and the lower traces the membrane currents. Leak currents have been estimated after blocking of the inward Ba currents with 0.1 mM Cd. The arrows indicate the holding potential (-80 mV), the triangles and the dashed lines the zero current. (B) On the current-voltage relationships, peak current (●), leak current (▲), and leak-corrected inward current (○) are represented. (C) In the plots of steady-state inactivation, peak Ba current during the test pulse is normalized to the maximum current and given as a function of membrane potential during the conditioning step (duration 30 seconds). (D) Exogenous IBA recorded in an injected oocyte in the absence and in the presence of 0.1 mM Cd. (E) I-V relationships established for the exogenous peak IBA (●), leak current (▲) and leak-corrected IBA (○). (F) Steady-state inactivation of the exogenous IBA obtained as in C. (G) Blocking effects of 1 μM nitrendipine (1 min superfusion) on the peak exogenous IBA recorded from a holding potential of -90 mV. (○) control, (●) 1 μM nitrendipine.

at room temperature. All the results are expressed as mean \pm S.E. of mean.

Results

Figure 1 shows endogenous (control oocytes) and exogenous (injected oocytes) Ba currents from the same animal elicited by various depolarizing steps from a holding potential of -80 mV. Resting membrane potentials were not significantly different between control (-40 ± 6 mV, $n = 10$) and injected oocytes (-45 ± 6 mV, $n = 10$). Endogenous (control oocytes) Ba currents (IBA) are illustrated in Fig. 1A. Leak current was estimated after blockade of IBA with 0.1 mM Cd. The current-voltage (I-V) relationship for leak-corrected endogenous IBA (Fig. 1B) shows that the voltage activation threshold was -22 ± 1 mV ($n = 12$) and the peak current measured at +10 mV was -15 ± 2 nA ($n = 12$). The time to half-inactivation measured at +10 mV was 163 ± 21 ms ($n = 10$). The steady-state inactivation curve for endogenous IBA is shown in Fig. 1C. IBA was half-inactivated at -37 ± 1 mV ($n = 12$). Figure 1D illustrates exogenous (injected oocytes) IBA elicited by various depolarizing steps from a holding potential of -80 mV. The I-V curve for the leak-corrected exogenous IBA (Fig. 1E) shows that the activation voltage threshold was -37 ± 1 mV ($n = 12$) and the peak current measured at +10 mV was -75 ± 3 nA ($n = 12$). The time to half-inactivation measured at +10 mV was 438 ± 55 ms ($n = 10$). Steady inward current was always recorded at the end of the 400 ms duration depolarizing pulse. The steady-state inactivation curve for exogenous IBA is shown in Fig. 1F. IBA was half-inactivated at -19 ± 1 mV ($n = 12$). As it is well established that dihydropyridines are potent blockers of ICa in myometrial cells (10), we investigated the effects of nitrendipine and nifedipine on the endogenous

and exogenous IBA. Nitrendipine as well as nifedipine (1 μM) did not affect the endogenous IBA (2, 11). On the contrary, both dihydropyridines inhibited the exogenous IBA. Addition of 1 μM nitrendipine for 1 min inhibited the exogenous IBA (HP -90 mV, depolarization to +10 mV) by $38 \pm 1\%$ ($n = 5$; Fig. 1G) without affecting the leak current obtained in the presence of 0.5 mM Cd. The degree of inhibition of IBA by dihydropyridines may be dependent on the existence of a voltage-dependent block mechanism (12, 13).

The exogenous Ba current in BaMs (40 mM Ba) was compared to a current obtained in 40 mM Ba solution in isolated myometrial cells using the whole-cell patch-clamp configuration. Fig. 2A shows a family of currents elicited from a holding potential of -70 mV to various depolarizations in the absence and in the presence of 0.5 mM Cd. The I-V relationship shows a maximum inward current for positive potentials ($+9 \pm 2$ mV, $n = 10$; Fig. 2B). The activation voltage threshold was close to that obtained from the injected oocytes (-31 ± 2 mV, $n = 10$). The time to half-inactivation measured at +10 mV was 58 ± 8 ms ($n = 12$). The potential to half-inactivation (-22 ± 2 mV; $n = 5$; Fig. 2C) was similar to that obtained from the injected oocytes (-19 ± 1 mV; $n = 12$).

Discussion

The Cl-free and Na-free BaMs solution represents the best ionic conditions to detect relatively pure Ba currents in oocytes since in these conditions, leak, K and Cl currents are strongly reduced. This allows to record small endogenous Ba currents in control oocytes (-15 ± 2 nA; $n = 12$) which do not markedly influence the exogenous Ba currents (-75 ± 3 nA; $n = 12$). The results presented in this paper are in favor of Ca channels encoded by myometrial

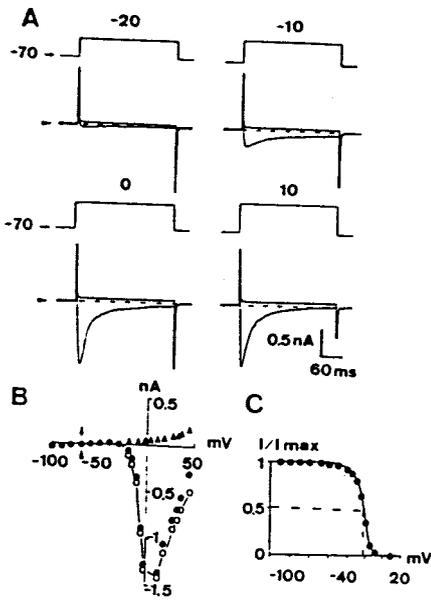


Fig. 2 : (A) Inward currents recorded in single myometrial cells maintained in primary culture in 40 mM Ba solution before and after addition of 0.5 mM Cd. (B) I-V relationships for IBa : (●) peak current ; (▲) leak current recorded in the presence of Cd ; (○) leak-corrected current. (C) Steady-state inactivation of IBa obtained as in Fig. 1C.

mRNA injected in oocytes. This new type of synthesized Ca channel current can be distinguished from the endogenous Ca channel current by several means : i) peak amplitude, ii) voltage activation threshold; iii) steady-state inactivation parameter, iv) sensitivity to dihydropyridines. This newly synthesized Ca channel current described *in ovo* seems to be similar to the Ca channel current elicited in isolated myometrial cells maintained in short-term culture. Nevertheless, inactivation kinetics of the exogenous Ba current appear slower than those recorded in single cells. These discrepancies in time course of inactivation may indicate that kinetics of the *in ovo* Ca channels incorporated in oocytes membrane are modified owing to either a new phospholipid environment or different intracellular regulation mechanisms or contamination by endogenous currents. Further experiments will be needed to resolve this question.

References

1. Dascal N., Lübbert H., Snutch T.P., Davidson N. & Lester H.A. (1986). Expression and modulation of voltage gated-calcium channels after RNA injection in *Xenopus* oocytes. *Science*, 231 : 1147-1150.
2. Leonard J.P., Nargeot J., Snutch T.P., Davidson J. & Lester H.A. (1987). Ca channels induced in *Xenopus* oocytes by rat brain mRNA. *J. Neurosciences*, 7 : 875-881.
3. Gundersen C.B., Miledi R. & Parker I. (1983). Voltage operated channels induced by foreign messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, 220 : 131-140.
4. Goldin A.L., Snutch T., Lübbert H., Dowsett A., Marshall J., Auld V., Downey W., Fritz L.C., Lester H.A., Dunn R., Catterall W.A. & Davidson N. (1986). Messenger RNA coding for only the subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 7503-7505.

5. Werner R., Miller I., Azarnia I. & Dahl G. (1985). Translation and functional expression of cell-cell channel mRNA in *Xenopus* oocytes. *J. Membrane Biol.*, 87 : 253-268.
6. Boyle M.B., Azhderian E.M., MacLusky N.J., Naftolin F. & Kaczmarek L.K. (1987). *Xenopus* oocytes injected with rat uterine RNA express very slowly activating potassium currents. *Science*, 235 : 1221-1224.
7. Gurdon J.B., Lane C.D., Woodland H.R. & Marbaix G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233 : 177-182.
8. Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J. (1982). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
9. Dumont J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus* oocytes (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.*, 155 : 73-78.
10. Amédée T., Mironneau C. & Mironneau J. (1987). The calcium channel current of pregnant rat single myometrial cells in short term primary culture. *J. Physiol. Lond.*, 392 : 253-272.
11. Umbach J.A. & Gundersen C.B. (1987). Expression of a ω -conotoxin-sensitive calcium channels in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from Torpedo electric lobe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 5464-5468.
12. Bean B.P., Sturek M., Puga A. & Hermsmeyer K. (1986). Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries : modulation by dihydropyridines drugs. *Circul. Res.*, 59 : 229-235.
13. Sanguinetti M.C. & Kass R.S. (1984). Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Circul. Res.*, 55 : 336-348.

Received September 28 / Received after revision
December 21 / Accepted December 31, 1988

PUBLICATION N° 2.

EXPRESSION OF CALCIUM CHANNELS IN XENOPUS OOCYTE INJECTED WITH CRAB SKELETAL MUSCLE FIBRE mRNA.

FOURNIER, F., JDAIAA, H., LORY, P., BRULE, G., CURGY, J.J. and GUILBAULT, P.

Biology of the Cell. (1990). 68, 37-42.

Expression of calcium channels in *Xenopus* oocyte injected with crab skeletal muscle fibre mRNA

Franck Fournier¹, Hassan Jdaïâa¹, Philippe Lory², Gérard Brûlé¹,
Jean-Jacques Cury³, Pierre Guilbault^{1*}

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université des Sciences et Techniques de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex;

²Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, CNRS UPR 8402, route de Mende, 34033 Montpellier;

³Laboratoire d'Endocrinologie des Invertébrés, CNRS URA 148, Université des Sciences et Techniques de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

(Received 20 April 1989; accepted 10 November 1989)

Summary – Using the whole cell voltage-clamp technique and a Cl free and Na free Ba methane sulfonate solution, stage V and VI *Xenopus* oocytes demonstrated a Ba current (endogenous component) with a peak amplitude average of 6 nA (6 ± 2 nA). When oocytes were injected with crustacean skeletal muscle mRNA, an additional component of I_{Ba} could be detected (exogenous I_{Ba}). The latter current could be distinguished from the native one by several electrophysiological means: a peak amplitude average of 90 nA (90 ± 4 nA), activation potential threshold, steady state inactivation properties and sensitivity to Ca blockers. As shown by Jdaïâa and Guilbault in crustacean skeletal muscle fibres, exogenous I_{Ba} could be divided into two components: a “fast component” and a “slow component” probably passing through two types of Ca channels (fast and slow) since the peak Ba current voltage relationship was biphasic and the fast component of exogenous I_{Ba} was less sensitive than the slow to nifedipine. The features of the newly synthesized channels incorporated in the *Xenopus* oocyte membrane suggest that they may be associated with fast and slow channels, previously described in many preparations, particularly in crustacean skeletal muscle fibres.

calcium channel mRNA / crab skeletal muscle / *in vivo* translation

Introduction

Excitable cells of vertebrates and invertebrates often possess 2 types of voltage-sensitive Ca channels [4, 5, 13, 14, 16]. These different Ca channels have been named as the long-lasting type (L type) and the transient type (T type) [17] on the basis of physiological parameters and sensitivity to pharmacological agents (dihydropyridine and Cd^{2+} ions). In order to characterize various forms of voltage-gated Ca channels, it would be useful to study them in a similar membrane environment, with the aim of resolving the problem of multiplicity of Ca channels.

Proteins are translated by *Xenopus laevis* oocytes following the microinjection of heterologous mRNA into the oocyte cytoplasm [12]. Of particular interest is the synthesis of various receptors and ion channel proteins; the latter have been assembled into cell plasma membrane after microinjection of poly (A)⁺ mRNA isolated from various chemically or electrically excitable tissues [2, 11, 20]. Recently, Dascal and colleagues [7, 19], Fournier *et al* [10] reported the appearance of new divalent cation currents in *Xenopus laevis* oocytes injected with mRNA from brain, heart or smooth muscle of the rat. The present investigation involves similar experiments in which oocytes express 2 components of Ca channels, following mRNA microinjection from crustacean muscle fibres. In 40 mM Ba^{2+} , free of Cl^- and Na^+ ions medium, the inward Ba current was composed of a fast inactivating component and a steady component. Thus, the existence of two types

of Ca current (fast and slow), similar to those described by Jdaïâa and Guilbault [13] in crustacean skeletal muscle fibre, is therefore discussed.

Although this paper confirms the presence of fast and slow channels in crustacean muscles, it should be noted that this is the first demonstration of Ca channels being translated by *Xenopus laevis* oocytes following microinjection of mRNA extracted from skeletal muscle fibres. The data presented here constitute the initiation of a more extensive study of the role of such channels and, in particular, of the fast channel in excitation-contraction coupling. Incorporated into the oocyte membrane, the regulating of activity of this last channel can be developed with the aid of previously available pharmacological techniques. Moreover, it is easy to inject the oocyte with various regulating substances which modulate channel activity. The muscle fibre itself is not available for this study because such Ca channels are confined to the terminal portions of the extensive T tubules.

Materials and Methods

Total RNA was extracted from the fibre of the crab *Carcinus maenas* using a guanidium thiocyanate extraction method [2, 6], and subjected on to an oligo-dT cellulose column. mRNA were injected into stage V and VI immature oocytes of *Xenopus laevis* [8]. For experiments presented here, 5 females have been used. Oocytes injected with physiological solution served as controls. After injection with mRNA or physiological solution (ND96 solution), oocytes were incubated at 21°C for 6–9 days in a modified Barth's solution containing (mM): NaCl 88, KCl 1, $CaCl_2$ 0.41, Ca (NO_3)₂ 0.33, $MgSO_4$ 0.82, $NaHCO_3$ 2.4, pyruvate 2.5,

* Correspondence and reprints

theophyllin 0.5, Hepes 5, pH 7.4. Penicillin and streptomycin were added 100 U/ml and 100 μ g/ml, respectively. When cells were investigated for ionic currents under normal ionic conditions, they were incubated in the normal ionic solution (ND96 solution), its ionic composition (mM) being: NaCl 96, KCl 2, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 2, Hepes 5, pH=7.4. Ba currents were obtained from oocytes incubated in the barium methanesulfonate solution (40 mM Ba solution), its ionic composition (mM) being: Ba (OH)₂ 40, KOH 2, 4-aminopyridine 5, TEA-OH 50, Mops 5, pH 7.2 (titrated with methane sulfonic acid). Membrane currents were recorded with a modified single electrode voltage clamp system [for further details, see 10].

Results shown in the figures give an example of traces which are representative of the mean. Each set of experiments was carried out at least 8 times.

Results and Discussion

Comparison of membrane current in control and injected oocytes with poly (A)⁺ mRNA

In a normal physiological solution (ND96 solution) the depolarization of control oocyte membrane (fig 1A1) from a holding potential of -100 mV to 20 mV produced a transient outward current, usually 50 nA in amplitude. Previous studies have shown the transient current to be a chloride current $I_{Cl(Ca)}$, evoked by entry of Ca through

voltage dependent Ca channels [1, 15]. The current was totally inactivated at a holding potential of 20 mV (fig 1A1). In Cl-free solution with a high concentration of Ba, both the leak and the slow outward currents were reduced, $I_{Cl(Ca)}$ disappeared and a transient inward current was observed by depolarization from a holding potential of -110 mV. This current, called the endogenous I_{Ba} , was smaller than most currents observed in control *Xenopus* oocytes. The net peak amplitude (after subtraction of the leak current) was usually less than 10 nA. I_{Ba} was transient and was almost completely inactivated by a holding potential of 30 mV (fig 1A2). Oocytes injected with crustacean muscle fibre mRNA showed an increase of both $I_{Cl(Ca)}$ up to 250 nA (fig 1B1), from a holding potential of -100 mV and I_{Ba} up to 80 nA (fig 1B2) compared with control oocytes (fig 1A1, A2). Both currents also showed inactivation at a holding potential more positive than 0 mV (fig 1B1, B2).

Description and characterization of the exogenous inward current

Figure 2 shows the representative exogenous inward current passing through the new Ca channel in 40 mM Ba solution. The Cl-free and Na-free Ba Ms solution represents the best ionic conditions to detect relatively pure Ba currents in oocytes since in these conditions, leak, K

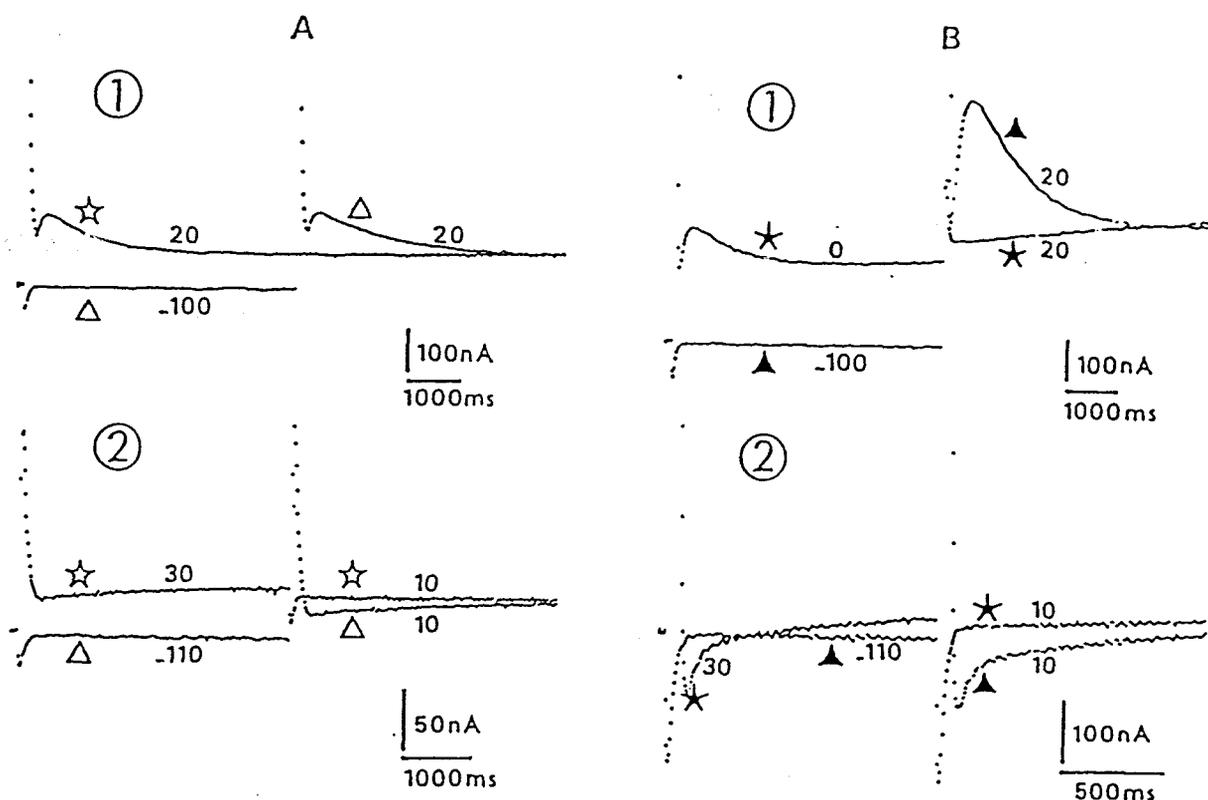


Fig 1. Examples of representative ionic currents ($I_{Cl(Ca)}$ -traces 1 and I_{Ba} -traces 2 recorded respectively, in ND96 and 40 mM Ba solutions. A and B correspond to membrane currents recorded, respectively, in control oocytes (open symbols) and oocytes injected with mRNA (filled symbols). From a HP of -90 mV, for different traces indicated by different symbols, test pulse was preceded by a conditioning pulse of 4 s duration. The value of imposed membrane potential is indicated for each trace. 1, $I_{Cl(Ca)}$ in control oocyte (panel A1) and oocyte injected with mRNA from crab skeletal muscle fibre (panel B1); oocytes bathed in normal ionic solution (ND96 solution); 2, I_{Ba} in control oocyte (panel A2) and injected oocyte (panel B2); oocytes bathed in 40 mM Ba solution. Mean of the peak Ba current measured at 10 mV in control oocytes was 6 ± 2 nA ($N=12$) and under the same conditions in injected oocytes was 90 ± 4 nA ($N=12$). These results are expressed as mean \pm SE of mean.

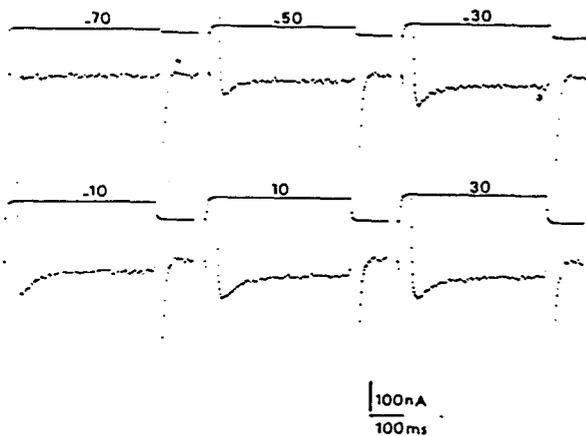


Fig 2. Representative total currents recorded in injected oocyte for various depolarizing steps in 40 mM Ba solution. The upper traces represent the membrane potentials and the lower traces the membrane currents. In this Ba solution, a large exogenous I_{Ba} appeared. Holding potential: -90 mV.

and Cl currents are strongly reduced [7, 19]. Within 6–9 days after injection of mRNA into oocytes, the latter displayed a Ba current with amplitudes of 60–120 nA. The period between microinjection of mRNA and measurements was relatively long, different from most other known cases (2–4 days). However, expression of Na channels translated by *Xenopus* oocytes after injection of skeletal muscle mRNA was also relatively long since Sigel [18] has shown that maximum of the exogenous Na current was obtained 6 days after injection. In effect, as written by Sigel: "New incorporation of active channel could be observed up to 9 days after injection". As shown in figure 2, from a holding potential of -90 mV, the inward Ba current first appeared at a threshold potential of -70 mV. The peak amplitude of the inward current increased with greater depolarizing potential steps, and the activation as well as inactivation processes became more rapid. The inward current did not completely inactivate and the steady

inward current remained at the end of the depolarizing pulse of 500 ms. This inward current was decreased by adding $100 \mu\text{M}$ Cd (fig 3A) or $1 \mu\text{M}$ nifedipine (fig 3B). Subsequent experiments revealed that the Cd as well as the nifedipine did not completely inhibit the Ba current of injected oocytes with mRNA. However, the percentage of inhibition was less with nifedipine.

The relationship between I_{Ba} and membrane potential ($I_{Ba}-E_m$ relation), established from records of 5 oocytes injected by crustacean muscle mRNA is shown in figure 4. The presence of 2 Ba currents passing through two types of Ca channels (fast and slow) seems evident, since the peak-current voltage relationship is biphasic. Evidence for two types of Ca channels has been previously reported by Jdaïâa and Guilbault [13], and confirmed in 1987 by Zaradnik and Zachar [21] in crustacean skeletal muscle fibre. The present data demonstrate that this inward Ba current is composed of 2 components which differ in potential dependence and kinetics (fig 2). As shown in figure 4, an initial (less regular than the other) low amplitude component was activated at potentials of -70 to -60 mV. It presented a clearly time-dependent inactivation (see also fig 2). The second high amplitude component was activated at a membrane potential of -40 to -30 mV and its inactivation developed very slowly. In figure 4 the hump on the descending branch of the curve clearly separates two potential-dependent activation processes. The activation of the second began at depolarizations at which the first current component had already reached its maximum value. The presence of a hump in the current-voltage relationship also led Fedulova *et al* [9] to propose the existence of 2 Ca channels in rat neurone membrane. The total I_{Ba} in oocytes injected with muscle mRNA was inhibited (50–90%) by $100 \mu\text{M}$ Cd or $1 \mu\text{M}$ nifedipine (fig 3). However, available data were not sufficiently accurate to determine whether the fast or slow component was selectively inhibited. The results are qualitative, but with high concentrations of Cd, such as $100 \mu\text{M}$, the endogenous and the long-lasting types of Ca channels incorporated in the membrane of oocytes were probably inhibited more than the exogenous transient Ca channels. These last channels are known to be weakly sensitive to Cd^{2+} ions [3].

It was more convenient to study the inactivation of the I_{Ba} utilizing experimental pulses, in which, following a

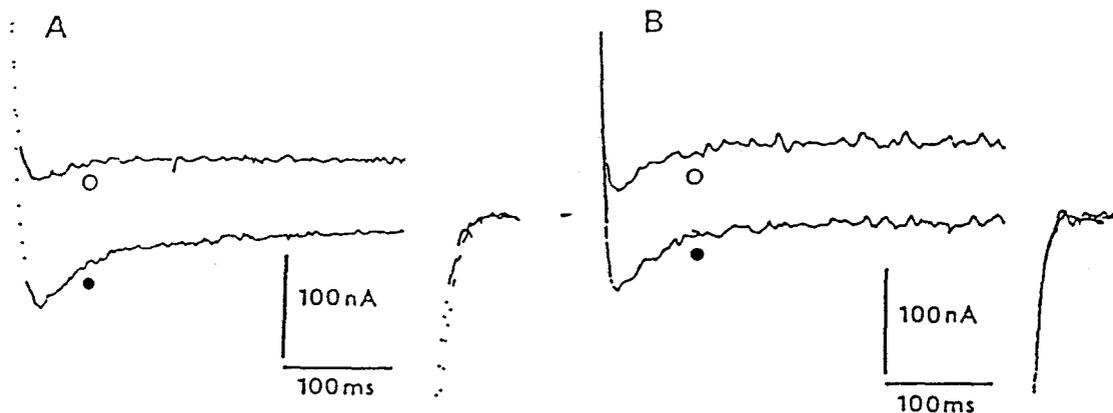


Fig 3. Effect of $100 \mu\text{M}$ Cd (A) and $1 \mu\text{M}$ nifedipine (B) on the inward current measured at 10 mV in oocytes injected with mRNA from crab skeletal muscle in Ba solution. Tracings (●A) and (●B) are control tracings, recorded before addition of Cd or nifedipine to Ba solution and tracings (○A) and (○B) recorded, respectively, after addition of $100 \mu\text{M}$ Cd or $1 \mu\text{M}$ nifedipine. Holding potential: -90 mV.

variable depolarizing pulse, a second pulse (corresponding in amplitude to the peak of the current-voltage curve, 10 mV) was applied immediately after the 1st pulse of 5000 ms (fig 5). The Ba current was divided into 2 components of inactivation, a transient type and a long lasting type. The respective instantaneous currents, i_{O1} and i_{O2} are plotted against prepulse potentials as shown in figure 6. The instantaneous transient component was completely inactivated when the holding potential was more positive than -10 mV. The instantaneous lasting current, i_{O2} , demonstrated a small amount of steady-state inactivation with a holding potential of -30 mV.

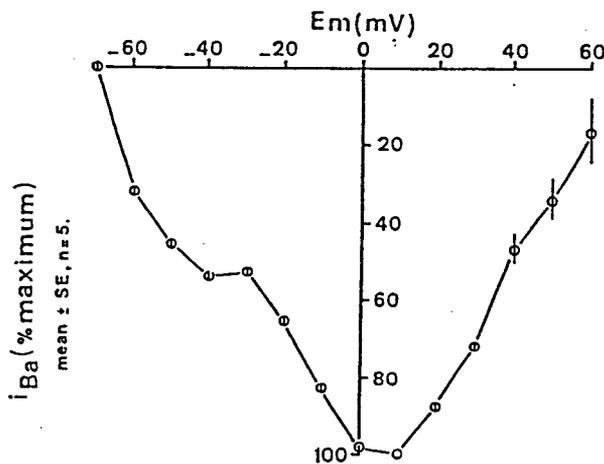


Fig 4. Normalized peak Ba current voltage relationship corresponding to the mean of Ba current measured in 5 oocytes injected with mRNA crab skeletal muscle fibre, bathed in 40 mM Ba solution. I_{Ba} corresponded to the leak-corrected inward current; leak currents have been estimated after blocking of the inward Ba current with 0.5 mM Cd. 100% correspond to the maximum inward current measured at membrane potential of 10 mV for the 5 oocytes. As indicated in figure, at each percentage value is shown standard error of the mean. Note that this I_{Ba} -voltage relationship is particular, presenting a hump in its descending branch.

As shown previously, with the same 2 pulse procedure, the characteristics of steady state inactivation as a function of the membrane potential of the total exogenous I_{Ba} was tested at its maximum and 200 ms after the beginning of the test pulse. Duration of the conditioning pulse was 5000 ms. Figure 7A shows the dependence of the steady state inactivation at the maximum of I_{Ba} , corresponding largely to the first component of inactivation (see also fig 6). The potential at which the inactivation parameter (h_{∞}), equal to 0.5, was -45 mV. As shown in figure 7B, 200 ms after the beginning of the test pulse, h_{∞} was equal to 0.5 at a potential of -5 mV. The decrease of the I_{Ba} lasting component became obvious at holding potentials above -40 mV. Thus, this latter component seems to be less sensitive at the large negative potential as compared to the transient component.

Conclusion

In this study, arguments are presented for the existence of two types of Ca channels incorporated in the membrane of the *Xenopus* oocyte injected with crustacean muscle fibre mRNA. One type seems to be transient and the other long-lasting. Cd (100 μ M) seems to inhibit much of the long-lasting type and the endogenous channel, while nifedipine (1 μ M) affects only the long-lasting Ca channel. These data agree with results that Jdaïã and Guilbault [13] have reported concerning the existence of 2 types of Ca channels in crustacean muscle fibre. These authors described a Ca current elicited by depolarization that quickly inactivates (fast inactivating channel) and an other that slowly inactivates (slowly inactivating channel). Comparison of present data with results of numerous authors leads to the following hypothesis: the 1st and 2nd components would correspond respectively to the fast slow currents passing by fast and slow channels incorporated in the oocyte membrane.

Acknowledgments

Financial support was provided by the Association Française Contre les Myopathies.

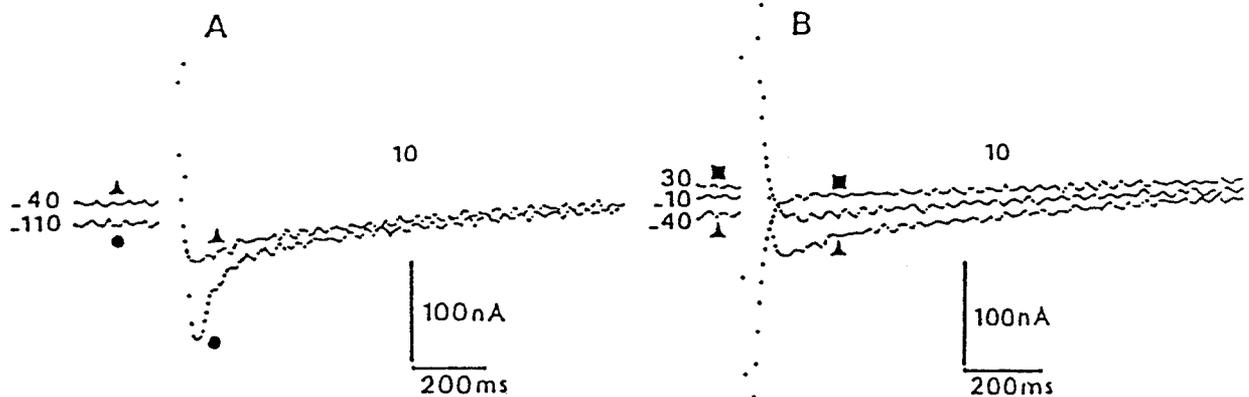


Fig 5. Effect of a conditioning membrane potential on the peak of exogenous I_{Ba} recorded from oocyte injected with mRNA bathed in 40 mM Ba solution. Inward currents evoked by test pulses were largely dependent upon membrane potential during conditioning pulses of 5 s duration. As indicated in figure, membrane potentials during test pulses were 10 mV and during conditioning pulse were -110 , -40 , -10 and 30 mV.

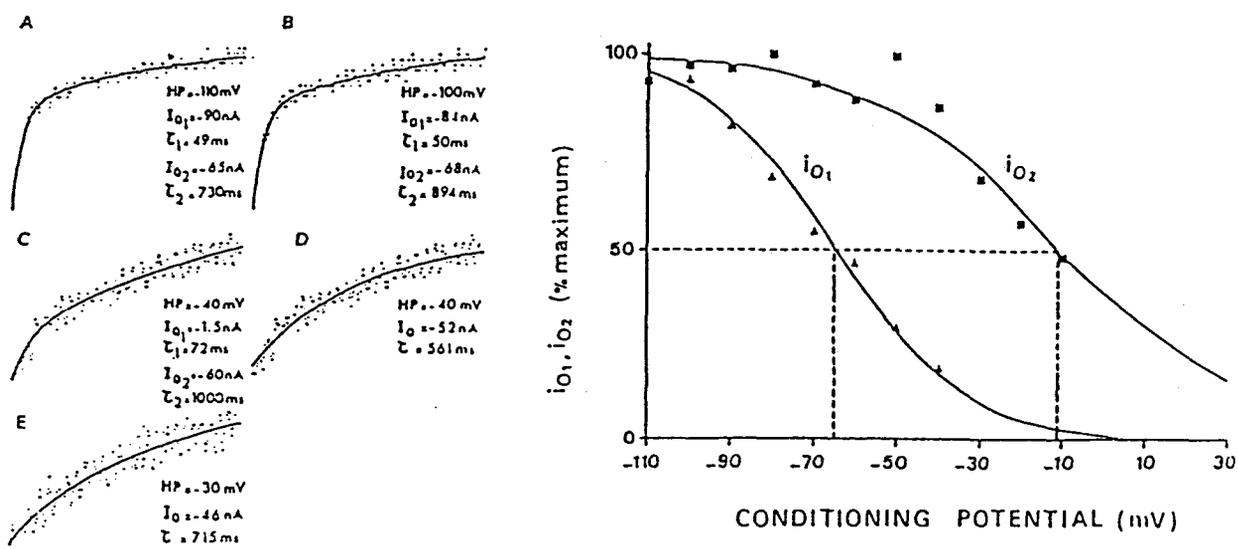


Fig 6. Theoretical analysis from tracings in figure 5 of the dependence of instantaneous amplitude (i_{O1} , and i_{O2}) of 2 components of the Ba current inactivation, elicited by a 10 mV membrane potential during test pulse, as function of the conditioning membrane potential (HP) of 5 s duration. For this analysis, clampfit program (pclamp program: Axon Instruments Inc) was used.

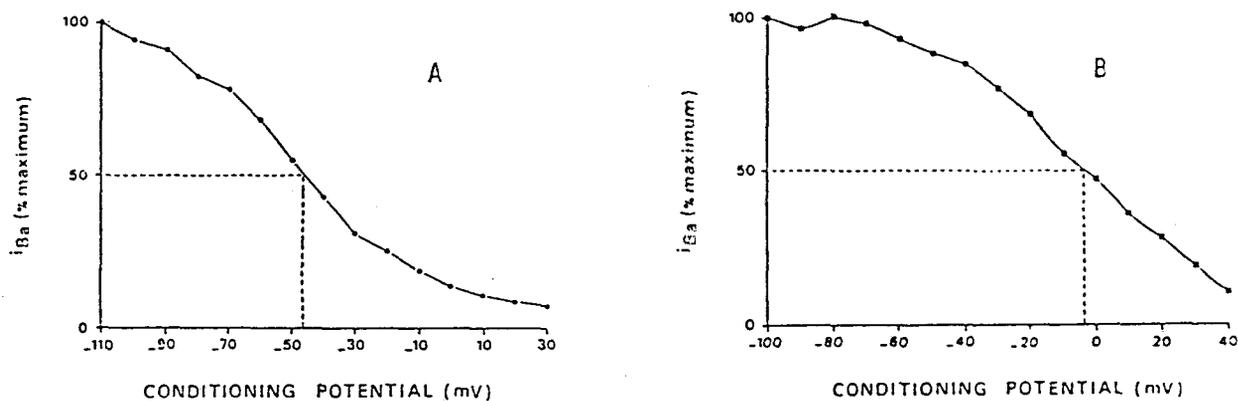


Fig 7. Normalized inactivation of i_{Ba} as function of conditioning potential at its maximum (A) and 200 ms after the beginning of the test pulse (B) of an oocyte injected with mRNA.

References

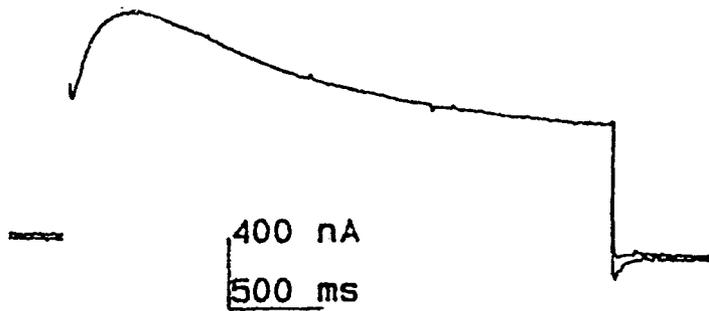
- 1 Barish ME (1983) A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J Physiol (Lond)* 342, 309-325
- 2 Barnard EA, Miledi R, Sumikawa K (1982) Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond Biol Sci B* 215, 241-246
- 3 Bean BP (1985) Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology. *J Gen Physiol* 86, 1-30
- 4 Carbone E, Lux HD (1984a) A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurones. *Biophys J* 46, 413-418
- 5 Carbone E, Lux HD (1984b) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature (Lond)* 310, 501-502
- 6 Chirgwin JM, Przybyla AE, Mac Donald RJ, Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5284-5299
- 7 Dascal N, Snutch TP, Lubbert H, Davidson N, Lester HA (1986) Expression and modulation of voltage gated-calcium channels after RNA injection in *Xenopus* oocytes. *Science (Wash DC)* 231, 1147-1150
- 8 Dumont JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocytes development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153-180
- 9 Fedulova SA, Kostyuk PK, Veselovsky NS (1985) Two types

- of calcium channels in the somatic membrane of newborn rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol (Lond)* 359, 431-446
- 10 Fournier F, Brule G, Honoré E, Mironneau J, Guilbault P (1989) Expression of Ba current in *Xenopus* oocyte injected with pregnant rat myometrium mRNA. *Pflügers Arch* 413, 682-684
 - 11 Gundersen CB, Miledi R, Parker I (1984) Messenger RNA from human brain induces drug and voltage-operated channels in *Xenopus* oocytes. *Nature (Lond)* 308, 421-424
 - 12 Gurdon JJ, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature (Lond)* 233, 177-182
 - 13 Jdaiaa H, Guilbault P (1986) Is inward calcium current in crayfish muscle membrane constituted of one or two components? *Gen Physiol Biophys* 5, 3-16
 - 14 Kostyuk PG (1989) Diversity of calcium ion channels in cellular membranes. *Neuroscience* 28, 253-261
 - 15 Miledi R (1982) A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond Biol Sci B* 215, 491-497
 - 16 Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW (1985) A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature (Lond)* 316, 443-446
 - 17 Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature (Lond)* 316, 440-443
 - 18 Sigel E (1987) Properties of single sodium channels translated by *Xenopus* oocytes after injection with messenger ribonucleic acid. *J Physiol (Lond)* 386, 73-90
 - 19 Snutch PT, Leonard JP, Nargeot J, Lubbert H, Davidson N, Lester HA (1987) Characterization of voltage-gated calcium channels in *Xenopus* oocytes after injection of RNA from electrically excitable tissues. In: *Cell Calcium and the Control of Membrane Transport* (Mandel LJ, Eaton DC, eds)
 - 20 Sumikawa K, Houghton M, Emtage JS, Richards BM, Barnard EA (1981) Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Nature (Lond)* 292, 862-864
 - 21 Zaradnik I, Zachar J (1987) Calcium channels in crayfish muscle fibre fragments studied by means of the vaseline gap technique. *Gen Physiol Biophys* 6, 113-125

Bien que dans ces deux cas (ARNm de muscle utérin ou de muscle squelettique de crustacé) les conditions nécessaires semblent réunies pour la détection fonctionnelle d'un éventuel phénomène de CICR (entrée de calcium importante car densité de canaux calciques accrue), aucune composante T_2 attestant de l'existence d'un tel mécanisme n'a pu être mise en évidence sur des ovocytes injectés avec ces deux types de préparations d'ARNm. En effet, comme l'illustre la figure 17, la dépolarisation d'ovocytes exprimant soit des ARN de myomètre, soit des ARN de muscle de crabe au maximum de la conductance calcique (+20mV) en milieu ND96, n'entraîne l'apparition que de la seule composante de courant sortant de chlore T_1 présentant d'ailleurs dans les deux cas une amplitude relativement importante. Par ailleurs, le courant sortant global $ICl(Ca)$ est, dans les deux cas, insensible au rouge de ruthénium (concentration finale intracellulaire $10\mu M$, résultat non illustré). Ainsi, bien qu'il ait été suggéré qu'un mécanisme de type CICR existe au sein de ces deux différentes structures (GOBLET et MOUNIER, 1986; BRULE et coll., 1987; ENDO et coll., 1982; SAIDA, 1982) et qu'il semble participer au développement de la contraction, celui-ci, contrairement à celui du cerveau ou de coeur de mammifère n'est pas exprimé dans l'ovocyte suite à l'injection des ARNm respectifs.

Il n'est pas exclu, au vu de ces résultats, que les entités moléculaires (complexe récepteur-canal inséré dans la membrane du réticulum) représentant le support structural et architectural du mécanisme de CICR, représentent un groupe polymorphe renfermant de nombreuses isoformes structurellement différentes. Ce polymorphisme pourrait coïncider avec l'origine du tissu considéré et ceci pourrait expliquer, au moins en partie, les différences d'expression, dans l'ovocyte, du phénomène de CICR observées en fonction du tissu considéré. Une telle situation peut être mise en avant concernant l'expression des canaux calciques issus de différents tissus de vertébrés dans l'ovocyte. En effet, les canaux calciques de type L cardiaques peuvent être exprimées dans l'ovocyte de Xénope alors que, pour l'instant, les préparations d'ARNm totaux issus de fibres musculaires squelettiques de vertébrés n'ont donné aucun résultats dans ce même vecteur d'expression pour le canal calcique type L squelettique. Il a été démontré, par ailleurs, que les ARN spécifiant ces deux isotopes de canaux L présentent une structure différente (TANABE et coll., 1987; MIKAMI et coll., 1989).

A



B

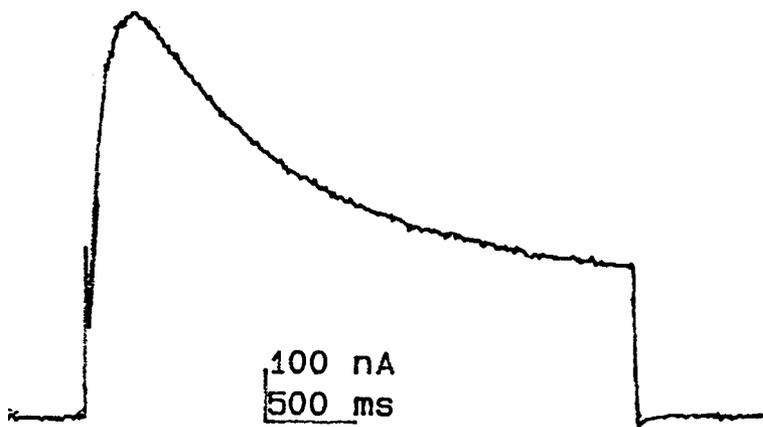


Figure 17 : Courants de chlore $ICl(Ca)$ typiques obtenus sur des ovocytes injectés soit avec des ARN de fibres musculaires de crabe (A) soit avec des ARN de myomètre de ratte gestante (B). Dans les deux cas, la composante T_2 ne s'exprime pas alors que ces ovocytes expriment des canaux calciques voltage dépendants suggérant ainsi l'absence du mécanisme de Ca induced Ca release.

Ces résultats préliminaires relatant l'expression d'un mécanisme de CICR dans l'ovocyte de xénope à partir, en particulier, d'ARNm de cerveau de mammifère constituent une étape essentielle du travail réalisé et exposé ici puisque ce mécanisme, comme nous le verrons, est intimement lié à la réponse purinergique ainsi qu'à d'autres réponses déclenchées par des neurotransmetteurs du système nerveux central exprimés dans l'ovocyte et s'effectuant par une stimulation du métabolisme des phosphoinositides. En effet, l'aboutissement de nos travaux vise à démontrer l'existence d'une relation étroite entre le métabolisme des phosphoinositides entraînant entre autre la production d' $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ et de diacylglycérol suite à l'activation de récepteurs de type métabotropique et le développement d'une réponse dépendante du calcium extracellulaire apparentée à un phénomène de CICR.

Ainsi, dans un premier temps, seront exposées les différentes réponses obtenues dans l'ovocyte suite à l'activation du récepteur purinergique exogène. Les travaux, énoncés sous la forme de deux articles, démontrent:

_ que l'activation du récepteur purinergique entraîne une réponse typique $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ dans l'ovocyte correspondant à une libération de Ca par les réserves intracellulaires sensibles à l' InsP_3 ;

- que l'activation de ce récepteur conduit secondairement à une sensibilisation du mécanisme de CICR, également transplanté dans l'ovocyte, suite à l'injection d'ARNm de cerveau de mammifère.

En second lieu, nous nous attacherons à étudier le mécanisme régissant cette sensibilisation du phénomène de CICR, en relation avec le métabolisme des phosphoinositides (production de Diacylglycérol et d' InsP_3).

III - LES RECEPTEURS PURINERGIQUES - PRESENTATION GENERALE.

Le rôle de l'ATP intracellulaire en tant que source d'énergie intervenant dans de nombreuses réactions de biosynthèse est reconnu depuis de nombreuses années. D'une manière générale, les cellules sont le siège de processus relativement complexes (glycolyse, cycle de Krebs) conduisant à la synthèse d'ATP en vue de son renouvellement à un taux intracellulaire permettant une activité optimale. Il est donc établi que la cellule tend à conserver "son ATP" et que, par conséquent, celui-ci ne traverse pas la membrane plasmique des cellules vivantes. Toutefois, l'ATP extracellulaire (et/ou l'ADP) à des concentrations de l'ordre de la micromole peut influencer un grand nombre d'activités biologiques comme l'agrégation des plaquettes sanguines, le tonus vaculaire, la contraction musculaire, la fonction cardiaque (inotropisme) ou encore la neurotransmission périphérique et centrale. Ainsi, des nucléotides tels que l'ATP peuvent être expulsés soit directement du cytoplasme d'une grande variété de types cellulaires, soit par exocytose classique en ce qui concerne les plaquettes sanguines ou les neurones dits "purinergiques". Consécutivement, ces nucléotides peuvent interagir directement avec des récepteurs spécifiques (récepteurs purinergiques ou purinocepteurs) présents à la surface de cellules-cibles et ensuite être métabolisés localement par des ectonucléotidases (régulant ainsi localement la concentration extracellulaire des nucléotides).

Depuis peu, les récepteurs purinergiques ont été classés en deux catégories distinctes : les récepteurs de type P1 activés par l'adénosine et l'AMP et les récepteurs de type P2 liant préférentiellement l'ATP et l'ADP. Cette classification élaborée par BURNSTOCK en 1978 s'est affinée grâce notamment à l'utilisation de nouveaux critères basés sur les modes de transduction des signaux consécutifs à l'activation des récepteurs purinergiques. C'est ainsi que les purinorécepteurs de type P1 peuvent être globalement divisés en deux sous-groupes et la discrimination s'opère selon les effets de l'adénosine sur l'activité adénylate-cyclase. Ainsi, la stimulation des récepteurs P1A1 induit l'inhibition de l'adénylate-cyclase via une protéine G de type G_i alors que les récepteurs purinergiques affectés au groupe P1A2 augmentent, au contraire, l'activité de cette même enzyme par l'activation cette fois d'une protéine GTP dépendante de type G_s . Les signaux découlant de l'activation des récepteurs P2 purinergiques semblent plus variés et plus complexes. Néanmoins, ceux-ci se traduisent dans la plupart des cas connus par une augmentation de l'activité interne de calcium. Celle-ci s'opère soit, par la voie de dégradation des

phosphoinositides aboutissant à la synthèse d'Ins(1,4,5)P₃ (hépatocytes; cellules endothéliales; cellules tumorales d'ascites d'Ehrlich et myocytes aortiques de rat), soit par l'entrée de calcium via un canal directement associé au récepteur P2 (ROC) (canal déférent de rat, artère de l'oreille de lapin, myomètre de ratte gestante, pour revue voir GORDON, 1986). De plus, d'autres phénomènes tels que des variations du taux d'AMPc ou de prostaglandines peuvent coexister avec les mécanismes cités précédemment (plaquettes sanguines et hépatocytes) rendant ainsi la classification des récepteurs P2 hasardeuse si l'on se réfère à des critères faisant exclusivement appel à la nature du second messager mis en jeu. Récemment cependant, l'apport d'investigations pharmacologiques plus précises a permis, grâce notamment à l'utilisation de nouveaux ligands synthétiques (analogues structuraux de l'ATP), de discerner deux groupes majeurs P2X et P2Y dans la classe P2. Pour les P2X, la séquence d'efficacité des différents agonistes utilisés s'établit comme suit :

α, β méthylène ATP = β, γ méthylène ATP > ATP = 2 méthylthio ATP > ADP.

Lorsqu'il s'agit des récepteurs de type P2Y, cet ordre se modifie pour devenir :

2 méthylthio ATP > ADP > ATP > α, β méthylène ATP = β, γ méthylène ATP.

En outre, le ligand photo-affine arylazidoaminopropionyl ATP (ANAPP3), l' α, β méthylène ATP et la suramine entraînent une inhibition non compétitive ou une désensibilisation des récepteurs de type P2X alors qu'ils sont inefficaces sur les récepteurs de type P2Y. L'anthraquinone "reactive blue 2" ou bleu procion, quant à elle, inhibe spécifiquement les réponses purinergiques associées à l'activation des récepteurs de type P2Y (RICE et SINGLETON, 1989; BURNSTOCK et WARLAND, 1987)

Le tableau 4 résume quelques unes des caractéristiques des récepteurs P2. Quatre grandes catégories y sont représentées. Les récepteurs de myocytes vasculaires, de muscles lisses, de cellules cardiaques, des hépatocytes et de la glande parotide se répartissent dans les deux sous-classes X et Y selon la terminologie proposée par BURNSTOCK et KENNEDY (1985). La troisième sous-classe identifiée sous le terme P2Z, représentée par les deux types cellulaires mastocytes et lymphocytes, se caractérise par une activation nécessitant des concentrations en ATP relativement importantes (> 100 μ m). Ceci s'explique par le fait que dans ces cas particuliers, c'est l'ATP⁴⁻ (forme non liée de l'ATP) qui se fixe au récepteur occasionnant une

Table 1. Classification of P₂ purinoceptors

P ₂ class	Cell or tissue	Species	Response	Ca ²⁺ - activated K ⁺ channel§	Effect of substitution on activity		
					2-MeS or 2-Cl	L-Ribose	—P—CH ₂ —P— or —P—NH—P
T	Platelet* Thrombocyte	Mammals Avian	Aggregation; ↓ adenylate cyclase		↑	↓	↓
X	Bladder	Guinea pig; rat	Contraction		≈	≈	↑
	Vas deferens	Guinea pig	Contraction		≈	(↓)	↑
	Ear artery	Rabbit	Contraction		?	?	↑
	Femoral artery	Rat	Contraction		?	?	↑
	Pancreatic artery	Rat	Vasoconstriction		?	?	↑
Y	Taenia coli	Guinea pig	Relaxation	+	↑	↓	↓
	Trachea	Guinea pig	Relaxation	?	?	?	↓
	Portal vein	Rabbit	Relaxation	+	↑	?	↓
	Endothelium	Man; pig; rat; cattle; rabbit	PGI ₂ and EDRF production	+	↑	↓	↓
	Hepatocyte	Rat; guinea pig	K ⁺ efflux	+	?	?	?
	Parotid acinar cells	Mouse	K ⁺ efflux; amylase secretion	+	?	?	?
	Pancreas	Rat	Insulin secretion	+	?	?	↓
Z	Lymphocyte†	Man; rat	Cytotoxicity; DNA synthesis				↓
	Mast cells†‡	Rat	Degranulation				↓

* Responds to ADP, not ATP (which is an antagonist).

† Minimum active concentration ≈ 50 μM.

‡ Responds to ATP⁴⁻.

§ The presence of a Ca²⁺ activated K⁺ channel has been demonstrated either directly (K⁺ efflux, dependent on Ca²⁺ influx) or indirectly, by an effect of apamin, which blocks this channel

Tableau 4 : Classification des récepteurs purinergiques de type P₂. D'après GORDON, 1986.

perméabilisation de la membrane cellulaire.

Bien que l'utilisation de ces nouveaux composés permette d'éclaircir les propriétés pharmacologiques des différents sous-types de récepteurs P2, la caractérisation biochimique de ces derniers n'est encore, à l'heure actuelle, que peu avancée. Dans ce contexte, une approche génétique, basée sur les techniques de biologie moléculaire, semble constituer la meilleure alternative. L'une d'entre elles consiste à utiliser l'ovocyte de Xénope en tant que vecteur d'expression de récepteurs et de canaux membranaires. La traduction *in ovo* d'ARN messagers provenant de divers tissus excitables conduit à la réimplantation de systèmes fonctionnels complets (canaux ioniques, récepteurs...) et l'étude de ces systèmes dans un environnement contrôlé et relativement bien connu, débouche sur une dissection assez fine des mécanismes impliqués dans les modalités de transduction de ces récepteurs. L'ovocyte de Xénope a été utilisé pour étudier des protéines normalement exprimées à faible taux et ceci en injectant des quantités appréciables d'ARNm total. Cette approche rend possible l'étude de protéines telles que les récepteurs purinergiques non caractérisées sur le plan biochimique et pour lesquelles aucune sonde immunologique ou nucléotidique n'est encore disponible.

IV - EXPRESSION DU RECEPTEUR PURINERGIQUE DE TYPE P2 DANS L'OVOCYTE DE XENOPE
SUITE A L'INJECTION D'ARN_m DE CERVEAU DE COBAYE EMBRYONNAIRE.

A) - CARACTERISATION DANS L'OVOCYTE D'UNE REPOSE PURINERGIQUE METABOTRO-
PIQUE ASSOCIEE A LA STIMULATION DU METABOLISME DES PHOSPHOINOSITIDES.

PUBLICATION N°3 :

Ins(1,4,5)P₃ FORMATION AND FLUCTUATING CHLORIDE CURRENT RESPONSE INDUCED BY
EXTERNAL ATP IN *XENOPUS* OOCYTES INJECTED WITH EMBRYONIC GUINEA PIG BRAIN mRNA.

F.E.B.S. LETTERS (1990), 277, 1,2, 205-208.

Ins(1,4,5)P₃ formation and fluctuating chloride current response induced by external ATP in *Xenopus* oocytes injected with embryonic guinea pig brain mRNA

Franck Fournier, Eric Honoré, Thibault Collin and Pierre Guilbault

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, UFR de Biologie, Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Received 25 September 1990; revised version received 29 October 1990

In voltage-clamped *Xenopus* oocytes injected with embryonic guinea pig mRNA, effective concentrations of extracellular ATP elicited an inward fluctuating current. This current, carried by Cl⁻ ions, was mainly dependent upon liberation of Ca²⁺ ions from stores as demonstrated by experiments using intracellular EGTA loading and TMB-8 superfusion. Neomycin inhibited these fluctuating currents indicating that the transplanted purinoceptor is linked to phospholipase C activity and triggers Ins(1,4,5)P₃ formation. Ins(1,4,5)P₃ production evoked by external ATP was clearly demonstrated by directly measuring the water-soluble Ins(1,4,5)P₃ level in injected oocytes. Finally, it is suggested that the ATP effect was mediated by a Ca²⁺ release from Ins(1,4,5)P₃ sensitive pools since heparin blocked the ATP responsiveness. The acquired purinoceptor may be made apparent to a P₂ subtype since ATP and ADP were equipotent in eliciting Cl⁻ current while AMP and Adenosine were ineffective in injected oocytes.

Xenopus oocyte; Guinea pig brain mRNA; Ins(1,4,5)P₃; Internal Ca²⁺ pool; Extracellular ATP; P₂ purinoceptor

1. INTRODUCTION

The close association between neuronal activation and ATP secretion indicates that extracellular ATP can act as a cotransmitter [1] and exert a feedback modulation of the transmitter release in central and peripheral nervous systems. Thus, it was previously stated that afferent fibres may utilize ATP to excite neurons in the sensory regions of the brain, as well as in the spinal cord [2-4]. Furthermore, other findings have pointed out a release of ATP from cholinergic nerve endings in the central nervous system [5]. P₂ purinergic receptors, reported to be sensitive to ATP and ADP [6], exhibit a wide variety of transduction mechanisms (Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ mobilization, Ca²⁺ influx through receptor-operated channel). These mechanisms are not yet clearly defined but both contribute to increasing the free intracellular Ca²⁺ level. The complexity and diversity of these transduction processes led us to use the *Xenopus* oocyte translation system to express P₂ purinoceptor from embryonic guinea pig mRNA. *Xenopus* oocyte is a useful tool in the dissection of synaptic communication processes since it faithfully synthesises and assembles a variety of biologically active neurotransmitter receptors after injection of exogenous mRNA [7]. With this system, a range of studies

on receptor function is accessible when the receptors are active in controlled situations. In many cases, the agonist-induced responses were detected as changes in chloride conductance as a result of the activation of endogenous Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels in the oocyte plasma membrane [8]. In the present study, a description of an acquired P₂ purinoceptor activity is presented and evidence is provided for the participation of phosphoinositide breakdown and an Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺-release from intraoocyte stores to the purinergic response.

2. MATERIALS AND METHODS

Total RNA was extracted from embryonic guinea pig brain following the Chirgwin procedure [9] and poly(A)⁺ mRNA was selected with two runs of oligo(dT) cellulose chromatography. Oocytes were dissected away from tricaine methane sulphonate (MS 222)-anesthetized adult *Xenopus laevis* and prepared as reported elsewhere [10]. Stage VI oocytes were pressure-injected with 50 ng of mRNA and incubated in a modified Barth solution (MBS) supplemented with 50 µg/ml gentamycin for 3-6 days. Uninjected oocytes served as control.

Electrophysiological measurements were performed using the two-electrode voltage-clamp technique and membrane currents were monitored on a flat-bed single-pen chart recorder. In all experiments, the holding voltage was set to -70 mV and oocytes were routinely tested in the conventional bathing medium ND96 (in mM: NaCl 96; MgCl₂ 2; CaCl₂ 1.8; Hepes 5, pH 7.4 with NaOH) unless otherwise stated. Drugs were applied either externally by addition to the superfusate or internally by pressure injection using an additional micropipette (3-8 µm in diameter). The injected volume was 0.5-0.8% of the cell volume and all injection solutions were made up

Correspondence address: P. Guilbault, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, UFR de Biologie, Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

in 10 mM Hepes-KOH (pH 7). Experiments were conducted using batches of oocytes derived from three different donors.

To determine $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ level, 40–50 injected oocytes were incubated for 24 h at 22°C with MBS supplemented with 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ of myo-[2- ^3H]inositol. After extensive washing, cells were preincubated for 20 min with 10 mM LiCl in MBS medium and stimulated for 2 min with 300 μM ATP or 10 μM ACh. RNA-injected oocytes with no agonist stimulation served as control. The reaction was stopped by the addition of perchloric acid to 0.5 M and immediate homogenisation. Subsequently, cell extracts were neutralized with 1.5 M KOH in 75 mM Hepes and applied to Dowex AG 1 \times 8 columns (formate form). A stepwise elution was performed using 0.1 M formic acid and increasing concentrations of ammonium formate [11]. The radioactivity of the fraction eluted between 0.4 and 1 M ammonium formate containing $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ was counted in a liquid scintillation counter.

3. RESULTS AND DISCUSSION

At the holding voltage of -70 mV, the external application of an effective concentration of ATP (300 μM) in guinea pig brain RNA-injected oocytes induced an oscillatory inward current accompanied by an increase in membrane conductance (Fig. 1A: left panel). After a latency period of 28 ± 7 s ($n = 8$), this response peaked

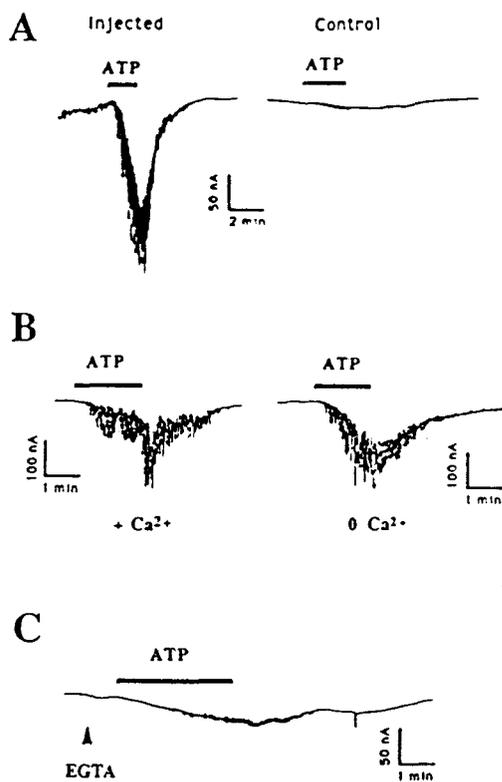


Fig. 1. ATP effects on membrane currents and Ca^{2+} dependence of the ATP response. (A) ATP-induced membrane currents compared in injected and control oocytes. (B) Dependence of ATP response upon external Ca^{2+} concentration: Ca^{2+} 1.8 mM (left panel); Ca^{2+} 0.1 mM EGTA (right panel). (C) Dependence of ATP response upon internal Ca^{2+} activity. Inhibition of ATP-evoked Cl^- current by intraoocyte injection of EGTA (final concentration = 0.1 mM). 300 μM ATP superfusion are indicated by horizontal bars.

between 2 and 4 min after ATP application and decreased over the next 4–8 min. This current presented a reversal potential of -25 ± 4 mV ($n = 5$) and was completely inhibited by 9-anthracene carboxylic acid (9AC; final concentration = 2.5 mM; $n = 5$; data not illustrated), a blocker of chloride conductance [7]. These results demonstrate that these oscillations were generated by an inward chloride current. Native oocytes failed to respond to extracellular ATP even when perfused with concentrations up to 300 μM (Fig. 1A: right panel; $n = 10$). Intracellular injection of ATP did not cause any change in the current recording of injected oocytes. In view of these observations, it may be advanced that ATP effects, following mRNA injection, are due to newly expressed purinoceptors in oocyte membrane. To our knowledge, the ATP response we describe is the first demonstration of an expression of purinoceptors in *Xenopus* oocytes after injection of mRNA from mammalian brain. As depicted in Fig. 1B, the fluctuating current is not dependent upon extracellular Ca^{2+} since no significant modification either of the wave form or of the amplitude of this current could be recorded in a Ca^{2+} -free medium (Ca^{2+} 0, EGTA 1 mM) in the presence of 300 μM ATP (right panel; $n = 4$). By contrast, intracellular injection of EGTA (final concentration = 0.1 mM) markedly attenuated the ATP response (Fig. 1C; $n = 8$), suggesting that the ATP-sensitive chloride current was mainly connected to intracellular Ca^{2+} variations probably resulting of release from an intracellular Ca^{2+} pool.

With the purpose of providing evidence for the involvement of intracellular Ca^{2+} stores in the ATP response, oocytes were challenged using

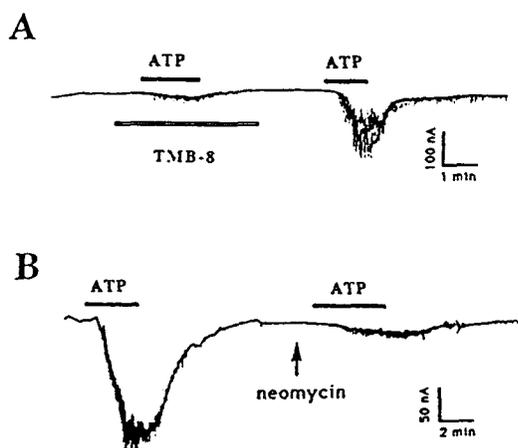


Fig. 2. Role of Ca^{2+} release from intracellular stores and mediation of ATP effects by phospholipase C. (A) Reversible inhibition by TMB-8 (external concentration of 100 μM) of the ATP-induced Cl^- current. (B) Effect of intra-oocyte injection of 400 pmol neomycin on a Ca^{2+} -activated Cl^- current evoked during ATP superfusion. Oocytes were superfused with 300 μM ATP; TMB-8 superfusion is indicated by the empty horizontal bar.

3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)octyl ester hydrochloride (TMB-8), a putative inhibitor of Ca^{2+} release from intracellular stores [12]. As shown in Fig. 2A, external application of this compound (final concentration = $100 \mu\text{M}$) reversibly inhibited the ATP response ($n = 5$). One of the metabolic transduction pathways which could account for the purinergic response in injected oocytes is phosphoinositide breakdown induced by phospholipase C. Previous intracellular loading of oocytes with neomycin (400 pmol ; Fig. 2B), an inhibitor of the enzymatic degradation of PIP_2 and PIP [13], strongly reduced the purinergic response ($n = 5$). These experiments suggest that phospholipase C activation, leading to $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ synthesis, underlies the ATP-induced oscillatory chloride current. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ production following purinoceptor activation was investigated by measuring the level of this water-soluble product in cells prelabelled with the precursor myo-[2- ^3H]inositol. As shown in Fig. 3A, a significant increase of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ could be detected 2 min after bathing oocytes with $300 \mu\text{M}$ ATP ($301 \pm 45\%$ of control; 3 experiments). This stimulation of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ production with ATP was comparable with the ACh-induced rise of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ formation in injected oocytes ($391 \pm 52\%$ of control; 3 ex-

periments). The $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ response of this Ca^{2+} mobilizing neurotransmitter may be considered as a reference positive control since the muscarinic receptor transduction pathway has been established in previous studies as a Ca^{2+} release from $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -sensitive Ca^{2+} stores in defolliculated oocytes injected with mammalian brain mRNA [14]. Moreover, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ level remained unchanged in native oocytes in the presence of ATP ($300 \mu\text{M}$; data not shown; 3 experiments). To release Ca^{2+} , $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ must bind to receptors that are somehow linked to Ca^{2+} channels connected with $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -sensitive pools. Heparin inhibits both the binding of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ to its purified receptor [15] and the mobilization of Ca^{2+} in numerous cell systems [16]. Fig 3B shows that intra-oocyte injection of heparin (final concentration = $80 \mu\text{M}$) blocked the ATP responsiveness ($n = 4$). Therefore, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced Ca^{2+} mobilization did appear to be involved in the ATP effects. Previous pharmacological studies (see [17] for review), based on the rank order of potency of various purinergic agonists, have led to establishing a classification of purinergic receptors as either P_1 (recognizing adenosine and AMP) or P_2 (recognizing ADP and ATP). As shown in Fig. 4, ATP and ADP (final concentration = $300 \mu\text{M}$) were quipotent in eliciting the fluctuating chloride current ($n = 5$) while AMP and adenosine (same concentration) were ineffective in guinea pig brain RNA-injected oocytes ($n = 5$). Therefore, the acquired purinoceptor may be made apparent to a P_2 receptor according to Burnstock's classification.

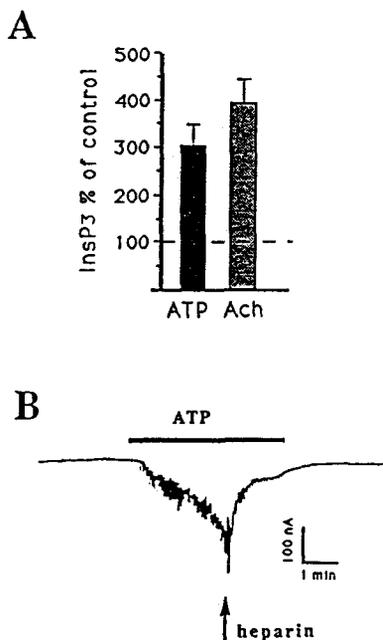


Fig. 3. Mediation of the ATP response by $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. (A) Accumulation of InsP_3 in injected oocytes followed for 2 minutes in the presence of $300 \mu\text{M}$ ATP or $10 \mu\text{M}$ ACh. Results are expressed as the percentage of basal level. (InsP_3 % of control) means \pm SE, three experiments (duplicates); 100% represents the amount of InsP_3 in the absence of external ATP. (B) Typical effect of intraoocyte injection of heparin (final concentration = $80 \mu\text{M}$) on Ca^{2+} activated fluctuating current evoked during the ATP superfusion. The oocyte was superfused with $300 \mu\text{M}$ ATP.

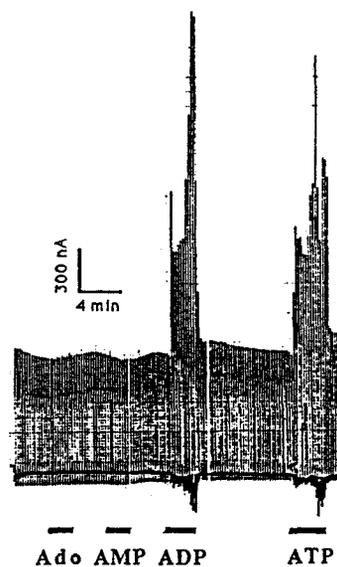


Fig. 4. Membrane currents induced by purinergic agonists in oocytes. Typical chart record of the effects of adenosine (Ado), AMP, ADP, ATP. Each compound was superfused at the concentration of $300 \mu\text{M}$. The oocyte was repeatedly depolarized to 20 mV for 4 s every 20 s to test the membrane conductance variations evoked by the different purinergic agonists.

Our results bring several lines of evidence for a stimulation by ATP of phosphoinositide breakdown evoked by activation of newly expressed purinoceptors. They are consistent with previous studies which have demonstrated that P₂ receptor occupation increases phosphatidyl inositol polyphosphate turnover with subsequent production of Ins(1,4,5)P₃ in a wide variety of cell systems including isolated hepatocytes, Ehrlich ascite tumor cells and rat ventricular cells [18-20]. Likewise, recent findings demonstrated that extracellular ATP caused a large increase in inositol phosphate accumulation in neural cells [21] and thereby initiate a chain of events, which may play a role in the induction of long-term adaptative changes (long-term potentiation; LTP) in synaptic neuronal function. The biochemical characterization of the P₂ class receptors is hardly advanced; no nucleic or immunological probes are available, thus preventing the use of classical techniques to study purinoceptors. Our results suggest an alternative way to investigate a functional and structural characterization of this type of receptor. This approach would be to use the *Xenopus* oocyte to clone the receptor gene, as was previously done with the 5-HT_{1C} or the substance K receptors [22,23].

Acknowledgements: This work received financial support from the Association Française contre les Myopathies.

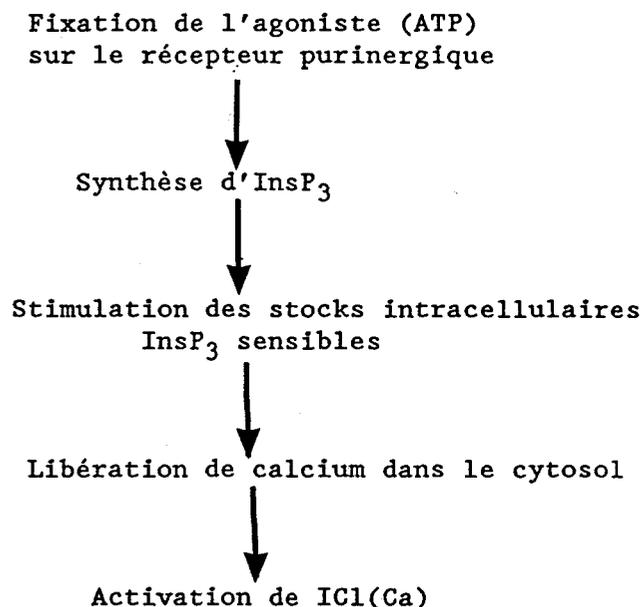
REFERENCES

- [1] Holton, F.A. and Holton, P. (1954) *J. Physiol. (Lond.)* 126, 124-140.
- [2] Burnstock, G. (1981) *J. Physiol. (Lond.)* 313, 1-35.
- [3] Jahr, C.E. and Jessel, T.M. (1983) *Nature* 304, 730-733.
- [4] Fyffe, R.E.W. and Perl, E.R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6890-6893.
- [5] Richardson, P.J. and Brown, S.J. (1987) *J. Neurochem.* 48, 622-630.
- [6] Burnstock, G. and Kennedy, C. (1985) *Gen. Pharmacol.* 16, 433-440.
- [7] Dascal, N. (1987) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 317-387.
- [8] Miledi, R. (1982) *Proc. R. Soc. Lond. B* 215, 491-497.
- [9] Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald, R.J. and Rutter, W.J. (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- [10] Fournier, F., Honoré, E., Brulé, G., Mironneau, J. and Guilbault, P. (1989) *Plüggers Arch.* 413, 682-684.
- [11] Berridge, M.J., Downes, C.P. and Hanley, H.R. (1982) *Biochem. J.* 206, 595-597.
- [12] Chiou, C.Y. and Malagodi, M.H. (1975) *Br. J. Pharmacol.* 53, 279-285.
- [13] Cockcroft, S. and Gomperts, B. (1985) *Nature* 314, 534-536.
- [14] Nomura, Y., Kaneko, S., Kato, K., Yamagishi, S. and Sugiyama, H. (1987) *Mol. Brain Res.* 2, 113-123.
- [15] Supattapone, S., Worley, P., Baraban, J. and Snyder, S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 1530-1534.
- [16] Worley, P.F., Baraban, J.M., Supattapone, S., Wilson, V.S. and Snyder, S.H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12132-12136.
- [17] Gordon, J.L. (1986) *Biochem. J.* 233, 309-319.
- [18] Charest, R., Blackmore, P.F. and Exton, J.H. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 15789-15794.
- [19] Dubyak, G.R. and De Young, M.B. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10653-10661.
- [20] Legssyer, A., Poggioli, J., Renard, D. and Vassort, G. (1988) *J. Physiol. (Lond.)* 401, 185-199.
- [21] Ehrlich, Y.H., Snider, R.M., Kornecki, E., Garfield, M.G. and Lenox, R.H. (1988) *J. Neurochem.* 50, 295-301.
- [22] Julius, D., MacDermott, A.B., Axel, R. and Jessel, T.M. (1985) *Science* 241, 558-564.
- [23] Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M. and Nakanishi, S. (1987) *Nature* 329, 836-838.

A notre connaissance, les résultats rapportés dans cet article constituent la première démonstration de l'expression d'un récepteur purinergique dans l'ovocyte de Xénope à partir d'ARNm issus de système nerveux central de mammifère.

Cet article décrit un premier type de réponse purinergique exogène détectable à un niveau de potentiel donné et fixe (-80 mV) dans l'ovocyte de xénope suite à l'injection d'ARNm de cerveau de cobaye embryonnaire. Il y est présenté, en effet, une réponse métabotrope typique conduisant à la production d'Ins(1,4,5)P₃ et consécutivement à la mobilisation de calcium à partir des stocks intracellulaires InsP₃ - sensibles. D'un point de vue électrophysiologique et dans les conditions physiologiques normales (ND96), cette réponse se manifeste finalement par l'activation d'un courant de chlore oscillant dépendant de l'activité interne de calcium [ICl(Ca)]. Par ailleurs, il est clairement démontré que le calcium externe n'intervient en rien dans le développement de ce type de réponse purinergique.

La chaîne des événements cellulaires impliqués dans cette réponse (figure 18) semble s'établir selon la séquence suivante:



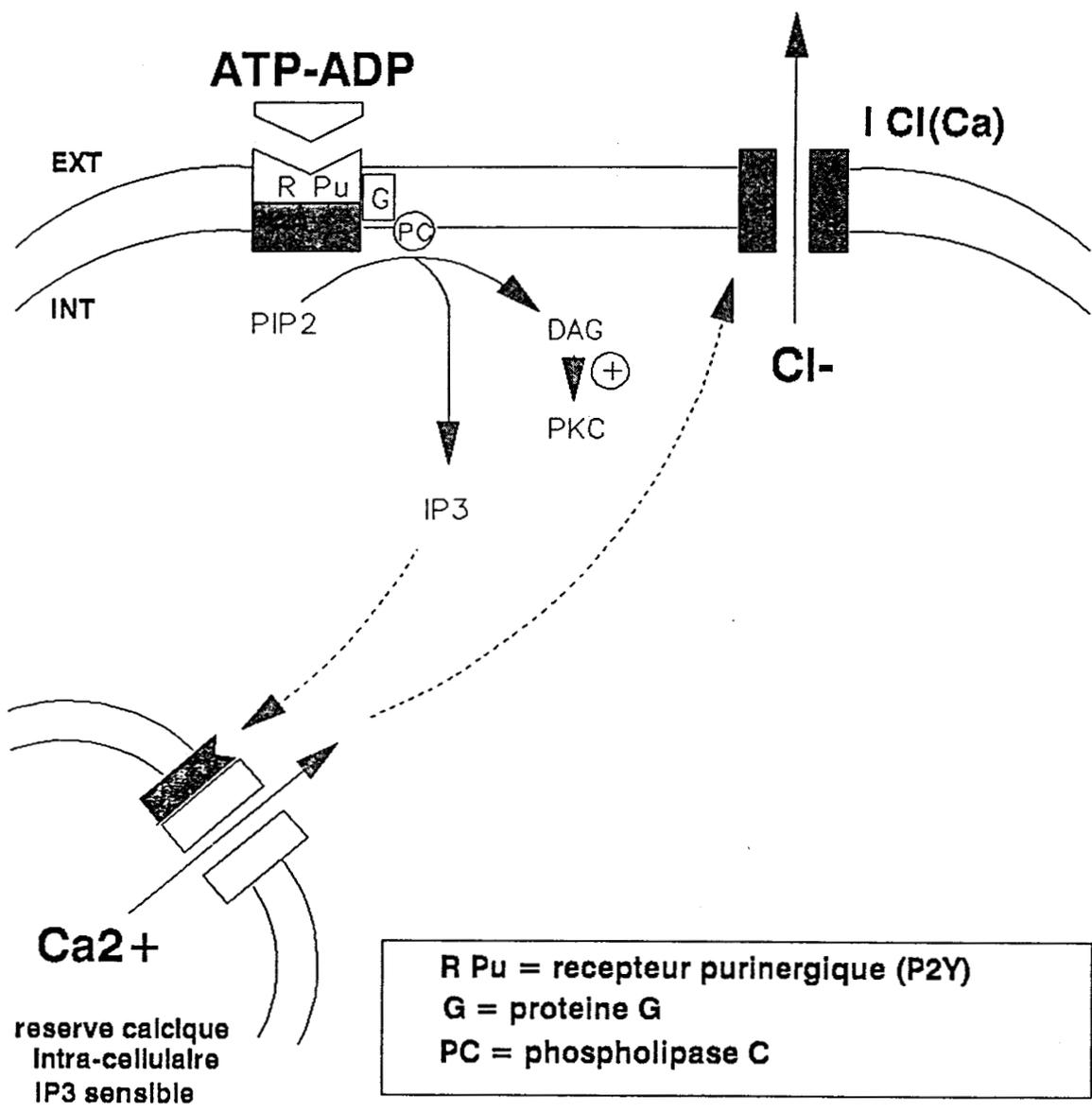


Figure 18 : Schéma illustrant le mode de transduction du récepteur purinergique exprimé dans l'ovocyte de xénope après injection d'ARNm de cerveau. Le récepteur activé stimule la voie métabolique des phosphoinositides et conduit donc à la production d'InsP₃. Celui ci mobilise le Ca à partir de réserves InsP₃ sensibles et l'augmentation du Ca intracellulaire qui s'en suit permet finalement l'activation du canal chlore endogène

Les agonistes de l'ATP, pour ce qui concerne les récepteurs de type P2 (récepteurs exprimés ici dans l'ovocyte de xénope), sont bien connus pour permettre l'activation de la phospholipase C par l'intermédiaire de la stimulation d'une protéine G (OKAJIMA et coll., 1989) . L'activation de ce type de récepteur conduit donc à une augmentation du turnover des phosphoinositides et donc à la production d'InsP₃ et de DAG comme cela a déjà pu être démontré dans les hépatocytes de rat (CHAREST et coll., 1985), dans les cellules tumorales d'ascites d'Ehrlich (DUBYAK et DE YOUNG , 1985; DUBYAK, 1986) et dans les cellules endothéliales d'aorte (HALLAM et PEARSON, 1986). En outre, la fixation des agonistes de récepteurs P2 entraînent l'activation de la protéine Kinase C dans les cellules alvéolaires de type II (SANO et coll., 1985) . Nos résultats semblent également montrer que le mode de transduction du récepteur purinergique transplanté dans l'ovocyte fasse aussi appel à l'activation de la phospholipase C.

L'hétérogénéité cellulaire et la nature complexe des interactions cellule-cellule au niveau du cerveau rendent difficile la détermination du lien entre le métabolisme des phosphoinositides et la fonction neuronale. Toutefois, les quelques études réalisées sur des neurones facilement identifiables ou sur des lignées cellulaires de neuroblastomes suggèrent que le rôle possible du métabolisme des phosphoinositides et en particulier la production d'InsP₃ serait la modulation des courants ioniques responsables de l'excitabilité membranaire. Dans ce cadre, un effet majeur contrôlé soit par le diacylglycérol, soit par l'InP₃ , pourrait s'effectuer sur les canaux potassiques ou sur les canaux chlore modulant eux-mêmes le potentiel de membrane (hyperpolarisation ou dépolarisation) et par la même la probabilité d'ouverture d'autres types de canaux ioniques tel que les canaux calciques voltage-dépendants.

B) SENSIBILISATION DU PHENOMENE DE CALCIUM INDUCED CALCIUM RELEASE PAR ACTIVATION DU RECEPTEUR PURINERGIQUE.

PUBLICATION N°4 :

FUNCTIONAL EXPRESSION OF P2Y PURINOCEPTORS IN BRAIN mRNA INJECTED *XENOPUS* OOCYTES.

European Journal of Physiology (Pflügers Archiv.). Sous presse.

FUNCTIONAL EXPRESSION OF P₂Y PURINOCEPTORS IN
BRAIN mRNA INJECTED *XENOPUS* OOCYTES.

Franck FOURNIER, Eric HONORE^o, Thibault COLLIN, Joël NARGEOT⁺
and Pierre GUILBAULT*.

* Laboratoire de Physiologie Cellulaire, UFR de Biologie, Université des Sciences et
Techniques de Lille-Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, FRANCE.

^o *present address* : Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, 660 route
des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, FRANCE.

⁺ Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, CNRS, route de Mende, 34033
Montpellier, FRANCE.

* To whom correspondence should be addressed.

Running Title : Purinoceptors expression in *Xenopus* oocytes.

Summary

Embryonic guinea-pig brain mRNA injected *Xenopus* oocytes expressed functional P₂Y purinoceptors. Extracellular ATP stimulated in a dose-dependent manner a delayed Ca²⁺-dependent Cl⁻ current component. Analyse of the interactions of ATP with compounds that affect Ca²⁺ fluxes through the plasma membrane or Ca²⁺ release from internal stores, indicates that ATP raises [Ca²⁺]_i by a mechanism that involves activation of voltage-dependant Ca²⁺ channels, which leads to influx of extracellular Ca²⁺ into the cells, as well as release of Ca²⁺ from intracellular stores. Since this phenomenon was not found in control oocytes, it is suggested that brain mRNA encoded for a newly synthesized Ca²⁺ release process stimulated by purinoceptor activation.

This mechanism could be largely involved in the short term regulation of intracellular Ca²⁺ level implied in ATP neuromodulation functions.

Introduction

In addition to the well-known role of ATP in supplying chemical energy for maintenance of cell activity, an increasing number of studies provides evidence for a variety of actions of extracellular ATP (for review see Gordon, 1986). The close association between neuronal activation and ATP secretion indicates that extracellular ATP can exert in the central and peripheral nervous systems a feed-back modulation of the release of transmitter. The functional role of ATP as a cotransmitter has been first postulated by Holton and Holton (1954). Evidence was found for ATP release from cholinergic nerve endings in the central nervous system (Burnstock, 1972). Afferent fibers utilize ATP to excite neurons in the sensory regions of the brain as well as in the

spinal cord (Burnstock, 1981 ; Jahr and Jessel, 1983). Clinical observations have implicated adenine nucleotides in schizophrenia and in depression (Burnstock, 1981).

ATP binds specifically to P₂ purinoceptors (Burnstock, 1978). Burnstock and Kennedy (1985) have proposed that P₂ purinoceptors may be further divided in several subtypes. The existence of at least four P₂ nucleotide receptor subtypes X, Y, Z and T has been hypothesized on the basis of functional responsiveness and the rank order of potency of structural analogs (for review see Gordon, 1986).

The transduction mechanism responsible for P₂ purinoceptor activity currently leads to an increase in free intracellular Ca²⁺ level. Different pathways have been described : i) an increase in the amplitude of the voltage-dependent Ca²⁺ channel current (Alvarez *et al.*, 1990) ; ii) the association of P₂Y purinoceptors with voltage-activated cation channels (Björnsson *et al.*, 1989) ; iii) a Ca²⁺ permeable purinoceptor-operated channel (Benham and Tsien, 1987 ; Honoré *et al.*, 1989) ; iiiii) mobilization of InsP₃-sensitive Ca²⁺ stores (Dubyak and De Young, 1985 ; Okajima *et al.*, 1989 ; Cockcroft and Stutchfield, 1989).

The lack of specific antagonists able to discriminate among receptor subtypes, the limited number of radioligand binding studies and the lack of affinity cross-linking study of the putative receptor protein led us to use the *Xenopus* oocyte translation system to express P₂ purinoceptors from embryonic guinea-pig brain mRNA. The *Xenopus* oocyte is useful in the dissection of the mechanisms of synaptic communication since it faithfully synthesizes and assembles a variety of biologically active neurotransmitter receptors and voltage-gated ion channels after injection of exogenous mRNA (for review see Dascal *et al.*, 1987). Furthermore, a range of studies on receptor function is accessible when the receptors are active in controlled situations (intracellular medium)

The present study provides a description of functional P₂Y purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes and brings evidence for the participation of a newly synthesized intracellular Ca²⁺ mobilization mechanism.

Results

ATP stimulates a calcium-activated chloride current in brain mRNA injected oocytes.

In control oocytes (Fig. 1A, upper traces), stepping the voltage from a holding potential of -100 mV to 20 mV elicited a transient outward (T_1) current (116 ± 37 nA ; $n = 18$). This current peak has already been described in the native oocyte (Miledi, 1982 ; Barish, 1983) and has been identified as a Ca^{2+} dependent Cl^- current. In guinea-pig brain mRNA injected oocytes (Fig. 1A, lower traces) the outward current amplitude was significantly ($p < 0.01$) increased (832 ± 66 nA, $n = 22$) and an additional delayed transient component (T_2) could be clearly distinguished (993 ± 123 nA, $n = 22$). T_1 appeared within 257 ± 44 ms ($n = 22$) and T_2 after a delay of 1024 ± 87 ms ($n = 22$). Superfusing the injected oocytes with ATP (Fig. 1A, lower traces) caused a marked increase in T_2 amplitude (320 ± 40 %, $n = 22$), but only a slight effect on T_1 (25 ± 7 %, $n = 22$). By contrast, in control oocytes (Fig. 1A, upper traces) ATP superfusion only induced a slight decrease in T_1 amplitude (-41 ± 19 % ; $n = 18$). Intraoocyte ATP injection (final concentration: 1 mM) failed to alter the two outward current components, suggesting that ATP acts extracellularly.

As illustrated in Fig. 1B, the ATP response was transient, indicating a desensitization process. The ATP response latency was 27 ± 9 s ($n = 7$) and the time to peak current ranged from 4 to 6 minutes.

In order to determine the ionic basis of the ATP-activated current, Cl^- was substituted with methanesulphonate which has a low permeability through Cl^- channels (Barish, 1983). Under these conditions, both T_1 and T_2 were reversed (Fig. 1B, inset). Furthermore, addition of the chloride channel blocker 9AC (2.5 mM) inhibited both current components (data not shown). Therefore, T_1 and T_2 were assumed to be carried by Cl^- .

The ATP response occurred in a dose-dependent manner (Fig. 1C, inset). Increasing ATP concentrations were superfused for 3 minutes with a period of 20 minutes. This protocol allowed to monitor dose-effect curves without any significant desensitization. The concentration threshold was 3 μM and half maximum effect 40 μM (Fig. 1C).

Pharmacology of the acquired-ATP response.

To characterize the ATP response, the potency of different purinergic agonists was investigated. While adenosine and AMP were ineffective ($n = 6$), ADP and ATP were equipotent in eliciting large Cl^- currents (Fig. 2A).

In various tissues (Dubyak, 1986), other purine and pyrimidine nucleotides triphosphate exhibit potent ATP-like effects. Fig. 2B demonstrates that ATP, UTP and ITP were equieffective although, GTP was ineffective. ATP appears to act in its native form since the non-hydrolysable analog $\text{ATP}\gamma\text{s}$ was as potent as ATP ($n = 5$; Fig. 2C). MeATP was without any effect ($n = 4$) and moreover MeATP which is known to be a non competitive antagonist of the $\text{P}_{2\text{X}}$ purinoceptors (for review see Gordon, 1986), failed to affect the ATP response.

On the contrary, reactive blue 2 (RB2), a putative $\text{P}_{2\text{Y}}$ receptor antagonist (Burnstock and Warland, 1987; Rice and Singleton, 1989) reversibly inhibited the ATP response ($n = 5$; Fig. 2D). Nevertheless, it has to be noticed that RB2 induced a reversible inhibition of the basal Cl^- current.

Finally, we investigated whether the ATP response might involve prostaglandin synthesis. In the presence of 10 μM indomethacin (15 minutes pretreatment), the ATP response was not significantly different from control ($n = 5$; data not shown).

Voltage-dependence of the ATP response.

As illustrated in Fig. 3A, the ATP response depended on the membrane voltage (current before ATP was digitally subtracted). Bell-shaped current to voltage relationship (I-V) of the ATP-sensitive current is depicted in Fig. 3B. The voltage threshold was -20 mV ($n = 3$), the peak current was recorded at 20 mV ($n = 3$) and current amplitude decreased when potential was made more positive than 20 mV.

The ATP-sensitive current inactivated in a voltage-dependent manner (Fig. 3C). The surimposed traces in Fig. 3C demonstrate that the ATP response was inactivated as the conditioning depolarization was made more positive than -50 mV. Half-inactivation occurred at a potential of -30 mV ($n = 3$; Fig. 3D).

ATP modulates voltage-dependent Ca^{2+} channel activity.

Superfusing the oocytes with a Ca^{2+} -free solution (Fig. 4A) or addition of 100 μM Cd^{2+} to the bath (data not shown), reversibly inhibited the ATP response.

To investigate the activity and the modulation of the Ca^{2+} channels expressed *in ovo*, oocytes were tested in a particular medium where Ba^{2+} (40 mM) was used as charge carrier and where Cl^- currents were abolished by using a test solution without Cl^- and in the presence of the Cl^- channel blocker 9AC (Leonard *et al.*, 1987). As ATP led to Ba^{2+} precipitation in the Ba^{2+} medium, we investigated the effects of ADP (an equipotent agonist) on the Ba^{2+} inward current ($I_{\text{Ba}^{2+}}$). The Cd^{2+} -sensitive $I_{\text{Ba}^{2+}}$ (net $I_{\text{Ba}^{2+}}$) recorded in an injected oocyte is illustrated in Fig. 4B (inset). The mean amplitude of $I_{\text{Ba}^{2+}}$ (holding potential : -100 mV ; depolarization to 20 mV) was -63 ± 6 nA ($n = 16$) versus -12 ± 3 nA ($n = 8$) in control oocytes. As shown in Fig. 4B, $I_{\text{Ba}^{2+}}$ occurred with only a single phase of inward current which decayed in a monotonic manner. Addition of 1 mM ADP to the Ba^{2+} solution resulted in an increase in $I_{\text{Ba}^{2+}}$ amplitude (26 ± 5 %, $n = 6$) but no additional component of current was revealed and the inactivation kinetic remained monotonic.

The I-V relationship of $I_{Ba^{2+}}$ is illustrated in Fig. 4B (filled dots). The $I_{Ba^{2+}}$ activation threshold was -40mV ($n = 6$) and the peak current was recorded at 20 mV ($n = 6$). In the presence of ADP, no significant change in the voltage-dependence of $I_{Ba^{2+}}$ was found (filled squares). Cd^{2+} inhibited the Ca^{2+} current (Fig. 4B ; empty dots).

Voltage inactivation of $I_{Ba^{2+}}$ was tested using the double pulse protocol (data not shown). The half-inactivation potential ($n = 4$) was -30 mV and remained unchanged in the presence of 1 mM ADP.

These results demonstrate that T_2 is not due to a second delayed phase of Ca^{2+} entry even if it is largely dependent on extracellular Ca^{2+} . Thus, it was postulated that the occurrence of T_2 results from an additional process of Cl^- channel opening which may probably depend on intracellular Ca^{2+} level.

Involvement of internal Ca^{2+} pools in the ATP response.

In order to assess the mechanisms underlying T_2 and particularly the eventual involvement of internal Ca^{2+} pools, we examined the effects of various experimental conditions known to alter intracellular Ca^{2+} activity. Injection of the Ca^{2+} chelator EGTA (final concentration : 200 μ M) partially reduced T_1 amplitude ($-39 \pm 6 \%$, $n = 6$) and completely abolished T_2 (Fig. 5A). Moreover, the effects of compounds known to interact on Ca^{2+} uptake and release from internal stores have been studied. TMB8 (100 μ M) inhibited in a reversible manner the ATP response ($n = 4$; Fig. 5B). Similar results were obtained with 3 mM caffeine ($n = 3$; data not shown).

A possible mechanism producing a delayed effect of Ca^{2+} may be that of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. Ba^{2+} has been shown to block Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism (Palade *et al.*, 1987 ; Gillo *et al.*, 1989). Injection of 250 pmoles Ba^{2+} inhibited T_2 ($n = 4$; Fig. 5C). Similar results were obtained with injection of ruthenium red (final concentration : 60 μ M ; $n = 3$; Fig. 5D).

Discussion

To our knowledge, the ATP response we described is the first demonstration of purinoceptor expression in brain mRNA injected *Xenopus* oocytes.

According to Burnstock (1978) classification, the acquired purinoceptor would correspond to a P₂ type (recognizing ATP and ADP but not A and AMP). ATP and the non-hydrolysable analog ATP γ s were equieffective, demonstrating that ATP hydrolysis was not required. A further subdivision of P₂ receptors was proposed by Burnstock and Kennedy (1985). MeATP which has been shown to specifically desensitize the P_{2X} receptors, did not affect the ATP response. On the contrary, reactive blue 2 which is known to be a P_{2Y} receptor specific antagonist (Burnstock and Warland, 1987 ; Rice and Singleton, 1989) reversibly blocked the ATP response. The rank order of potency of extracellular adenine nucleotides and the efficiency of the purinoceptor antagonists suggest that the ATP receptor is of the P_{2Y} subtype, according to the classification of Burnstock and Kennedy (1985). In other studies, P_{2Y} purinoceptors have been identified in the guinea-pig taenia coli and trachea (Burnstock and Kennedy, 1985 ; Gordon, 1986), where they cause muscle relaxation, and in the vascular endothelium where they are thought to release endothelium derived relaxing factor (or nitric oxides), and probably also prostacyclin to relax vascular smooth muscle. Similarly, identification of P_{2Y} purinoceptors associated with voltage-activated cation channels have been reported in cardiac ventricular myocytes of the rat (Björsson et al., 1989).

The ATP concentrations which could appear as being important (EC₅₀ : 40 μ M) are nevertheless consistent with those found in central and peripheral nervous systems to trigger purinoceptor-dependent responses. Ehrlich *et al.*, (1988) reported that iterative stimulation of cultured neural cells NG 10815 led by discharge to an ATP accumulation over 100 μ M. Other studies in primary culture of sheep anterior pituitary cells showed that full activation of P₂ purinoceptors required concentrations as large as 100 μ M (Van der Merwe *et al.*, 1988). In fact, studies in man show that during hemostasis, concentrations of adenine nucleotides in blood may reach levels as high as 20 μ M while

one order of magnitude higher levels of adenine nucleotides have been measured in plasma from soldiers suffering from traumatic shock (Green and Stoner, 1950). The present data may, therefore, be compatible with a pathophysiological role for ATP as an extracellular transmitter in the mammalian brain, particularly since compounds such as catecholamines and neuropeptides, which are released together with ATP from neural endings, may enhance the effects of extracellular ATP.

Expression of phagocyte P₂ nucleotide receptors in *Xenopus* oocytes have been recently reported (Murphy and Tiffany, 1990). Acquired ATP_γs responsiveness in oocyte injected with mRNA from the promyelocytic leukemia cell line HL60 was investigated by measuring the accelerated efflux of intracellular Ca²⁺. ADP and AMP were inactive whereas UTP and ITP exhibited activity that was similar in potency to that of ATP_γs. These authors concluded that the expressed purinoceptor was distinct from all other previously described P₂ purinoceptor subtypes. On the contrary, our results clearly demonstrate that ADP and ATP were equieffective to elicit a Cl⁻ current stimulation and therefore may more likely be similar to previously described purinoceptors.

Activation of the P_{2Y} purinoceptors by agonists enhanced both components of Cl⁻ currents (T₁ and T₂) spontaneously occurring after brain mRNA injection. The main effect consisted in a large increase in the second delayed current component (T₂). T₂ was exclusively found in mRNA injected oocytes and therefore, it may be assumed that oocytes have acquired either a novel type of Cl⁻ channel or a novel process of channel opening. Using the patch-clamp techniques, recent studies of Cl⁻ currents expressed *de novo* in brain mRNA injected oocytes gave evidence for only one single channel conductance (Takahashi *et al.*, 1987). Therefore, it seems that one single type of Cl⁻ channel would subserve both Cl⁻ components and that T₁ and T₂ may result from two distinct pathways of Ca²⁺ increase.

Removal of extracellular Ca²⁺ or addition of Cd²⁺ reversibly inhibited the ATP response. Furthermore, the bell-shaped I-V relationships and the inactivation properties of the ATP-sensitive current revealed that it may depend on Ca²⁺ entry through voltage-activated Ca²⁺ channels. ADP increased the Ca²⁺ inward current amplitude although, no

additional component of Ca^{2+} entry which could account for T_2 occurrence was found. Moreover, EGTA which is known to chelate internal Ca^{2+} , totally blocked T_2 while, T_1 was less affected. These results suggest that T_1 may be directly initiated by a Ca^{2+} entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels although, T_2 would arise from a second step of intracellular Ca^{2+} increase. The involvement of internal Ca^{2+} in the ATP response was further suggested by its inhibition with TMB8 and caffeine, both agents known to interact on Ca^{2+} release and uptake from internal stores. Similarly to Gillo *et al.*, (1989), using intracellular loading of Ba^{2+} or ruthenium red, we found that a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release process may trigger T_2 . Taken together, these results may indicate that a novel calcium release mechanism which could be faster or more sensitive to changes in intracellular Ca^{2+} than the native mechanism (Busa *et al.*, 1985 ; Berridge *et al.*, 1988) would be expressed in brain mRNA injected oocytes.

To date, there have been no study of physical characterisation of the putative P_2 receptor of any cell. In this context, the present report establishes that a specific protein from neurons exhibiting ATP responsiveness can be expressed in mRNA-injected *Xenopus* oocytes. Therefore, the primary structure of nucleotide receptors could be obtained by the cloning of cDNA through functional expression in the oocyte, independant of preliminary structure information about the receptor protein.

It is concluded that in addition to the involvement of ATP secreted by neurons in the process that initiates the production of long-term alterations in synaptic functional (Ehlich *et al.*, 1988), ATP may actually also be involved in short-term regulation of neuronal activity in the central nervous system by acting on specific purinoceptors.

Acknowledgements : We wish to thank Dr. M. LAZDUNSKI (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, Valbonne, FRANCE) for his valuable comments on the manuscript. We are grateful to the Association Française contre les Myopathies for financial support.

Experimental procedures.

mRNA extraction procedure.

mRNA extraction procedure as been previously described elsewhere (Fournier *et al.*, 1989). Briefly, whole cerebral hemispheres were quickly removed from 45 old days guinea-pig fetuses and total RNA was purified using a modified guanidium thiocyanate-CsCl method (Chirgwin *et al.*, 1979). Poly A⁺ mRNA was purified by oligo-dT cellulose chromatography (redi-column ; Pharmacia-LKB) according to standard procedures (Maniatis *et al.*, 1982).

mRNA injection in *Xenopus* oocyte.

Xenopus laevis were purchased from C.R.B.M (Montpellier, France). Pieces of the ovary were surgically removed and individual oocytes were dissected away in a modified Barth's solution (mM) : NaCl, 88 ; KCl, 1 ; NaHCO₃, 2.4 ; Ca(NO₃)₂, 0.33 ; CaCl₂ 0.41 ; MgSO₄, 0.82 ; N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 10 ; pH, 7.4 with NaOH. To discard follicular cells, Stage V and VI oocytes (Dumont, 1972) were treated for 2 hours with collagenase (1 mg . ml⁻¹, Boehringer Mannheim, FRG) in Barth's medium. 50 ng RNA were injected per oocyte using a pressure microinjector (Inject+Matic ; Geneva, Switzerland). Control oocytes were injected with 50 nl distilled water. Then, oocytes were kept for 4 to 7 days in Barth's medium supplemented with pyruvate (2.5 mM), theophylline (0.5 mM) and gentamycin (50 µg . ml⁻¹).

Electrophysiological measurements.

In a 0.3 ml perfusion chamber, a single oocyte was impaled with two standard glass microelectrodes (0.5 - 2.0 Mohm resistance) filled with 3 M -KCl and maintained under voltage clamp using a Dagan 8500 (Minneapolis, USA) amplifier. Stimulation of the preparation, data acquisition and analyses were performed using the pClamp software (Axon Instruments, Burlingame, USA). In addition, membrane currents were continuously displayed on a flat bed single pen recorder (Sefram, Paris, France). Drugs were applied either externally by addition to the surperfusate (peristaltic pump Gilson ; flow rate :

3 ml . min⁻¹) or internally by pressure injection (Inject+Matic, Geneva, Switzerland) using an additional micropipette (4 à 6 µm in diameter). The injected volume was 0.01 - 0.02 % of the cell volume. To calculate the final concentration of an injected substance, it was assumed to be distributed throughout the entire cell volume (1µl). All injection solutions were made in 10 mM HEPES-KOH distilled water (pH : 7.0). Saline solution (ND 96) of the following composition was used in all procedures unless otherwise stated (mM) : NaCl, 96 ; KCl, 2 ; CaCl₂, 1.8 ; MgCl₂, 2 ; HEPES, 5 (pH 7.4 with NaOH). Barium currents were measured in a Ba²⁺ methanesulphonate solution containing (mM) : BaOH, 40 ; NaOH, 50 ; KOH, 2 ; 9 Anthroïc-acid, 5 ; HEPES, 5 (pH 7.3 with methanesulphonic acid).

The drugs used (all purchased from Sigma unless otherwise stated) were : adenosine (A), adenosine 5'-monophosphate (AMP), adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), adenosine 5'-(γ-thio) triphosphate tetralithium salt (ATPγS) as purinergic agonists ; α, β methyleneadenosine 5'-triphosphate lithium salt (MeATP) as P_{2X} non competitive antagonist ; basilen blue E-3G and cibacron blue 3GA (RB2) as P_{2Y} antagonists ; inosine 5'-triphosphate sodium salt (ITP), uridine 5'-triphosphate sodium salt (UTP), guanosine 5'-triphosphate sodium salt (GTP) as purine and pyrimidine nucleotides triphosphate ; indomethacin as a prostaglandin synthesis inhibitor ; ruthenium red (R. Red) as a blocker of the Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mechanism ; 3,4,5 -trimethoxybenzoïc acid 8-(diethylamino) octyl ester hydrochloride (TMB8) and caffeine as internal pools Ca²⁺ fluxes inhibitors ; ethylene glycol-bis-(β-aminoethyl ether)-N, N'-tetraacetic acid (EGTA) as a Ca²⁺ chelator ; 9-anthroïc acid (9AC) from Fluka as a chloride channel blocker.

The variability of the results was expressed as the standard error of the mean with n indicating the number of cells contributing to the mean. Student's t test was used for statistical analysis.

References

- Alvarez, J.L., Mongo, K., Scamps, F., and Vassort, G. (1990) Effect of purinergic stimulation on the Ca^{2+} current in single frog cardiac cells. *Pflügers Arch.* 416, 189-195.
- Barish, M.E. (1983) A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J. Physiol. (Lond.)* 342, 309-325.
- Benham, C.D., and Tsien, R.W. (1987) A novel receptor-operated Ca^{2+} permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 328, 275-278.
- Berridge, M.J., Cobbold, P.H., and Cuthbertson, K.S.R. (1988) Spatial and temporal aspects of cell signalling. *Phil. trans. R. Soc. Lond. B.* 320, 325-343.
- Björsson, O.G., Monck, J.R., and Williamson, J.R. (1989) Identification of P₂Y purinoceptors associated with the voltage activated cation channels in cardiac ventricular myocytes of the rat. *Eur. J. Biochem.* 186, 395-404.
- Burnstock, G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509-581.
- Burnstock, G. (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In Straut, R. W. and Bolis, L., (eds), *Cell membrane receptors for drugs and hormones*. Raven Press, New-York.
- Burnstock, G. (1981) Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. *J. Physiol. (Lond.)* 313, 1-35.
- Burnstock, G., and Kennedy, C. (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P₂ purinoceptors. *Gen. Pharmacol.* 16, 433-440.
- Burnstock, G., and Warland, J.J.I. (1987) Reactive blue 2 selectively antagonises the relaxant responses to ATP and its analogues which are mediated by the P₂Y purinoceptor. *Br. J. Pharmacol.* 90, 383-391.
- Busa, W.B., Fergusson, J.E., Suresh, K.J., Williamson, J.R., and Nuccitelli, R. (1985) Activation of frog (*Xenopus laevis*) eggs by inositol triphosphate. I. Characterization of Ca^{2+} release from intracellular stores. *J. Cell. Biol.* 101, 677-682.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald, R.J., and Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.

- Cockcroft, S., and Stutchfield, J. (1989) The receptors for ATP and fMetLeuPhe are independently coupled to phospholipases C and A₂ via G-protein(s). *Biochem. J.* 263, 715-723.
- Dascal, N. (1987) The use of *Xenopus* oocytes for the study of ions channels. *C. R. C. Crit. Rev. Biochem.* 22, 317-387.
- Dubyak, G.R., and De Young, M.B. (1985) Intracellular Ca²⁺ mobilization activated by extracellular ATP in Ehrlich ascite tumor cells. *J. Biol. Chem.* 260, 10653-10661.
- Dubyak, G.R. (1986) Extracellular ATP activates polyphosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization in Ehrlich ascites tumor cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 245, 84-95.
- Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis*. (Daudin). *I. J. Morphol.* 136, 153-180.
- Ehrlich, Y.H., Snider, R.M., Kornecki, E., Garfield, M.G., and Lenox, R.H. (1988) Modulation of neuronal signal transduction systems by extracellular ATP. *J. Neurochem.* 50, 295-301.
- Fournier, F., Honoré, E., Brulé, G., Mironneau, J., and Guilbault, P. (1989) Expression of Ba²⁺ current in *Xenopus* oocytes injected with pregnant rat myometrium mRNA. *Pflügers Arch.* 413, 682-684.
- Gillo, B., Landau, E.M. Moriarty, T.M., Roberts, J.L., and Sealfon, S.C. (1989) A novel calcium-dependent chloride current in *Xenopus* oocytes injected with brain messenger RNA. *J. Physiol. (Lond.)* 417, 41-67.
- Gordon, J.L. (1986) Extracellular ATP : effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233, 309-319.
- Green, H.N., and Stoner, H.B. (1950) In *Biological actions of the adenine nucleotides*. pp 65-103, H.K. Lewis, London.
- Holton, F.A., and Holton, P. (1954) The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots ; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* 126, 124-140.
- Honoré, E., Martin, C., Mironneau, C., and Mironneau, J. (1989) An ATP-sensitive conductance in cultured smooth muscle cells from pregnant rat myometrium. *Am. J. Physiol.* 257, C297-C305.
- Jahr, C.E., and Jessel, T.M. (1983) ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurons. *Nature*, 304, 730-733.
- Leonard, J.P., Nargeot, J., Snutch, T.P., Davidson, J., and Lester, H.A. (1987) Ca channels induced in *Xenopus* oocytes by rat brain mRNA. *J. Neurosciences* 7, 875-881.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) In Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (eds), *Molecular cloning : A laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor.

- Miledi,R. (1982) A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocyte. Proc. R. Soc. Lond. B. 215, 491-497.
- Murphy,P.M., and Tiffany,H.L. (1990) Characterization of phagocyte P2 nucleotide receptor expressed in *Xenopus* oocytes. J. Biol. Chem. 265, 11615-11621.
- Okajima,F., Sato,K., and Kondo,Y. (1989) P₂-purinergic agonists activates phospholipase C in a guanine nucleotide- and Ca²⁺- dependent manner in FRTL-5 thyroid cell membranes. F.E.B.S. Lett. 253, 132-136.
- Palade, P. (1987) Drug-induced Ca²⁺ release from isolated sarcoplasmic reticulum. 2. Releases involving a Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. J. Biol. Chem. 262, 6142-6148.
- Rice,W.R., and Singleton,F.M. (1989) P₂Y-purinoreceptor regulation of surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells is associated with mobilization of intracellular calcium.Br. J. Pharmacol. 97, 158-162.
- Takahashi,T., Neher,E., and Sakmann,B. (1987) Rat brain serotonin receptors in *Xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 5063-5067.

Legends

Figure 1: ATP activates a calcium-activated chloride current in brain mRNA-injected oocytes.

A) Upper traces : the Ca^{2+} -activated Cl^- current in a control oocyte was not affected by 300 μM ATP superfusion.

Lower traces : 300 μM ATP superfusion stimulated the Ca^{2+} -activated Cl^- current in a brain mRNA injected oocyte.

B) Inset : lowering chloride concentration from 105 to 10 mM (substitution with methanesulphonate) reversed the ATP effects.

The response to 300 μM ATP superfusion displayed a desensitization process.

C) Inset : dose-effect relationship of the ATP response. Used concentrations were 10, 30, 100, 300 and 1000 μM . The graph represents the relationship between the ATP-activated chloride current amplitude as a function of the logarithm of the ATP concentration (in μM). Number of oocytes used for each mean data point is indicated.

In all experiments, the holding potential was -100 mV and the oocytes were depolarized to 20 mV every 20 seconds. ATP superfusion is indicated by filled bars.

Figure 2 : Pharmacological characterization of the acquired purinergic response.

A) Chart record of the effects of adenosine (A), AMP, ADP and ATP on the membrane currents.

B) Chart record of the effects of ATP, GTP, UTP and ITP on the membrane currents.

C) Chart record of the effects of ATP, $\text{ATP}\gamma\text{s}$ and MeATP on the membrane currents.

D) Inhibition of the ATP response by 30 μM reactive blue 2 (RB2). The application of RB2 is indicated by a continuous line.

Every compound was superfused at the concentration of 300 μM .

In all experiments, the holding potential was -100 mV and the oocytes were depolarized to 20 mV for 4 seconds every 20 seconds.

Figure 3: Voltage-dependence of the purinergic response.

A) ATP-sensitive currents were recorded at -10, 10 and 50 mV (the current before 300 μM ATP superfusion was digitally subtracted). The holding potential was -100 mV and the depolarizing potential is indicated on each current trace.

B) Current to voltage relationship of the ATP-evoked current.

C) Voltage-dependent inactivation of the ATP-activated current. Upper traces : voltage protocol ; lower traces : current recordings. The test-pulse potential was 20 mV and the prepulse potential (5s duration) was incremented by 10 mV every 20 seconds.

D) Inactivation curve of the ATP-sensitive current.

Figure 4 : The purinergic response depends on external Ca^{2+} .

A) Ca^{2+} -free solution (0 Ca^{2+} / 1 mM EGTA) reversibly blocked the ATP (300 μM) response. The Ca^{2+} -free solution superfusion is indicated by empty bar and ATP by filled bars.

The holding potential was -100 mV and the oocyte was depolarized to 20 mV every 20 seconds.

B) Inset : 1 mM ADP (4 minutes superfusion) increased the amplitude of the inward current (currents were digitally subtracted from the current recorded in the presence of 100 μM Cd^{2+}). The holding potential was -100 mV and the oocytes were depolarized to 20 mV every 20 seconds.

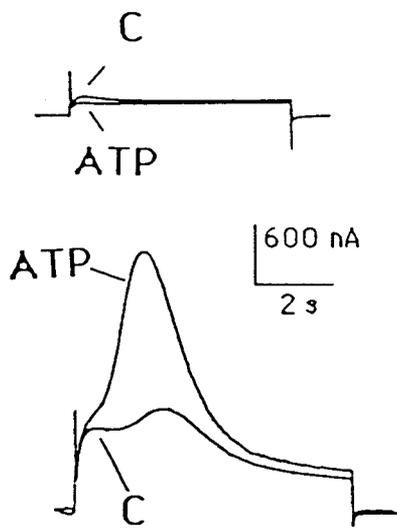
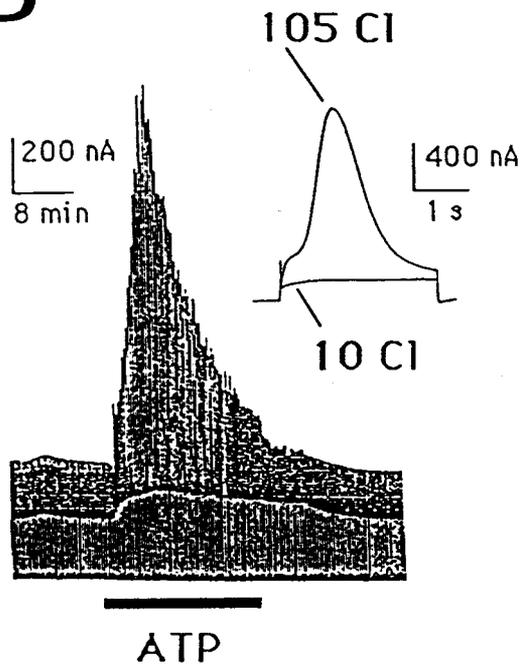
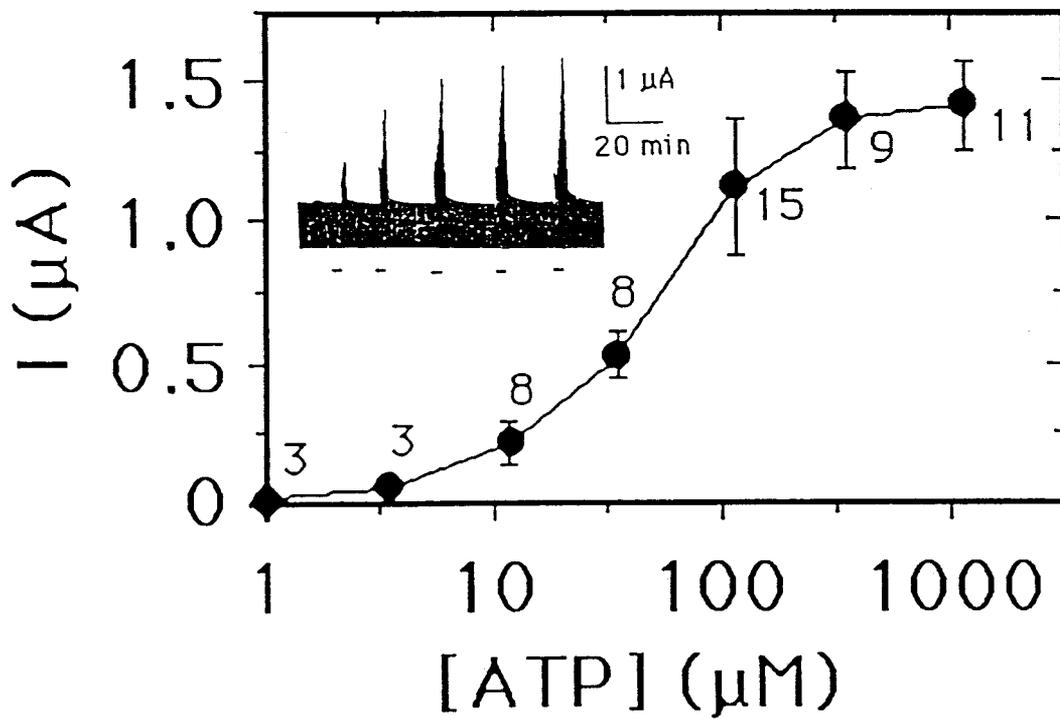
Current to voltage relationships of : i) the control membrane current (filled dots), ii) the current in the presence of 1 mM ADP (filled squares), iii) the current in the presence of 100 μM Cd^{2+} (empty dots).

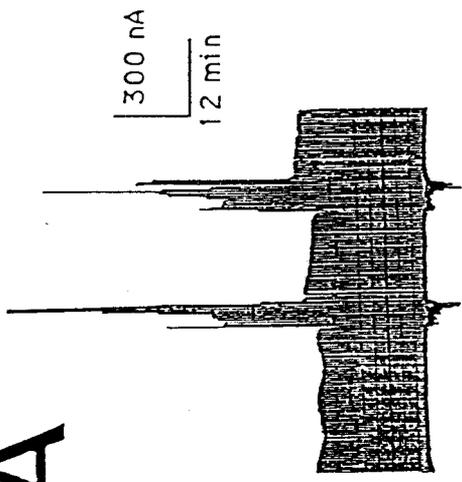
Every data point is the mean of 6 experiments. Standard error of the mean is indicated for the peak current recorded at 20 mV.

Figure 5 : Involvement of internal calcium activity in the purinergic response.

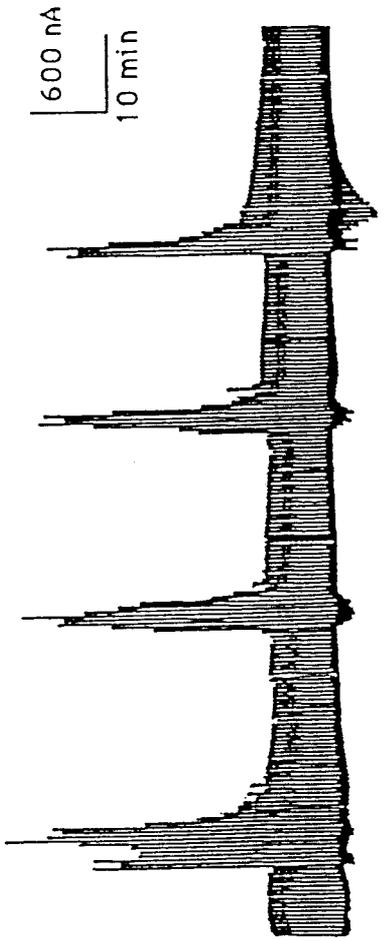
- A) EGTA injection (final concentration : 200 μM) inhibited the ATP-sensitive current.
- B) Chart record of the effects of 100 μM TMB8 superfusion on the ATP (300 μM) response. TMB8 superfusion is indicated by empty bar and ATP by filled bars.
- C) 250 pmol. Ba^{2+} injection depressed the ATP-activated current.
- D) Effects of ruthenium red (60 μM final concentration) on the ATP response.

In these experiments, the holding potential was -100 mV and the oocytes were depolarized to 20 mV every 20 seconds. In all experiments, ATP concentration was 300 μM .

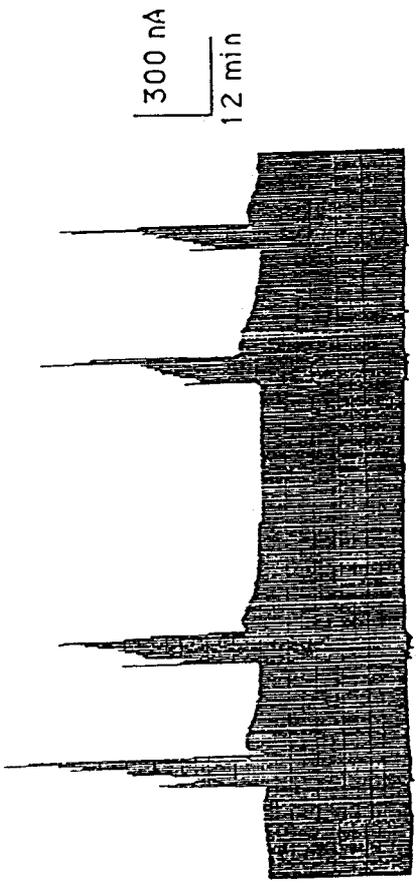
A**B****C**

A

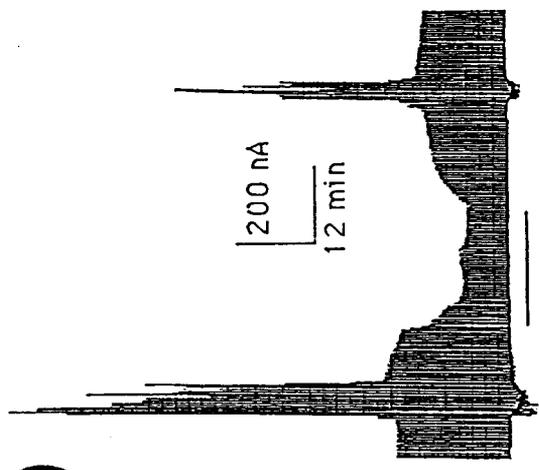
AMP ADP ATP

B

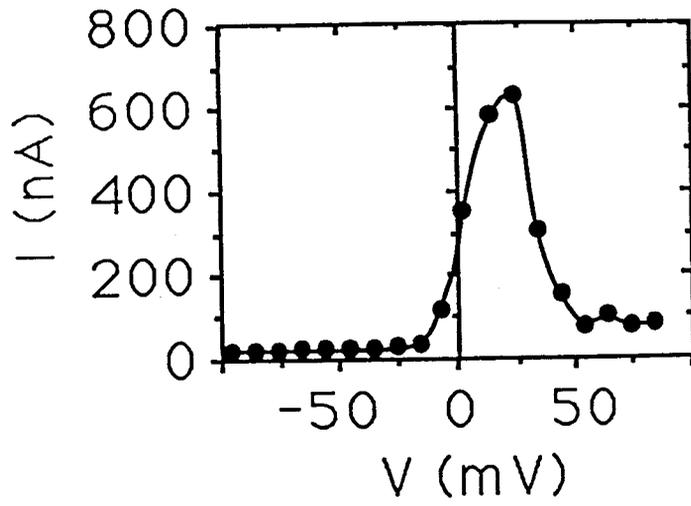
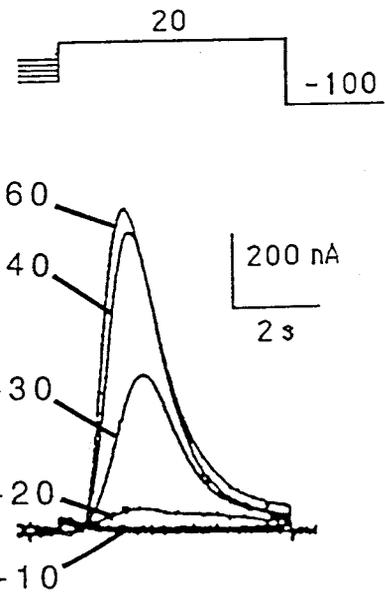
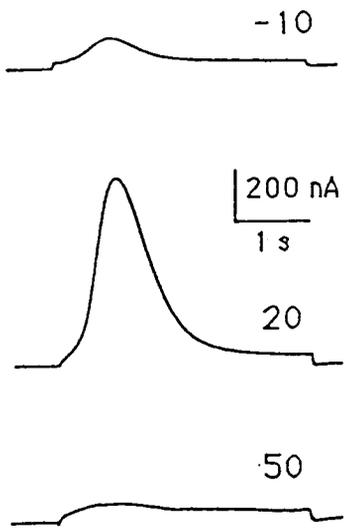
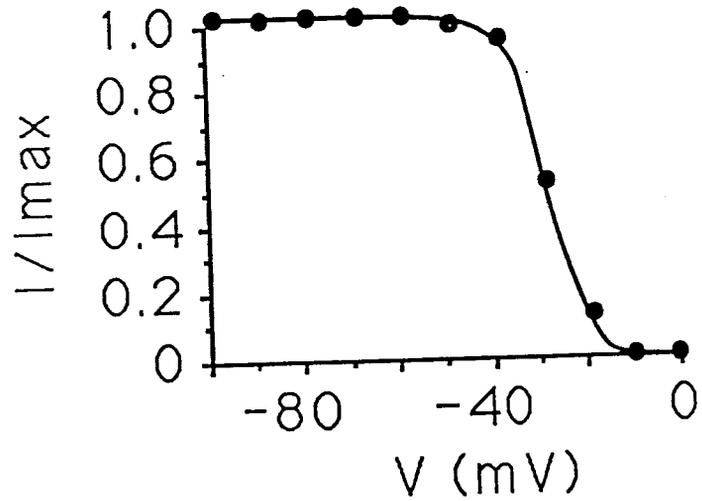
ATP GTP UTP ITP ATP

C

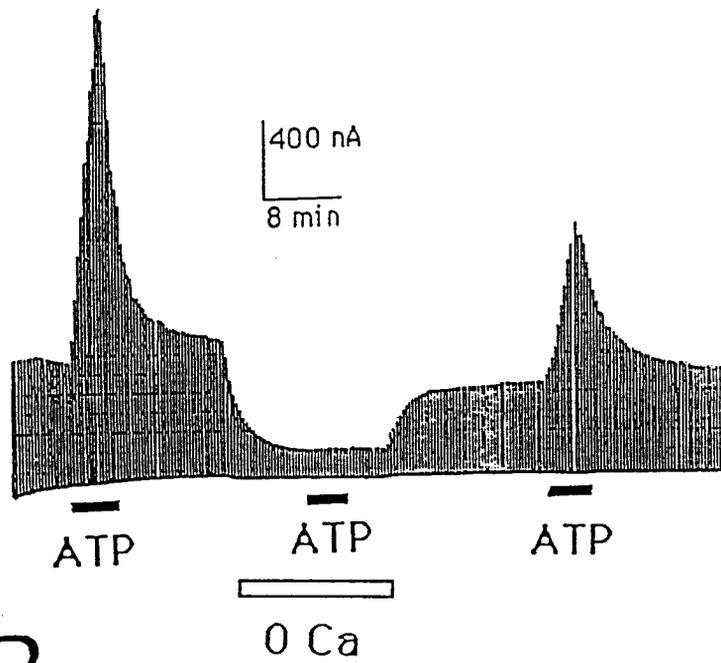
ATP ATP γ S MeATP ATP ATP

D

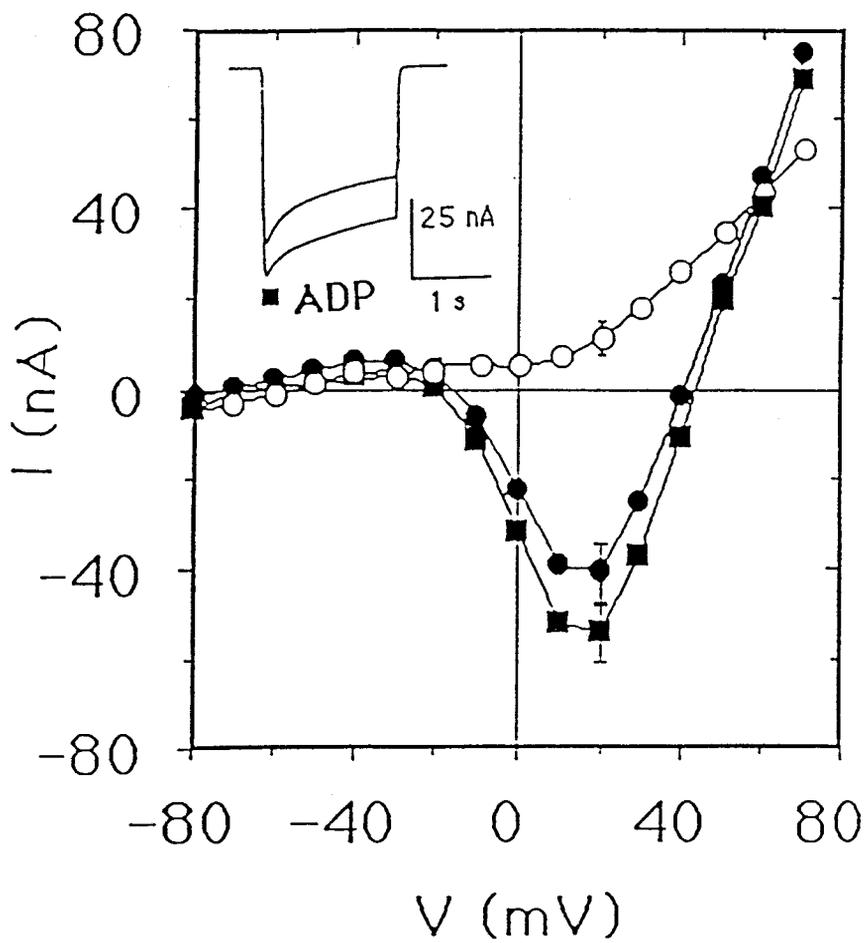
ATP ATP ATP RB2 ATP

B**D**

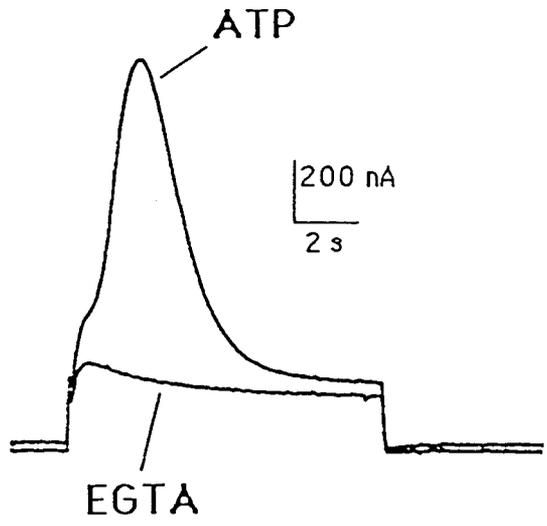
A



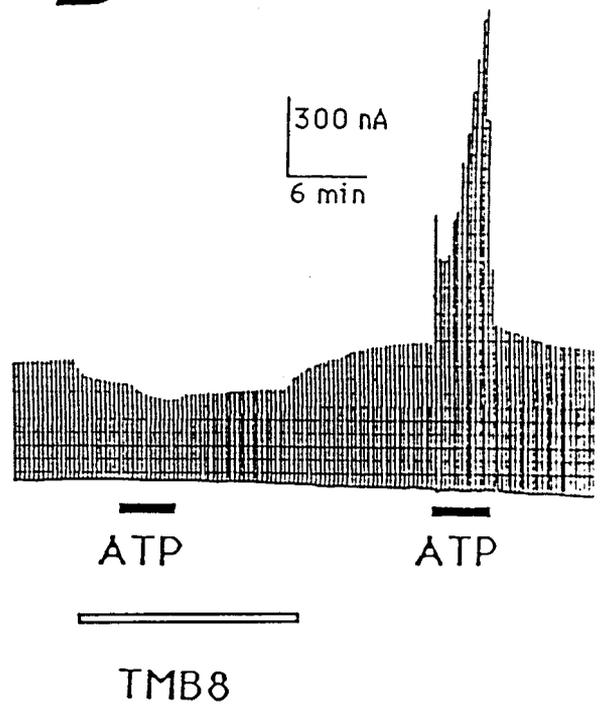
B



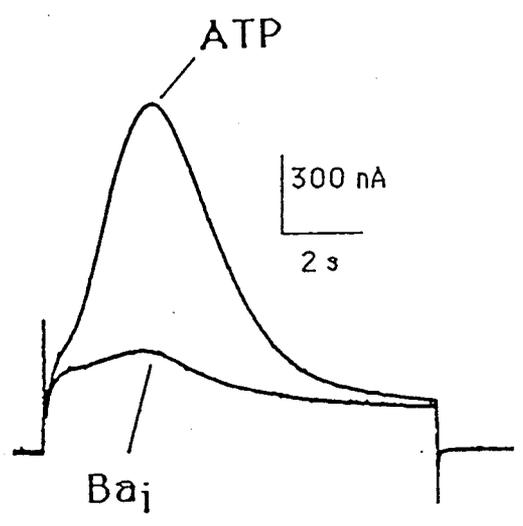
A



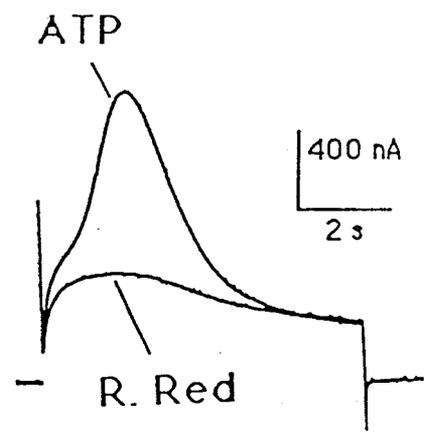
B



C



D



Ce deuxième article illustre un autre type de réponse obtenu lors de l'activation de récepteurs purinergiques exogènes définis précisément en fonction de la nomenclature proposée par BURNSTOCK comme des récepteurs appartenant à la classe P2Y. Il s'agit ici d'une réponse radicalement différente de celle déjà présentée puisque:

- 1) elle dépend complètement du calcium extracellulaire;
- 2) elle est antagonisée par les bloqueurs inorganiques des canaux calciques voltage-dépendants (Cd^{2+});
- 3) elle se développe de manière voltage-dépendante avec un maximum d'activation à + 20 mV (maximum de la conductance calcique);
- 4) elle s'inactive de manière voltage-dépendante ;
- 5) elle se développe progressivement et assez lentement puisque le maximum ne survient qu'après 4 à 8 mn de perfusion des agonistes purinergiques (ATP, ADP et ATPtS. Dans de nombreux cas, d'ailleurs, la réponse induite par la production d'InsP₃ (insensible au calcium externe) a déjà pratiquement disparu.

Ce deuxième type de réponse ATP est insensible à l'injection intracellulaire d'héparine (150 µg/ml), un inhibiteur sélectif et compétitif de la libération de calcium induite par l'InsP₃ à partir des stocks intracellulaires (résultat non illustré). Ceci démontre que cette réponse ATP est complètement indépendante de la production d'InsP₃ et de la libération de calcium qui lui est associée.

Par ailleurs, l'effet des agonistes purinergiques efficaces (ATP et ADP) se manifeste de manière inégale sur les deux composantes spontanées de ICl(Ca) déjà décrites auparavant (T₁ et T₂), activées lors de dépolarisations membranaires et dépendantes de l'activité des canaux calciques voltage-dépendants. En effet, il est montré, au travers de ces expériences, que l'activation du récepteur purinergique conduit à une potentialisation relativement discrète (30% au maximum) du courant entrant transitant par les canaux calciques. Cette augmentation initiale du courant entrant de calcium retrouvée fidèlement sur la composante T₁ (directement dépendante de l'entrée de calcium) se traduit de plus par une augmentation progressive et cette fois très marquée de la compo-

sante T_2 (dépendante quant à elle d'une libération de calcium par les réserves intracellulaires asservie à l'entrée de calcium : mécanisme de calcium induced calcium release).

Cet effet différentiel de l'ATP extracellulaire sur les deux composantes de courant chlore se traduisant par une augmentation importante de T_2 accompagné d'un effet mineur sur T_1 peut s'expliquer par le fait qu'une légère augmentation de l'entrée de calcium (environ 30% sur T_1) peut avoir des répercussions importantes si l'on considère que le relargage de type CICR, responsable de T_2 constitue non pas un relai simple, mais une étape amplificatrice de cette entrée de calcium dans l'ovocyte. Ainsi en tenant compte de l'existence du processus de CICR, il semble tout à fait plausible de considérer qu'un apport supplémentaire de charges calciques relativement restreint, engendré par l'augmentation du courant entrant de calcium suite à l'activation du récepteur purinergique, puisse aboutir à une libération de calcium par les stocks intracellulaires quant à elle fortement accrue et générant au bout du compte une réponse retardée fortement amplifiée (environ $320 \pm 42\%$ sur T_2).

V - MECANISME IMPLIQUE DANS LA FACILITATION DU PHENOMENE DE CALCIUM INDUCED CALCIUM RELEASE SUITE A L'ACTIVATION DU RECEPTEUR PURINERGIQUE. MISE EN EVIDENCE DU ROLE SIMULTANE DE LA PROTEINE KINASE C DANS LA POTENTIALISATION DE L'ACTIVITE DES CANAUX CALCIFIQUES ET DANS L'APPARITION DE LA COMPOSANTE T_2 .

A - Déclenchement de la composante T_2 suite à l'activation par l'ester de phorbol PMA de la protéine kinase C dans les ovocytes exprimant des ARN de cerveau de cobaye.

Il a été rapporté que les canaux calciques exprimés dans l'ovocyte à partir d'ARNm de cerveau de mammifère sont sensibles à l'activation de la protéine kinase C induite soit d'une part par la sollicitation de récepteurs aux neurotransmetteurs coexprimés et couplés à la phospholipase C ou soit d'autre part, plus directement, par des activateurs synthétiques comme les esters de phorbols type PMA ou PDBu (LEONARD et coll., 1987; SIGEL et BAUR, 1988).

Comme l'illustre la figure 19, l'effet potentiateur des agonistes purinergiques (ADP) sur le courant I_{Ca} peut être mimé par simple addition de PMA dans le milieu de perfusion (concentration finale 20nM; $133 \pm 5\%$, n=10). L'effet maximal du PMA sur ce courant entrant est assez tardif puisqu'il ne se

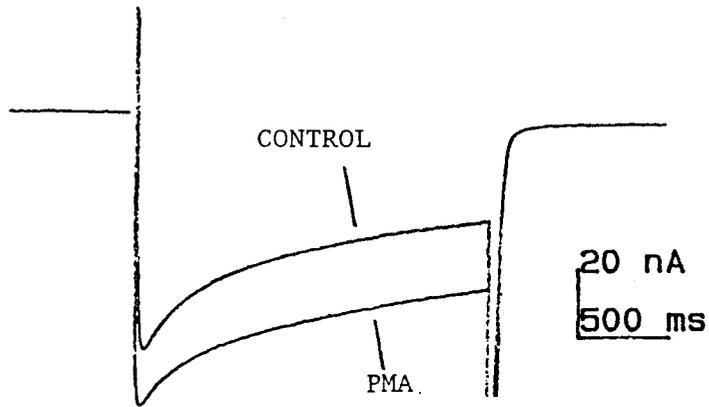
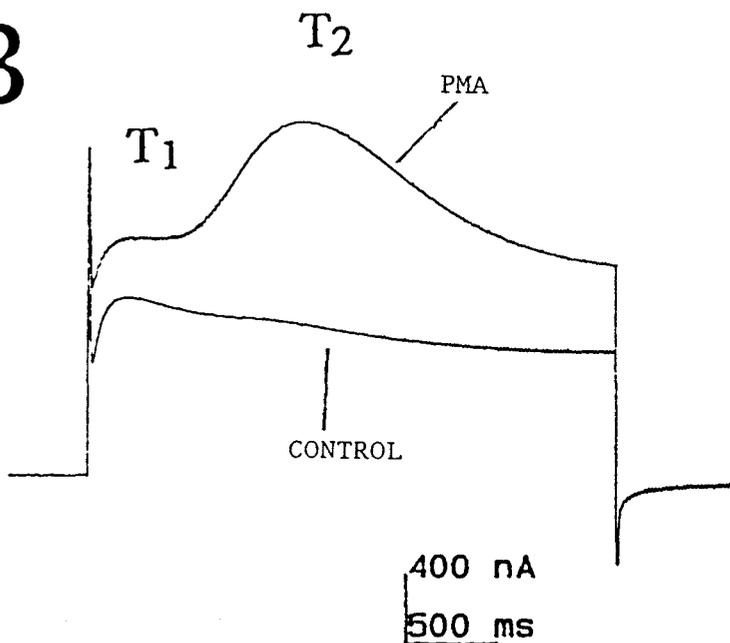
A**B**

Figure 19 : Mise en évidence sur un ovocyte injecté avec des ARN de cerveau de l'effet du PMA (20nM externe), un ester de phorbol activateur de la PKC sur l'activité des canaux calciques voltage dépendants et sur ICl(Ca). Ce composé provoquant une augmentation significative de I_{Ba} induit, en plus de l'augmentation de la composante T₁, le déclenchement de la composante T₂ en milieu physiologique normal (ND96).

manifeste que 4 à 8 min après le début de perfusion (il y a d'ailleurs une bonne correspondance entre ces valeurs et celles obtenues directement avec les agonistes purinergiques). Sur des ovocytes provenant du même lot (du même animal) et testés dans les conditions physiologiques normales (ND96), l'application externe de PMA, à la même concentration, provoque non seulement l'augmentation attendue de la composante T_1 ($130 \pm 7\%$ par rapport au contrôle, $n=8$), mais aussi, comme avec les agonistes purinergiques, l'apparition et la potentialisation de la composante T_2 ($246 \pm 37\%$ par rapport au contrôle, $n=8$; figure 19). Par la suite, cet effet du PMA se solde généralement par une dépression irréversible du courant $ICl(Ca)$, surtout lorsque de fortes concentrations de PMA sont utilisées (50 à 100 nM).

Ces expériences constituent un argument de poids en ce qui concerne l'intervention de la protéine kinase C dans le développement de la réponse purinergique calcium externe dépendante dans l'ovocyte (augmentation de T_1 et déclenchement de T_2). De plus, ces résultats semblent démontrer que cette sensibilisation du phénomène de CICR observée lors de l'activation du récepteur purinergique s'effectue par l'augmentation du courant entrant de calcium induite par l'activation de la protéine kinase C.

B - Déclenchement de la composante T2 suite à la potentialisation de l'influx de calcium induite par l'augmentation de la concentration externe de calcium.

Afin de circonscrire plus précisément le rôle de la protéine kinase C, il peut être démontré que le simple fait d'augmenter artificiellement l'amplitude du courant entrant de calcium est suffisant à lui seul pour déclencher l'apparition de T_2 . En effet, sur des ovocytes ne présentant pas spontanément la composante retardée T_2 , la potentialisation du courant entrant de calcium induite par l'augmentation de la concentration externe de calcium - de 1,8 mM à 5 mM - entraîne, bien entendu l'augmentation de la composante T_1 ($165 \pm 7\%$, $n=5$) mais occasionne, distinctement, l'apparition de la deuxième composante T_2 (figure 20). A la lueur de ces résultats il peut être émis l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de l'entrée de calcium induite par la protéine kinase C est à elle seule suffisante pour déclencher l'apparition de T_2 lors de l'activation du récepteur purinergique.

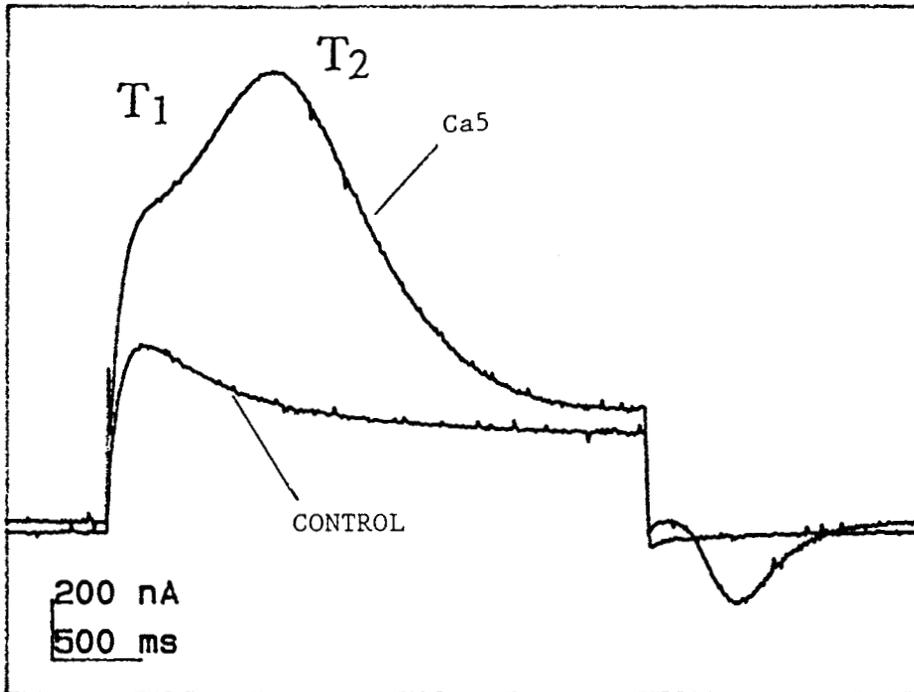


Figure 20 : Effet sur un ovocyte injecté de l'élévation du Ca extracellulaire (5mM) sur $I_{Cl(Ca)}$. L'augmentation du courant entrant visible sur la composante T_1 et due à l'augmentation du gradient électrochimique pour le Ca est contemporaine de l'apparition de la composante T_2 .

C - Effet de l'inhibiteur de l'activité de la protéine kinase C (H7) sur la composante T₂ induite lors de l'activation du récepteur purinergique exogène dans l'ovocyte de xénope.

En vue d'étayer cette argumentation concernant l'implication de la protéine kinase C, les effets d'inhibiteurs reconnus de l'activité de cette protéine comme le H7 (1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-méthylpipérazine) ont été analysés (KAWAMOTO et HIDAKA, 1984).

Ainsi, lorsque T₂ est complètement développée et parfaitement différenciée (3 à 5 mn après le début de perfusion de l'agoniste purinergique), l'injection intracellulaire de l'inhibiteur connu de la kinase C : H₇ (concentration intracellulaire finale 30µM) entraîne une importante réduction de cette composante (figure 21). De plus, ce composé, à la même concentration, inhibe totalement la composante T₂ induite par le PMA (20nM) sur les ovocytes injectés. Ceci indique que l'effet initial du PMA occasionnant l'apparition de T₂ est un effet spécifique sur la protéine kinase C (figure 21).

La réduction des effets de l'ATP sur T₂ par le H₇, ainsi que le développement de T₂ induit par le PMA, suggèrent de manière non équivoque que la protéine kinase C est largement impliquée dans la sensibilisation du phénomène de CICR consécutive à l'activation du récepteur purinergique.

D - Conclusion-Discussion.

Activation de la protéine kinase C et développement de la composante T₂.

L'ensemble de ces données permet de suggérer que la participation de la protéine kinase C semble circonscrite à l'augmentation du courant entrant de calcium impliquant d'une part la potentialisation de T₁ (directement asservie à l'entrée de calcium) et d'autre part l'augmentation ou l'apparition de T₂ (reflétant une amplification de l'entrée de calcium par une mobilisation du calcium intracellulaire dépendante elle-même du calcium: mécanisme de CICR).

Des travaux récents ont conduit à proposer que l'apparition de T₂ dans

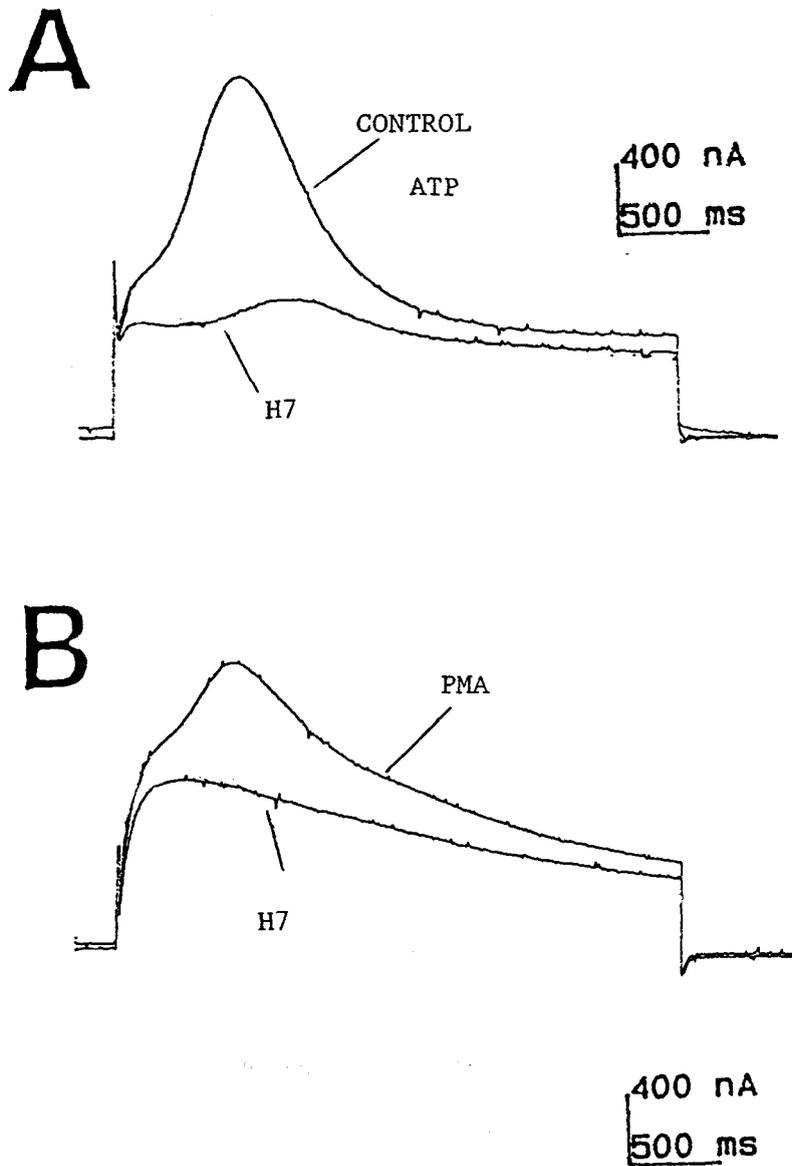


Figure 21 : Effet de l'injection intracellulaire d'H7 (concentration 30 μ M), un inhibiteur de l'activité de la PKC sur la réponse ATP (A) et sur la réponse PMA (B) induites dans les ovocytes injectés. Dans les 2 cas, l'H7 entraîne une réduction de T_1 et l'inhibition de T_2 (partielle dans le premier cas).

l'ovocyte de xénope injecté avec des ARN de cerveau de rat pouvait être effectivement corrélée à l'activation de la protéine kinase C (GILLO et coll., 1990). Selon ces auteurs, la protéine kinase C exercerait un effet direct sur le système de libération de calcium connecté aux stocks intracellulaires puisque dans leurs conditions, aucune modification du courant entrant (IBa) n'a été observée soit en présence de PMA ou de sérotonine permettant l'activation de la phospholipase C. Dès lors qu'aucun effet de l'InsP₃ n'a pu être montré par ces auteurs, il a été conclu que l'activation de la protéine kinase C représente le facteur dominant dans le processus de sensibilisation du CICR par action directe sur le stock interne de calcium.

Cependant, nos propres résultats démontrent, en accord avec d'autres publications récentes (SIGEL et BAUR, 1988) que l'effet de la protéine kinase C, observé sur les deux composantes de courant de chlore (T₁ et T₂), s'accompagne constamment, à l'inverse des observations de GILLO et coll., d'une augmentation significative de l'activité des canaux calciques voltage-dépendants exogènes. Par ailleurs, il semble que la seule augmentation du courant entrant de calcique soit suffisante pour déclencher et clairement différencier la composante T₂ et donc pour sensibiliser le phénomène de CICR exogène. Ceci est notamment démontré par nos expériences réalisées en augmentant la concentration extracellulaire de calcium.

Toutefois, il est clair que les effets de la protéine kinase C se manifestent de manière prépondérante sur le développement de la composante T₂. Bien que la libération de calcium par les stocks intracellulaires puisse représenter un relai amplificateur de l'entrée de calcium permettant de générer T₂ lors de l'augmentation de cette entrée de calcium évoquée par la protéine kinase C, il ne peut être exclu, du fait de la faible ampleur de l'effet sur le courant entrant (30 à 35% au maximum), que cette protéine kinase C puisse agir sur d'autres cibles cellulaires que le canal calcique. En fin de compte, il peut être supposé que la stimulation de ces autres cibles potentielles puisse conduire à un effet spécifique aboutissant à l'apparition de T₂. Cette suggestion peut être étayée par le fait que certaines observations mentionnent que les esters de phorbol et en particulier le PMA peuvent induire un effet direct de la protéine kinase C sur l'activité des stocks intracellulaires en provoquant une augmentation de la libération de calcium (GUNTHER, 1981; GILLO et coll., 1989).

Néanmoins, il convient de noter que dans nos expériences, les effets des agonistes purinergiques ainsi que ceux du PMA sur l'entrée de calcium (visualisée par le courant IBa) ont été quantifiés et appréciés en mesurant

l'amplitude du courant au pic (début d'impulsion). Or, il s'avère que ces activateurs ainsi que d'autres substances dont les effets sur I_{Ba} seront décrits par la suite (glutamate et acétylcholine) entraînent en plus un ralentissement significatif de l'inactivation de I_{Ba} et que donc les effets potentiateurs de ces substances sont plus marqués en fin d'impulsion qu'au pic de courant (cf. figure 19 et 24). En définitive, l'augmentation du courant entrant et le ralentissement de l'inactivation conjugués peuvent ainsi conduire à une entrée de charges calciques fortement accrue et largement suffisante pour permettre une activation appréciable du phénomène de Ca-induced-Ca release.

Modulation de l'activité des canaux calciques de neurones par la protéine kinase C.

Bon nombre d'effets d'activation de la protéine Kinase C ont été rapportés, en ce qui concerne les cellules neuronales, mais la nature de ces effets s'avère extrêmement variable. La plupart du temps, les effets de la protéine kinase C sur l'activité des canaux calciques semblent plutôt s'effectuer dans le sens d'une inhibition dans les neurones, les lignées cellulaires neuronales et dans les cellules endocrines excitables (GROSS ET MAC DONALD, 1988; MARCHETTI et BROWN, 1988; RANE et DUNLAP, 1986; WERZ et MAC DONALD, 1987 ab; DOERNER et coll., 1988; HARRIS et coll., 1986). A l'inverse, comme cela a déjà été mentionné, des effets potentiateurs de la protéine kinase C sur le courant de calcium concernant les neurones sympathiques (LIPSCOMBE et coll., 1988 a) et certains neurones d'aplysie (STRONG et coll., 1987). Ce dernier cas est particulièrement intéressant puisqu'il s'avère que la modulation par la protéine kinase C s'effectue en rendant fonctionnels des canaux préalablement silencieux. Les avis se rapportant à la détermination du type de canal calcique sensible à la modulation par la protéine kinase C divergent également. A titre d'exemple, RANE et DUNLAP (1986) suggèrent que l'activation de la protéine kinase C entraîne l'inhibition des courants calciques de type L dans les neurones de ganglions dorsaux de la moëlle épinière. A l'inverse, d'autres auteurs défendent l'hypothèse selon laquelle la cible de la protéine kinase C serait représentée par la famille de canaux calciques de type N (GROSS et MAC DONALD, 1988). Par ailleurs, EWALD et coll. (1989) ont démontré que l'inhibition de la protéine kinase C dans les cellules de ganglions dorsaux de moëlle épinière entraîne une réduction des effets inhibiteurs du neuropeptide Y sur le courant de type L (EWALD et coll. 1988b; WALKER

et coll., 1988). Dans les neurones d'hippocampe, DOERNER et coll. (1988) ont observé que l'activation de la protéine kinase C conduit à la réduction de la portion transitoire du courant calcique global en affectant vraisemblablement les canaux de type N.

Selon TSIEN et coll. (1988), la plupart des neurotransmetteurs inhibent l'activité des canaux calciques. Toutefois, certains neurotransmetteurs peuvent présenter des effets potentiateurs (GRAY et JOHNSON, 1987). Les effets inhibiteurs des neurotransmetteurs ont été observés sur les trois types de canaux calciques classiquement reconnus (T, N et L; TSIEN, 1988). De plus, dans certains cas, il a pu être mis en évidence que ces effets inhibiteurs étaient accompagnés de la production du second messenger diffusible: diacylglycérol (EWALD et coll., 1989).

En ce qui concerne le canal calcique neuronal exprimé à partir d'ARN de cerveau de mammifère dans l'ovocyte, la situation est encore plus confuse puisque, se référant à ses propriétés pharmacologiques (insensibilité aux dihydropyridines et à l' ω conotoxine), il ne s'agit ni d'un canal de type L ni d'un canal de type N (LEONARD et coll., 1987). Très récemment, LIN et coll., (1990) ont rapporté le blocage de ce courant par la toxine d'araignée FTX. Ce résultat est très important car il semble indiquer que la majeure partie des canaux exprimés sur les ovocytes injectés avec des ARNm de cerveau entier de mammifère correspondent à un nouveau type de canal décrit au niveau dendritique (TANK et coll., 1988; LLINAS et coll., 1989) : canal calcique de type P.

Du fait du taux d'expression important dans l'ovocyte des canaux calciques et également des propriétés électrophysiologiques du courant enregistré, LEONARD et coll. ont suggéré que les canaux calciques exprimés dans l'ovocyte pourraient intervenir au niveau du tissu natif dans la libération de neurotransmetteurs. Ainsi, selon nos résultats, l'ATP extracellulaire excercerait alors son rôle neuromodulateur en régulant l'activité de ces canaux calciques de type P par la PKC interposée ou en contrôlant, grâce à la production d'InsP₃ jouant sur l'excitabilité cellulaire, la probabilité d'ouverture de ces canaux. L'ensemble de ce système serait amplifié au niveau intracellulaire par un mécanisme de calcium induced-calcium release dévolu à l'entrée de calcium s'effectuant par ces mêmes canaux calciques.

Par ailleurs, certaines publications indiquent que les canaux calciques de type P (FTX sensibles) pourraient jouer un rôle beaucoup plus important que la simple intervention dans la libération du neurotransmetteur. En effet, ce courant pourrait intervenir dans la propagation du potentiel d'action au niveau des dendrites des cellules de Purkinje du tronc cérébral puisque ces

"spikes" sont insensibles aux DHP et à l'*w* conotoxine mais sont, par contre, bloqués par la FTX. Ce canal calcique de type P pourrait participer également, au niveau d'autres structures, au développement du courant calcique global (LIN et cool, 1990) :

- courant calcique présynaptique de la synapse de l'axone géant de seiche.
- "spikes" calciques mesurés au niveau de la neurohypophyse de grenouille.
- courant calcique somatodendritique des cellules granulaires du tronc cérébral en culture.
- courant calcique mesuré sur les neurones de drosophile.

La modulation de ce nouveau type de canal par les seconds messagers intracellulaires est à ce jour peu connue. Toutefois, il semble, à en croire les résultats acquis sur l'ovocyte, que ce canal soit, au moins partiellement, sensible à la phosphorylation induite par la protéine kinase C conduisant à une potentiation du courant suite à l'activation de récepteurs métabotropiques. Il n'est pas exclu que cette sensibilité puisse être retrouvée au niveau du tissu d'origine.

VI - SENSIBILISATION DU PHENOMENE DE CALCIUM INDUCED CALCIUM RELEASE PAR ACTIVATION D'AUTRES RECEPTEURS METABOTROPIQUES (LIES A L'ACTIVITE DE LA PHOSPHOLIPASE C) EXPRIMES A PARTIR D'ARN_m DE CERVEAU DE MAMMIFERES.

Déclenchement de la composante T2 suite à l'activation des récepteurs glutamate et acétylcholine exogènes.

De nombreux types de récepteurs membranaires peuvent être exprimés dans l'ovocyte de xénope suite à l'injection d'ARN_m de cerveau de mammifère (pour revue, voir SNUTCH, 1988). Ces récepteurs sont soit couplés à un système de production de seconds messagers intracellulaires (InsP₃, AMPc, GMPc); il s'agit alors de récepteurs de type métabotrope, soit couplés à un canal ionique dont l'ouverture est conditionnée par la fixation du ligand externe (récepteur ionotrope). Comme cela a été démontré précédemment, le récepteur purinergique de type P2Y peut être rangé dans la classe de récepteurs métabotropiques puisqu'il apparaît être couplé à l'activité d'une phospholipase

C permettant la synthèse des deux seconds messagers déclenchant chacun un type particulier de réponse : InsP_3 et diacylglycérol.

La possibilité pour d'autres types de récepteurs exprimés d'occasionner une réponse mimant celle du récepteur purinergique ou en d'autres termes d'engendrer la sensibilisation du phénomène de CICR a été envisagée.

Dans ce cadre, et d'une manière non exhaustive, certains récepteurs particuliers ont été étudiés:

- le récepteur glutamate (le glutamate est l'un des principaux neurotransmetteurs du système nerveux central) et le récepteur muscarinique à l'acétylcholine.

Ces récepteurs sont classiquement exprimés (pour revue, voir SNUTCH, 1988) dans l'ovocyte et couramment étudiés depuis de nombreuses années. Comme le récepteur purinergique, ils sont couplés à la phospholipase C et activent donc le métabolisme des phosphoinositides.

Comme l'illustre la figure 22, ces deux types de récepteurs exprimés dans l'ovocyte (récepteur Ach., récepteur glutamate) engendrent, lorsqu'ils sont activés par leurs agonistes respectifs, la réponse typique correspondant à la différenciation de la composante T_2 ; c'est à dire à la sensibilisation du mécanisme de CICR. Les caractéristiques générales de cette composante surnuméraire induite par ces deux types de récepteurs s'apparentent en tout point à la composante T_2 "purinergique" (même selectivité ionique, même dépendance vis à vis du calcium externe, même voltage-dépendance etc.) Dans les deux cas, le baryum intracellulaire (inhibiteur du phénomène de CICR) inhibe la composante T_2 , démontrant ainsi qu'il s'agit bien d'un effet de facilitation du mécanisme de CICR (figure 23). A l'inverse, l'activation de récepteurs non couplés à la phospholipase C et n'entraînant pas d'entrée de calcium importante comme le récepteur kainate ne déclenche pas l'apparition de cette composante (résultats non illustrés).

Par ailleurs, il est démontré que l'acétylcholine et le glutamate engendrent tous deux une augmentation du courant entrant IBa enregistrée en milieu BaMS 40 mM (figure 24). Les effets observés sont respectivement de $28 \pm 4\%$ pour 10 μM d'Ach, $n=3$; de $37 \pm 5\%$ pour 10 μM de glutamate, $n=3$ (ces valeurs étant enregistrées au pic de IBa).

A l'appui de ces résultats, il peut être mentionné que récemment, GILLO et coll. (1990) ont montré que l'activation du récepteur 5HT_{1C} , récepteur

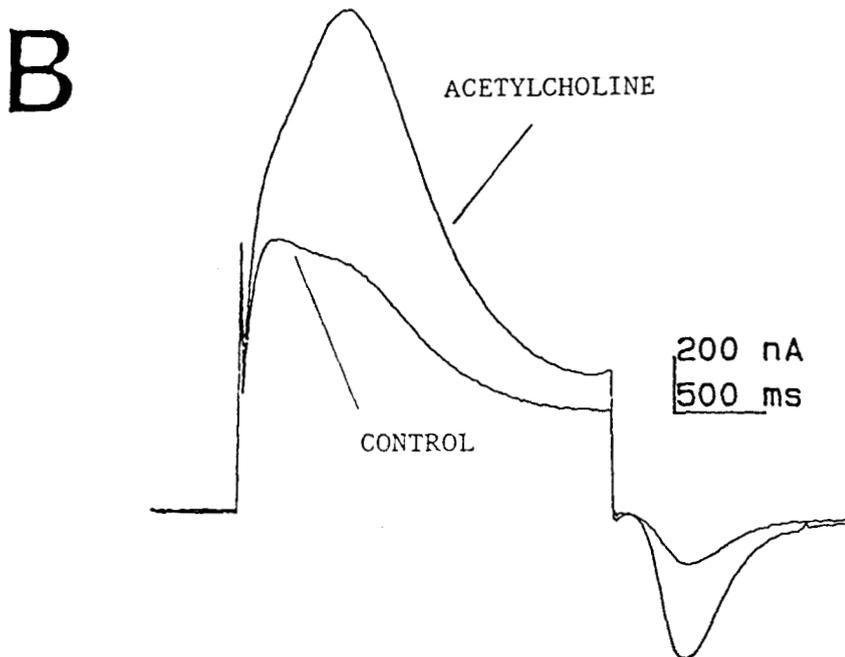
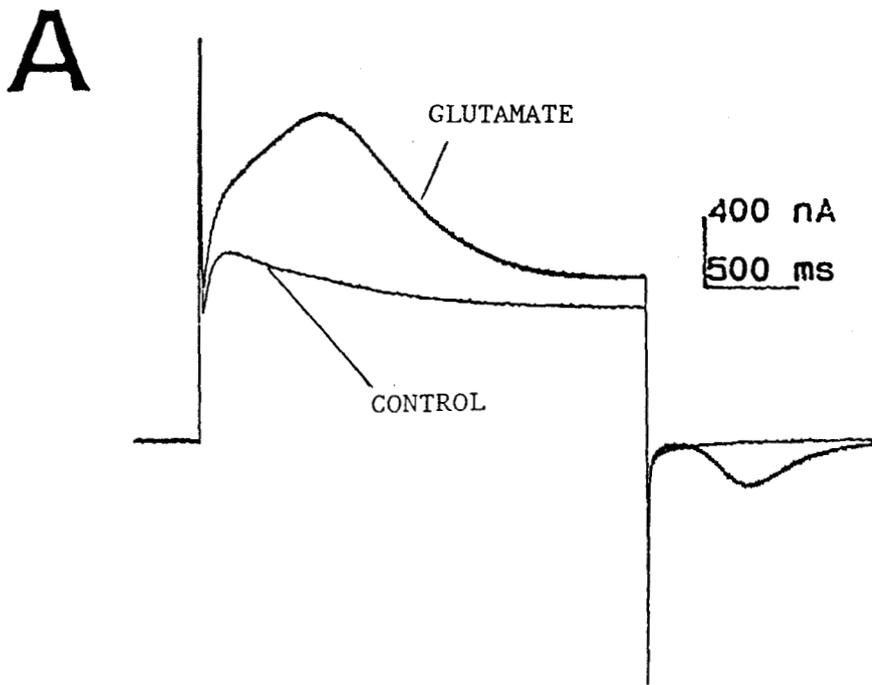


Figure 22 : Déclenchement ou potentialisation de la composante T_2 suite à l'activation de 2 types différents de récepteurs métabotropiques (connus pour stimuler la phospholipase C) dans des ovocytes injectés avec de l'ARN de cerveau de cobaye.

A - activation du récepteur glutamate.

B - activation du récepteur acétylcholine.

Les réponses obtenues s'apparentent à celles déclenchées par l'activation du récepteur purinergique dans l'ovocyte.

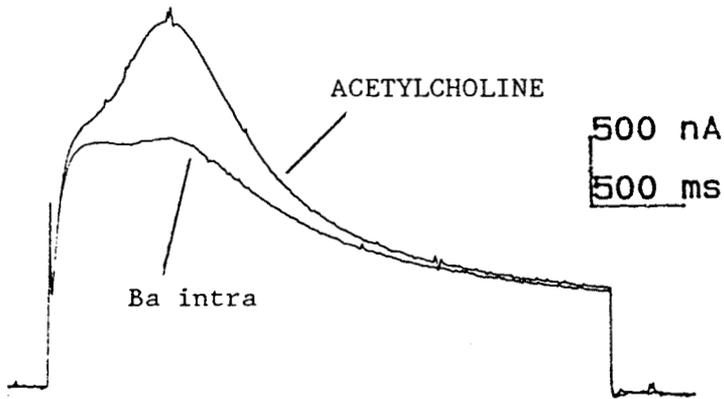
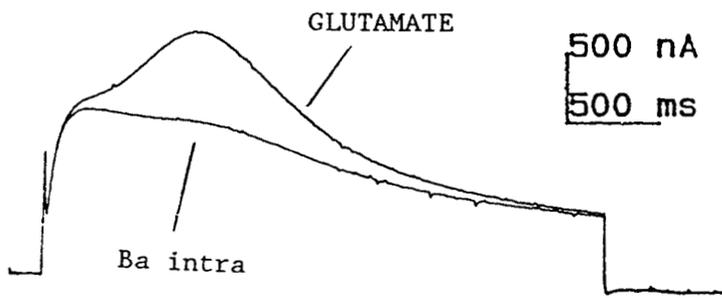


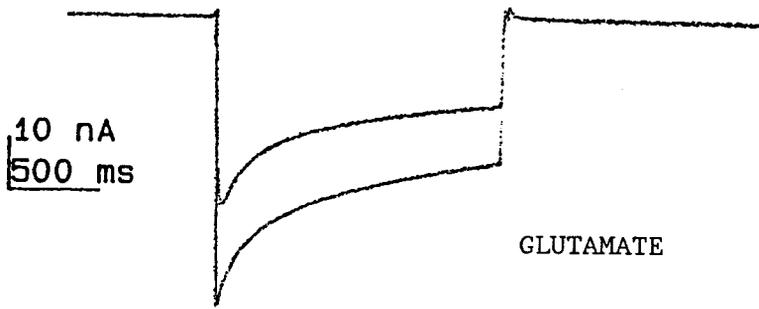
Figure 23 : Effet inhibiteur du Ba intracellulaire (300 pmoles) sur les réponses (T_2) déclenchées par l'activation des récepteurs glutamate (A) et acetylcholine (B) dans l'ovocyte injecté avec de l'ARN de cerveau de Cobaye. D'autres types de récepteurs métabotropiques que le récepteur purinergique sont capables d'induire la réponse typique T_2 de l'activation du CICR exogène.

également couplé à la phospholipase déclenche le phénomène de CICR dans les ovocytes injectés avec les ARN de cerveau de rat. Ces auteurs suggèrent comme cela a déjà été mentionné auparavant que cet effet passe par l'activation de la protéine kinase C. Toutefois, le mécanisme intime invoqué semble différent puisqu'il ne concerne pas une augmentation du courant entrant de calcium alors que, par ailleurs, d'autres auteurs mentionnent un effet potentiateur de l'Ach, du quisqualate et de la sérotonine sur IBa (SIGEL et BAUR, 1988; KANEKO et coll., 1990; GILLO et coll., 1987), effet médié également par l'activation de la protéine kinase C.

Les résultats concernant l'étude des réponses induites par ces quelques récepteurs métabotropiques permettent de dégager les conclusions suivantes:

- La sensibilisation du mécanisme de CICR dans l'ovocyte de xénope semble, d'une manière générale, s'effectuer suite à l'activation de récepteurs exogènes induisant une activité protéine kinase C;
- La sensibilisation du CICR, d'un point de vue qualitatif, ne présente aucune spécificité pour un type de récepteur métabotrope donné .
- La sensibilisation du CICR semble bien procéder d'une augmentation significative du courant entrant de calcium (déclenchée , à l'occasion, suite à l'activation d'un récepteur métabotrope exprimé dans la membrane ovocytaire).

A



B

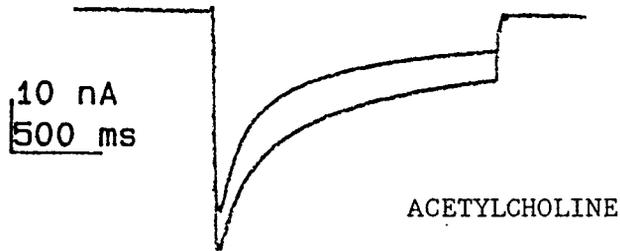


Figure 24 : Effet potentiateur du glutamate (10 μ M, A) et de l'acetylcholine (10 μ M, B) sur le courant IBa exogène exprimé dans l'ovocyte (BaMS 40).

DISCUSSION

DISCUSSION

Le mécanisme de calcium induced calcium release.

L'existence du phénomène de calcium induced calcium release a été démontrée en ce qui concerne les fibres musculaires squelettiques et cardiaques (ENDO, 1985; FABIATO, 1985; LONDON et coll., 1986; CANNELL et coll., 1987). Par ailleurs le récepteur à la ryanodine cardiaque, support moléculaire du mécanisme de CICR a été récemment cloné et séquencé (NAKAI et coll., 1990). Le cDNA, ainsi isolé, a été utilisé comme sonde oligonucléotidique pour rechercher la présence de ce récepteur au sein de différents tissus. Cette étude effectuée par "northern blot hybridation" a permis de mettre en évidence la présence de ce récepteur au niveau du système nerveux central et donc de préjuger de l'intervention du mécanisme de CICR dans certaines fonctions neuronales comme la stimulation de la libération de neurotransmetteurs. Par ailleurs, il a été suggéré qu'un tel mécanisme de CICR pourrait constituer, par le biais de fluctuations du calcium intracellulaire, le support des hyperpolarisations rythmiques observées sur les neurones sympathiques traités à la caféine (KUBA, 1980 ; LIPSCOMBE et coll., 1988). D'après ces auteurs, ces hyperpolarisations seraient engendrées par l'activation rythmique de canaux potassiques calcium dépendants grâce à des libérations en cascade de calcium s'effectuant par des mécanismes successifs de CICR. Dans ces cellules, les stocks de calcium impliqués dans ce type de processus ont été localisés au niveau des citernes de réticulum endoplasmique apposées à la membrane plasmique (FUJIMOTO et coll., 1980). D'autres types d'investigations, utilisant des techniques de microscopie électronique ont permis de démontrer qu'il existait dans les neurones des structures jonctionnelles entre le réticulum endoplasmique et la membrane de surface similaires aux jonctions adjacentes réticulum sarcoplasmique - sarcolemme de la fibre musculaire cardiaque renfermant le mécanisme de CICR et indispensable à la propagation du signal calcique conduisant à la contraction.

Le mécanisme de CICR décrit dans le cadre de ces travaux est activé du fait de l'entrée de calcium par les canaux calciques exogènes s'ouvrant lors de dépolarisations membranaires. Cependant, ce mécanisme pourrait, selon certains auteurs, être activé lors de l'entrée de calcium s'effectuant par d'autres voies comme par exemple au cours de l'activation du récepteur NMDA (LEONARD et coll., 1990). En effet, l'activation de ce récepteur transplanté dans l'ovocyte suite à l'injection d'ARNm de cerveau de mammifère engendre, lorsque la cellule est maintenue à un niveau stable de potentiel, une réponse en courant biphasique avec une phase précoce et transitoire suivie d'une phase plus lente et relativement maintenue dans le temps. Si la première phase correspond à une entrée de calcium par le canal directement associé au récepteur (récepteur ionotropique), il a été suggéré par ces mêmes auteurs que la deuxième phase pourrait être sous la dépendance au moins partielle d'un mécanisme de CICR. Dans le même ordre d'idée, l'utilisation d'ionophores perméables au calcium comme l'ionomycine ou le A23187 entraîne également une réponse biphasique apparentée à celle du NMDA. Dans ce cas également, certains auteurs ont suggéré que la deuxième phase maintenue pouvait correspondre à l'activation d'un mécanisme de CICR présent dans l'ovocyte (BOTON et coll., 1988).

La réponse purinergique exprimée dans l'ovocyte.

En résumé, l'activation du récepteur purinergique défini pharmacologiquement dans nos expériences comme un récepteur de type P2Y transplanté dans la membrane de l'ovocyte de Xénope occasionne l'apparition de deux types de réponses distinctes, toutes deux vraisemblablement liées à l'activation de la phospholipase C permettant la transformation du PIP2 en InsP₃ d'une part, et en diacyl-glycérol d'autre part :

- une réponse instantanée et précoce liée à une production d'InsP₃ et à une libération consécutive de calcium par les stocks intracellulaires InsP₃ sensibles;

- une réponse différée se manifestant sous la forme d'une sensibilisation par la protéine kinase C (augmentation du courant entrant de calcium) d'un phénomène de calcium induced calcium release exprimé spontanément dans l'ovocyte, suite à l'injection d'ARN messagers de cerveau de mammifère.

Le fait que ces deux types de réponses purinergiques puissent apparaître simultanément (en même temps) indique qu'il n'existe pas de désensibilisation croisée entre ces deux réponses. Il peut donc être suggéré que la réponse induite par l'InsP₃ et celle induite par le mécanisme de CICR n'interfèrent pas entre elles. Ainsi, si l'on considère, à juste titre, que la réponse InsP₃ s'effectue grâce au relargage de calcium à partir d'un stock InsP₃ sensible, la seconde réponse, correspondant au relargage de type CICR pourrait alors s'effectuer à partir de stocks intracellulaires de nature différente (InsP₃ insensibles). Recemment, il a été en effet proposé que, d'une manière générale, les réserves internes de calcium des cellules peuvent être divisées en deux groupes distincts: stocks InsP₃ sensibles et stocks InsP₃ insensibles (pour revue voir PETERSEN et WAKUI, 1990). En effet, l'InsP₃ ne peut en moyenne que libérer que 30 à 50% du calcium contenu dans les réserves intracellulaires; le reste pouvant être mobilisé par des ionophores calciques comme la ionomycine ou le A23187 (libération passant par un mécanisme de CICR). Il a par ailleurs été suggéré que ces deux types de stocks intracellulaires pouvaient également coexister dans l'ovocyte de xénope (SEALFON et coll., 1990). Aussi est on amené à conclure que le mécanisme de CICR, vraisemblablement synthétisé à partir des ARNm de cerveau de mammifère, s'insère et se connecte à des stocks intracellulaires InsP₃ insensibles. En outre, il n'est pas exclu que ces deux compartiments puissent communiquer entre eux permettant ainsi au calcium d'être transféré d'un type de stock à l'autre (BERRIDGE et IRVINE, 1989).

Role de l'ATP extracellulaire en tant que neurotransmetteur.

L'ATP peut exercer des effets sur les jonctions neuroeffectrices en agissant directement en tant que neurotransmetteur permettant de moduler la libération d'autres neurotransmetteurs. L'ATP est présent de manière ubiquitaire dans le tissu neuronal et, par ailleurs, il est relargué durant la stimulation nerveuse de nombreux tissus dont le colon de lapin, l'artère de l'oreille de lapin, le canal déférent et l'organe électrique de torpille (pour revue, voir GORDON, 1986).

Le concept visant à considérer l'ATP comme un transmetteur au niveau des nerfs dits "purinergiques" découle de certaines observations indiquant que d'une part, une composante du système nerveux autonome, ni adrénergique, ni cholinergique, est associée à l'activité de fibres musculaires lisses de certaines régions du tractus gastrointestinal et que d'autre part, l'ATP est localisé dans certains neurones du système nerveux central.

Quelques arguments assez probants assignent à l'ATP un rôle de neurotransmetteur:

- l'élévation du taux d'ATP libéré après stimulation nerveuse;
- les effets de certaines stimulations nerveuses mimées par l'ATP exogène;
- la présence au niveau de jonctions neuroeffectrices d'enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ATP;
- la présence dans les terminaisons nerveuses des fibres purinergiques de vésicules opaques caractéristiques de vésicules contenant de l'ATP.

En outre, dans certaines fibres, l'ATP n'est qu'un cotransmetteur. En effet, il a pu être colocalisé avec d'autres neurotransmetteurs comme par exemple l'adrénaline (SNEDDON et BURNSTOCK, 1984a; BURNSTOCK et SNEDDON, 1985). POTTER et coll., (1983) ont observé que des neurones de ganglion rachidien cervical sécrétaient un transmetteur purinergique, en plus de l'acétylcholine et de la noradrénaline, quand ils sont en coculture avec des myocytes cardiaques. De plus, l'effet majeur exercé par ces neurones est de nature purinergique. Par

ailleurs, l'ATP peut moduler le potentiel de membrane des neurones de ganglions autonomes en régulant la conductance potassique de repos (AKASU et coll.1983).

Les effets purinergiques au niveau central sont parfois inhibiteurs (réduction de la fréquence des trains de potentiel d'action, réduction de la libération de neurotransmetteurs comme l'acétylcholine ou la noradrénaline). Par contre études ont montré que l'ATP pouvait avoir des effets excitateurs sur certains nerfs de régions sensorielles du cerveau (noyau caudal du trijumeau) ou de corne dorsale de la moelle épinière (JAHR et JESSEL, 1983; SALT et HILL, 1983; FYFFE et PERL, 1984). De plus, certaines observations cliniques suggèrent que les nucléotides d'adénine pourraient être impliqués dans certaines pathologies comme la schizophrénie ou la dépression nerveuse (BURNSTOCK, 1980).

Les résultats exprimés jusqu'ici font état de l'expression d'un récepteur purinergique à partir d'ARNm de système nerveux central dont l'activation permet une potentiation de l'activité des canaux calciques par le biais de la PKC. Les rapports attendant à la présence de ce type de récepteur dans le système nerveux central sont peu nombreux. Ceci montre que l'ovocyte, exprimant en général des ARNm majoritaires peut aussi servir de moyen de détection de récepteurs appartenant au système nerveux central et dont la présence n'était encore qu'à peine soupçonnée. Ce cas de figure s'est déjà produit auparavant concernant le récepteur quisqualate métabotropique (Q_{Ap}), un sous type de récepteur glutamate dont l'activité s'est révélée importante dans le contrôle des mécanismes d'excitabilité neuronale et dans les phénomènes d'excitotoxicité à l'origine de la genèse de foyers épileptiques.

Jusqu'à lors, il a été suggéré que le récepteur purinergique de type P2 pourrait être impliqué dans les mécanismes de LTP c'est à dire la potentiation à long terme de l'efficacité synaptique (EHRlich et coll., 1990). En effet, sur des cellules hippocampiques en culture, ce récepteur stimule la voie des phosphoinositides par activation de la phospholipase C et donc, en conjugaison avec l'activation de la PKC et des canaux calciques voltage dépendants, l'activation de ce récepteur pourrait se trouver à l'origine, *in vivo*, au niveau présynaptique, de cette hyperactivité maintenue dans le temps. Ce phénomène de LTP, présent entre autre, au niveau de certains groupes de neurones d'hippocampe (noyau CA1 et CA3) ou d'autres régions du système nerveux central est très important puisqu'il pourrait constituer le support physiologique moléculaire des processus d'apprentissage et de mémorisation cellulaire, ces mécanismes étant eux mêmes à la base des propriétés de plasticité et

d'adaptation neuronale.

Toutefois, nos résultats ne permettent pas de préjuger de l'existence d'une telle association fonctionnelle entre le récepteur purinergique, l'activité des canaux calciques et le mécanisme de CICR au niveau des cellules natives, c'est à dire dans les neurones du système nerveux central. En effet, il s'agit peut être ici d'une association hétérologue artificielle issue de la recombinaison et de la colocalisation de ces différents protagonistes dans une seule et même cellule: l'ovocyte. En tout état de cause, l'entrée de calcium, le relargage intracellulaire dépendant de l' InsP_3 et l'activation de la PKC sont les mécanismes cellulaires de base conduisant au phénomène de LTP. Dans le système nerveux central, les récepteurs purinergiques de type P2 ont également été repérés au niveau des cellules pituitaires (VAN DER MERWE et coll., 1989) et le mécanisme de transduction est encore une fois lié à la production de phosphoinositides. Néanmoins, ces auteurs ne discutent pas de l'implication physiologique de la présence d'un tel récepteur dans ces cellules.

Conclusion.

Ces résultats démontrent que l'ovocyte de xénope utilisé en tant que système de recombinaison permet d'étudier dans un véritable environnement cellulaire contrôlé des mécanismes intervenant dans la modulation des signaux calciques intracellulaires comme non seulement les canaux ioniques de la membrane plasmique mais aussi les complexes protéiques de libération de calcium à partir des réserves intracellulaires. Ce point apparaît tout à fait nouveau et essentiel puisqu'en effet, non obstat certaines publications préliminaires (GILLO et coll., 1989), les travaux présentés dans cette thèse représentent la première démonstration de l'expression d'un mécanisme de CICR ainsi que la première caractérisation de ses propriétés.

Bien que remplissant un rôle fondamental concernant l'augmentation de la concentration cytosolique de calcium, processus à l'origine de nombreuses réponses cellulaires, ces mécanismes de libération de calcium n'ont été que peu étudiés sous l'angle d'approches structure-fonction faisant appel à des méthodologies de biologie moléculaire. Dans ce cadre, l'expression fonction-

nelle de tels mécanismes dans l'ovocyte devrait fournir un procédé d'étude permettant d'élucider, comme cela a déjà été entrepris en ce qui concerne les canaux ioniques de la membrane plasmique, leurs propriétés fondamentales au niveau moléculaire ainsi que leur modulation par certains effecteurs intracellulaires (phosphorylation etc...).

L'appréciation des variations de calcium intracellulaires s'est effectué dans nos expériences grâce à l'index chlore. Toutefois, les canaux chlore et le mécanisme de CICR peuvent être soumis à une régulation par des effecteurs communs. Aussi est-il envisagé d'étudier le fonctionnement du mécanisme de CICR en employant des sondes calciques sensibles telles que le FURA 2 permettant, en couplage avec des techniques d'imagerie, de déterminer la propagation spatio-temporelle du signal calcique. En effet, il convient à l'heure actuelle d'avoir une idée plus précise sur la répartition et la compartimentation des différents types de stocks intracellulaires ainsi que sur les différentes interactions qu'ils peuvent contracter entre eux. Parallèlement, l'étude de ce mécanisme peut s'effectuer plus directement à partir de préparations microsomales enrichies en systèmes membranaires intracellulaires d'ovocytes (réticulum endoplasmique, calciosomes). Cette technique, couplée aux méthodes de reconstitution dans des liposomes et de patch-clamp permettra d'accéder encore plus précisément à la détermination des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du système protéique responsable de l'activité de type calcium induced calcium release.

Comme cela a été décrit, le récepteur purinergique exprimé à partir d'ARNm provenant du système nerveux central a pu être caractérisé à la fois d'un point de vue pharmacologique mais aussi sur le plan de son fonctionnement (mécanisme de transduction). D'autres résultats non illustrés dans ce rapport et qui restent encore à l'état préliminaires semblent démontrer que l'activation de la phospholipase C par les agonistes purinergiques s'effectue par l'intermédiaire d'une protéine G (GTP binding protein). Par ailleurs, un certain nombre d'arguments nous conduisent à envisager une interaction entre la réponse purinergique type InsP_3 et la réponse également purinergique visualisée sous la forme du CICR. En effet, il semble, singulièrement, que l'injection directe d' InsP_3 dans l'ovocyte permette le déclenchement de la composante T_2 . En outre, cette composante T_2 induite par l' InsP_3 est également sensible au rouge de ruthénium démontrant ainsi que cette réponse est toujours

dépendante du mécanisme de CICR. Tout laisse à penser que ce type de réponse pourrait en fait provenir d'une relation étroite s'établissant entre les stocks de calcium InsP_3 sensibles et les stocks InsP_3 insensibles, ces derniers étant selon toute vraisemblance le siège de l'activité de type CICR. Il est envisagé, en effet, qu'une partie du calcium présent dans les stocks sensibles à l' InsP_3 serait transférée par un mécanisme encore à élucider dans les stocks InsP_3 insensibles. De plus, il semble que l'établissement de cette relation pourrait être contrôlé non par l' InsP_3 directement mais par un ou plusieurs de ses dérivés métaboliques comme par exemple l' InsP_4 . Cette voie d'investigation s'avère tout à fait intéressante puisqu'elle tend à vouloir démontrer que la production d' InsP_3 consécutive à l'activation d'un récepteur métabotropique pourrait en fait engendrer, en plus du relargage classique directement dépendant de l' InsP_3 , une réponse secondaire asservie au calcium extracellulaire et se manifestant sous la forme d'un mécanisme de CICR. En d'autres termes, l' InsP_3 et/ou ses dérivés métaboliques pourraient intervenir dans le remplissage optimal des stocks InsP_3 insensibles (possédant le mécanisme de relargage CICR) pour rendre ainsi une partie de la réponse InsP_3 sous la dépendance du calcium externe et donc sous la dépendance de l'entrée de calcium s'effectuant par les canaux calciques voltage dépendants. Il s'agit là d'une vision un peu finaliste et encore hypothétique mais qui s'appuie sur certaines constatations déjà mentionnées par bon nombre d'auteurs qui décrivent des interactions entre les deux types de stocks intracellulaires de calcium, celles-ci aboutissant au transfert de charges calciques d'un stock à l'autre (pour revue, voir BERRIDGE et coll., 1989).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

AKASU, T., HIRAI, K. et KOKETSU, K. (1983). Modulatory actions of ATP on membrane potentials of bullfrog sympathetic ganglion cells. *Brain Res.*, 258, 313-317

BARISH, M.E. (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature *xenopus* oocyte. *J. Physiol. (Lond.)*, 342, 309-325.

BERRIDGE, M.J. (1988). Inositol triphosphate-induced membrane potential oscillations in *xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)*, 403, 589-599.

BERRIDGE, M.J. and IRVINE, R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signaling. *Nature*, 341, 197-205

BERTRAG, A.H. (1987). Muscle chloride channels. *Physiol. Rev.*, 67, 618-724.

BOTON, R., DASCAL, N., GILLO, B. and LASS, Y. (1989). Two calcium activated chloride conductances in *xenopus laevis* oocytes permeabilized with the ionophore A23187. *J. Physiol. (Lond.)*, 408, 511-534.

BRULE, G., HAUDECOEUR, G. et GUILBAULT, P. (1987). Ca channels and excitation contraction coupling of crustacean skeletal muscle fiber. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86a, 3, 581-588.

BURNSTOCK, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In Straut, R.W. and Bolis, L., Eds, cell membrane receptors for drugs and

hormones. Raven Press, New York.

BURNSTOCK, G. and KENNEDY, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2 purinoceptors. *Gen. Pharmacol.* , 16, 433-440.

BURNSTOCK, G., and WARLAND, J.J.I. (1987). Reactive blue 2 selectively antagonises the relaxant responses to ATP and its analogues which mediated by P2Y purinoceptor. *Br. J. Pharmacol.* 90, 383-391

CANNEL, M.B., BERLIN, J.R. and LEDERER, W.J. (1987). Effect of membrane potential changes on the calcium transient in single rat cardiac muscle cells. *Science*, 238, 1419-1423.

CHIRGWIN, J.M., PRZYBYLA, A.E., McDONALD, R.J. et RUTTER, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18, 5284-5299.

DASCAL, N. et LANDAU, E.M. (1980). Types of muscarinic response in *xenopus* oocytes. *Life Science*, 27, 1423-1428.

DASCAL, N. (1987). The use of *xenopus* oocyte for the study of ion channels. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 22, 317-387.

DOERNER, D., PITLER, T.A., ALGER, B.E. (1988). Protein kinase C activation blocks specific calcium and potassium current components in isolated hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 8, 4069-4078.

DUBYAK, G.R. and DE YOUNG, M.B. (1985). Intracellular Ca²⁺ mobilization activated by extracellular ATP in Ehrlich ascite tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 260, 10653-10661.

DUBYAK, G.R. (1986). Extracellular ATP activated polyphosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilization in Ehrlich ascites tumor cells. Arch. Biochem. Biophys. 245, 84-95.

DUMONT, J.N. (1972). Oogenesis in *xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocytes development in laboratory maintained animals. J. Morphol., 136, 153-180.

ENDO, M. (1985). Calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Current Topics in Membrane and Transport, 25, 181-230.

ENDO, M., YAGI, S., et IINO, M. (1982). Tension-PCa relation and sarcoplasmic reticulum responses in chemically skinned smooth muscle fibres. Fed. Proc., 41, 2245-2250.

EWALD, D.A., MATTHIES, H.J.G., PERNEY, T.M., WALKER, R.J. and MILLER, R.J. (1988b). The effect of protein kinase C down regulation of the inhibitory modulation of dorsal root ganglion neuron Ca^{2+} currents by neuropeptide Y. J. Neurosci., 8; 2447-2451.

EWALD, D.A., PANG, I.H., STERNWEIS, P.C. and MILLER, R.J. (1989). Differential G-protein mediated coupling of neurotransmitter receptors to Ca^{2+} channels in rat dorsal root ganglion neurons in vitro. Neuron (in press)

FABIATO, A. (1985). Stimulated calcium current can both cause calcium loading and trigger calcium release from sarcoplasmic reticulum of skinned canine cardiac Purkinje cell. J. Gen. Physiol., 82, 291-320.

FINKEL, A.S. et GAGE, P.W. (1984). Conventional voltage clamping with two microelectrodes. In voltage and patch clamping with microelectrodes, Eds

SMITH, T.G., LECAR, H., REDMAN, S.J. and GAGE, P.W., 48-94.

FOURNIER, F., HONORE, E., BRULE, G., MIRONNEAU, J. et GUILBAULT, P. (1989). Expression of Ba currents in *xenopus* oocytes injected with pregnant rat myometrium mRNA. *Pflügers Archiv.*, 413, 682-684.

FOURNIER, F., JDAIAA, H., LORY, P., BRULE, G., CURGY, J.J., et GUILBAULT, P. (1990). Expression of calcium channels in *xenopus* oocyte injected with crab skeletal muscle fibre mRNA. *Biol. Cell.*, 68, 37-42.

FOURNIER, F., HONORE, E., COLLIN, T., NARGEOT, J. et GUILBAULT, P. (1990). Functional expression of P2Y purinoceptors in brain mRNA injected oocytes. *Pflügers Archiv.* Soumis à publication.

FOURNIER, F., HONORE, E., COLLIN, T. et GUILBAULT, P. (1990). Ins (1,4,5)P₃ formation and fluctuating chloride current response induced by external ATP in *xenopus* oocytes injected with embryonic guinea pig brain mRNA. *FEBS. LETT.* Sous Presse.

FUJIMOTO, S., YAMAMOTO, K., KUBA, K., MORITA, K. and KATO, E. (1980). Calcium localization in the sympathetic ganglion of the bullfrog and the effect of caffeine. *Brain Research*, 202, 21-32.

FYFFE, R.E.W. et PERL, E.R. (1984). Is ATP a central synaptic mediator for certain primary afferent fibers from mammalian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6890-6893.

GILLO, B., SEALFON, S., MORIATY, T.M., ROBERTS, J.L. et LANDAU, E.M. (1987). Potentiation of voltage-activated currents by serotonin in *Xenopus* oocytes injected with rat caudate mRNA. *Society for Neuroscience Abstracts*, 13, 1134.

GILLO, B., LASS, Y., NADLER, E. et ORON, Y. (1987). The involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium in the two component response to acetylcholine in *xenopus* oocytes. *J. Physiol.(Lond.)*, 392, 349-361.

GILLO, B., LANDAU, E.M., MORIARTY, T.M., ROBERTS, J.L. and SEALFON, S.C. (1989). A novel calcium-dependent chloride current in *xenopus* oocytes injected with brain messenger RNA. *J. Physiol. (Lond.)*, 417, 41-67.

GOBLET, C. et MOUNIER, Y. (1986). Calcium induced calcium release mechanism from the sarcoplasmic reticulum in skinned crab muscle fibers. *Cell Calcium*, 7, 61-72.

GOLDIN, A.L., SNUTCH, T., LÜBBERT, H., DOWSETT, A., MARSHALL, J., AULD, V., DOWNEY, W., FRITZ, L.C., LESTER, H.A., DUNN, R., CATTERAL, W.A. and DAVIDSON, N. (1986). Messenger RNA coding for only the subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 83, 7503- 7505.

GORDON, J.L. (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233, 309-319.

GUNTHER, R. (1981). Effects of 12-O-tetra décanoyl-phorbol-13-acetate on calcium efflux and protein discharge in pancreatic acini. *J. Biol. Chem.*, 256, 12040-12048.

GURDON, J.B., LANE, C.D., WOODLAND, H.R. and MARBAIX, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233, 177-182.

GRAY, R. and JOHNSON, D. (1987). Noradrenaline and B-adrenoceptor agonist

increase activity of voltage dependent calcium channels in hippocampal neurons. *Nature*; 327, 235-245.

GROSS, R.A. and MAC DONALD, R.I. (1988). Reduction of the same calcium current component by A and C kinases : Differential pertussis toxin sensitivity. *Neurosci.Lett.*, 88; 50-60.

HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. and SIGWORTH, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, 391, 85-100.

HARRIS, K.M., KONGSAMUT, S. and MILLER, R.J. (1986). Protein kinase C mediated regulation of calcium channels in PC-12 pheochromocytoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134; 1298-1305.

HOLLMAN, M.A., O'SHEA-GREENFIELD, S.W. et HEINEMANN, S.R. (1989). Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*, 342, 643-648.

JAHN, C.E. et JESSELL, T.M. (1983). ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature*, 304, 730-733.

KANEKO, S., DOI, E., WATANABE, H. and NOMURA, Y. (1990). A long-lasting potentiation of calmodulin-mediated chloride channel activity without a mediation of protein Kinase C in *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Cell Calcium*, 11, 309-317.

KAWAMOTO, S. et HIDAKA, H. (1984). 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 125, 258-264.

KOBILKA, B.K., MACGREGOR, C., DANIEL, K., KOBILKBA, T.S., CARON, M.G. and LEFKOWITZ, R.J.(1987). Functional activity and regulation of human β_2 - adrenergic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 262, 15796-15802.

KUBA, K. (1980). Release of calcium ions linked to the activation of potassium conductance in a caffeine - treated sympathetic neurones. *J. Physiol. (Lond)*, 298, 251-269.

LEGSSYER, A., POGGIOLI, J., RENARD, D. and VASSORT, G. (1988). ATP and other adenine compounds increase mechanical activity and inositol trisphosphate production in rat heart. *J. Physiol. (Lond)*, 401, 185-199.

LEONARD, J.P., NARGEOT, J., SNUTCH, T.P., DAVIDSON, N. and LESTER, H.A. (1987). Ca channels induced in *xenopus* oocytes by rat brain mRNA. *J. Neurosci.*, 7, 875-881.

LEONARD, J.P. and KELSO, S.R. (1990). Apparent desensitization of NMDA responses in *xenopus* oocytes involves calcium dependent chloride current. *Neuron*, 2, 53-60.

LIN, J.W., RUDY, B. and LLINAS, R. (1990). Funnel-web spider venom and a toxin fraction block calcium current expressed from rat mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. USA*, 87; 4538-4552.

LLINAS, R., SUGIMORI, M. and CHERKSEY, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86; 1689-1693.

LIPSCOMBE, D., BLEY, K. and TSIEN, R.W. (1988a). Modulation of neuronal Ca²⁺ channels by cAMP and phorbol esters. *Soc. Neurosci.*, 14;153 (abs).

LIPSCOMBE, D., MADISON, D.V., POENIE, M., REUTER, H., TSIEN, R.Y. and TSIEN, R.W. (1988). Spatial distribution of calcium channels and calcium transients in growth cones and cell bodies of sympathetic neurones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2398-2402.

LONDON, B. et KRUEGER, J.W. (1986). Contraction in voltage-clamped, internally perfused single heart cell. *J. Gen. Physiol.*, 88, 475-505.

LORY, P., RASSENDREN, F.A., RICHARD, S., TIAHO, F. et NARGEOT, J. (1990). Characterization of voltage-dependent calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from rat heart. *J. Physiol. (Lond.)*, 429, 95-112.

LÜBBERT, H., HOFFMAN, B., SNUTCH, T.P., VAN DYKE, T., LEVINE, A.J., HARTIG, P.R., LESTER, H.A. and DAVIDSON, N. (1987). cDNA cloning of a serotonin 5 HT_{1C} receptor by electrophysiological assays of mRNA-injected *xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4332-4336.

MALAGODI, M.H., and CHIOU, C.Y. (1974). Pharmacological evaluation of a new Ca²⁺ antagonist, 8-(N,N-diethylamino)-octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride (TMB-8): Studies in skeletal muscles. *Pharmacology (Basel)*, 12, 20-31

MARCHETTI, C. and BROWN, A.M. (1988). The protein kinase C activator 1-oleyl-2-acetyl-sn-glycerol inhibits two types of calcium currents in GH3 cells. *Am. J. Physiol.*, 254; C206-C210.

MIKAMI, A., IMOTO, K., TANABE, T., NIIDOME, T., MORI, Y., TAKESHIMA, H., NARUMIYA, S. and NUMA, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine sensitive calcium channel. *Nature*, 340, 230-

MILEDI, R. (1982). A calcium-dependent transient outward current current in *xenopus laevis* oocytes. Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci. B., 215, 491-497.

MILEDI, R. and PARKER, I. (1984). Chloride current induced by injection of calcium into *xenopus* oocytes. J. Physiol. (Lond.), 357, 173-183.

MOORMAN, J.R., ZHOU, Z., KIRSCH, G.E., LACERDA, A.E., CAFFREY, J.M., LAM, D.M., JOHO, R.H. et BROWN, A.M. (1987). Expression of single calcium channels in *Xenopus* oocytes after injection of mRNA from rat heart. Am. J. Physiol., 253, H985-H991.

NAKAI, J., IMAGAWA, T., HAKAMATA, Y., SHIGEKAWA, M., TAKESHIMA, H. and NUMA, S. (1990). Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. FEBS. Lett., 271, 169-177.

OKAJIMA, F., SATO, K. and KONDO, Y. (1989). P2-purinergeric agonist activated phospholipase C in a guanine nucleotide and Ca²⁺ - dependent manner in FRTL-5 Thyroid cell membranes. F.E.B.S. Lett. 253, 132-136.

OOSAWA, Y. et YAMAGISHI, S. (1989). Rat brain glutamate receptors activate chloride channels in *xenopus* oocytes coupled by inositol trisphosphate and calcium. J. Physiol. (Lond), 408, 223-232.

PALADE, P. (1987). Drug-induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum. 2. Release involving a Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. J. Biol. Chem., 262, 6142-6148.

PETERSEN, O.H. et WAKUI, M. (1990). Oscillating intracellular Ca²⁺ signals

evoked by activation of receptors linked to inositol lipid hydrolysis: Mechanism of generation. *J. Membrane Biol.*, 118, 93-105.

RANE, S.G. and DUNLAP, K. (1986). Kinase activator 1,2-oleylacetyl glycerol attenuates voltage dependent calcium currents in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 184-188.

RICE, W.R., and SINGLETON, F.M. (1989). P2Y purinoceptor regulation of surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells is associated with mobilization of intracellular calcium. *Br. J. Pharmacol.* 97, 158-162.

SAIDA, K. (1982). Intracellular Calcium release in skinned smooth muscle. *J. Gen. Physiol.*, 80, 191-202.

SALT, T.E. et HILL, R.G. (1983). Excitation of single sensory neurones in the rat caudal trigeminal nucleus by ionophoretically applied adenosine 5' triphosphate. *Neurosci. Lett.*, 35, 53-57.

SEALFON, S.C, MUNDAMATTOM, S. et GILLO, B. (1990). Modulation of calcium mobilization by guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate) in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.*, 1, 135-138.

SIGEL, E. (1990). Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J. Membrane Biol.*, 117, 201-221.

SIGEL, E. et BAUR, R. (1988). Activation of protéine kinase C differentially modulates neuronal Na⁺, Ca²⁺, and t aminobutyrate type A channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6192-6196.

SNUTCH, P.T., LEONARD, J.P., LUBBERT, H., DAVIDSON, N. and LESTER, H.A. (1987). Characterization of voltage-gated calcium channels in *xenopus* oocytes

after injection of RNA from electrically excitable tissues. In : Cell Calcium and the Control of Membrane Transport (Mandel L.J., Eaton D.C. eds.). pp. 153-166.

SNUTCH, T.P. (1988). The use of *xenopus* oocytes to probe synaptic communication. Trends Neurosci., 11, 250-256.

SNYDER, P.M., KRAUSE, K.H. et WELSH, M.J. (1988). Inositol Trisphosphate Isomers, but not Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate Induce Calcium influx in *Xenopus laevis* Oocytes. J. Biol. Chem., 263, 11048-11051.

SOREQ, H. (1985). The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA microinjected *xenopus* oocytes. CRC Crit. Rev. Biochem., 18, 199-237.

STRONG, J.A., FOX, A.P., TSIEN, R.W. and KACZMAREK, C.K. (1987). Stimulation of protein kinase C recruits covert calcium channels in Aplysia bag cell neurons. Nature, 325, 714-717.

STÜHMER, W., CONTI, F., SUZUKI, H., WANG, W., NODA, M., YAHAKI, N., HUBO, H. and NUMA, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of sodium channel. Nature, 339, 597-533.

SUMIKAWA, K., HOUGHTON, M., EMTAGE, J.S., ROCHARDS, B.M. and BARNARD, E.A. (1981). Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *xenopus* oocytes? Nature, 292, 862-864.

SUMIKAWA, K., PARKER, I. and MILEDI, R. (1988). Effect of tunicamycin on the expression of functional brain neurotransmitter receptors and voltage-operated channels in *xenopus* oocytes. Mol. Brain. Res., 4, 191-199.

TAKAHASHI, T., NEHER, E. and SAKMANN, B. (1987). Rat brain serotonin receptors in *xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 5063-5067.

TANABE, T., TAKESHIMA, H., MIKAMI, A., FLOCKERZI, V., TAKAHASHI, H., KANGAWA, K., KOJIMA, M., MATSUO H., HIROSE, T. and NUMA, S. (1987). Primary structure of receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. Nature, 328, 313-318.

TANABE, T., MIKAMI, A., NUMA, S. et BEAM, K.G. (1990a). Cardiac type excitation-contraction coupling in dysgenic skeletal muscle injected with cardiac dihydropyridine receptor cDNA., Nature, 344, 451-453.

TANABE, T., BEAM, K.G., ADAMS, B.A., NIIDOME, T. et NUMA, S. (1990b). Regions of skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. Nature, 346, 567-569

TANK, D.W., SUGIMORI, M., O'CONNOR, J.A. and LLINAS, R. (1988). Spatially resolved calcium dynamics of mammalian purkinje cells in cerebellar slice. Science, 242; 773-777.

WALKER, M.W., EDWALD, D.A., PERNEY, T.M. and MILLER, R.J. (1988). Neuropeptide Y modulated neurotransmitter release and Ca^{2+} currents in rat neurons. J. Neurosci., 8, 2438-2446.

WERZ, M.A. and MAC DONALD, R.L. (1987a). Phobol esters : Voltage dependent effects on calcium dependent action potentials of mouse central and peripheral neurons in cell culture. J. Neurosci., 7, 1639-1647;

WERZ, M.A. and MAC DONALD, R.L. (1987b). Dual action of protein kinase C to decrease calcium and potassium conductances in mouse neurons. Neurosci. Lett.,

78, 101-107.

WHITE, M.M. and AYLWIM, M. (1990). Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca^{2+} -activated Cl^- channels in *xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.*, 37, 720-724.



RESUME

L'ovocyte de xénope immature a été utilisé à la fois comme vecteur d'expression d'ARN messagers et comme modèle de détection et d'étude des principaux mécanismes intervenant dans la modification du calcium libre intracytosolique. En particulier, nos résultats ont permis de mettre en évidence l'expression, à partir d'ARNm de cerveau de cobaye, d'un phénomène de libération autocatalytique de calcium à partir de réserves intracellulaires (phénomène de Ca induced Ca release: CICR). Ce système de mobilisation du Ca est stimulé par l'entrée de Ca s'effectuant par les canaux calciques exogènes voltage-dépendants et se comporte donc comme un relai amplificateur entraînant une augmentation importante et transitoire de la concentration interne de calcium. En outre, nos résultats amènent à conclure que l'expression de ce mécanisme de CICR n'est effective qu'à partir de préparations d'ARNm de cerveau ou de coeur de cobaye. Par ailleurs, d'autres types de préparations (fibres musculaires squelettiques de crustacés et myomètre de ratte gestante), pourtant connues pour engendrer l'expression de canaux calciques dans la membrane ovocytaire, ne permettent en aucun cas de visualiser la présence d'un tel mécanisme suggérant ainsi une certaine hétérogénéité dans la répartition tissulaire de ce phénomène.

Dans un deuxième temps, il est démontré que l'activation d'un récepteur métabotropique comme le récepteur purinergique de type P2Y, couplé à la phospholipase C et occasionnant une production accrue d'InsP₃ et de diacylglycérol, entraîne une sensibilisation significative du mécanisme de Ca induced Ca release exogène. Cette facilitation semble s'effectuer par le biais d'une potentialisation de l'influx de calcium (facteur déclenchant) et ceci grâce vraisemblablement à une phosphorylation des canaux calciques induite suite à l'activation de la protéine kinase C (PKC) par le diacylglycérol. Cette idée est renforcée par le fait que d'autres types de récepteurs métabotropiques transplantés (récepteur glutamate et récepteur acétylcholine), connus pour également stimuler le courant entrant de Ca exogène dans l'ovocyte grâce à l'activation de la PKC, induisent, lorsqu'ils sont sollicités par leurs agonistes respectifs des réponses similaires à celle du récepteur purinergique et correspondant aussi à une sensibilisation du mécanisme de CICR.

Il est proposé finalement que ces différentes entités protéiques exprimées dans l'ovocyte (mécanisme de CICR, récepteur purinergique et canaux calciques) pourraient constituer, *in situ*, un système cellulaire intégré participant notamment à la stimulation de la libération de neurotransmetteurs; ce qui permettrait d'augmenter l'efficacité synaptique au niveau central.

MOTS-CLES Ovocyte de xénope, ARN messagers, courant de chlore calcium dépendant, mécanisme de calcium induced calcium release, stocks de calcium intracellulaires, courant calcique, récepteur purinergique, récepteurs métabotropiques, protéine kinase C, InsP₃