

THESE

Présentée à l'Université des Sciences et Technologies de LILLE pour
obtenir ¹⁻

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

Mention Physiologie Cellulaire

par

Sandrine Humez

Mise en évidence et caractérisation d'une conductance proton et son rôle
dans la sensibilisation de la libération de calcium par le réticulum
endoplasmique dans l'ovocyte de *Rana esculenta*

Travail réalisé au Laboratoire de Physiologie Cellulaire du Centre de Biologie
Cellulaire (USTL) sous la direction scientifique de Monsieur P. Guilbault

soutenue le 19 décembre 1995 devant le jury composé de Messieurs:

Jean-Paul Dupouy: Président

Jean -Marc Dubois: Rapporteur

Pierre Charnet: Rapporteur

Gérard Brûlé: Examineur

Bernard Dupuis: Examineur

Pierre Guilbault: invité



L'ensemble des travaux qui font l'objet de cette thèse ont été réalisés dans le Laboratoire de Physiologie Cellulaire du Centre de Biologie Cellulaire de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, sous la direction scientifique du Professeur Pierre GUILBAULT. Il a initié ce travail et a su me faire bénéficier de ses compétences scientifiques, de son dynamisme et de sa grande disponibilité. Je tiens tout d'abord à lui exprimer mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire dans lequel j'ai effectué tout d'abord mon DEA puis mes travaux de thèse. Je tiens aussi à lui exprimer toute ma reconnaissance pour la patience dont il a fait preuve à mon égard et pour les précieux conseils qu'il a su me prodiguer durant ces quatre années. Je tiens aussi à exprimer le profond regret que j'éprouve à ne pas pouvoir bénéficier de sa présence officielle dans ce jury de thèse.

Je voudrais exprimer mes remerciements :

- à Monsieur Jean-Marc DUBOIS, Directeur de Recherche au CNRS, (Laboratoire de Physiologie Cellulaire, ERS, CNRS, Université de Paris Sud, Orsay), qui me fait l'honneur de faire partie du jury. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance pour ses critiques et pour avoir bien voulu juger ce travail.

- à Monsieur Pierre CHARNET, Chargé de Recherche au CNRS, (Laboratoire d'Electrophysiologie et Pharmacologie Moléculaires, CRBM, CNRS, Montpellier), d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma très grande reconnaissance.

- à Monsieur Gérard BRULE, Professeur, (Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, Faculté des Sciences Exactes et Fondamentale, AMIENS), pour m'avoir souvent encouragé et aussi pour m'avoir permis de collaborer avec les membres de son équipe. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

- à Monsieur Jean-Paul DUPOUY, Professeur, (Laboratoire de Neuroendocrinologie Fonctionnelle du Centre de Biologie Cellulaire, Université de

Sciences et Technologies, LILLE), pour m'avoir prodigué de précieux conseils et qui me fait l'honneur de présider ce jury.

- à Monsieur Bernard DUPUIS, Professeur, (Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de médecine, LILLE), qui a bien voulu faire partie de mon jury de thèse. Je tiens tout particulièrement à lui exprimer toute ma gratitude et mes plus profonds remerciements pour avoir accepté de prendre la direction officielle de cette thèse par suite des difficultés administratives de dernière heure.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement:

- Thibault COLLIN, Maître de conférences, (Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, Faculté des Sciences Exactes et Fondamentale, AMIENS), et Fabrice MATIFAT pour l'aide qu'ils ont apportée dans la réalisation de ce travail et leur soutien.

-Halima OUADID, Maître de Conférences, (Laboratoire de Physiologie Cellulaire du centre de Biologie Cellulaire, USTL) pour son aide et sa sympathie.

Enfin, je réserve ma dernière pensée au Professeur Franck FOURNIER.

A ma mamie, mon papy, ma mère, à Claude, et à mon frère Olivier

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p 5
PREMIER CHAPITRE: DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
Première partie: LES MECANISMES INTERVENANT DANS LA REGULATION DU pH INTRACELLULAIRE	
INTRODUCTION	p 7
I- LES SYSTEMES DE TRANSPORT	p 7
A- L'échangeur Na^+/H^+	p 7
1°) Les isoformes	p 9
2) Régulations de l'échangeur Na^+/H^+	p 9
B- Les échangeurs bicarbonate	p 10
1°) L'échangeur $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ dépendant du Na^+	p 11
2°) L'échangeur $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ indépendant du Na^+	p 11
3°) Le symport $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$	p 12
II- LES CANAUX PROTONS DEPENDANT DU VOLTAGE	p 13
A- Caractéristiques générales de la conductance proton	p 14
1°) Sélectivité	p 14
2°) Sensibilité au pH extracellulaire et intracellulaire	p 16
3°) La conductance unitaire	p 17
4°) Les inhibiteurs	p 18
5°) Vitesse, cinétique d'activation et mécanismes moléculaire d'activation	p 20
B- Le phénomène de déplétion et ses conséquences	p 21
1°) Ordre de grandeur du changement de pH induit par l'activation de la conductance proton	p 22
2°) Les conséquences de la déplétion des ions H^+ intracellulaires sur les propriétés électrophysiologiques et sur le potentiel d'inversion du courant proton	p 23
C- Régulation de la conductance proton	p 25
D- Nature moléculaire de la conductance proton	p 26
1°) Le courant de proton passe bien par un canal proton	p 26
2°) La partie sous-membranaire du complexe NADPH oxidase, le cytochrome b558 est-elle une	

partie essentielle du canal H ⁺ ?	p 28
E Rôle physiologique de la conductance proton dans la régulation du pH intracellulaire	p 30
1°) Dans les neurones	p 30
2°) Dans les phagocytes	p 30
3°) Dans les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaire	p 31
4°) Dans les cellules musculaires	p 32
5°) Dans les ostéoblastes	p 32
6°) Dans les ovocytes	p 33
7°) Conclusion	p 34

Deuxième partie: L'AUGMENTATION DE L'ACTIVITE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

INTRODUCTION	p 36
I- AUGMENTATION DU TAUX DE CALCIUM PAR LE RELARGAGE DE CALCIUM DES STOCKS NON MITOCHONDRIAUX	p 36
A- Structure et distribution des stocks de calcium intracellulaire	p 37
B- La libération de Ca ²⁺ induite par les réservoirs sensibles à la ryanodine	p 37
C- La libération de Ca ²⁺ induite par les réservoirs InsP ₃ sensibles	p 39
1°) Les voies de production de l'InsP ₃ .	p 40
2°) Le récepteur-canal sensible à l'InsP ₃	p 40
3°) Modalité d'ouverture du récepteur-canal	p 41
4°) Modalités d'augmentation du Ca ²⁺ induite par l'InsP ₃	p 41
5°) Le phénomène de CICR et le récepteur-canal InsP ₃ .	p 42
II- LES INFLUX CALCIQUES	p 43
A- L'influx de calcium induit par la réponse métabotrope	p 43
1°) L'influx causé par la déplétion des stocks sensibles à l'InsP ₃	p 43
2°) L'influx causé par des seconds messagers issus de la réponse métabotrope	p 45
3°) Les structures moléculaires impliquées dans l'influx calcique	p 46
4°) Rôle de l'influx	p 47
B- L'influx de calcium induit par l'activité de canaux calciques voltage-dépendants	p 48

1°) Les différents types de canaux calciques	p 48
2°) Structure des canaux calciques	p 49
3°) Structure et rôle de la sous unité α_1	p 50
4°) Structure de α_2/δ et γ	p 51
5°) Structure et rôle de la sous-unité β	p 51
6°) Conclusion	p 54

DEUXIEME CHAPITRE : MATERIEL ET METHODES	p 56
---	------

TROISIEME CHAPITRE: RESULTATS ET DISCUSSION	p 61
--	------

Première partie: Caractéristiques des conductances ioniques endogènes activées par les dépolarisations dans l'ovocyte de *Rana esculenta*

I- description et classification des réponses	p 61
A- première classe de réponse	p 61
B- Deuxième classe de réponse	p 63
C- Troisième classe de réponse	p 64
II- Détermination des caractéristiques des courants "bas seuil" et Iout	p 65
A- Isolement du courant "bas seuil" et détermination de ces caractéristiques	p 66
B- Isolement de Iout et détermination de quelques unes de ses caractéristiques	p 67

Deuxième partie: Caractérisation de la conductance "haut seuil" dans l'ovocyte de *Rana esculenta*

Troisième partie: Facilitation de la libération de Ca^{2+} des stocks sensibles à l'InsP₃ par l'activation de la conductance proton dans l'ovocyte de <i>Rana esculenta</i>	p 79
--	------

QUATRIEME CHAPITRE: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p 99
--	------

REREFENCES	p 102
-------------------	-------

ANNEXE	p 127
---------------	-------

INTRODUCTION

Depuis 1980, un nombre important de travaux traitant des mécanismes impliqués dans les réponses des cellules, consécutives à une stimulation électrique ou chimique de leur membrane plasmique, montre que bien souvent ces réponses conduisent à une augmentation contrôlée du taux des ions calcium et/ou des protons du milieu intracellulaire. En particulier dans les ovocytes de batraciens, cette augmentation provient de la libération des ions calcium contenus dans les calciosomes (structures dérivées du réticulum endoplasmique) et/ou d'un influx de calcium en provenance du milieu extracellulaire s'écoulant à travers différents types de canaux: récepteurs-canaux; canaux voltage-dépendants; canaux activés par la déplétion en calcium des calciosomes. Ce n'est que tout récemment, depuis 1990, que cette régulation de l'activité intracellulaire des ions calcium dont dépend en partie l'amplitude de la réponse cellulaire, est abordée en prenant en compte sa modulation par le pH intracellulaire. En effet, un certain nombre de travaux très récents montre que les flux de calcium, s'écoulant à travers les canaux, ancrés dans la membrane plasmique et celle des calciosomes, sont étroitement contrôlés par le pH intracellulaire.

Ainsi l'étude, présentée dans ce mémoire, concerne l'analyse de certains mouvements de calcium associés aux variations de pH intracellulaire à l'origine de la réponse cellulaire, mouvements calciques déclenchés par la dépolarisation membranaire dans l'ovocyte immature de *Rana esculenta* dont la membrane plasmique présente une conductance aux ions H^+ voltage-dépendante. Dans ces conditions expérimentales, il est montré que la dépolarisation membranaire conduit, à la suite d'une alcalinisation intracellulaire (consécutives à une déplétion des ions H^+ grâce au courant sortant de protons), à une sensibilisation de la libération des ions calcium à partir des calciosomes sensibles à l'InsP₃.

Premier Chapitre: données bibliographiques

Première partie

Les mécanismes intervenant dans la régulation du pH intracellulaire

LES MECANISMES INTERVENANT DANS LA REGULATION DU pH INTRACELLULAIRE

La distribution des ions H^+ de part et d'autre de la membrane de la plupart des cellules est telle que le milieu intracellulaire est plus alcalin qu'il ne le serait si cette distribution des ions H^+ n'était que passive. En effet, si les ions H^+ étaient en équilibre électrochimique à travers la membrane plasmique, pour un potentiel de repos moyen de -60 mV et pour un pH extracellulaire (pHe) de 7,4, la valeur du pH interne (pHi) serait de 6,4 or, dans les cellules de mammifère, pHi est situé entre 6,8 et 7,5 (Roos et Boron, 1981). Cette forte valeur de pHi est en fait engendrée par des mécanismes d'extrusion de protons à partir du milieu intracellulaire permettant de maintenir une activité des ions H^+ compatible avec le fonctionnement des systèmes enzymatiques cytoplasmiques. Ces mécanismes permettent aussi de lutter contre une tendance "chronique" à l'acidification intracellulaire due à la production de composées acides issus du métabolisme basal ainsi qu'à un influx passif d'ions H^+ à travers la membrane plasmique.

Les systèmes d'extrusion des protons jouent également un rôle majeur dans le contrôle du pH intracellulaire notamment lors d'une acidification induite par un accroissement de l'activité cellulaire. Par exemple, dans les neurones de mollusque (Ahmed & Connor, 1980) l'augmentation de calcium induite par l'activité électrique conduit bien à une acidification du milieu intracellulaire due, en particulier, à l'extrusion du calcium par l'échangeur Ca^{2+}/H^+ . Une telle chute de pH se retrouve en général lorsqu'une augmentation de Ca^{2+} apparaît lors de l'activation cellulaire. Les systèmes de transport de protons interviennent aussi dans la régulation du pH intracellulaire dans les conditions physiologiques normales.

Les systèmes majeurs d'extrusion des protons intracellulaires dont le rôle est donc de réguler pHi peuvent être classés en deux groupes: les transporteurs (échangeurs et symports) et les canaux H^+ dépendant du voltage.

I- LES TRANSPORTEURS

A- L'ECHANGEUR Na^+/H^+

L'échangeur Na^+/H^+ , à la base du mécanisme de régulation du pH_i , est le plus étudié. Il est décrit, pour la première fois, par Murer et coll. en 1976 et est retrouvé dans de nombreux types cellulaires. Il apparaît être un système ubiquitaire. Dans des conditions physiologiques normales, cet échangeur permet l'extrusion d'un ion H^+ contre un ion Na^+ , il est donc électriquement neutre et en fonctionnant il alcalinise la cellule. La "force" nécessaire à l'extrusion des protons du milieu intracellulaire est fournie par le gradient des ions Na^+ et par conséquent dépend de l'activité de l'ATPase Na^+/K^+ . L'échangeur Na^+/H^+ permet en dehors de toute activation cellulaire de maintenir le pH interne de la cellule à une valeur optimale. Il est inhibé par l'amiloride et ses dérivés 5-amino substitués.

L'augmentation de Na^+ dans le milieu extracellulaire induit une augmentation de l'activité de l'échangeur et donc une augmentation du pH intracellulaire. En dépit du gradient de Na^+ établi par l'ATPase Na^+/K^+ , l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ est cependant prioritairement réglé par le pH intracellulaire. Cette sensibilité de l'échangeur est due à des sites allostériques qui contrôlent son activité (Aroson et coll. 1982; Aroson, 1985). C'est ainsi que, lors d'une acidification intracellulaire, les sites sont protonés et permettent d'augmenter l'activité de l'échangeur assurant ainsi la protection du milieu intracellulaire contre l'acidification. Quand, à l'opposé, pH_i atteint la neutralité, les sites de régulation sont déprotonés assurant le transport inverse des ions H^+ ce qui permet de réduire l'alcalinisation intracellulaire. L'existence d'une telle coopérativité positive entre la concentration de protons et l'échangeur Na^+/H^+ implique donc que ce dernier est capable de répondre à de faibles variations de pH_i par un grand changement d'activité.

L'échangeur Na^+/H^+ , régulant pH_i , est aussi impliqué dans d'autres fonctions cellulaires comme notamment dans celles assurant le contrôle et l'initiation de la mitose (pour revue,

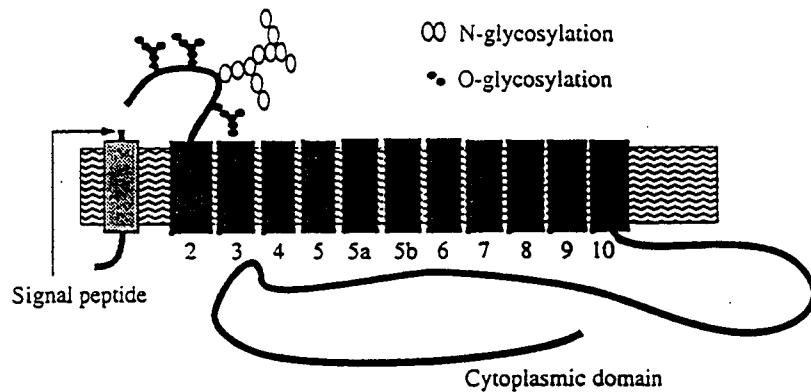


Figure 1: Structure de l'échangeur Na⁺/H⁺ de type NHE1 (d'après Bianchini & Pouysségur, 1994). Les segments 5a et 5b sont les segments transmembranaires les plus conservés de la famille des gènes NHE. Les glycosylations de type O-glycosylation et N-glycosylation sont situées sur la première boucle extracellulaire. Le premier segment transmembranaire a les caractéristiques d'un peptide signal clivable (Counillon et coll., 1994).

voir Moolenaar, 1986 et Grinstein et coll., 1989), la régulation du volume cellulaire et la réabsorption de Na^+ dans les cellules épithéliales (Demaurex & Grinstein, 1994).

1°) Les isoformes

Cinq isoformes de l'échangeur Na^+/H^+ sont connues (NHE1, β NHE, NHE2, NHE3 et NHE4). Elles sont composées d'environ 800 acides aminés (aa) et possèdent la même structure (voir figure 1). La molécule possède deux domaines fonctionnels séparés. Le premier est le domaine N-terminal (500 aa environ), il est hydrophobe et est constitué de 10 à 12 segments transmembranaires). Le second est le domaine C-terminal (300 aa environ). La partie N-terminale transmembranaire est nécessaire et suffisante pour la catalyse de l'échange ionique alors que le domaine C-terminal détermine le pK de l'échangeur et permet aussi son activation par les facteurs de croissance, les hormones et les chocs osmotiques (Wakabayashi et coll., 1992; Tse et coll., 1993a). Si l'isoforme NHE1 est exprimée de manière ubiquitaire, les autres isoformes (NHE2, NHE3 et NHE4) ne se retrouvent qu'au niveau apical des épithéliums polarisés (Pour revue, voir Fliegel & Frölich, 1993; Tse et coll., 1993a). De plus, les isoformes NHE2, NHE3 et NHE4 sont différentes de l'isoforme NHE1 en ce qui concerne leur composition en acides aminés, leur cinétique, leur rôle, et leur sensibilité à être inhibées par l'amiloride et ses analogues (Tse et coll., 1993a et b; Fliegel & Frölich, 1993; Counillon et coll., 1993). L'isoforme NHE1 est très sensible à l'inhibition par l'amiloride alors que l'isoforme NHE3 l'est moins (Tse et coll., 1993b). Ainsi, si l'isoforme NHE1 semble jouer un rôle dans la régulation du volume cellulaire, les autres isoformes jouent par contre un rôle majeur dans l'absorption transépithéliale du Na^+ .

2°) Régulation de l'échangeur Na^+/H^+

De nombreux exemples de régulation de l'échangeur Na^+/H^+ sont reportés dans la littérature (pour revue, voir Frelin et coll., 1988; Bianchini & Pouyssegur, 1994). La plupart des effecteurs mentionnés ci-dessous augmente son activité ce qui conduit à une forte alcalinisation du milieu intracellulaire (0,4 unité pH). Ces effecteurs sont: des

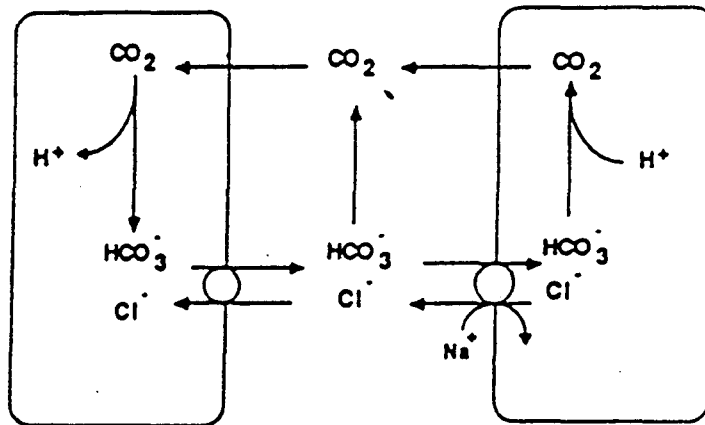


Figure 2: Régulation du pHi par les échangeurs bicarbonate.

Cette figure montre comment l'échangeur $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (à gauche) et l'échangeur HCO_3^- dépendant du Na^+ (à droite) régulent le pHi. Un efflux de bicarbonate conduit à une acidification du milieu intracellulaire alors qu'un influx conduit à une alcalinisation intracellulaire.

hormones (l'insuline, la vasopressine), des facteurs de croissance (dérivés des plaquettes: PDGF, facteur de croissance épidermique: EGF); des facteurs chimiotactiques, des facteurs liés à la fertilisation des ovocytes (Grinstein & Rothstein, 1986; Ma et coll., 1994; Tanaka et coll., 1994). Les mécanismes permettant l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ dépendent des sites de régulation de la PKC, de la PKA, de la kinase II dépendante de la calmoduline (CaM kinase II) et de la famille des protéines activant la mitose (MAP), de la protéine p34 cdc2 et des protéines kinases dépendant des cyclines (Fliegel & Fröhlich, 1993). Suivant l'isoforme, la PKC active ou inhibe l'échangeur. En effet, NHE1 et NHE2 sont activées alors que NHE3 est inhibée quand elles sont exprimées dans des systèmes de recombinaison (Wakabayashi et coll., 1992; Levine et coll., 1992, Tse et coll., 1993 b); ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec ces isoformes étudiées in situ (Casavola et coll., 1992). Il est aussi montré que la CaM Kinase II inhibe les isoformes NHE2 et NHE3 (Cohen et coll., 1991; Tse et coll., 1992; Collins et coll., 1993). L'échangeur est aussi régulé positivement par le calcium dans certains types cellulaires (Anwer & Engelink, 1993). Cette régulation par le calcium peut se faire selon différentes voies comme celle de la calmoduline kinase (Tanaka et coll., 1994) ou par une voie impliquant la phospholipase A2 (Frelin et coll., 1988). Il est aussi régulé positivement ou négativement suivant les isoformes par l' AMPc.

Quant au temps d'action des effecteurs, il varie de quelques secondes, quelques minutes à quelques heures, voire quelques jours entraînant une modification du taux d'activité des molécules de l'échangeur ou du nombre de ces molécules (pour revue: Frelin et coll., 1988; Fliegel & Fröhlich, 1993; Alpern et coll., 1993; Tse et coll., 1993a).

B- LES ECHANGEURS BICARBONATE ET LE SYMPORT BICARBONATE/SODIUM

Les systèmes bicarbonate agissent en acidifiant ou en alcalinisant le milieu intracellulaire suivant le sens du flux net d'ions HCO_3^- catalysé dans la membrane. Comme le schématise la figure 2, un flux net sortant de bicarbonate est associé à une acidification

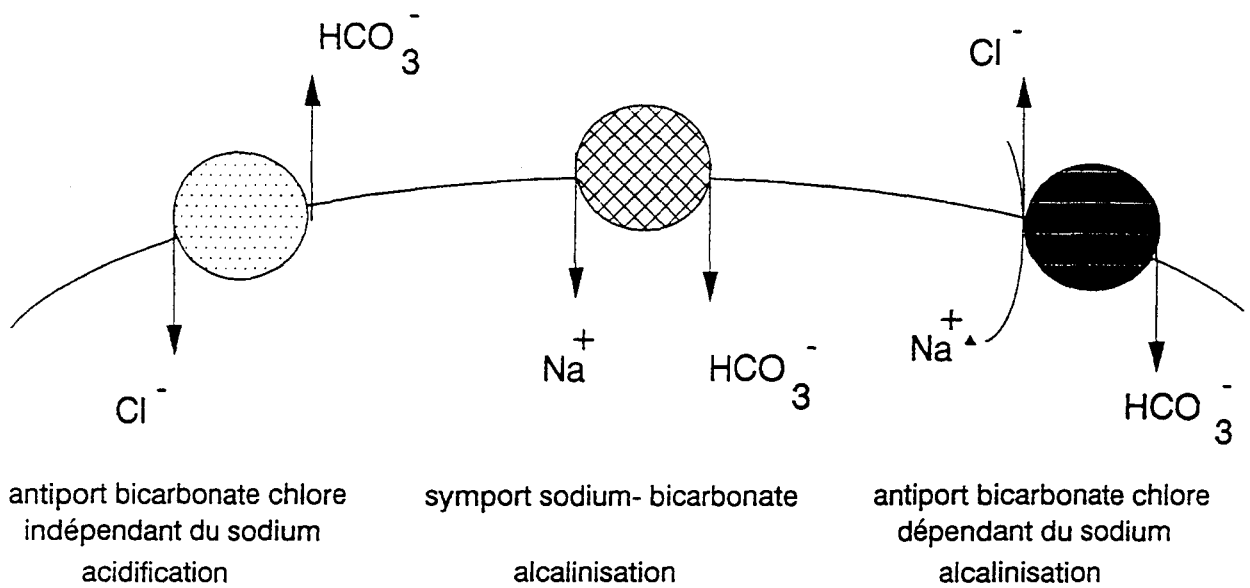


Figure3: Les trois systèmes de transport passif des ions bicarbonate.

intracellulaire tandis qu'à l'inverse un flux net entrant est associé à une alcalinisation intracellulaire. La régulation de pH_i par les systèmes bicarbonate nécessite donc une forte perméabilité de la cellule pour le CO_2 qui est facilitée par l'anhydrase carbonique, cette dernière permettant, à partir des ions HCO_3^- et H^+ , la formation du CO_2 et H_2O .

Les systèmes bicarbonate sont mis tout d'abord en évidence dans les cellules d'invertébrés (Roos et Boron, 1981; Thomas, 1977, Boron & Boulpaep, 1983). Ce n'est que récemment que leur étude est entreprise dans les cellules de vertébrés. En effet, les premières études relatives à la régulation du pH_i , effectuées sur les cellules de vertébrés, sont essentiellement centrées sur l'étude de l'échangeur Na^+/H^+ en absence du tampon biologique CO_2/HCO_3^- et donc d'activité des échangeurs bicarbonate.

Trois types de systèmes bicarbonate (présentés dans la figure 3) sont mis en évidence: (i) l'échangeur HCO_3^-/Cl^- dépendant du Na^+ ; (ii) l'échangeur HCO_3^-/Cl^- indépendant du Na^+ ; (iii) le symport Na^+/HCO_3^- . Ils sont tous les trois indirectement dépendant de la synthèse d'ATP.

- 1°) **L'échangeur HCO_3^-/Cl^- dépendant du Na^+** est électriquement neutre, il catalyse l'entrée de deux ions HCO_3^- et d'un ion Na^+ contre la sortie d'un ion Cl^- . Dans les conditions normales, il fonctionne donc en alcalinisant la cellule, jouant un rôle régulateur du pH_i . Après une acidification du milieu intracellulaire il permet le retour du pH_i à sa valeur normale. Ce système est dépendant de la concentration des ions HCO_3^- , Cl^- et Na^+ , son fonctionnement dans des conditions de pH intracellulaire acide s'accompagne d'un efflux de Cl^- et d'un influx de Na^+ .

- 2°) **L'échangeur HCO_3^-/Cl^- indépendant du Na^+** est aussi électriquement neutre. Dans les conditions normales, comme le gradient de concentration est plus grand pour le Cl^- que pour le bicarbonate, l'activité de cet échangeur conduit à un efflux de HCO_3^- et donc contribue à l'acidification intracellulaire. Il joue donc un rôle dans le retour du pH à sa valeur normale suite à une alcalinisation. Lors d'une diminution

de Cl^- du milieu extracellulaire, cet échangeur fonctionne en sens inverse et conduit à une alcalinisation du milieu intracellulaire.

- 3°) Le symport $\text{HCO}_3^- / \text{Na}^+$ conduit, suivant les conditions physiologiques expérimentales et les types cellulaires, à un efflux ou à un influx de HCO_3^- et donc respectivement à une acidification ou à une alcalinisation intracellulaire. Il est mis en évidence, pour la première fois, au niveau des cellules rénales du tubule proximal (Boron & Boulpaep, 1983) et est ensuite décrit dans d'autres tissus épithéliaux (LaCour, 1989). Il peut être électrogène, la stochiométrie étant en général le flux de trois ions HCO_3^- associé à celui d'un ion Na^+ (Shrode & Putnam, 1994) Dans certains types cellulaires, il est neutre électriquement (Aickin, 1994b). Dans les cellules épithéliales, il opère en créant un efflux de HCO_3^- et donc conduit à une acidification de la cellule; dans d'autres types cellulaires, il fonctionne en créant un influx de bicarbonate et donc conduit à une alcalinisation (pour revue voir, Frelin et coll., 1988; Anwer & Engelink, 1993).

Alors que l'isoforme NHE1 de l'échangeur Na^+/H^+ est distribuée de manière ubiquitaire, les autres isoformes de l'échangeur Na^+/H^+ ainsi que les symports, dépendant des ions HCO_3^- , ne sont pas toujours présentes au sein d'un même type cellulaire (Frelin et coll., 1988). Il peut aussi être constaté que, si plusieurs de ces systèmes de régulation du pH_i sont présents dans un même type cellulaire, ils ne contribuent pas tous de la même manière à la régulation du pH_i . C'est ainsi que dans les cellules de l'uretère de cobaye, les systèmes de régulation du pH_i présents sont: l'échangeur Na^+/H^+ , l'échangeur $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ et le symport $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Dans ce type cellulaire, l'échangeur Na^+/H^+ permet au pH_i de recouvrer sa valeur normale suite à une acidification intracellulaire, alors que dans des conditions normales, en présence du tampon $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, c'est le symport $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ qui permet le retour du pH à sa valeur normale (dans ce cas l'échangeur Na^+/H^+ est peu actif; Aickin, 1994 a et b). C'est le contraire qui se produit dans les cellules musculaires lisses de cobaye provenant de l'artère fémorale (Aickin, 1994c). Dans ces cellules, possédant aussi l'échangeur Na^+/H^+ et le symport $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$, c'est

l'échangeur Na^+/H^+ qui est responsable du retour du pHi à sa valeur normale suite à une acidification intracellulaire.

En conclusion, la régulation du pHi par les systèmes de transport dépendant du Na^+ (Na^+/H^+) et les systèmes dépendant du bicarbonate est loin d'être uniforme et son étude dans chaque type cellulaire doit s'effectuer en essayant de montrer le rôle que joue chaque système de transport dans les conditions physiologiques normales.

II- LES CANAUX PROTONS DÉPENDANT DU VOLTAGE

L'existence d'un processus d'extrusion des protons du milieu intracellulaire via un canal ionique dépendant du voltage est démontrée, pour la première fois, en 1982 par Thomas & Meech au niveau des neurones d'escargot (*Helix aspersa*). Ces canaux sont ensuite décrits au niveau des neurones d'un autre mollusque, *Limnaea stagnalis*, (Byerly, Meech & Mody, 1984) et de l'ovocyte d'Amphibyste (Barish & Baud, 1984). A cette époque, le courant H^+ décrit au niveau des neurones d'escargot et celui des ovocytes d'Amphibyste sont pris pour des curiosités électrophysiologiques de faible importance en biologie cellulaire. Le consensus est que les flux H^+ dépendent surtout des mécanismes de transport, des pompes et des échangeurs. Ce n'est qu'en 1987 qu'est montré le rôle fondamental d'une conductance proton au niveau des neutrophiles et est abordée sa régulation (Henderson et coll., 1987; Henderson et coll., 1988, Kapus et coll., 1992; Nanda & Grinstein, 1991; DeCoursey & Cherny, 1993). Récemment cette conductance aux ions H^+ est décrite dans d'autres phagocytes, comme les macrophages et les granulocytes (Kapus et coll., 1993a; Kim et coll., 1993 ; Demaurex et coll., 1993a ; DeCoursey & Cherny, 1994a). Également, cette conductance est mise en évidence dans les cellules de l'épithélium des alvéoles pulmonaires et de la prostate (DeCoursey, 1991; DeCoursey & Cherny, 1994a), du muscle squelettique (Bernheim et coll., 1993) et des ostéoclastes (Nordström et coll., 1995).

Cette conductance, dépendante du voltage, est aussi présente dans d'autres modèles comme la lignée cellulaire OK (Oppossum Kidney) (Graber et coll., 1991), les cellules

type cellulaire	espèce	référence
<u>Conductance proton mise en évidence</u>		
Neurone	Helis Aspersa	Thomas & Meech, 1982
	Lymnea Stagnalis	Byerly et coll., 1984
Ovocyte	Ambystome	Barish & Baud, 1984
Epithelium		
alvéoles pulmonaires	Rat	DeCoursey, 1991
poumon	Humain	DeCoursey & Cherny, 1994
prostate A549	humain	DeCoursey & Cherny, 1994
Phagocytes macrophages		
monocyte	Humain	Holevinski et coll., 1994
péritoneaux	souris	Kapus et coll., 1993
TPH-1	Humain	Kim et coll., 1993
Phagocytes granulocyte		
Neutrophiles	Humain	DeCoursey & Cherny, 1993
HL60	Humain	Demaurex et coll., 1993
K 562	Humain	DeCoursey & Cherny, 1994
Muscle squelette	Humain	Bernheim et coll. 1993
Ostéoclaste	Lapin	Nordström et coll., 1995
<u>Conductance proton supposée</u>		
Cellules rénales OK	Opposum	Graber et coll., 1991
Cellules peau	Grenouille	Lyall et coll. 1992
Neurones	sangsue	Frey & Schule, 1993
Entérocytes	Poulet	Peral et coll., 1995 (a et b)

Tableau 1: Distribution de la conductance proton dans le règne animal

principales de la peau de grenouille (Lyall et coll., 1992), les neurones de sangsue (Frey & Shule, 1993), et les entérocytes de poulet (Peral et coll., 1995 a et b). Dans ces derniers types cellulaires ne sont avancées que des preuves indirectes, elles permettent néanmoins de supposer son existence. Aussi, cette conductance n'est pas seulement décrite au niveau des cellules animales, elle est aussi supposée exister au niveau de la membrane des cellules d'élodée (Miedema et coll., 1992).

Le tableau 1, ci-contre, rend compte de la grande diversité et de la distribution de la conductance proton dans le règne animal.

A- CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA CONDUCTANCE PROTON

La conductance proton est, dans la littérature, décrite par de nombreux auteurs comme une conductance très sélective. Son activation est dépendante du potentiel, elle ne s'inactive pas au cours du temps et son seuil de potentiel d'activation est modulé par le pH extracellulaire et par le pH intracellulaire.

1°) sélectivité

L'étude des variations du potentiel d'inversion, (dont la méthode de détermination est présentée dans la figure 4) en fonction des différentes concentrations d'ions du milieu extracellulaire permet de montrer que cette conductance proton est très sélective. En effet, lorsque la concentration des ions Na^+ , K^+ ou Cl^- du milieu externe est fortement modifiée, le potentiel d'inversion du courant de proton ne change pas significativement. (Barish & Baud, 1984; Bernheim et coll., 1993; Demaurex et coll., 1993a; Kapus et coll., 1993a). Ceci montre clairement que cette conductance est très sélective. De plus l'application de l'équation de Goldman- Hodgkin et Katz implique que la perméabilité des ions H^+ est estimée être 10^6 fois supérieure à celle des autres ions inorganiques (Demaurex et coll., 1993a). Néanmoins, dans certains cas comme dans les cas de l'ovocyte d'Ambystome ou dans les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires, le changement de la concentration des ions Na^+ conduit à de petits changements du potentiel

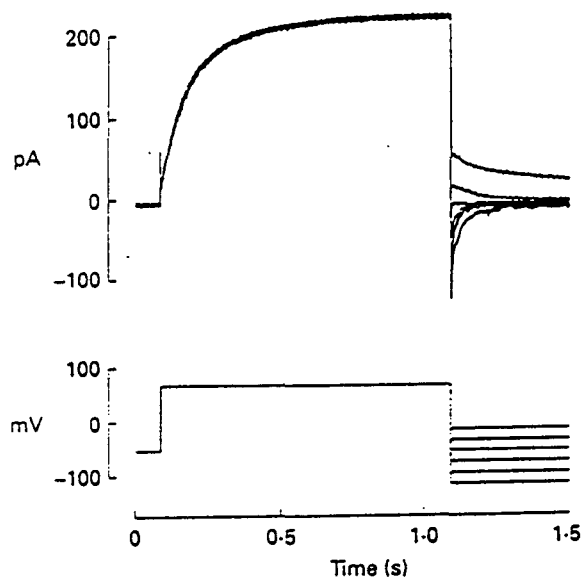


Figure 4: Détermination du potentiel d'inversion du courant de proton (d'après Demaurex et coll., 1993).

Le courant est activé en portant le potentiel de membrane à +60 mV durant 2 secondes à partir d'un potentiel de maintien de -60 mV, le potentiel de membrane est ensuite ramené, après chaque dépolarisation, à des potentiels de -120, -100, -80, -60, -40 et -20 mV. Le potentiel pour lequel le courant de désactivation est nul correspond au potentiel d'inversion du courant. Dans les conditions expérimentales correspondant à cet exemple (pHe: 7.45 et pHi: 5.5), le potentiel d'inversion du courant de proton est de -60 mV.

d'inversion vers des potentiels plus positifs (Barish & Baud, 1984; DeCoursey & Cherny, 1994a). Cependant, il est clairement démontré, au niveau des cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires, que ce déplacement du potentiel d'inversion est dû, non pas au passage des ions Na^+ par le "canal", mais à un effet de la concentration extracellulaire des ions Na^+ sur l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ (DeCoursey & Cherny, 1994b).

Il faut aussi mentionner qu'en dépit d'une telle sélectivité, le changement du potentiel d'inversion pour un changement d'une unité de pH intracellulaire ou extracellulaire atteint rarement, à 20 °C, la valeur de 58 mV prévue par l'équation de Nernst. En effet, la variation du potentiel d'inversion est tout au plus de 40 mV voire souvent moins (Bernheim et coll., 1993; DeCoursey & Cherny, 1994a; Demaurex et coll. 1993a; Kapus et coll., 1993a; Mahaut-Smith, 1989). Dans certains modèles cependant (le neurone de l'escargot *Helix aspersa*, l'ovocyte d'Ambystome et les ostéoclastes), la variation du potentiel d'inversion pour une variation de une unité de pH est très proche des 58 mV (Thomas & Meech, 1982; Barish & Baud, 1984; Nordröm et coll., 1995).

Il faut aussi noter que la valeur du potentiel d'inversion déterminée, grâce à la technique électrophysiologique classique (voir figure 4), est toujours supérieure, après activation de la conductance, à celle qu'il est possible de calculer en tenant compte des concentrations des ions H^+ des milieux intracellulaire et extracellulaire. Cette valeur plus positive suggère l'existence, au cours de l'activation, d'un phénomène de déplétion des ions H^+ intracellulaires consécutif à l'activation du courant sortant de H^+ . Au niveau des cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires lorsque la valeur du pH intracellulaire égale celle du pH extracellulaire (5,5), le potentiel d'inversion mesuré est de 30 mV alors que la valeur de la pile d'équilibre calculée pour les protons est de 0 mV (DeCoursey, 1991). Dans ces cellules, il est aussi montré que la valeur du potentiel d'inversion varie en fonction de la durée du potentiel d'activation du courant. Cette variation témoigne d'une déplétion des ions H^+ intracellulaires en dépit d'un essai de maintien du pH intracellulaire grâce à l'emploi d'une pipette de patch remplie d'un tampon pH (MES pH 5,5) d'une concentration de 5 mM. Même en présence du même tampon pH à une concentration de

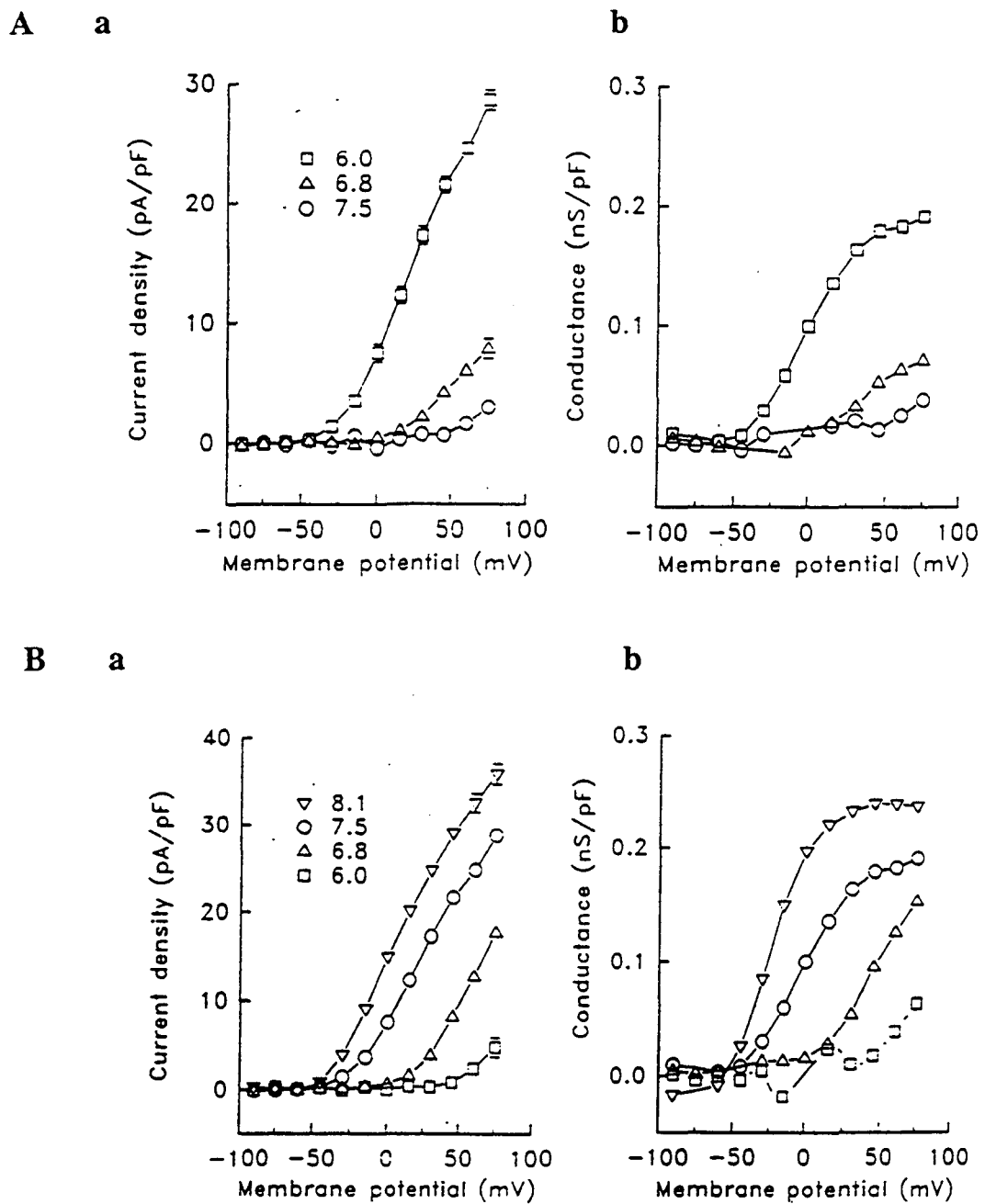


Figure 5: Effets des modifications du pHi et du pHe sur l'amplitude et le seuil d'activation du courant proton et de la conductance (d'après Kapus et coll., 1993b). Les créneaux de potentiel amenant le potentiel de -90 à 75 mV sont appliqués pendant 2,5 secondes avec un incrément de 15 mV toutes les 30 secondes.

A- Effet de la variation du pHi (pHe est de 7,5). a- Courbe de l'amplitude du courant mesuré à la fin des impulsions dépolarisantes, en fonction du potentiel. b- Evolution de la conductance en fonction du potentiel.

B- Effect de la variation du pHe (pHi est de 6). a- Courbe de l'amplitude du courant, mesuré à la fin des impulsions dépolarisantes en fonction du potentiel. b- Evolution de la conductance en fonction du potentiel.

100 mM dans la pipette, il existe toujours une nette différence entre le potentiel d'inversion mesuré et le potentiel calculé (DeCoursey, 1991).

2°) sensibilité au pH extracellulaire et intracellulaire

Dans tous les types cellulaires où est décrite la conductance proton, les changements de pH produisent les mêmes effets sur le courant et sur la conductance (Kapus et coll., 1993a, voir figure 5)

a- effet de l'acidification du milieu extracellulaire

L'acidification du milieu extracellulaire conduit à un déplacement du seuil d'activation de la conductance proton vers les potentiels positifs. Cet effet du pH sur le seuil d'activation est similaire à celui observé sur d'autres canaux dépendant du voltage (canaux Na^+ et Ca^{2+}). Classiquement cet effet du pH est attribué à la neutralisation des charges fixées à la face externe de la membrane ou à l'embouchure du canal (Hille, 1968; Woodhull, 1973). Néanmoins, cet effet de type électrostatique n'est pas le seul responsable de l'effet du pH sur le seuil d'activation de la conductance proton. En effet, Byerly et coll. (1984) proposent que les protons du milieu extracellulaire interagiraient avec la structure moléculaire réglant le mode d'ouverture du canal. En effet, ces auteurs observent un déplacement du seuil d'activation de la conductance de 46 mV vers les potentiels positifs lorsque le pH externe passe de 7,4 à 6,4, déplacement supérieur à celui prédit par la théorie de GOUY-CHAPMAN-STERN qui ne serait que de 37 mV par unité de pH (Gilbert & Ehrenstein, 1970). De plus, la cinétique d'activation du courant proton est très largement ralentie à un pH externe acide et, là encore, plus largement qu'elle ne le serait si elle était due à un simple changement de seuil.

Il est à noter que le seuil d'activation se déplace dans le même sens que celui de la valeur de la pile d'équilibre aux protons, E_{H^+} , (Thomas & Meech, 1982; Barish & Baud, 1984; Bernheim et coll., 1993; Byerly et coll., 1984; DeCoursey, 1991; DeCoursey & Cherny, 1994; Kapus et coll., 1993a). D'une manière générale, les effets du pH externe sur le seuil d'activation présente un maximum (Barish & Baud, 1984; Byerly et coll., 1984;

DeCoursey, 1991; Kapus et coll. 1993a). Cette saturation des effets du pH externe sur ce seuil semble montrer, qu'une fois tous les sites de modulation protonés, toute diminution supplémentaire du pH externe n'a plus d'effet.

b- effet de l'acidification du milieu intracellulaire

L'acidification du milieu intracellulaire conduit, quant à elle, à un déplacement du seuil de potentiel d'activation de la conductance proton vers des potentiels plus négatifs. Comme pour les changements de pH extracellulaire, ce déplacement du seuil d'activation de la conductance n'égalise pas le changement de valeur de la pile d'équilibre aux protons (Byerly et coll., 1984; DeCoursey & Cherny, 1994a; Demaurex et coll., 1993a; Thomas & Meech, 1982). Dès 1984, Byerly et coll. proposent que les protons du milieu intracellulaire pourraient se lier aux groupes acides présents à la face interne de la membrane quand le pH intracellulaire est acide et ainsi altérer le potentiel intramembranaire en augmentant la différence de potentiel perçue par les "canaux".

c- conclusion

Cette forte sensibilité de la conductance proton aux pHs intracellulaire et extracellulaire notamment en ce qui concerne le déplacement de son seuil de potentiel d'activation vers les potentiels positifs, toujours supérieur à celui de la pile d'équilibre aux ions H^+ montre pourquoi, l'activation de la conductance ne permet que le développement d'un courant sortant de H^+ .

Aussi, la modulation du seuil d'activation de la conductance proton joue un rôle important dans les mécanismes de régulation du pH intracellulaire; par exemple, lors d'une acidification du milieu intracellulaire, le seuil d'activation se déplace vers les potentiels négatifs et la conductance ainsi augmentant, permet un efflux d'ions H^+ qui conduit à la restauration de pH_i .

3°) La conductance unitaire

Malgré le nombre croissant de travaux menés sur cette conductance aux ions H^+ , la valeur exacte de la conductance unitaire n'est cependant pas encore connue. En effet, jusqu'à présent il n'est pas possible de la mesurer à l'aide des techniques à disposition et de ce fait, elle ne peut être qu'estimée (pour revue, voir DeCousey & Cherny, 1994a). Cette conductance unitaire peut, en effet, être estimée soit par l'analyse de la fluctuation du courant de membrane (Bernheim, 1993) soit par comparaison avec les conductances unitaires de canaux laissant passer les protons comme les canaux formés à partir de la gramicidine (Hladky & Haydon, 1972; Levitt & Decker, 1988), ou à partir des protéolipides, F0 et CF0, ces derniers étant respectivement une des sous-unités de l' H^+ ATPase bactérienne et de l' H^+ ATPase des chloroplastes d'épinard (Schindler & Nelson, 1982; Schoenknecht et coll., 1986). A partir de ces éléments, la conductance unitaire estimée serait très faible: 10 fS (Bernheim et coll. 1993). Cette valeur de conductance unitaire est bien sûr très inférieure à celle de canaux ioniques dépendant du voltage qui est de l'ordre de quelques pS à plusieurs dizaines de pS. Ainsi, ces différences de valeur ont tout naturellement conduit les chercheurs à discuter de la nature moléculaire de la conductance proton (cet aspect relatif à cette nature moléculaire sera discuté plus avant).

4°) Les inhibiteurs

a- La conductance proton est inhibée par certains cations

Une des caractéristiques majeures du courant porté par les protons concerne son inhibition par les ions Cd^{2+} et Zn^{2+} à très faible concentration et son blocage par les ions La^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} et Ba^{2+} à la concentration de l'ordre de la mM (Bernheim et coll., 1993; Beyrly & Suen, 1989; Meech & Thomas, 1987; Thomas & Meech, 1982). Au niveau des cellules musculaires squelettiques, le courant proton, inhibé par les ions Cd^{2+} , l'est aussi par les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} (Bernheim et coll., 1993). L'effet inhibiteur de ces ions inorganiques s'effectue par le biais d'un déplacement du seuil de potentiel d'activation de la conductance proton vers des potentiels plus positifs en fonction de la concentration de l'ion inhibiteur; à ce déplacement du seuil de potentiel

est associé un ralentissement de la cinétique d'activation (Barish & Baud, 1984; Bernheim et coll., 1993; Byerly et coll., 1984; DeCoursey, 1991; Decoursey & Cherny, 1993; Demaurex et coll., 1993a; Kapus et coll., 1993a; Mahaut-Smith, 1989).

L'effet de ces ions, sur le courant porté par les protons, est expliqué en tenant compte du fait que ces ions, tout comme les protons d'ailleurs, se liant aux charges négatives situées à la face externe de la membrane ou près de l'embouchure du canal, altèrent la différence de potentiel intramembranaire ressentie par le canal (effet de charges). Comme l'effet inhibiteur de ces ions inorganiques s'effectue de la même façon que celui produit par l'acidification du milieu extracellulaire, il est logique de penser que le site d'action de ces ions concerne celui qui interagit avec les protons. De même, il est aussi à remarquer que le ralentissement de la cinétique d'activation de la conductance est plus marqué qu'il ne le serait si l'effet de l'inhibiteur ne concernait que le déplacement du seuil d'activation de la conductance. Par analogie avec les effets des cations divalents sur d'autres canaux (Gilly & Armstrong, 1982; Hille, 1992), Byerly et coll. dès 1984 proposent que les cations divalents comme le Cd^{2+} ralentiraient la cinétique d'activation de la conductance proton en intervenant directement sur les modalités d'ouverture du canal.

b- La conductance proton est inhibée par certaines substances organiques

Dans certaines préparations biologiques (Bernheim et coll. 1993; Byerly et coll., 1984, Meech & Thomas, 1987) mais non dans d'autres (Barish & Baud, 1984; DeCoursey 1991; Mahaut-Smith, 1989), les ions TEA^+ inhibent partiellement le courant proton. De même, les bases faibles comme le D-600, la 4-AP (4-aminopyridine), l'amiloride, la rimantadine et amantadine peuvent conduire, dans certains modèles, à une réduction du courant porté par les protons (DeCoursey & Cherny, 1994a; Meech & Thomas 1987, DeCoursey & Cherny, 1994b). L'action de ces substances peut s'effectuer soit par leur interaction directe avec le canal soit par un changement de pH local induit par le passage de ces substances à travers la membrane plasmique sous la forme non ionisée (ce dernier mécanisme étant le plus vraisemblable). En effet, les acides faibles (Gutknecht &

Tosteson, 1973) ainsi que les bases faibles (Cherny et coll., 1990) traversent la membrane sous la forme non chargée et peuvent alors modifier le pH intracellulaire grâce à une réaction de protonation ou de déprotonation. C'est ainsi que l'amiloride, qui diminue le courant H^+ en déplaçant le seuil d'activation de la conductance, agit au niveau intracellulaire, grâce à son passage à travers la membrane sous forme non ionisée, en captant les protons intracellulaires; elle produit une alcalinisation interne qui a pour conséquence le déplacement de la courbe de la conductance proton en fonction du potentiel vers des potentiels plus positifs.

c- conclusion

A l'heure actuelle, il n'y a pas d'agents pharmacologiques organiques connus capables de bloquer sélectivement la conductance proton soit en se liant au canal, soit en bouchant le pore de ce dernier. Cette absence d'inhibiteur sélectif pose donc le problème de la caractérisation biochimique de ce canal. En effet, ne disposant pas d'outils spécifiques, toute tentative éventuelle de purification biochimique de l'entité protéique, à l'origine de cette conductance aux ions H^+ , s'avère impossible. En effet, la découverte d'un bloqueur sélectif faciliterait grandement l'étude relative au support moléculaire de la conductance unitaire.

5°) Vitesse, cinétique d'activation et mécanisme moléculaire d'activation

a- vitesse d'activation

En dépit des similitudes entre les différentes conductances aux ions H^+ décrites dans la littérature, des différences existent en ce qui concerne leur cinétique d'activation impliquant pour chacune un mode différent d'ouverture et de fermeture du "canal" proton. La vitesse d'activation au niveau des neurones de mollusque et de l'ovocyte d'Ambystome est très rapide (Byerly et coll., 1984; Mahaut-Smith, 1989; Barish & Baud, 1984). Par contre, au niveau des cellules de mammifères, le courant proton s'active beaucoup plus lentement (Bernheim et coll., 1991; DeCoursey, 1991, Demaurex et coll., 1993a; Kapus et coll., 1993a). Au niveau des neutrophiles le courant, pour de

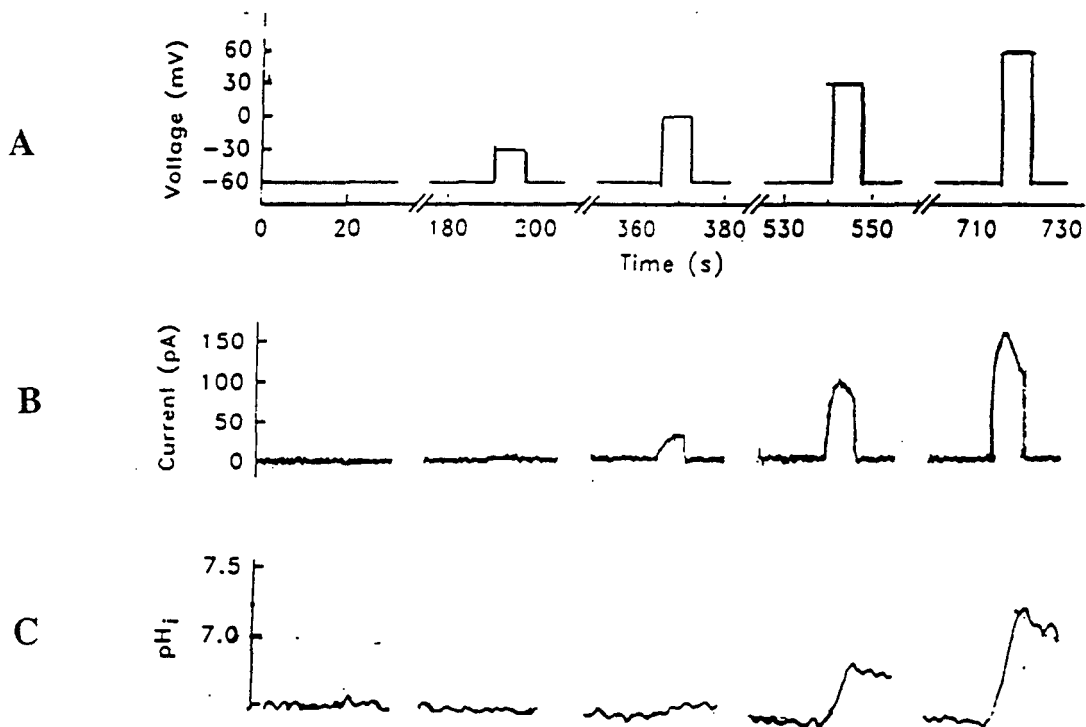


Figure 6: Alcalinisation du pHi consécutive à l'activation de la conductance proton (d'après Kapus et coll., 1993b). A l'aide de la technique de patch-clamp en configuration "cellule entière" les cellules sont dépolarisées et grâce à la pipette de patch contenant notamment une solution tampon de pH de 6,5 (10 mM deMES), leur pHi est de 6,5 (pHe étant de 7). Les variations de pHi sont mesurées grâce à la technique de microspectrofluorométrie (la sonde pH utilisée est le BCECF)

A- Des dépolarisations successives amenant le potentiel à -30, 0, 30 et 60 mV sont appliquées durant 7 secondes toutes les 180 secondes. B- Courant proton enregistré au cours de dépolarisations successives. C- Changement de pHi induit par l'activation du courant de proton.

faibles dépolarisations, augmente même durant 3 min avant d'atteindre un maximum (DeCoursey & Cherny, 1993).

b- cinétique et mécanisme moléculaire de l'activation

Deux cinétiques d'activation ont été décrites: l'une exponentielle, l'autre sigmoïde, impliquant ainsi deux modes possibles d'ouverture du "canal".

Au niveau de l'ovocyte d'Ambystome, la cinétique d'activation ainsi que la cinétique de désactivation sont décrites chacune par une exponentielle (Barish & Baud, 1984). De ce fait, l'activation de la conductance proton peut être analysée à l'aide d'un modèle comprenant deux états: ouvert ou fermé. Par contre dans d'autres préparations, et en particulier au niveau des cellules de mammifères, le mode de "gating" ne peut pas être décrit à l'aide de ce modèle à deux états, la cinétique d'activation étant décrite par une sigmoïde (Bernheim et coll., 1993; DeCoursey, 1991; DeCoursey & Cherny, 1993; Kapus et coll., 1993a). De plus, cette cinétique d'activation dans les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires est ralentie quand le potentiel de maintien de la cellule est porté à un potentiel plus positif que le potentiel de repos, ceci suggérant ainsi qu'il existerait au moins deux états fermés et un état ouvert du "canal" proton.

B-LE PHENOMENE DE DEPLETION ET SES CONSEQUENCES

L'activation de la conductance proton peut produire de grands changements du pH intracellulaire (figure 6) conduisant, pour un potentiel d'activation déterminé, à un changement de valeur du gradient électrochimique. Ainsi, comme le seuil de potentiel et la cinétique d'activation dépendent du pH intracellulaire, toute modification du pH intracellulaire induit donc, lors de l'activation de la conductance, un changement des propriétés électrophysiologiques du "canal" qui doivent être prises en compte par l'expérimentateur quand il désire décrire la cinétique du courant porté par les protons.

1°) Ordre de grandeur du changement de pH induit par l'activation de la conductance proton.

Dans les conditions physiologiques normales, l'activation du courant proton conduit à une augmentation de pHi. Dans tous les types cellulaires où est décrite la conductance proton, le phénomène d'alcalinisation du milieu intracellulaire dû à la déplétion des ions H⁺, est observé (pour revue, voir DeCoursey & Cherny, 1994a). Ce phénomène de déplétion est montré en mesurant directement pHi (Demaurex et coll. 1993, Kapus et coll. 1993a, Mahaut-Smith, 1989; Meech & Thomas, 1987; Thomas et Meech, 1982) ou indirectement en mesurant le potentiel d'inversion du courant proton (Barish & Baud, 1984; DeCoursey, 1991). Le temps requis pour que se produise l'alcalinisation intracellulaire dépend des types cellulaires. Cette augmentation du pHi peut apparaître après plusieurs minutes d'activation de la conductance proton au niveau des neurones d'escargot (Meech & Thomas, 1987; Thomas, 1979; Thomas & Meech, 1982) ou en quelques secondes comme par exemple au niveau de petites cellules comme les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires, les granulocytes, les macrophages (DeCoursey, 1991; Demaurex et coll., 1993a; Kapus et coll., 1993a). Au niveau de l'ovocyte d'Ambystome, cette alcalinisation intracellulaire peut aussi se manifester quelques secondes après une forte activation de la conductance proton (Barish & Baud, 1984). Ainsi, la cinétique de changement du pH intracellulaire est en particulier liée au diamètre des cellules et à l'intensité du courant sortant de protons activé lors de dépolarisations membranaires dont l'amplitude et la durée vont conditionner la vitesse de variation du pH intracellulaire.

Par exemple, dans les neurones d'escargot (*helix aspersa*), l'alcalinisation intracellulaire se produit quelques minutes après l'activation du courant: pHi change de 0,5 unité en 7 minutes quand le potentiel varie de -80 à 30 mV (Meech & Thomas, 1987). Dans les ostéoclastes, le changement de pHi peut atteindre 0,25 unité pH en 10sec pour un potentiel imposé de 60 mV (Nordtröm et coll., 1995); dans les granulocytes, HL60, le pH varie de 0,75 unité en 30 sec pour un pHi de départ de 6,5 et un pH externe de 7,5 (Demaurex et coll., 1993); dans les macrophages, ce changement de pH atteint 0,75 unité

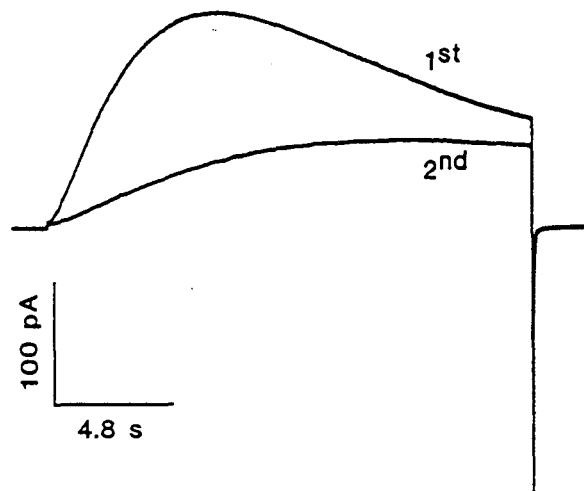


Figure 7: Conséquence du changement de pH_i induit par l'activation du courant proton sur la cinétique d'activation et l'amplitude du courant sortant d'ions H^+ (d'après DeCoursey & Cherny, 1994a).

Le pH_i et le pH_e sont égaux ($pH\ 5,5$). Le potentiel de la cellule est amené à $100\ mV$ durant 20 secondes deux fois de suite à 30 secondes d'intervalle. Pour la première impulsion (1^{st}) le courant proton atteint un maximum puis décroît (signe du changement de pH_i induit par l'activation de ce courant). La seconde impulsion (2^{nd}) induit un courant bien moins ample que le précédant indiquant que le pH_i n'a pas repris sa valeur de départ entre les deux impulsions. La cinétique d'activation du courant au cours de la seconde impulsion est plus lente que celle de la première impulsion. Le courant à la fin de la seconde impulsion n'atteint pas l'amplitude qu'il avait en fin de première impulsion.

en 7 sec pour un potentiel de membrane de 60 mV et un pHi de départ de 6,5, le pHe étant de 7,5 (Kapus et coll., 1993a). Pour ces quatre derniers exemples, le milieu intracellulaire n'est pas ou peu tamponné (la concentration du tampon de pH dans la pipette de patch n'étant que de 10 mM). Même en présence d'une concentration de tampon de 100 mM dans la pipette, un fort changement de pH, suite à l'activation de la conductance proton, persiste. En effet, chez les macrophages dont le milieu intracellulaire est tamponné de la même manière à l'aide d'un tampon pH de 6 d'une concentration de 100 mM, la variation du pHi atteint encore 1 unité en 9 secondes (Kapus et coll., 1993a)

En résumé ce phénomène de déplétion rend aussi compte du rôle important de l'activation de la conductance proton lors de changements du pH intracellulaire et démontre dès lors le rôle physiologique prépondérant de cette conductance proton dans la régulation du pHi.

2°) Les conséquences de la déplétion des ions H⁺ intracellulaires sur les propriétés électrophysiologiques et sur le potentiel d'inversion du courant proton

a- Conséquences de la déplétion sur la cinétique d'activation, l'amplitude du courant et la conductance

La déplétion des protons à la face interne de la membrane résultant de l'activation du courant proton modifie fortement le décours de ce dernier. Pour une dépolarisation de forte amplitude et de longue durée, le courant diminue au cours du temps (figure 7). En effet l'alcalinisation du milieu intracellulaire réduit son amplitude du fait de la diminution du gradient électrochimique d'une part mais aussi du fait de la diminution de la conductance d'autre part puisque l'activation de cette conductance est régulée par le pH intracellulaire. Les conséquences de cette alcalinisation sont bien illustrées dans la figure 7 où il est vu que deux dépolarisations membranaires de même amplitude s'effectuant à 30 sec d'intervalle entraînent pour la seconde activation un courant bien moins ample. De plus, comme le phénomène de déplétion peut conduire à une diminution du courant du fait de l'alcalinisation du milieu intracellulaire, il en découle donc, lors d'un calcul éventuel de la vitesse d'activation, une sous-estimation de sa valeur puisque l'activation

du courant reflète à la fois le changement de conductance en fonction du potentiel, le changement du gradient électrochimique et le changement de conductance en fonction du pH_i . De même, la diminution d'amplitude du gradient électrochimique associée à une augmentation de la conductance peut, du fait du maintien de l'amplitude du courant durant une impulsion dépolarisante, laisser à penser que la conductance reste stable. Dans les types cellulaires où l'activation de la conductance est lente, des impulsions dépolarisantes de longues durées ne permettent donc pas de conclure à un état stable de la conductance activée si n'est pris en compte que le maintien apparent du courant (Bernheim et coll., 1993; DeCoursey, 1991; DeCoursey & Cherny, 1993; DeCoursey & Cherny, 1994a). En conséquence, la pente de la relation liant la conductance au potentiel et la détermination du potentiel de demi-activation à partir de cette relation dépendront de l'ampleur du phénomène de déplétion. De ce fait, la relation conductance-potentiel à l'état stable (pseudo-état stable) ne peut donc pas être déterminée sans risque d'erreurs par l'équation de Boltzmann. C'est ainsi que la courbe traduisant l'évolution de la conductance en fonction du potentiel ne présente pas toujours un plateau de saturation (Byerly et coll., 1984).

b- Conséquences de la déplétion des ions H^+ sur la détermination du potentiel d'inversion

Comme cela est précisé plus haut, la valeur du potentiel d'inversion déterminée expérimentalement, est bien souvent supérieure à la valeur de la pile d'équilibre calculée à partir de l'équation de Nernst qui prend en compte les activités des ions H^+ intra et extracellulaire. Cette différence s'explique par le fait que la valeur du pH_i augmente durant une impulsion dépolarisante suite à l'activation du courant sortant d'ions H^+ . La détermination du potentiel d'inversion à l'aide de la relation liant le courant instantané au potentiel ne peut correspondre au potentiel de la pile d'équilibre aux ions H^+ , calculée à partir des valeurs de pH_i et pH_e dans la mesure où, durant la dépolarisation membranaire activant la conductance proton, il y a une alcalinisation du milieu intracellulaire et donc une variation positive de la valeur de la pile d'équilibre aux ions H^+ . Cette sortie de

protons conduisant à la déplétion explique donc pourquoi une variation, par exemple, de 1 unité de pH extracellulaire, entraîne souvent une variation de E_{H^+} bien inférieure à 58 mV.

c- conclusion

Du fait de la déplétion intracellulaire des ions H^+ consécutive au courant sortant de protons lors d'un potentiel dépolarisant constant, la relation liant le courant I_{H^+} à la conductance n'est pas linéaire et la conductance au cours du temps ne peut donc être évaluée sans risque d'erreurs. Elle ne peut l'être que dans la mesure où est mesurée simultanément avec le courant, l'activité intracellulaire des ions H^+ . Et encore, même dans ces conditions, du fait que l'activation de cette conductance, le seuil d'activation et la cinétique d'activation du courant au cours d'un potentiel imposé dépendent très étroitement des valeurs de pH_i et de pH_e , il s'avère donc difficile, voire impossible, d'établir très exactement l'évolution de la conductance proton en fonction du potentiel et du temps.

C- REGULATION DE LA CONDUCTANCE PROTON

Jusqu'à ce jour, la régulation de la conductance proton n'est appréhendée qu'au niveau des neutrophiles. En 1987 et 1988 Henderson et coll. démontrent de manière indirecte l'existence d'une perméabilité membranaire aux protons et donc d'une conductance activée lors d'une acidification intracellulaire induite par l'activation du complexe "NADPH oxidase". Par la suite, il est montré qu'une telle conductance peut être activée au potentiel de repos des cellules par la PKC et par l'acide arachidonique (Nanda et Grinstein, 1991; Kapus et coll., 1992; Henderson & Chappell, 1992; Kapus et coll., 1993b; Demaurex et coll., 1993b). Il est à ce point de l'exposé nécessaire de préciser que la conductance proton activée par l'acide arachidonique et la PKC semble pour beaucoup d'auteurs très peu sensible aux variations de potentiel. Or en 1993, Decoursey & Cherny d'une part et Demaurex et coll. d'autre part, démontrent cependant, à l'aide de la

technique de patch clamp, l'existence, dans les neutrophiles et les HL60 différenciés, d'une conductance proton dépendante du voltage, régulée positivement par l'acide arachidonique. On peut donc se demander si la conductance proton activée par l'acide arachidonique et/ou par la PKC ne correspondrait pas à une conductance proton différente de la conductance proton voltage-dépendante. En fait, il pourrait exister deux conductances aux ions H⁺.

D- NATURE MOLECULAIRE DE LA CONDUCTANCE PROTON

La structure moléculaire dont dépend la conductance proton est encore présentement inconnue et de nombreuses questions quant à sa nature se posent. L'absence de ligands spécifiques ne permet donc pas encore sa purification biochimique et donc la détermination de sa structure moléculaire.

1°) Le courant de protons passe bien par un canal proton

Il est proposé dans la littérature que les protons pourraient passer à travers des canaux ioniques connus comme, par exemple, à travers des canaux potassiques. Au niveau des neurones de *Lymnaea stagnalis*, les cinétiques d'activation des courants potassique et proton présentent les mêmes caractéristiques (Byerly & Suen, 1989). De même au niveau des cellules des alvéoles pulmonaires, les conductances potassique et proton ont le même seuil d'activation mais cependant des cinétiques d'activation différentes. De plus, la charybdotoxine (bloqueur du canal potassique) à la concentration de 100 nM n'exerce aucun effet sur le courant proton alors qu'elle inhibe totalement le courant potassique à la concentration de 1 nM (DeCoursey & Cherny, 1994a). Les inhibiteurs d'autres types de canaux n'ont pas ou peu d'effets sur la conductance proton. En effet, n'ont aucune influence sur la conductance proton: le SITS (20 μM) (4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2-2'-disulfonic acid), l'amiloride (100 μM), l'apamine (0,3 μM), la nifédipine (1 μM) (Meech & Thomas, 1987; Mahaut-Smith, 1989; Bernheim et coll., 1993), la venturicine (10 μM) la charybdotoxine (100 nM) la noxiustoxine (100 nM), la

phenylcyclidine (200 μM), l'acide méfanamique (100 μM), la 9-AC (anthracene-9-carboxylic acid) (1 mM) (DeCoursey & Cherny, 1994a). Une inhibition partielle par le DITS (100 μM) (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid) est cependant reporté par Holevinski et coll.(1994).

En outre, il est émis dans la littérature par plusieurs auteurs, l'hypothèse selon laquelle les protons pourraient traverser la membrane à l'aide d'un transporteur ou de systèmes impliqués dans les réactions enzymatiques. En effet, un des éléments qui permet la discrimination entre un canal proton et un transporteur concerne le nombre d'ions qui passent à travers la membrane. Comme un canal est à même de transporter plus de 10^7 ions par seconde (Hille, 1992) et qu' au pH physiologique, le courant unitaire présumé du canal proton ne serait que de 1 ou 2 fA à un potentiel de 100 mV, cela ne correspondrait qu'à un transport de 10^4 protons par seconde. Ainsi, les ions H^+ seraient évacués hors de la cellule à l'aide de transporteurs ou d'enzymes (Hille, 1992). Il existe néanmoins de nombreux arguments qui vont à l'encontre d'une conductance voltage dépendante correspondant à l'activation d'un transporteur, ces arguments sont les suivants: (i) le taux maximum d'efflux par cellule par l'intermédiaire de la conductance proton est bien plus grand que celui concernant les autres systèmes de transport; (ii) les inhibiteurs des transporteurs n'ont pas ou peu d'effet sur la conductance proton: le SITS (20 μM), le CCmP (carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone, 20 μM), le DCCD (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, 100 μM), l'oligomycine (10 $\mu\text{M}/\text{ml}$) (Meech & Thomas, 1987), le NEM (N-ethyl-maleimide, 2 mM), le diethylpyrocarbonate (1 mM), l'amiloride (10 μM), la venturicidine (10 μM) n'ont pas d'effet sur la conductance proton (DeCoursey & Cherny, 1994a); (iii) le courant de protons est toujours enregistré même en absence d'ATP intracellulaire (Demaurex et coll., 1993; Kapus et coll.,1993a) ce qui exclut une possible voie de passage des protons grâce à l'activité d'une H^+ ATPase.

Finalement, il semblerait que la voie de passage des protons puisse s'effectuer par des canaux, ou par des entités protéiques, se comportant comme des canaux ioniques, ces dernières présenteraient en plus d'une forte sélectivité ionique, une probabilité d'"ouverture" et une cinétique d'activation dépendant du potentiel.

2- La partie sous-membranaire du complexe NADPH oxidase, le cytochrome b558 est-elle une partie essentielle du canal H⁺ ?

Des données très récentes de ces deux dernières années concernant la conductance proton, présente au niveau des neutrophiles, permettent néanmoins d'entrevoir la possible entité moléculaire de la conductance (voir DeCoursey et Cherny, 1994a).

Cette conductance proton apparaît lors de l'activation du complexe NADPH oxidase qui a pour rôle de produire des métabolites toxiques de l'oxygène servant à lutter contre l'invasion de microorganismes. La production d'ions superoxide est associée à celle importante de protons qui doivent être expulsés hors de la cellule.

Le complexe NADPH oxidase, est composé d'au moins 5 sous-unités, trois d'entre elles sont cytoplasmiques, ce sont les sous-unités suivantes: 47 kDa (p 47-*phox*), 67 kDa (p 67-*phox*) et 22 kDa (*rac-1*, *rac-2*, ou *krev-1*) (Kraus et coll., 1990; Eklund et coll., 1991; Abo et coll., 1991). Les deux autres, composant le cytochrome b 558, sont associées à la membrane plasmique, ce sont gp91-*phox* (91 kDa) et p22-*phox* (22 kDa). Lorsque le macrophage est stimulé, les composants cytoplasmiques migrent vers la membrane et s'associent au cytochrome pour former le complexe NADPH oxidase fonctionnel. Il existe des pathologies où les neutrophiles des patients sont incapables de former ce complexe fonctionnel; ces patients souffrent ainsi d'infections bactériennes récurrentes car leurs neutrophiles ne sont plus capables de former l'oxygène activé, O₂⁻ (Curnutte, 1992). Il existe dans cette pathologie deux types de déficience au niveau des composants du complexe: dans l'un des groupes de patients, la protéine gp 91-*phox* est absente (et donc le cytochrome b 558) ; dans l'autre groupe, c'est le composant cytoplasmique p47-*phox* qui est absent.

- En 1993, Nanda et coll. montrent que les neutrophiles de ces patients ne peuvent pas compenser une charge intracellulaire acide via la conductance proton alors qu'ils peuvent cependant la compenser, grâce à l'activité de l'échangeur Na⁺/H⁺ ou de l'H⁺ ATPase. **Le test utilisé dans ce cas pour évaluer la conductance H⁺ était de prendre en compte l'activation de la conductance par la PKC, l'évaluation de cette dernière étant faite à partir de la mesure, par**

microspectrofluorométrie, de la variation du pHi. Ainsi l'activation par la PKC tend à suggérer que l'oxidase ou un de ses composants serait le support moléculaire de la conductance proton ou que l'oxidase activée soit le facteur déclenchant l'activation de l'entité protéique permettant l'extrusion des protons.

- En 1994, par contre, la même équipe (Nanda et coll.) démontre que, malgré l'absence du complexe NADPH fonctionnel, un courant proton voltage-dépendant pouvait être enregistré. Ces auteurs, au vu de leur premier travail (1993) sont alors amenés dans ce second travail à envisager la présence dans ces neutrophiles de deux conductances aux ions H⁺: une activée par la PKC non voltage dépendante et une dépendante du potentiel.

- Cependant l'année suivante, Henderson et coll.(1995) obtiennent des résultats différents de ceux de Nanda et coll.. En effet, ils montrent, en utilisant des cellules CHO qui ne possèdent pas de conductance proton, que ces cellules acquièrent, suite à leur tranfection par le gène codant pour la protéine gp91-*phox*, la capacité d'expulser des protons à partir du milieu intracellulaire. Ces auteurs envisagent l'hypothèse selon laquelle cette protéine serait le canal proton sans pour autant exclure le fait que l'expression de gp91-*phox* pourrait indirectement induire l'expression dans les cellules CHO du canal proton. **Il est encore nécessaire de préciser que, dans cette étude, le test biologique utilisé pour mettre en évidence la conductance proton est l'alcalinisation qu'elle produit au potentiel de repos quand elle est stimulée par l'acide arachidonique.**

Ainsi, au sein des neutrophiles, il existerait deux conductances aux ions H⁺: l'une non voltage-dépendante pouvant correspondre à gp91-*phox* et l'autre dépendante du voltage dont la nature moléculaire reste encore inconnue. Egalement il peut être imaginé que gp-91-*phox* pourrait être une sous-unité auxiliaire responsable de la régulation par l'acide arachidonique et la PKC d'une seule conductance proton. Il n'est pas exclu non plus qu'une régulation de type électrostatique puisse exister par l'intermédiaire du complexe NADPH. En effet, une des entités protéiques du complexe, gp47-*phox*, indispensable à l'activité de la conductance proton (Nanda et coll., 1993), peut être phosphorylée au

niveau de plusieurs sites, cette phosphorylation induisant peut être une modification du potentiel de surface à la face interne de la membrane; cette modification permettrait alors un déplacement du seuil de potentiel d'activation de la conductance vers les potentiels négatifs.

E- ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA CONDUCTANCE PROTON DANS LA REGULATION DU pH INTRACELLULAIRE

Les modifications du seuil de potentiel et de la cinétique d'activation de la conductance proton en fonction du potentiel et du temps sous l'influence en particulier des pHs intracellulaire et extracellulaire permettent de comprendre le rôle important que peut jouer cette conductance dans la régulation du pH intracellulaire dans les différents types cellulaires.

1°) Dans les neurones

L'arrivée de trains de potentiels d'action conduit à l'acidification du milieu intracellulaire. En effet, l'augmentation du taux de calcium intracellulaire, engendrée par l'activité neuronale, peut être dissipée par le système d'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ dont le fonctionnement conduit à l'acidification du milieu intracellulaire. Cette acidification provoquant donc un changement du seuil d'activation de la conductance vers des potentiels plus négatifs permettra ainsi, au potentiel de repos, la sortie de l'excès d'ions H^{+} intracellulaires. De plus, à pH_i acide, la cinétique d'activation qui est très rapide dans ce type cellulaire (de l'ordre de 5ms pour la demi-activation à +30 mV) peut rendre compte durant le potentiel d'action nerveux d'une ample et rapide sortie des ions H^{+} , réduisant ainsi l'acidification intracellulaire associée à l'activité nerveuse.

2°) Dans les phagocytes

Les phagocytes sont attirés vers les sites d'infection où ils ont pour rôle de s'opposer à l'invasion des microorganismes via des mécanismes comme la phagocytose, la sécrétion

d'enzymes ou la production de métabolites toxiques de l'oxygène comme les ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). La production de $O_2^{\cdot-}$ s'effectue grâce à un mécanisme de réduction de l'oxygène par un complexe enzymatique qui est le complexe NADPH oxydase comme cela a été dit plus haut. La réduction de l'oxygène par ce complexe a pour conséquence une production rapide et massive d'ions H^+ . L'acidification intracellulaire reste cependant limitée et ne provoque donc pas de dépolarisation de la cellule, le potentiel de repos restant constant, même en absence de bicarbonate, du fait de l'extrusion des ions H^+ par l'échangeur Na^+/H^+ (activé par l'acidification du milieu intracellulaire). L'activation de l'échangeur Na^+/H^+ ne peut cependant pas permettre l'évacuation complète de l'excès des ions H^+ et c'est dans ce cadre qu'intervient alors l'activation de la conductance proton décrite dans ce modèle. En effet, l'activation voltage-dépendante de la conductance proton dépendant aussi très étroitement du pH_i , permet, en présence d'un excès d'ions H^+ intracellulaires, le déplacement du seuil d'activation de cette conductance vers les potentiels négatifs et ainsi l'extrusion des ions H^+ hors de la cellule.

3°) Dans les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires

Les cellules de l'épithélium pulmonaire alvéolaire du fait de leur rôle et de leur fonctionnement sont soumises à des variations du pH_i . Ces cellules sécrètent le surfactant. Ce surfactant est stocké et relargé par des corpuscules lamellaires dont le pH interne n'est que de 6,1; quand il est sécrété, une acidification locale transitoire à la face interne de la cellule se produit. De plus, l'épithélium pulmonaire est la barrière structurale entre le sang et l'air alvéolaire à travers laquelle les ions H^+ associés aux ions HCO_3^- sont évacués sous forme de CO_2 et H_2O , ce qui, par voie de conséquence, peut exposer les cellules épithéliales à de rapides et larges fluctuations du pH_i . Dans ces cellules, le pH_i peut varier en 15 min de 7,47 à 6,37 lors d'anoxies (Pillai et coll., 1986). Il peut donc être imaginé qu'à bas pH_i , l'activation même faible d'une fraction de la conductance proton doit avoir un effet important sur le pH_i de la cellule épithéliale.

4°) Dans les cellules musculaires

Lors de l'activation du muscle, l'arrivée des potentiels d'action conduit à une acidification intracellulaire et là encore, l'activation de la conductance proton peut largement participer à la régulation du pHi. Il est intéressant de mentionner que dans ce modèle les ions Ca^{2+} bloquent la conductance proton (Bernheim et coll., 1993). Cependant ce blocage est dépendant du potentiel et peut ainsi être levé par la dépolarisation. Dans ce cas, une activation de la conductance proton au potentiel de repos par une acidification du milieu intracellulaire ne peut pas constituer la voie de contrôle du pHi puisque, pour jouer un rôle, il faudrait que l'inhibition par le Ca^{2+} puisse être levée par un changement de pHi (cette possibilité n'est pas à l'heure actuelle démontrée). Néanmoins il est possible que la conductance proton puisse réguler le pHi puisqu'elle peut être activée lors de chaque potentiel d'action. En effet, Bernheim et coll. (1993) montrent très clairement que cette conductance peut être activée lors d'un potentiel d'action. Ils montrent en effet que 9 % de la conductance maximale peut être activée pendant les premières millisecondes amenant le potentiel membranaire de repos (-80 mV) à une valeur de 42 mV. Si le courant H^+ est activé, lors d'un potentiel d'action, une augmentation progressive de la conductance peut se produire à chaque pic de potentiel lors de l'émission d'un train de potentiels d'action, dans la mesure où la relaxation du courant n'est pas complète et donc que l'intervalle de temps entre deux potentiels d'action est faible. Ces derniers auteurs observent que ce phénomène de sommation peut apparaître et que la conductance proton peut être activée à 40 % de son maximum. De plus, après chaque potentiel d'action, lors de la repolarisation, le potentiel de membrane devient très négatif (-80 mV) et c'est aussi à ce potentiel que le blocage par le calcium de la conductance intervient.

5°) Dans les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont ces cellules multinuclées qui sont responsables de la résorption du Ca^{2+} des os. Ils servent à détruire les matières organiques et inorganiques autour de leur sites d'attachement. Ces cellules rejettent des protons dans le milieu extracellulaire via une H^+ ATPase. Ainsi, cette acidification du milieu extracellulaire joue un grand rôle dans les mécanismes de résorption et en particulier elle est capable d'induire la résorption des

minéraux de l'os (Neuman & Neuman, 1988). Nordström et coll. (1995) proposent que la conductance aux protons, présente dans les ostéoclastes, pourrait agir dans les mécanismes d'acidification du milieu externe. D'un autre côté, il est démontré que ces ostéoclastes sont dotés du système NADPH fonctionnel capable, tout comme dans les phagocytes, de provoquer une acidification intracellulaire (Key et coll., 1990; Garrett et coll., 1990). Ainsi, à l'heure actuelle, il est proposé que la conductance proton pourrait intervenir pour réguler le pH intracellulaire des ostéoclastes de façon similaire à son intervention dans les phagocytes (Nordström et coll., 1995)

6°) Dans les ovocytes

Jusqu'à maintenant, la conductance proton n'est reporté que dans un seul type d'ovocyte, l'ovocyte d'Ambystome (Barish & Baud, 1984). De plus, il est montré qu'elle diminue pendant les 5 premières heures de la maturation pour finalement disparaître et laisser place à une conductance sodique (Baud & Barish, 1984). De plus, au niveau de l'ovocyte d'Ambystome, la maturation conduit à une dépolarisation de la membrane et à une alcalinisation du milieu intracellulaire, alcalinisation qui pourrait éventuellement avoir pour origine l'activation de la conductance proton voltage-dépendante. Cependant, l'intervention directe de cette conductance dans le processus de maturation n'est pas encore élucidée.

7°) Conclusion

Bien que la conductance proton ne soit pas mise en évidence dans tout les types cellulaires, elle semble néanmoins jouer un rôle fondamental dans la régulation du pH intracellulaire quand elle est présente. Il est aussi nécessaire de préciser que c'est bien au niveau de l'ovocyte que son rôle semble le moins connu. Ceci peut se comprendre dans la mesure où les études électrophysiologiques menées sur les ovocytes sont réalisées le plus souvent sur l'ovocyte de Xénope qui ne présente pas de conductance proton voltage-dépendante. Comme nous le verrons dans ce mémoire, la conductance proton décrite au niveau des ovocytes de *Rana esculenta* peut, lors de son activation, sensibiliser

transporteurs	vitesse de changement du pHi (pH/min)	utilisation d'ATP?	electrogénique?	effet sur pHi mode normal
Na ⁺ /H ⁺	0,13-0,23 (6,3-6,5)	indirecte	non	alcalinisation
Na ⁺ /HCO ₃ ⁻	0,12 (7,0)	indirecte	oui	alcalinisation
Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	0,08 (7,8)	indirecte	non	acidification
H ⁺ -ATPase	0,09 (6,6)	directe	oui	alcalinisation
canal" H ⁺	6,0 (6,0)	non	oui	alcalinisation

Tableau 2: Comparaison des différents mécanismes intervenant dans la régulation du pHi dans les petites cellules (d'après DeCoursey & Cherny, 1994 b). Les valeurs calculées sont déduites de résultats obtenus à partir de phagocytes et de cellules épithéliales (leur diamètre étant compris entre 8 et 15 μm); les valeurs entre parenthèses correspondent à la valeur du pHi.

d'importants mécanismes intracellulaires comme la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique, sensible à l'InsP₃.

De plus, il est nécessaire de préciser que l'activation de la conductance proton est le seul moyen qui permette l'évacuation à partir du milieu intracellulaire des ions H⁺ sans dépense d'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. De plus sa capacité à sortir les protons du milieu intracellulaire est très largement supérieure à celle d'autres systèmes permettant aussi de réguler le pH intracellulaire (voir tableau 2).

Premier Chapitre: données bibliographiques

Deuxième partie

L'augmentation de l'activité du calcium intracellulaire

L'AUGMENTATION DE L'ACTIVITE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

L'augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire est l'un des éléments fondamentaux du couplage excitation-réponse cellulaire, elle aboutit à des réponses aussi diverses que variées comme la contraction, la sécrétion, l'activation de la transcription d'une part et celle de systèmes enzymatiques d'autre part. Cette augmentation des ions Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire provient du relargage des ions Ca^{2+} contenus dans les réserves intracellulaires non mitochondriales et/ou d'un influx de Ca^{2+} provenant du milieu extracellulaire, l'influx de calcium ayant comme origine:

- (i) l'activation de récepteurs-canaux appelés ROC (pour Receptor Operated Channels). Ils permettent l'entrée de Ca^{2+} via la fixation de neurotransmetteurs, d'acides aminés excitateurs et de divers ligands à leur récepteur spécifique (acétylcholine, glutamate, sérotonine, N-méthyl-D-Aspartate ou ATP par exemple). Ce mode d'entrée de Ca^{2+} ne sera pas détaillé dans ce chapitre;
- (ii) l'activation de canaux calciques par la déplétion des stocks intracellulaires calciques et par les seconds messagers: les SOC (pour Store Operated Channels) et les SMOC (pour Second Messenger Operated Channels);
- (iii) l'activation de canaux calciques dépendant du voltage, les VOC (pour Voltage Operated Channels).

I- AUGMENTATION DU TAUX DE CALCIUM PAR LA LIBERATION DE CALCIUM DES STOCKS NON MITOCHONDRIAUX

Il existe deux types de réservoirs calciques non mitochondriaux capables de participer à l'augmentation du Ca^{2+} interne. Le premier est le réservoir sensible à l' InsP_3 dont la liaison à son récepteur-canal calcique, situé dans la membrane du calciosome, provoque le mécanisme de relargage. Le second réservoir capable de libérer du Ca^{2+} est le réservoir dit insensible à l' IP_3 , il est encore appelé réservoir sensible à la ryanodine ou sensible à la

caféine puisque ces substances pharmacologiques sont capables d'engendrer la libération de Ca^{2+} à partir de ces stocks. En ce qui concerne le réservoir sensible à la ryanodine, c'est soit le calcium lui-même soit la dépolarisation (de manière indirecte) qui induit le relargage de calcium.

A- Structure et distribution des stocks de calcium intracellulaire.

Les calciosomes, correspondant aux portions modifiées du réticulum endoplasmique, à partir desquels le Ca^{2+} est libéré, renferment dans leur membrane trois éléments essentiels: (i) des pompes calciques intervenant dans la séquestration du calcium (Ca-ATPase par exemple), celles-ci pouvant être bloquées en particulier par des substances telles que la thapsigargine ou le vanadate; (ii) des protéines de fixation du calcium (Ca-binding proteins) comme la calséquestrine ou la calréticuline, protéines intravésiculaires intervenant dans le stockage du calcium; (iii) des récepteurs-canaux spécifiques à l'InsP₃ ou à la ryanodine qui permettent de libérer le calcium dans le cytosol. Ces calciosomes sont hétérogènes sur le plan fonctionnel du fait de leur sensibilité à la ryanodine ou à l'InsP₃ ou à ces deux substances. La distribution de ces stocks varie considérablement selon les types cellulaires. Ainsi, certaines cellules comme les fibres musculaires squelettiques ne possèdent que des stocks sensibles à la ryanodine et à l'inverse d'autres modèles comme l'ovocyte de Xénope ne renferment que ceux sensibles à l'InsP₃. Entre ces deux extrêmes, il convient de noter que la plupart des cellules renferment en fait les deux types de stocks dans des proportions variables, c'est le cas des neurones, cellules chromaffines, cellules endothéliales, oeuf d'oursin,...).

B- La libération de Ca^{2+} induite par les réservoirs sensibles à la ryanodine

Le récepteur ryanodine est un récepteur canal formé de 4 sous-unités identiques. Ces sous-unités sont issues de trois gènes distincts (*ryr1*, *ryr2* et *ryr3*) codant pour trois isoformes de récepteurs "ryanodine" (Ryr 1, Ryr 2 et Ryr 3) qui sont exprimés de

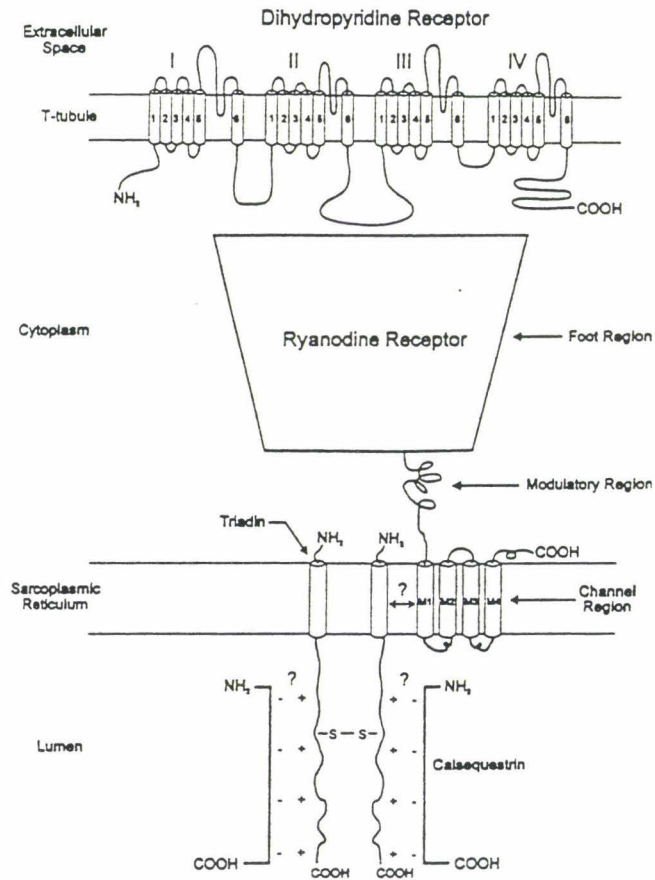


Figure 8: Modèle moléculaire de la triade (d'après McPerson & Cambell, 1993). Pour faciliter la compréhension du schéma, seule la sous-unité $\alpha 1$ du récepteur dihydropyridine et une seule sous-unité du récepteur ryanodine sont représentées. Les points d'interrogation indiquent la nature spéculative des interactions entre la "triadin" et le récepteur dihydropyridine et entre la "triadin" et la calcéquestrine.

manière spécifique dans certains types cellulaires. Ryr 1 est exprimé dans le muscle squelettique, dans les cellules de Purkinje du cervelet et dans les oeufs d'oursin; Ryr 2 est exprimé dans les cellules cardiaques et le cerveau; Ryr 3 est exprimé dans le muscle squelettique à l'exception de celui des mammifères, dans les corps striés, le cortex limbique du cerveau, dans les muscles lisses et dans les autres cellules de vertébré (pour revue voir Ogawa, 1994).

La libération de Ca^{2+} à partir des stocks sensibles à la ryanodine s'effectue de deux manières suivant les types cellulaires: (i) soit c'est le calcium cytosolique lui-même qui déclenche la libération de Ca^{2+} en stimulant le récepteur-canal ryanodine, ce processus de libération est le processus de "calcium induced calcium release" (CICR), il est mis en évidence pour la première fois par Endo et coll. en 1970; (ii) soit c'est la variation de potentiel, qui, via une structure spécialisée, provoque la libération de calcium des stocks sensibles à la ryanodine. Ce processus de libération est le processus de "depolarization-induced- Ca^{2+} release" (DICR), spécifique du muscle squelettique, qui coexiste avec le processus de CICR (pour revue, voir Ogawa, 1994). C'est au niveau de la triade que s'effectue le couplage entre la dépolarisation et la libération de calcium des stocks sensibles à la ryanodine (figure 8). Il est maintenant bien connu que la libération de Ca^{2+} de ces réservoirs est indépendante du Ca^{2+} extracellulaire mais qu'elle est liée à la présence de canaux calciques dépendant du voltage, sensibles aux dihydropyridines (DHP). Au niveau de la triade, une certaine proportion de récepteurs-canaux (homotétramères), sensibles à la ryanodine, sont en apposition avec les récepteurs tétramériques aux DHPs (Bers & Sliffel, 1994). A l'heure actuelle, il est bien établi que la différence de potentiel ressentie par le récepteur aux DHPs est transmise au récepteur-canal calcique grâce à un changement de conformation du récepteur aux DHPs. Ce récepteur-canal subissant, lui aussi le changement de conformation, permet le passage des ions Ca^{2+} (McPerson & Campbell, 1993; Yano et coll., 1995). Le couplage entre le récepteur aux DHPs et le récepteur-canal ryanodine semble s'effectuer de manière directe grâce à une boucle cytoplasmique du récepteur aux DHPs (Beam et coll., 1986; Tanabe et coll., 1988; Tanabe et coll., 1990; Lu et coll., 1994). Néanmoins, certains auteurs

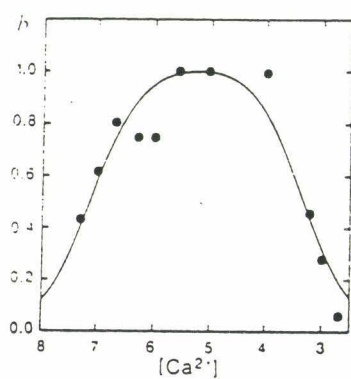


Figure 9: Régulation par le calcium de la libération de Ca^{2+} à partir du processus de "Ca²⁺ induced Ca²⁺ release" que traduit la relation liant le taux de Ca^{2+} libéré à la concentration de Ca^{2+} cytosolique (d'après Bezprozvanny et coll., 1991) .

pensent qu'une troisième protéine pourrait jouer un rôle dans ce couplage (Caswell et coll., 1991).

Dans les autres types cellulaires, comme par exemple dans les cellules cardiaques, c'est l'entrée de Ca^{2+} via des canaux dépendant du voltage qui provoque l'ouverture du récepteur-canal sensible à la ryanodine selon le processus de CICR. En fait le processus de CICR constitue dans ce cas un excellent système d'amplification de l'augmentation intracellulaire de calcium induite par les canaux voltage-dépendants. De même la libération de Ca^{2+} , selon le processus de CICR, à partir de l'activation du récepteur-canal sensible à la ryanodine, est aussi régulé par le calcium lui-même (Bezprozvanny, 1991). En effet, l'intensité du processus de CICR dépend de la concentration de Ca^{2+} puisque l'ampleur du processus est décrit par une courbe en cloche en fonction de la concentration de Ca^{2+} cytosolique (figure 9).

Il apparaît aussi très intéressant de mentionner que des données récentes montrent que le récepteur-canal ryanodine peut être régulé par le c-ADPR (cyclic adénosine 5' diphosphate), ce nucléotide apparaissant à l'heure actuelle comme un modulateur endogène du récepteur canal-ryanodine. Son rôle est mis en évidence, pour la première fois, dans les oeufs d'oursin (Galione et coll., 1991). Depuis, le rôle modulateur du cADPR est aussi mis en évidence dans les neurones et les cellules des acinis pancréatiques (Hua et coll., 1994; Thorn et coll., 1994), mais non dans les fibres musculaires squelettiques (Mészáros et coll., 1993). De plus, il est connu que l'action du c-ADPR passe par l'activation de la calmoduline (Lee et coll., 1994). Pour plus de détails, le lecteur peut consulter la revue de Lee (1994) en ce qui concerne les données relatives au c-ADPr et les revues de McPherson & Campbell (1993), Ogawa (1994) en ce qui concerne le récepteur-ryanodine.

C- La libération de Ca^{2+} induite par les réservoirs InsP_3 sensibles

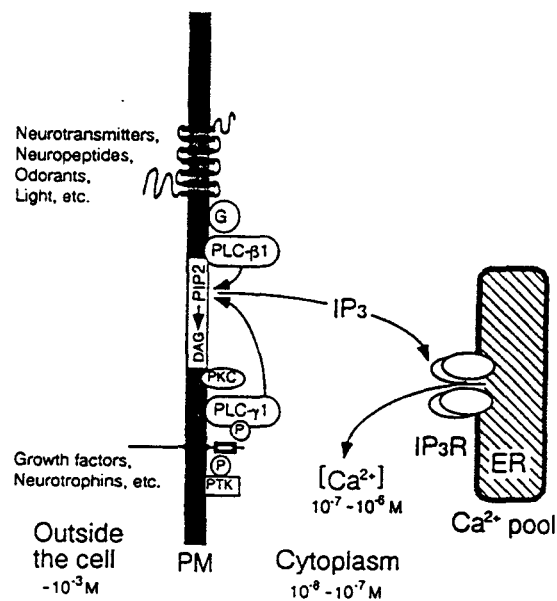


Figure 10: Cascades de transduction amenant à la production d'InsP₃ et à la libération de Ca²⁺ (d'après Berridge, 1993). Deux cascades conduisent à la formation d'InsP₃. La première est stimulée par les neuropeptides, les neurotransmetteurs, les molécules odorantes qui, se liant à leurs récepteurs spécifiques par l'intermédiaire d'une protéine G, activent une phospholipase C de type β1. La seconde cascade est stimulée par les facteurs de croissance qui se lient à leur récepteur de type tyrosine-kinase dont l'activation conduit à la stimulation d'une phospholipase C de type γ1. L'activation de ces deux phospholipases conduit alors à une production d'InsP₃ et de diacylglycérol (DAG) du fait du clivage du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). L'InsP₃, ainsi libéré, permet la libération du Ca²⁺ des stocks intracellulaires grâce à sa fixation sur son récepteur tétramérique.

La stimulation de récepteurs de type métabotrope (liés au métabolisme des phosphoinositides) provoque une élévation du calcium intracellulaire via en particulier la libération du calcium contenu dans les stocks intracellulaires sensibles à l'InsP₃.

1°) Les voies de production de l'InsP₃.

L'InsP₃ est produit lors de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate par la phospholipase C (PLC). Deux voies conduisent à l'activation de la PLC (figure 10). Dans un premier cas, la PLC est activée du fait de la liaison de neurotransmetteurs (glutamate, acétylcholine, dopamine, sérotonine) ou de neuropeptides (neuropeptide Y, substance P, ...) à leurs récepteurs spécifiques, ces derniers couplés à une protéine G. La liaison du ligand à son récepteur aboutit à l'activation d'une PLC de type β1. Dans un second cas, c'est l'activation d'un récepteur de type tyrosine-kinase (récepteur aux facteurs de croissance par exemple) qui conduit à l'activation d'une PLC de type γ. L'InsP₃ ainsi produit sera ensuite rapidement métabolisé par InsP₃-3 kinase ou l'InsP₃-5 phosphatase (Walker et coll., 1987).

2°) Le récepteur-canal, sensible à l'InsP₃.

A l'heure actuelle, on sait que, tout comme le récepteur-canal ryanodine, le récepteur-canal InsP₃ est un homotétramère. Pour l'instant, 3 gènes codant pour 3 types de monomères sont isolés (Furuichi et coll., 1994). C'est le gène codant pour le monomère de type 1 qui est le plus connu. Ce gène donne lieu à la synthèse de 6 isoformes par épissage alternatif (Feris & Sneyder, 1992; Furuichi et coll., 1992; Mikoshiba, 1993). Chaque monomère (Furuishi et coll., 1989; Mignery et coll., 1990) peut être divisé en trois parties (figure 11): (i) un domaine N-terminal cytoplasmique (83% de la molécule); (ii) un domaine de six segments transmembranaires; (iii) un domaine C-terminal, court et cytoplasmique, (5,3% de la molécule). Les 650 premiers acides aminés de la région N-terminale représente le domaine de liaison avec l'InsP₃. L'autre partie de la région N-terminale constitue le domaine de modulation (pour revue voir Furuichi & Mikoshiba, 1995). Ce domaine de modulation contient les sites de liaison des modulateurs comme

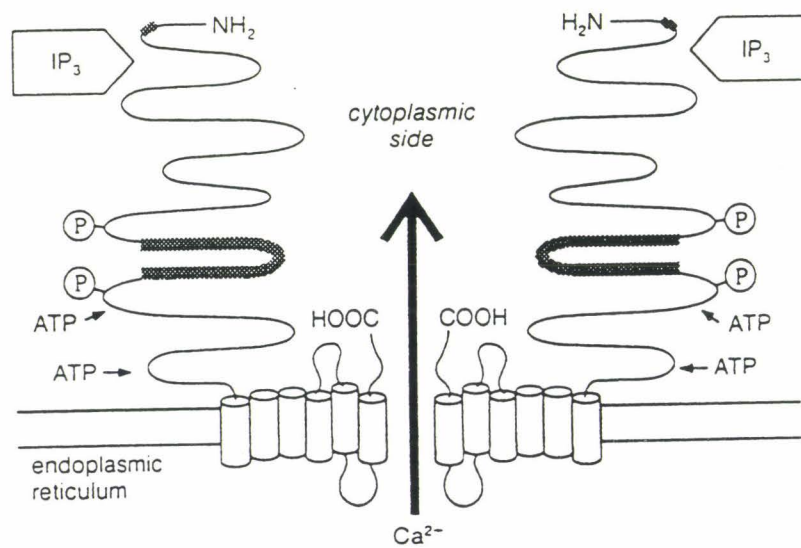


Figure 11: Modèle schématique du récepteur InsP_3 montrant sa structure transmembranaire (d'après Mikoshiba, 1993). Une seule moitié de la structure homotétramérique est représentée. Les sites d'épissage alternatif sont présentés en grisé. Les extrémités N et C-terminales sont situées du côté cytoplasmique. P représente les sites de phosphorylation; ATP, les sites de fixation de l'ATP.

celui des ions Ca^{2+} ou de l'ATP par exemple ainsi que les sites de phosphorylation. Il existe sur ce domaine deux sites de phosphorylation pour la PKA, un site de phosphorylation pour la PKG et deux sites potentiels de phosphorylation pour la CaMKII et la PKC. Ajoutons que le récepteur InsP_3 est aussi autophosphorylable. L'ensemble des agents modulant l'activité du récepteur-canal InsP_3 sont indiqués dans la figure 12.

3°) Modalité d'ouverture du récepteur-canal.

D'après la structure du récepteur-canal, il peut être déduit la présence de 4 sites potentiels de liaison de l' InsP_3 à son récepteur. Ce récepteur-canal répond à l'agoniste comme un canal conventionnel, c'est à dire en augmentant sa probabilité d'ouverture suite à une élévation du taux d' InsP_3 (Watras et coll., 1991). Le temps d'ouverture moyen est de 10 ms et il existerait 4 états de conductance, chacun de 20 pS (Watras et coll., 1991). De plus, Meyer et coll. (1990) proposent l'existence d'une coopérativité positive entre les sous-unités et la liaison séquentielle de l' InsP_3 aux 4 sites du récepteur tétramérique. Chaque fixation d'une molécule d' InsP_3 produirait une ouverture partielle du canal. Par contre, d'autres auteurs ne mettent pas en évidence cette coopérativité et suggèrent que la fixation d'une seule molécule d' InsP_3 serait suffisante pour permettre l'ouverture du canal (Finch et coll., 1991).

4°) Modalité d'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire induite par l' InsP_3

Des études réalisées, sur des populations de récepteurs sensibles à l' InsP_3 , à partir de vésicules ou de cellules entières, montrent une grande variabilité de la sensibilité au relargage de Ca^{2+} par les réservoirs sensibles à l' InsP_3 (Finch et coll., 1991; Muallen et al, 1989). L'analyse spatiale de la libération de Ca^{2+} par les stocks sensibles à l' InsP_3 , au niveau de l'ovocyte de Xénope, montre l'existence de "points chauds" confirmant ainsi la sensibilité différentielle des stocks InsP_3 (Parker & Yao, 1991). Ceci conduit à l'idée selon laquelle le Ca^{2+} peut être libéré par quantum. En effet, Yao et coll. (1995) proposent que l' InsP_3 provoquerait la libération d'une petite quantité de Ca^{2+} et que ce Ca^{2+} ainsi libéré sensibiliserait le relargage de Ca^{2+} en activant les récepteurs-canaux

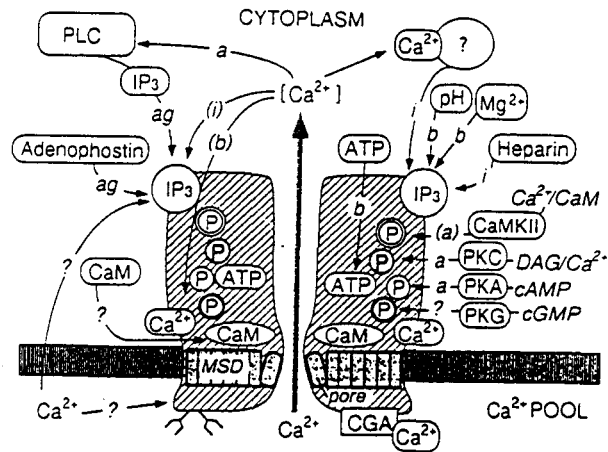


figure 12: Schéma représentant les agents régulant la libération de Ca^{2+} par le récepteur InsP_3 (d'après Furuichi & Mikoshiba, 1995).

Les sites fonctionnels présents sur le récepteur InsP_3 sont encerclés.

Les abréviations sont: - IP_3 pour les sites de liaison à l' InsP_3 ; - P pour les sites de phosphorylation des protéines kinases dépendantes: CaMKII , PKA , PKG , PKC ; - ATP pour le site de liaison de l'ATP; - CaM pour le site de liaison de la calmoduline; - Ca^{2+} pour le site de liaison du Ca^{2+} . Les flèches indiquent le site cible et l'action: ag, pour action agoniste, a, pour activation, i, pour inhibition, b, pour régulation de type biphasique, et ?, pour non caractérisé.

La liaison de l' InsP_3 à son récepteur est affectée par le pH, le Ca^{2+} , le Mg^{2+} et l'héparine (Worley et coll., 1987). L'augmentation du taux de Ca^{2+} cytosolique affecte la liaison de l' InsP_3 à son récepteur par la calmoduline (Danoff et coll., 1988, Mignery et coll., 1992; Delden et coll., 1993) et la probabilité d'ouverture du canal. Le Ca^{2+} intraluminal affecte aussi la liaison de l' InsP_3 à son récepteur ou active la libération de Ca^{2+} (Kindman & Meyer, 1993; Oldershaw & Taylor, 1993; Parys et coll., 1993). La chromogranine A (CGA) interagit avec la portion intraluminaire du récepteur à des pHs intravésiculaires acides (Yoo & Lewis, 1994).

voisins. Ce phénomène de sensibilisation est tout à fait possible quand est pris en compte la modulation par le calcium de la probabilité d'ouverture du récepteur-canal (Bezprozvanny et coll., 1991).

Cette sensibilité différentielle peut, en effet, être expliquée de deux manières:

(i) la première prend en compte l'idée que la sensibilité du récepteur-canal InsP_3 varie en fonction de la quantité de Ca^{2+} contenu dans les stocks (Missiaen et coll., 1991; Tregear et coll., 1991; Missiaen et coll., 1992; Missiaen et coll., 1992b; Missiaen et coll., 1994). Ainsi, plus la quantité de Ca^{2+} stockée est forte, plus la sensibilité du récepteur-canal est grande.

(ii) la seconde prend en compte la très forte diversité des monomères constituant le récepteur-canal. Comme nous l'avons décrit plus haut, le gène codant pour le récepteur de type 1 donne 6 isoformes des quatre unités monomériques constituant le canal. De plus, cette diversité moléculaire des monomères doit être encore plus grande si est pris en compte le phénomène d'épissage alternatif des gènes codant pour les monomères de type 2 et 3 (Pour revue voir Furuichi et Mikoshiba, 1995; Mikoshiba, 1993). En dernier lieu, les hétéromultimères constitués de plusieurs isoformes ne contribueraient-ils pas à augmenter cette diversité et par là ne traduiraient-ils pas des sensibilités différentes du récepteur pour son ligand?

5°) Le phénomène de CICR et le récepteur-canal InsP_3 .

La propriété de sensibilisation calcique régénérative concernant les récepteurs-canaux, sensibles à la ryanodine, se retrouve également pour les récepteurs-canaux sensibles à l' InsP_3 . En effet, il est maintenant bien établi que le relargage de calcium à partir des stocks intracellulaires sensibles à l' InsP_3 est modulable, de manière biphasique par le Ca^{2+} cytosolique (Iino, 1990; Parker & Ivorra, 1990; Finch et coll., 1991, Yao & Parker, 1992; Besprozvany et coll., 1991). En effet, en absence de Ca^{2+} , l' InsP_3 n'a qu'un effet modéré sur son récepteur-canal mais son activité augmente avec le taux de Ca^{2+} : à une concentration donnée (300 nM de Ca^{2+}), elle est maximale puis décroît pour des concentrations supérieures (figure 13).

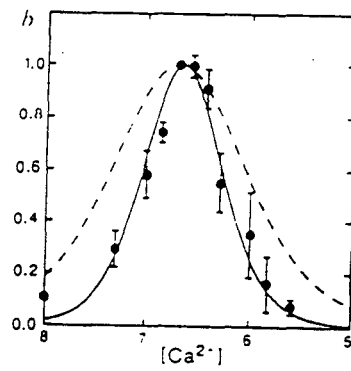


Figure 13: Régulation par le calcium de la libération de Ca^{2+} des stocks sensibles à l'InsP3 (d'après Bezprozvanny et coll., 1991) traduite par la relation liant le taux de libération de Ca^{2+} au taux de Ca^{2+} cytosolique.

Comme il est mentionné plus haut, lorsque l'InsP₃ est injecté dans l'ovocyte de Xénope, la libération de Ca²⁺ est localisée à des "points chauds", puis la réponse se propage en vagues circulaires ou en spirale (Parker et Yao, 1991; Leichleiter et coll., 1991; Leichleiter & Clapham, 1992). Cette réponse complexe semble en fait résulter en partie d'un effet de rétrocontrôle positif du Ca²⁺ sur sa propre libération (Yao et coll., 1995). Iino & Endo (1992) démontrent que ces effets positifs et négatifs du Ca²⁺ arrivent séquentiellement durant la phase d'élévation d'un pic de Ca²⁺. Au taux basal d'InsP₃, au cours d'une oscillation, le rétrocontrôle positif intensifie la libération initiale puis, du fait de l'augmentation du taux calcique, elle est aussitôt atténuée par le rétrocontrôle négatif (figure 13). Avec Rouxel et coll. (1992) il peut être proposé que le rétrocontrôle négatif serait dû au passage des récepteurs-canaux d'un état de faible affinité (RI) à un état inactif de forte affinité (RH). Une fois le taux de Ca²⁺ revenu à sa valeur initiale, le récepteur de l'état inactif (RH) repasse à l'état actif (RI) permettant ainsi le développement d'un autre pic calcique. Cette interconversion du récepteur-canal dépendante du Ca²⁺ pourrait donc en définitive rendre compte du mécanisme à l'origine du développement des pics répétitifs de Ca²⁺ (Iino & Endo, 1992; Rouxel et coll., 1992). Ce phénomène de modulation par le Ca²⁺ permettrait aussi la sensibilisation de la libération de Ca²⁺ à un taux basal d'InsP₃. En effet, il est déjà décrit que l'entrée de Ca²⁺, via des canaux calciques dépendant du potentiel, provoque une libération de Ca²⁺ des stocks sensibles à l'InsP₃ (Yao & Parker, 1992; Fournier et coll., 1994).

II- LES INFLUX CALCIQUES

A- L'INFLUX DE CALCIUM INDUIT PAR LA REPONSE METABOTROPIQUE

1°) L'influx causé par la déplétion des stocks sensibles à l'InsP₃

Il est à l'heure actuelle bien démontré que l'influx de calcium produit, lors de la réponse métabotrope, est causé par la déplétion en Ca^{2+} des stocks intracellulaires sensibles à l'InsP₃. En effet, cet influx de calcium se manifeste même en absence de production d'InsP₃ par la simple déplétion des stocks (la déplétion étant réalisée en bloquant les Ca-ATPases par la thapsigargine). Cet influx de Ca^{2+} s'effectue à travers des canaux calciques non voltage-dépendants. Ils sont regroupés sous le terme générique de SOC pour "Store operated channels". A l'heure actuelle, la nature exacte du message à l'origine de l'induction de cette entrée de Ca^{2+} et la structure moléculaire à l'origine de cet influx sont encore mal connues.

C'est Hoth & Penner en 1992 qui, pour la première fois, enregistrent un courant calcique appelé Icrac pour "Calcium Release Activated Channel", courant entrant de Ca^{2+} induit par la déplétion des stocks par l'EGTA. L'existence d'un tel courant est aussi mise en évidence au niveau de l'ovocyte de Xénope (Parekh et coll., 1993; Petersen & Berridge, 1994). Ces canaux, par où transite Icrac, ne sont pas dépendants du voltage, ne sont pas directement activés par l'AMPc, le GMPc, le GTP, l'InsP₃ ou l'InsP₄ ni par les protéines G (Hoth & Penner, 1992). Icrac est bloqué par les ions di- et trivalents avec l'ordre d'efficacité suivant: $\text{La}^{3+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Be}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Mn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Sr}^{2+}, \text{Ba}^{2+}$. Le courant Icrac n'est cependant pas le seul courant décrit qui permet une entrée de Ca^{2+} , produite par la déplétion des stocks intracellulaires comme l'a montré Clapham (1995). Récemment il est montré que l'influx de calcium, dépendant de la déplétion des stocks, pourrait aussi être activée grâce au relargage, à partir d'organelles intracellulaires, d'un nouveau messager diffusible, le CIF (pour Ca^{2+} Influx Factor) dans les cellules Jurkat (Randriamampita & Tsien, 1993). Le CIF, petite protéine de 0,5 KDa, est aussi capable d'engendrer l'influx de Ca^{2+} dans d'autres types cellulaires. De même, Parekh et coll. (1993), dans l'ovocyte de Xénope, mettent en évidence un canal calcique activé par l'intermédiaire d'une phosphatase libérée par la déplétion des stocks.

L'existence d'une interaction entre les stocks sensibles à l'InsP₃ et l'entrée de Ca^{2+} via le cytosquelette est aussi proposée. Il est connu qu'au moins une partie des stocks permettant la libération de Ca^{2+} , lors de l'activation cellulaire, sont situés près de la

membrane plasmique (Foskett et coll., 1989; Roos et coll., 1989). Des preuves d'une telle interaction entre les stocks et le cytosquelette sont apportées par les travaux de Guillemette et coll. (1988) et Rossier et coll. (1991). Ces auteurs montrent, grâce à l'emploi de marqueurs de la membrane plasmique, que dans des fractions subcellulaires, les sites de liaison de l'InsP₃ sont bien localisés dans cette membrane plasmique. De nombreux résultats suggèrent ainsi une association entre le récepteur InsP₃ et le cytosquelette. Il est aussi avancé que des changements conformationnels du récepteur InsP₃ conduiraient à des changements du cytosquelette qui, en retour, induiraient l'activation de canaux calciques.

2°) L'influx causé par des seconds messagers produits au cours de la réponse métabotrope

Comme cela est déjà indiqué ci-dessus, la seule déplétion des stocks intracellulaires est capable d'activer l'entrée de calcium. Néanmoins, il est aussi clairement démontré que des messagers issus de la réponse métabotrope peuvent aussi induire ou mieux faciliter l'entrée de Ca²⁺ (pour revue voir Putney & Bird 1993). Ce qui semble aussi clair c'est que les seconds messagers n'activent pas Icrac et que donc l'influx de Ca²⁺ s'effectue aussi à travers d'autres types de canaux.

En effet, Kuno & Gardner (1987) montrent que l'InsP₃, appliqué à la face interne de la membrane isolée par "patch clamp", augmente l'activité des canaux calciques. Cette observation suggère l'existence de canaux calciques sensibles à l'InsP₃. Ces types de récepteurs-canaux liés à la réponse métabotrope sont nommés SMOC pour Second Messenger Operated Channels. L'existence de ces récepteurs à l'InsP₃ est à l'heure actuelle plausible puisque étayée par de nombreux travaux (Restrepo et coll., 1990; Fadool & Ache, 1992; Khan et coll., 1992; Fujimoto et coll., 1992). En effet, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les récepteurs InsP₃ interagissent avec des protéines de la membrane plasmique. Il est donc raisonnable de penser que l'InsP₃, produit par l'activation de récepteurs métabotropiques, puisse par le biais de sa liaison

avec un récepteur InsP_3 situé à la face interne de la membrane, induire un courant entrant de Ca^{2+} .

L' InsP_4 , un dérivé phosphorylé de l' InsP_3 , semble également jouer, dans certains types cellulaires, un rôle régulateur de l'influx de Ca^{2+} (Irvine, 1990; Lückhoff & Clapham, 1992). C'est Irvine & Moor (1987, 1986) qui montrent, pour la première fois, le rôle biologique de l' InsP_4 . L' InsP_4 peut produire une augmentation du Ca^{2+} interne en potentialisant l'effet de l' InsP_3 . Par contre, dans les ovocytes, l' InsP_4 seul est capable de permettre la libération du calcium des réserves intracellulaires et aussi d'activer l'influx de Ca^{2+} (Parker & Miledi, 1987; DeLisle et coll., 1992). De plus, Lückhoff & Clapham (1992) montrent que l' InsP_4 active des canaux calciques de la membrane plasmique. A l'heure actuelle, l'ensemble des résultats obtenus (pour revue voir Putney & Bird, 1993) conduit au modèle proposé par Irvine (1990, 1992) selon lequel l' InsP_3 et l' InsP_4 interagiraient pour réguler l'entrée de Ca^{2+} . C'est ainsi qu'au vu des résultats obtenus sur les ovocytes de Xénope, il semble que l'influx dépendant de la seule déplétion du calcium des stocks et l'influx activé par les second messagers puissent se dérouler simultanément. D'autres messagers issus de l'activation du métabolisme des phosphoinositides sont proposés comme facteurs contribuant à l'activation de l'entrée de Ca^{2+} . De plus il est connu que, dans les acini des cellules pancréatiques, les agents provoquant la libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaires calciques, comme le carbachol augmente le taux de GMPc (Pandol & Schoefield-Payne, 1990; Heisler & Lambert, 1978). L'entrée de Ca^{2+} induite, en réponse à cet agoniste, est inhibée par un inhibiteur de la guanylate cyclase: le LY83583. L'inhibition peut être levée lors de l'application de dibutyryl GMPc et de 8 bromo GMPc (Pandol & Schoefield-Payne, 1990; Heisler & Lambert, 1978; Bahnson et coll., 1993). Des résultats semblables sont obtenus dans les macrophages (Randriampita et coll., 1991). De l'ensemble des résultats relatifs aux effets du GMPc , il ressort que ce GMPc pourrait aussi être considéré comme un modulateur de l'influx de Ca^{2+} .

3°) Les structures moléculaires impliquées dans l'influx calcique

A partir des données exposées ci-dessus, il semble donc raisonnable de penser que plusieurs types de canaux soient responsables de l'influx. Le premier type de canal responsable de cet influx de Ca^{2+} serait un récepteur-canal homologue des récepteurs InsP_3 mais situé dans la membrane plasmique, le site actif se trouvant à la face interne. Le ou les autres types de canaux ne sont pas encore identifiés. Il existe néanmoins un autre candidat potentiel, le produit du gène *trp* de la drosophile. Ce gène est cloné à partir de drosophiles mutées dont les photorécepteurs sont incapables d'être activés. Le phénotype *trp* peut, dans ce cas, être reproduit et coderait pour un canal calcique membranaire (Hardie & Minke, 1992). En effet, la structure protéique exprimée, laisserait passer le calcium puisque le lanthane bloque dans ce cas l'influx calcique. Comme les photorécepteurs utilisent comme système de transduction le système phospholipase C/ InsP_3 , il est donc permis de penser que le produit du gène *trp* pourrait être le canal calcique dont l'ouverture serait déclenchée par la déplétion des stocks sensibles à l' InsP_3 (Minke & Selinger, 1992). Des résultats, en faveur de cette interprétation, peuvent être avancés: (i) le produit du gène *trp* montre des homologies avec le canal calcique de type L (Phillips et coll., 1992); (ii) malgré les homologies entre le produit de ce gène et un canal calcique voltage-dépendant, le segment S4 connu pour être le "voltage sensor" des canaux dépendant du voltage est absent dans le produit de *trp* (Phillips et coll., 1992); (iii) la protéine issue du gène contient par contre des motifs ankirine pouvant servir à son ancrage dans le cytosquelette (rappelons en effet, que l'une des hypothèses d'activation de l'entrée de Ca^{2+} prend en compte l'existence d'une interaction d'une structure membranaire avec le cytosquelette).

4°) Rôle de l'influx

De nombreux résultats suggèrent que l'influx de Ca^{2+} agirait en modulant la libération de Ca^{2+} des stocks sensibles à l' InsP_3 . Par exemple, il est bien connu que la réduction de la concentration extracellulaire de Ca^{2+} réduit la fréquence des oscillations correspondant aux vagues calciques dans de nombreux types cellulaires (Jacob et coll., 1988; Kawanishi et coll., 1989; Hajjar & Bonventre, 1991). A l'inverse, il est aussi bien

montré que, dans l'ovocyte de Xénope, l'influx accélère la fréquence des vagues de Ca^{2+} (Girard & Clapham, 1993) et qu'il provoque la libération de Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires sensibles à l'InsP₃ (Yao & Parker, 1993). Le rôle modulateur de cet influx concerne tout d'abord le remplissage des stocks intracellulaires (Kawanishi et coll., 1989). Comme le Ca^{2+} cytosolique facilite ou inhibe l'ouverture des récepteurs-canaux InsP₃ (Iino, 90; Parker & Ivora, 1990; Finch et coll., 1991, Bezprozvanny et coll., 1991; Yao & Parker, 1992), il est actuellement proposé que l'influx de Ca^{2+} modulerait la réponse calcique induite par l'InsP₃ par sensibilisation du récepteur-canal InsP₃. Des preuves d'une telle interaction sont maintenant clairement établies; en effet, il est montré que l'influx de Ca^{2+} peut provoquer la libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaires sensibles à l'InsP₃ (Yao & Parker, 1994, Fournier et coll., 1994).

B- L'INFLUX DE CALCIUM INDUIT PAR L'ACTIVITE DE CANAUX CALCIQUES VOLTAGE-DEPENDANTS

1°) Les différents types de canaux calciques

Il existe à l'heure actuelle 5 types de canaux calciques différenciés par leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques. Ces 5 types peuvent être subdivisés en trois grands groupes:

-Le premier groupe est constitué de canaux calciques dont le seuil d'activation est très bas (-70 mV). Le représentant de cette famille est unique, il présente une cinétique d'activation très rapide, il s'agit du canal calcique de type T (pour transient), qui possède également une cinétique d'inactivation très rapide. A l'heure actuelle, aucun ligand très sélectif, susceptible de moduler son activité, n'est connu. Cependant la tétramétrine, l'amiloride, le chlordiazépodix inhibent son activité (Hagiwara et coll., 1988; Titgat et coll., 1990; Reuvery et coll., 1993).

-Le second groupe est constitué lui aussi d'un seul type de canal dont le seuil d'activation est de l'ordre de -60 mV: c'est le type P (P pour Purkinje). il est bloqué sélectivement par le venin d'une araignée (*Agelenopsis Aspera*) et

Type	Nomenclature	Activation	Inactivation	Conductance
T	<i>Transient</i>	bas seuil (environ - 70 mV)	rapide	8 pS
L	<i>Long-lasting</i>	haut seuil (environ - 20 mV)	lente	20-25 pS
N	<i>Neuronal</i>	haut seuil (environ - 30 mV)	intermédiaire	10-20 pS
P	Purkinje	intermédiaire (environ - 60 mV)	lente	10-12 pS
Q	Q après P	haut seuil (environ - 30 mV)	intermédiaire	-

Tableau 3: Propriétés biophysiques des canaux calciques (d'après Nargeot & Charnet, 1994).

Type	Dihydropyridine	ω -CgT-GVIA	ω -Aga-IVA	ω -CmT-MV1C	Ions divalents
T	+/-	-	-	-	Ni > Cd
L	++	+/-	-	-	Cd > Ni
N	-	++	-	+	Cd > Ni
P	-	-	++	+	?
Q	-	-	+/-	++	?

Ni : nickel ; Cd : cadmium.

Tableau 4: Pharmacologie des inhibiteurs des canaux calciques (d'après Nargeot & Charnet, 1994).

plus particulièrement par la polyamine FTX et une fraction peptidique (l'oméga-Ctg-GVIA).

-Le troisième groupe est constitué de canaux s'activant pour un haut seuil de potentiel (entre -20 et -30 mV). Le premier représentant de ce groupe est le canal de type L (pour long lasting), il est pharmacologiquement sensible aux dihydropyridines (antagonistes: nifédipine, nitrendipine et agoniste: le (-) BayK 8644. Le second représentant de ce groupe est le canal calcique de type N (N pour ni T ni L et/ou N pour neuronal), il est bloqué sélectivement par une toxine provenant d'un escargot marin (*conus geographus*): l'oméga-conotoxine GIVA. Le troisième type de canal calcique à haut seuil est le canal calcique de type Q (Q pour après P), il est apparenté au type P et présente une sensibilité à l' ω -aga-IVA mais est plus spécifiquement bloqué par une autre toxine extraite de *Conus magus*: l' ω -conotoxine MVIIC (ω -CmT-MVIIC).

L'ensemble des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques de ces différents types de canaux calciques sont résumées dans les tableaux 3 et 4.

2°) Structure des canaux calciques :

C'est grâce à l'affinité de la nitrendipine pour le canal calcique de type L de muscle squelettique (Fosset et coll., 1983) que ce canal a pu être purifié; il est composé de 5 sous-unités: $\alpha 1$, β , $\alpha 2$, δ , γ . La stoechiométrie est de 1: 1: 1: 1: 1. Ces sous-unités sont aussi retrouvées dans tous les types de canaux calciques à l'exception de la sous-unité γ qui est spécifique du canal calcique de type L du muscle squelettique:

- la sous unité $\alpha 1$ a une masse moléculaire située entre 212 et 252 kDa. Elle est capable, à elle seule, de former un canal calcique fonctionnel, elle forme le pore du canal;

- les sous unités $\alpha 2$ et δ reliées ensemble par un pont disulfure forment un complexe transmembranaire glycosylé. Le poids moléculaire de ces sous unités est respectivement de 140 et 25 kDa;

- la sous unité β est cytosolique. Son poids moléculaire est d'environ 60 kDa;

- La sous-unité γ , spécifique du canal calcique de type L squelettique, a un poids moléculaire de 30 kDa.

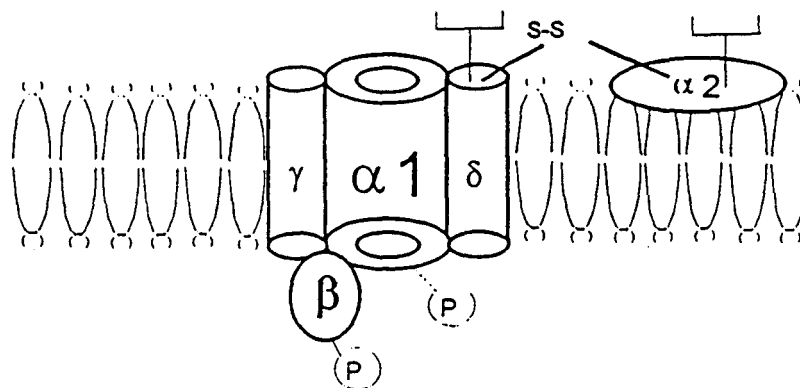


Figure 14: Structure schématique du canal calcique squelettique de type L. Le canal calcique est composé de quatre sous-unités dont trois ($\alpha 1$, $\alpha 2/\delta$, γ) sont transmembranaires, la sous unité β étant cytosolique. La sous-unité $\alpha 1$ forme le pore du canal.

Gène	Type	Taille	Activation Inactivation	Pharmacologie du canal exprimé	Distribution principale
Classe S	L	212 kDa	haut seuil lente	DHP +	muscle squelettique
classe A	P et/ ou Q	250 kDa	haut seuil modérée	ω -Aga-IVA +/- ω -CmT-MVIIC ++	cerveau, cœur, rein
classe B	N	260 kDa	haut seuil modérée	ω -CgT-GVIA++	cerveau
classe C	L	240 kDa	haut seuil lente	DHP ++	cerveau cœur, muscle lisse rein
classe D	L	245 kDa	haut seuil lente	DHP ++ ω -CgT-GVIA+/- pancréas	cerveau cœur
classe E	T?	252 kDa	bas seuil rapide	ω -Aga-IVA+/-	cerveau

Tableau 5: Caractérisation des différents gènes codant pour les canaux calciques (d'après Nargeot & Charnet, 1994).

Les sous-unités α et β sont phosphorylables *in vitro* par la PKA et la PKC, la caséine kinase et la calmoduline kinase.

La représentation de ces sous-unités dans la membrane plasmique est illustrée à la figure 14.

3°) Structure et rôle de la sous unité $\alpha 1$

A partir de sa purification biochimique son clonage a pu être réalisé. A partir de son ADN complémentaire, en 1987, la sous unité $\alpha 1$ clonée, est séquencé par Tanabe et coll., à partir du muscle squelettique de lapin. Par la suite, d'autres sous-unités sont clonées par homologie. A l'heure actuelle, 6 gènes codant pour des sous-unités $\alpha 1$ sont identifiés et certains donnent lieu à un processus d'épissage alternatif ce qui rend compte bien sûr de la diversité de ces sous-unités $\alpha 1$. Ces gènes sont nommés S, A, B, C, D et E (voir tableau 5) si l'on se réfère à la classification de Snutch qui est actuellement la plus utilisée. La fonctionnalité de ces sous-unités $\alpha 1$ du point de vue électrophysiologique et pharmacologique est toujours retrouvée grâce à leur expression dans des vecteurs de recombinaison tels que les myotubes de muscle de souris dysgéniques ou les ovocytes d'amphibiens.

Le gène de classe A correspond sur le plan fonctionnel au canal de type P; le gène de classe B correspond au canal de type N; les gènes de classe S, C et D correspondent au canal de type L; le gène de classe S correspond au canal de type L squelettique. Le gène de classe C possède trois isoformes obtenues par épissage alternatif (l'une identifiée dans le muscle cardiaque, l'autre dans le muscle lisse et la dernière dans le cerveau); le gène de classe D possède deux isoformes: l'une cardiaque, l'autre cérébrale; enfin le gène de classe E correspond vraisemblablement sur le plan fonctionnel au canal de type T.

Les caractéristiques des diverses sous-unités de canaux calciques sont résumées dans le tableau 5.

Du point de vue de la structure, la sous unité- $\alpha 1$ est formée de 4 domaines transmembranaires (I, II, III, et IV), eux-mêmes organisés en six hélices α transmembranaires (S1, S2, S3, S4, S5, S6). Entre les segments transmembranaires 5 et

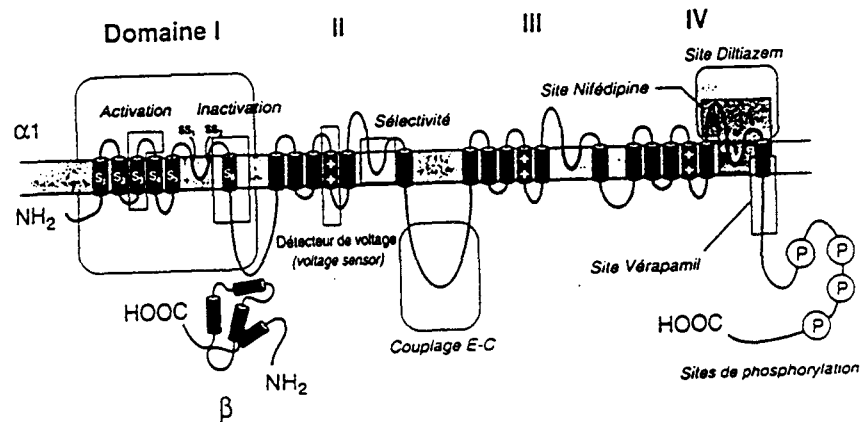


Figure 15: Cartographie fonctionnelle de la sous-unité $\alpha 1$ (d'après Nargeot & Charnet, 1994). L'obtention de mutations ponctuelles et de canaux-chimères réalisée, à partir des différentes sous-unités $\alpha 1$ clonées, permet de localiser certaines séquences importantes pour le fonctionnement normal du canal. Le détecteur de voltage ("voltage sensor", partie responsable de l'activation) est identifié dans le quatrième segment de chaque domaine (S4). De même les séquences responsables de l'activation et de l'inactivation des types L et P sont partiellement caractérisées. Des séquences nécessaires pour la fixation des dihydropyridines (nifédipine), des benzothiazépines (diltiazem) et des phénylalkylamines (vérapamil) sont maintenant localisées. Les domaines d'interaction avec la sous-unité β sont situés sur la boucle entre les domaines I et II. La structure responsable du couplage excitation-contraction (couplage E-C) de type squelettique (via le récepteur ryanodine) est situé sur $\alpha 1$ S au niveau de la boucle qui relie les domaines II et III.

6, la boucle peptidique est formée de deux feuillets intramembranaires (SS1 et SS2). Grâce aux techniques de mutagenèse dirigée et à l'expression de ces chimères ainsi formées dans des systèmes de recombinaison, la relation entre la structure et la fonction de ces sous-unités est maintenant bien connue. L'ensemble des données relatives au rapport structure-fonction sont résumées dans la figure 15.

4°) Structure de $\alpha 2/\delta$ et γ

$\alpha 2$ est beaucoup plus conservée que $\alpha 1$ et son messenger se retrouve dans tous les tissus étudiés (Biel et coll., 1991). A l'heure actuelle, un seul gène codant pour $\alpha 2$ est caractérisé, il est sujet à l'épissage alternatif permettant d'obtenir deux isoformes distinctes. Il est important de signaler qu'un seul messenger code pour $\alpha 2$ et δ . Les chaînes peptidiques de celles-ci sont séparées des autres sous-unités par clivage protéolytique et ces deux sous-unités, $\alpha 2$ et δ , restent unies par un pont disulfure. La fonction de la sous-unité $\alpha 2$ serait de stabiliser la sous-unité $\alpha 1$ dans la membrane en augmentant l'activité des canaux calciques (Mikami et coll., 1989; Varadi et coll., 1991). La sous-unité γ , décrite uniquement dans le muscle squelettique (Jay et coll., 1990), est maintenant clonée et caractérisée depuis 1993 (Powers et coll.); son rôle restant encore aujourd'hui inconnu.

5°) Structure et rôle de la sous-unité β

La sous-unité β est une protéine cytoplasmique, d'environ 60 kDa, hydrophile, associée à la sous-unité $\alpha 1$ par un motif conservé compris entre le domaine I et II de la sous-unité $\alpha 1$ et située 24 acides aminés après le début de IS6 (Pragnell et coll., 1994). A l'heure actuelle, 4 types de sous-unités β sont clonées: $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$ (tableau 6). Les gènes codant pour les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ donnent lieu respectivement à 3 et 2 isoformes obtenues par épissage alternatif. Il n'y a pas pour la sous-unité β de répartition tissulaire particulière. Il est possible néanmoins de constater des différences de répartition inter-espèce concernant l'expression de la sous-unité β au niveau cardiaque. Ainsi, la sous-unité $\beta 2$ s'exprime de façon importante au niveau cardiaque chez le lapin ou le rat alors

gène	isoforme	tissus	espèce	référence
$\beta 1$	a	m. squelettique.	lapin	Ruth et coll. (1989)
		coeur	homme	Collin et coll. (1993)
	b	cerveau	rat	Pragnell et coll. (1991)
		coeur	homme	Collin et coll. (1993)
	c	cerveau	homme	Williams et coll. (1992)
		coeur	homme	Collin et coll. (1993)
gène $\beta 1$	a, b, c		homme	Powers et coll. (1992)
$\beta 2$	A	cerveau	rat	Peres-Reyez et coll. (1992)
	a, b	coeur, m. lisse	lapin	Hullin et coll. (1992)
$\beta 3$		cerveau, m. lisse	lapin	Hullin et coll. (1992)
		cerveau	rat	Castellano et coll. (1993a)
		cerveau, ovaire,		
		m. lisse	homme	Collin et coll. (1994)
$\beta 4$		cervelet	rat	Castellano et coll. (1993b)
MysB	A	foetus humain		Rosenfeld et coll. (1993)
	B	foetus humain		Rosenfeld et coll. (1993)
	C	foetus humain		Rosenfeld et coll. (1993)

Tableau 6: Distribution tissulaire des messagers de toutes les isoformes de la sous-unité β clonée.

qu'au niveau du coeur humain seul le gène de $\beta 1$ (isoformes a, b et c) s'exprime. De plus la sous-unité $\beta 3$ (clonée à partir de tissus embryonnaires humains) s'exprime au niveau du cerveau et du muscle lisse mais est totalement absente du coeur (Collin et coll., 1994). Actuellement les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 4$ ne sont pas encore décrites chez l'homme. En revanche, un ADNc codant pour une sous-unité β (Mys b) proche sur le plan structural de la sous-unité $\beta 2$, est isolée par Rosenfeld et coll. (1993) en criblant une banque de cerveau foetal humain avec des sérums de patients atteint du syndrome de Lambert-Eaton; à priori cette protéine ne correspond à aucun produit des gènes $\beta 1, \beta 2, \beta 3$ et $\beta 4$ précédemment décrits.

Les sous-unités β jouent un rôle particulièrement important dans la modulation de l'activité de la sous-unité $\alpha 1$ du canal calcique. Elles peuvent, dans ce sens, être considérées comme de véritables modulateurs endogènes. En effet, l'expression, dans des systèmes de recombinaison de $\alpha 1$ seule n'aboutit pas toujours à l'activité normale du canal calcique telle qu'elle existe in situ. Par contre, l'adjonction de la sous-unité β aboutit à une normalisation de cette activité (Lacerda et coll., 1991; Stea et coll., 1993). Ainsi la fonction des sous-unités β est mise en évidence grâce aux systèmes de recombinaison. Plusieurs types de sous-unités du canal calcique peuvent être exprimées et leur activité comparée à celle de la seule sous-unité $\alpha 1$ en analysant leurs propriétés électrophysiologiques. Lacerda et coll. en 1991, pour la première fois, montrent que la sous-unité β (de type 1) est un modulateur biophysique des canaux calciques formés par la sous-unité $\alpha 1$ de type L de lapin et que $\beta 1$ peut stabiliser le canal dans un état lui permettant de lier les DHPs. Par la suite, afin d'examiner le rôle des sous-unités $\beta 2, \beta 3$ et $\beta 4$, les auteurs utilisent l'ovocyte de Xénope comme modèle de recombinaison. Dans ces conditions, l'expression fonctionnelle de la sous-unité $\alpha 1$ de type L cardiaque seule aboutit à l'observation d'un courant sensible aux dihydropyridines (150 nA en milieu Ba^{2+} , 40 mM; Wei et coll., 1991) et son expression avec celle de la sous-unité β conduit à d'amples changements au niveau de l'activité du canal, comme l'illustre la figure 16. Les effets sont les suivants:

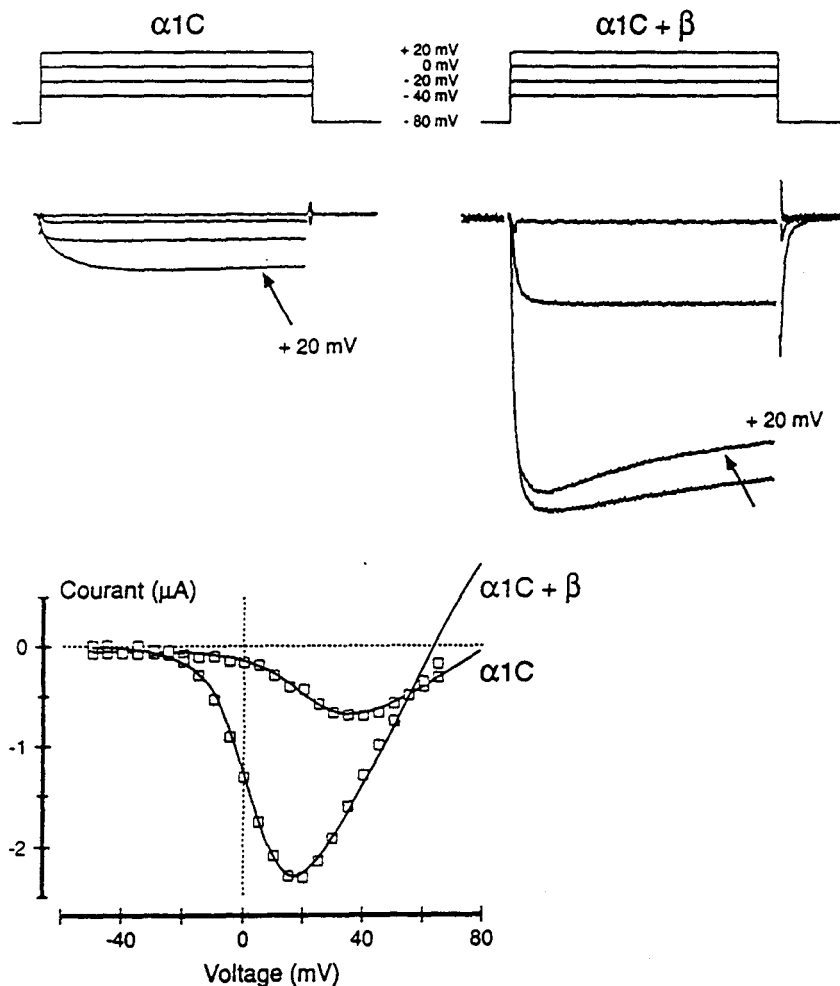


Figure 16: Modulation des propriétés électrophysiologiques de la sous-unité $\alpha 1C$ par la sous-unité β (d'après Nargeot & Charnet, 1994). Courants calciques enregistrés après injection dans des ovocytes de Xénope des ADNc codant pour la sous-unité $\alpha 1$ (classe C) ou $\alpha 1C + \beta$. La coinjection de la sous-unité β augmente l'amplitude du courant, accélère la cinétique d'activation et déplace le pic de la courbe courant-potentiel d'environ 20 mV dans le sens des hyperpolarisations. Les courants présentés sont enregistrés pour des dépolarisations de -40, -20, 0 et 20 mV à partir d'un potentiel de membrane de -80 mV.

(i) **Les sous-unités β induisent une augmentation de l'amplitude du courant** (Castellano et coll., 1993a et b). Cet effet s'effectue non pas en modifiant le nombre de sous-unité $\alpha 1$ exprimées, ni en augmentant l'expression fonctionnelle de la sous unité $\alpha 1$. En effet, Neely et coll. (1993) montrent que si β augmente l'amplitude du courant calcique, les courants de porte, par contre, enregistrés lors de l'expression de $\alpha 1$ avec β ou $\alpha 1$ seule sont identiques. Finalement, β n'altère pas le nombre de sous-unités $\alpha 1$ exprimées, ni les mouvements de charges mais faciliterait le couplage entre les mouvements de charges du "voltage sensor" et l'ouverture du pore. En effet, pour de fortes dépolarisations, la conductance est 5 fois plus grande quand β est coexprimée avec $\alpha 1$. Les résultats de Neely et coll. (1993) montrent une augmentation du nombre de sites liant les dihydropyridines quand $\alpha 1$ est coexprimée avec β (Lacerda et coll., 1991; Nishimura et coll., 1993; Mitterdorfer et coll., 1994), cette augmentation serait en relation avec un changement de conformation de $\alpha 1$, rendant plus accessible le site aux dihydropyridines.

(ii) **Les sous-unités β déplacent le seuil d'activation des canaux calciques vers les potentiels négatifs** (Wei et coll., 1991). En général, la présence des sous-unités β permet le déplacement du seuil d'activation du canal calcique d'environ 10 mV. Ce résultat implique que les sous-unités β peuvent moduler les propriétés biophysiques de la sous unité $\alpha 1$ en augmentant d'une part le taux de sous-unités $\alpha 1$ fonctionnelles mais aussi en modulant d'autre part la caractéristique principale des canaux calciques, c'est à dire, leur dépendance vis à vis du potentiel.

(iii) **Les sous-unités β modifient les cinétiques d'activation et d'inactivation des canaux calciques.** En effet, lorsque $\alpha 1$ du muscle squelettique est exprimée seule, la cinétique d'activation est décrite par deux exponentielles, l'une rapide (3-6 ms) l'autre plus lente (50- 80 ms). Les sous-unités β accélèrent cette cinétique d'activation en réduisant les constantes de temps d'activation (Perez-Reyes et coll., 1992; Castellano et coll., 1993 a et b). Egalement, les sous-unités β modifient aussi la cinétique d'inactivation. En effet, le courant de baryum observé lorsque seule est exprimée la sous-unité $\alpha 1$ présente un processus d'inactivation lent alors qu'en présence de la sous-unité

β , la cinétique d'inactivation est plus rapide. De plus, l'effet des sous-unités β sur la cinétique d'inactivation varie selon les sous-unités exprimées. Par exemple, lorsque $\alpha 1$ seule est exprimée, le taux d'inactivation est de 40%, ce taux d'inactivation passe respectivement à 60% ou 75 % si par contre $\beta 3$ ou $\beta 4$ sont coexprimées avec cette sous-unité $\alpha 1$ (Castellano et coll., 1993 a et b). Il faut aussi mentionner que $\beta 1a$ ou $\beta 2$ affecte beaucoup moins la cinétique d'inactivation.

L'ensemble de ces données indiquent que la sous-unité β peut fortement participer à l'apparente diversité fonctionnelle des canaux calciques. Récemment, il est montré que c'est la région N-terminale de la sous-unité β qui confère à cette dernière sa spécificité dans l'inactivation (Olcese et coll., 1994).

Enfin il faut aussi faire remarquer que les canaux calciques endogènes de l'ovocyte de Xénope sont aussi modulés par les sous-unités $\beta 1$, leur voltage-dépendance n'étant cependant pas modifiée (Williams et coll., 1992; Singer et coll., 1991; Matifat et coll., 1995).

6°) Conclusion

La diversité des types de sous-unités $\alpha 1$ dont l'activité est modulée par les sous unités β , montre que l'augmentation de l'activité du Ca^{2+} intracellulaire via une dépolarisation membranaire peut finalement conduire à des cinétiques particulières de l'influx calcique suivant la composition en sous-unités des canaux calciques. De plus, cette complexité dans la réponse calcique augmente encore si sont prises en compte les possibles régulations par phosphorylation des sous-unités $\alpha 1$ et β . Enfin, l'évolution du taux de Ca^{2+} intracellulaire est encore rendue plus complexe si l'on prend en compte le fait que cette entrée de Ca^{2+} à travers les canaux calciques peut aussi moduler l'activité d'autres systèmes de libération de Ca^{2+} à partir des réservoirs intracellulaires de calcium, réservoirs sensibles ou non à l'InsP₃ (Yao & Parker, 1992; Fournier et coll., 1994; voir en annexe l'article de Matifat et coll., 1995)

Deuxième Chapitre: Matériel et méthodes

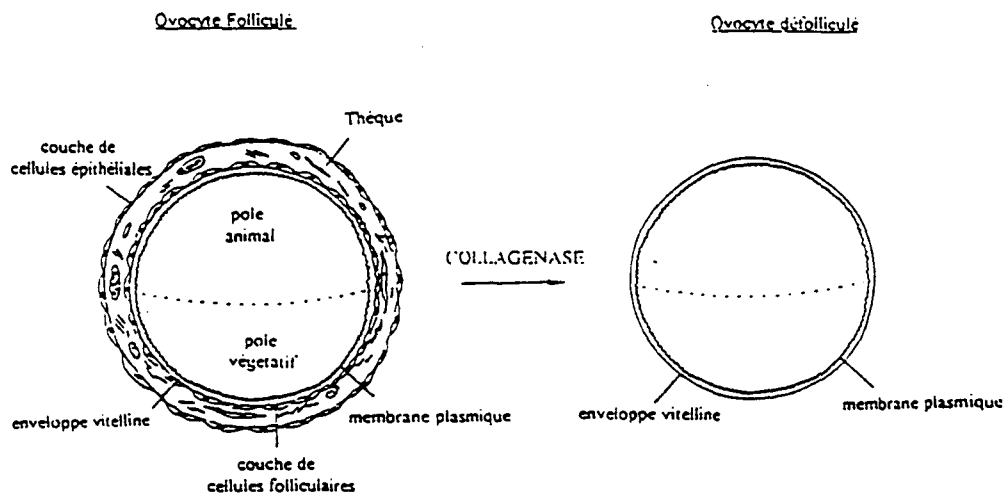


figure 17: Représentation schématique de l'ovocyte avec les couches cellulaires qui l'entourent *in vivo* (à gauche) et après le traitement par la collagénase (à droite). D'après Snutch, 1988.

MATERIEL ET METHODES

I- PREPARATION DES OVOCYTES

Les femelles adultes de *Rana esculenta* en provenance du centre d'élevage ARTHURS Frères (Notre Dame de Mont, France) sont maintenues à 4°C dans une eau régulièrement renouvelée. Les lobes ovariens, prélevés sur les femelles décérébrées et démyélinisées, sont immergés dans le milieu physiologique de référence (ND96) proposé par Nathan Dascal (Dascal, 1987). Sa composition (en mM) est: NaCl: 96, CaCl₂: 1,8; KCl : 2; Mg Cl₂: 2 ; Hepes: 5; pH 7,45 ajusté avec NaOH.

Les ovocytes sont ensuite individualisés manuellement à l'aide de pinces fines et seuls les ovocytes de plus fort diamètre sont sélectionnés (supérieur à 1,2 mm). Les ovocytes sont recouverts d'une membrane vitelline accolée à la membrane plasmique et d'une couche de cellules folliculaires (Figure 17). A ce stade, les ovocytes folliculaires sont soit utilisés tels quels, soit dégagés de leur couche de cellules folliculaires. Cette couche de cellules folliculaires est enlevée soit manuellement sous contrôle binoculaire soit par un traitement à la collagénase (1,5 mg par ml) sous faible agitation pendant 2 heures à température ambiante dans le milieu physiologique de référence dépourvu de calcium. Après le traitement à la collagénase, les ovocytes sont abondamment rincés dans le milieu physiologique (ND96). Ils seront ensuite triés et conservés dans le milieu ND 96 additionné de streptomycine (100mg/ml) à une température de 19°C. Le milieu de conservation (ND96 additionné de streptomycine 100 mg/ml ou de gentamycine 50µg/ml) est renouvelé chaque jour.

II- MICROINJECTION DES OVOCYTES

Les ovocytes peuvent, suivant les protocoles expérimentaux, subir des injections intracytoplasmiques. Dans ce cas, les injections s'effectuent à l'aide d'une microseringue (Nichiryo modèle 800 montée sur un micromanipulateur) dont l'embout est constitué d'une micropipette confectionnée à partir d'un fin capillaire. Ce capillaire, préalablement

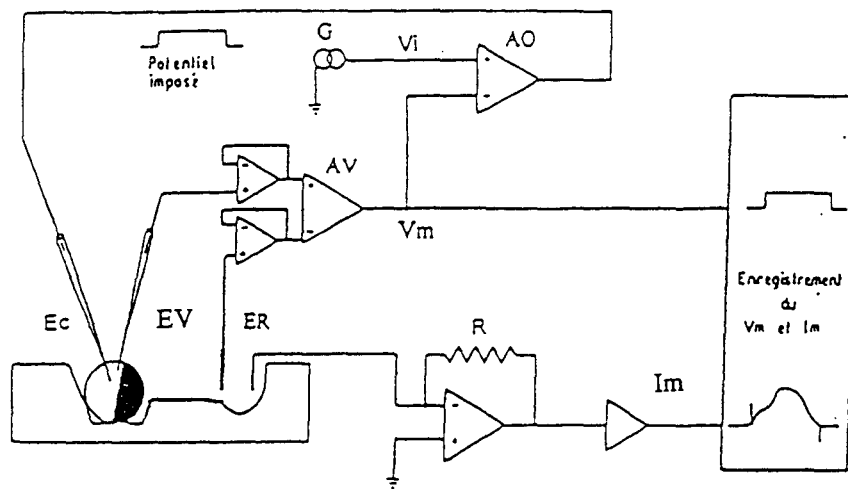


Figure 18: Schéma synoptique du montage électrophysiologique utilisé

AO: amplificateur opérationnel

AV: amplificateur de fonction

EC: électrode de courant

EV: électrode de potentiel

ER: électrode de référence

V_i : potentiel imposé

V_m : potentiel de membrane

I_m : courant membranaire global

étiré, est coupé à la pointe à l'aide de fins ciseaux, sous contrôle binoculaire pour obtenir un diamètre n'excédant pas 15 μM . La micropipette remplie d'huile de paraffine est adaptée au piston de la micropipette. Pour l'aspiration de la solution à injecter, 1 à 2 μl sont déposés sur le couvercle d'une boîte de pétri, la pointe de la pipette est ensuite plongée dans la goutte et l'aspiration de cette dernière est ensuite effectuée. L'injection, peut être réalisée avant tout enregistrement des signaux électriques (c'est le cas de l'injection de vecteurs d'expression) ou durant l'expérimentation. Dans ce dernier cas, l'ovocyte sera d'abord empalé par le capillaire d'injection avant toute implantation des microélectrodes d'enregistrement. Durant l'enregistrement des courants ioniques, l'injection dans l'ovocyte de composés pharmacologiques se fait dans un tampon HEPES (5 mM)/ KOH pH 7,35.

III- MESURES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

L'enregistrement du courant membranaire qui permet par la suite l'analyse du fonctionnement des canaux ioniques, s'effectue à l'aide de la technique classique des deux microélectrodes en configuration de voltage imposé. 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, grâce à son passage à travers la membrane plasmique, correspond au courant transmembranaire. Le schéma électrique du montage utilisé est présenté dans la figure 18.

Le potentiel de membrane est mesuré à l'aide de deux microelectrodes: 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 mesurée grâce à l'amplificateur (AV) dont le gain en tension est 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 opérationnel (AO) monté en contre-réaction totale. Le courant débité par cet amplificateur, correspondant au courant de membrane global, est mesuré par l'intermédiaire de la chute de tension qu'il provoque aux bornes d'une résistance de valeur connue, placée entre le milieu extracellulaire et le potentiel de terre. Pour obtenir un bon asservissement, l'amplificateur (AO) monté en contre-réaction permet de délivrer une tension de sortie de ± 130 V. Il s'agit d'un appareil commercialisé par la société DAGAN INSTRUMENT (type 8500) et spécialement conçu pour la mesure de courants s'écoulant à travers la membrane d'ovocytes d'amphibiens pouvant atteindre une amplitude allant jusqu'à 0,1 mA, courant 10 fois plus faible que le courant maximal que peut délivrer l'amplificateur (1 mA). Ainsi, dans les conditions habituelles d'utilisation, le potentiel de membrane, lu par l'intermédiaire de 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, étant assez élevée (± 130 V), évite la saturation de l'amplitude du courant capacitif et permet donc de ce fait une imposition rapide de créneaux de potentiel. La microélectrode de mesure du potentiel, remplie de KCl 3M, présente une résistance de 0,5 mégohm en moyenne, celle d'injection de courant, également remplie de KCl 3M, présente une résistance de l'ordre de 0,1 mégohm pour permettre l'injection d'une quantité importante de courant.

La stimulation des ovocytes, l'acquisition des données s'effectuent par informatique grâce au logiciel PCLAMP (version 5.5) via une interface analogique numérique (Axon Clamp). De plus le courant est enregistré simultanément en continu par l'intermédiaire d'une interface et d'un logiciel BIO 1000 (Nortek, Villeneuve d'Ascq) couplé à un second ordinateur.

Les ovocytes sont testés dans une cuve expérimentale de forme conique et d'une capacité de 250 μ l. Leur périfusion s'effectue grâce à une pompe péristaltique (GILSON) assurant un débit de 3 ml/min. L'évacuation du périfusat s'effectue par aspiration directe dans la cuve à l'aide d'une trompe à vide.

Chaque type de courant ionique, reflétant l'activité d'une seule classe de canaux, est étudiée de manière spécifique en jouant sur la sélectivité ionique de ces canaux. Ceci est

	activité (mM)	concentration (mM)
Chlorure	44,1	58,0
potassium	82,8	109,0
sodium	3,4	4,4

Tableau 7:

Activité et concentration des ions chlorure, potassium et sodium dans le milieu intracellulaire de l'ovocyte de *Rana temporaria*, (d'après Keicher & Meech, 1994).

réalisé par le biais d'une modification de la composition en ions du milieu externe périfusant l'ovocyte au cours de l'enregistrement des courants membranaires.

Comme les concentrations des ions dans le milieu intracellulaire de l'ovocyte de *Rana esculenta* ne sont pas connues, celles utilisées pour le calcul de la valeur des piles d'équilibre concernant les ions Cl^- , K^+ et Na^+ sont celles déterminées dans les ovocytes d'une espèce proche (*Rana temporaria*) en 1994 par Keicher & Meech (tableau 7). En tenant compte des concentrations extracellulaires pour ces mêmes ions dans le milieu normal (ND 96), les valeurs de ces piles à 20 °C seraient: -15,2 mV pour E_{Cl^-} , -100,7 mV pour E_{K^+} et 77,6 mV pour E_{Na^+} .

La variabilité des résultats est exprimée par la déviation standard par rapport à la moyenne, avec n, indiquant le nombre d'ovocytes contribuant à cette moyenne.

Pour tous les tracés de courant et les courbes courant-potentiel présentés, le courant de fuite est automatiquement soustrait.

Troisième Chapitre: Resultats Dicussion

Première partie

**Caractéristiques des conductances ioniques endogènes
activées par les dépolarisations dans l'ovocyte de *Rana
esculenta***

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

CARACTERISTIQUES DES CONDUCTANCES IONIQUES ENDOGENES ACTIVEES PAR DES DEPOLARISATIONS DANS L'OVOCYTE IMMATURE DE *Rana esculenta*

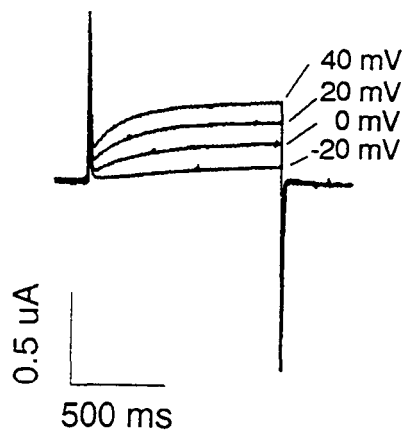
Dans les conditions ioniques de référence (ovocytes placées dans le milieu physiologique de référence ND96), lorsque les ovocytes sont dépolarisés durant environ 1 sec (975 ms) à différents niveaux de potentiel à partir d'un potentiel de départ (Holding potential, HP) de -60 mV, un courant global sortant dépendant du potentiel et du temps apparaît. Après les dépolarisations, quand le potentiel retourne instantanément (en pratique le plus rapidement possible) à la valeur de -60 mV, un courant de queue (courant de désactivation) se manifeste. Suivant les lots d'ovocytes, en fonction du taux d'expression des canaux ioniques présents dans la membrane ovocytaire, le décours du courant sortant et son seuil de potentiel d'activation permettent de classer les réponses obtenues en trois classes.

I- DESCRIPTION ET CLASSIFICATION DES REPONSES

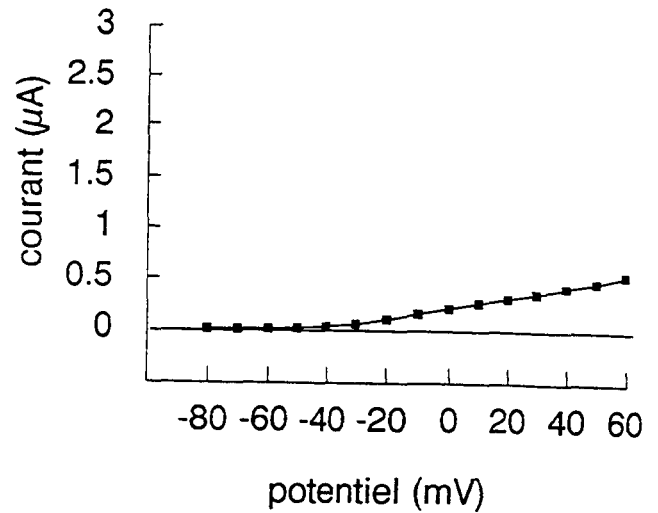
A- première classe de réponse

La réponse de cette classe correspond, comme cela va être confirmé ci-dessous, à la seule activation de canaux s'activant pour un seuil relativement bas de potentiel. 3 % de l'ensemble des lots d'ovocytes testés ne répondent que par un courant activé à bas seuil. Rappelons que c'est en 1984 que Taglietti et coll., dans des conditions de potentiel imposé, sur l'ovocyte folliculaire de grenouille (*Rana esculenta*), démontrent l'existence d'un courant sortant retardé dépendant du potentiel et du temps, activé à un seuil de

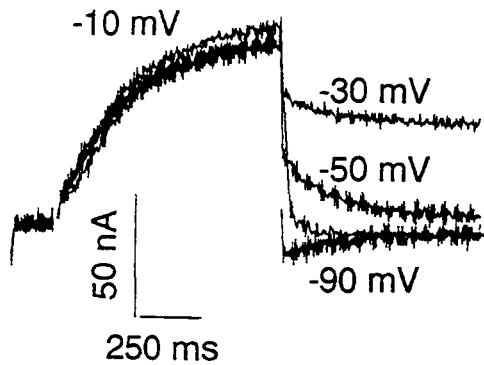
A



B



C



D

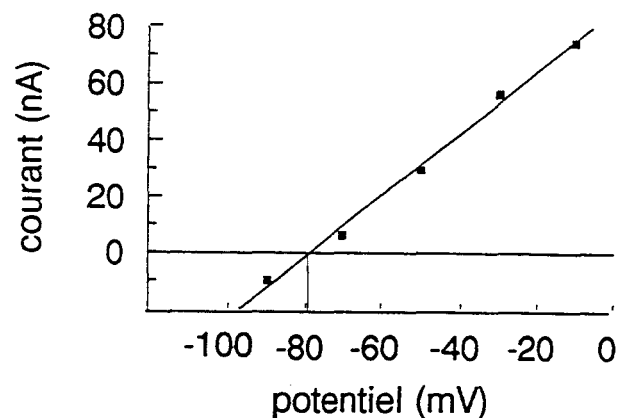


Figure 19: Mise en évidence d'un courant "bas seuil" et détermination de son potentiel d'inversion.

A- Famille de tracés de courant enregistrés suite à des dépolarisations successives, d'une durée de 975 ms, amenant le potentiel de membrane de -60 mV à -20, 0, 20 ou 40 mV toutes les 30 sec. B- Relation courant-potentiel (l'amplitude du courant est mesuré en fin d'impulsion). C- Détermination du potentiel d'inversion (le courant sortant activé par une dépolarisation amenant le potentiel de membrane de -60 mV à -10 mV est en fin d'impulsion ramené successivement à -90, -70, -50 ou -30 mV. D- Relation liant le courant instantané au potentiel de retour (à chaque potentiel de retour, le courant instantané (au temps 0) est obtenu par extrapolation suite à la détermination de la constante de temps du courant de désactivation et de la mesure de son amplitude 50 ms après le début de la repolarisation grâce à l'emploi du programme PClamp (Axon Instruments)).

Les enregistrements sont réalisés en milieu normal, ND96.

potentiel de -40 mV, bloqué par les ions TEA⁺. Le potentiel d'inversion de ce courant (E_{rev}), dépendant très étroitement de la concentration externe en ions K⁺, est très proche sinon égal à la valeur de la pile d'équilibre aux ions K⁺ (E_{rev}= -82±5 mV). L'année suivante, en 1985, Peres et coll. confirment les résultats de Taglietti et coll. (1984) et montrent que ce courant s'écoule bien à travers des canaux potassiques.

Dans nos conditions expérimentales, à partir d'un HP de -60 mV, la dépolarisation membranaire, amenant le potentiel de membrane de l'ovocyte à -20, 0, 20 et 40 mV pendant 975 ms entraîne, comme l'illustre la partie A de la figure 19, le développement d'un courant dynamique de sens sortant, ne s'inactivant pas, et dont l'amplitude et la vitesse d'activation augmentent avec le potentiel. Après les dépolarisations, lorsque le potentiel de membrane retourne à sa valeur de départ (-60 mV), un courant sortant de désactivation apparaît dont l'amplitude instantanée est fonction du taux d'activation de la conductance responsable du courant sortant. En effet, les courants de désactivation correspondant aux différents niveaux du potentiel d'activation diminuent d'amplitude exponentiellement en fonction du temps avec une constante de temps de 143± 12 ms (n=5); ceci montre que, vraisemblablement, une seule conductance est activée lors des dépolarisations.

La courbe courant-potentiel (partie B de la figure 19) révèle, en accord avec les données de Taglietti et coll. (1984) et Peres et coll. (1985), que la conductance activée responsable du courant sortant, s'active pour un potentiel seuil de l'ordre de -40 mV. La détermination de E_{rev} en vue de connaître la nature ionique du courant sortant est réalisée à l'aide de la méthode classique qui consiste à déterminer après une ample activation du courant sortant pour quelle valeur du potentiel de retour le courant de désactivation s'annule, ce potentiel correspondant en théorie au potentiel de la pile d'équilibre aux ions portant le courant. Les tracés du courant de désactivation, montrés dans la partie C de la figure 19, permettent de situer la valeur de ce potentiel entre -90 et -70 mV (de l'ordre de -80 mV). De plus, la relation liant la valeur instantanée, extrapolée, du courant de désactivation en fonction de la valeur du potentiel correspondant, illustrée dans la partie D de la figure 19, est linéaire, montrant que le courant "ne rectifie pas instantanément".

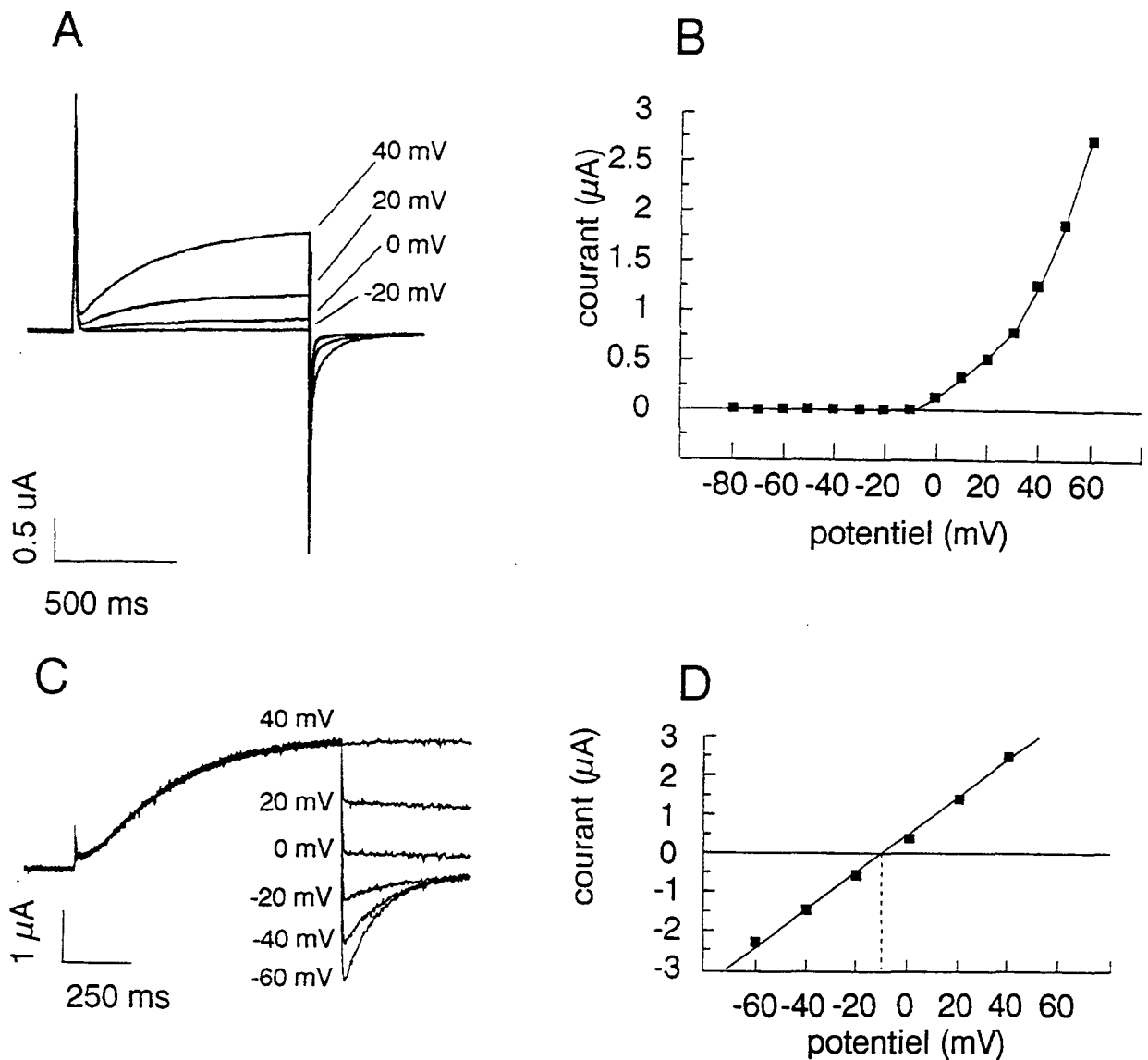


Figure 20: A- Mise en évidence d'un courant "haut seuil" et détermination de son potentiel d'inversion.

A- Famille de tracés de courant enregistrés suite à des dépolarisations successives, d'une durée de 975 ms, amenant le potentiel de membrane de -60 mV à -20, 0, 20 et 40 mV toutes les 30 sec. B- Relation courant-potentiel (l'amplitude du courant est mesuré en fin d'impulsion) C- Détermination du potentiel d'inversion (le courant sortant, activé par une dépolarisation amenant le potentiel de membrane de -60 mV à 40 mV est en fin d'impulsion ramené successivement à -60, -40, -20, 0, 20 ou 40 mV. D- Relation liant le courant instantané au potentiel de retour, le courant instantané au temps 0 étant déterminé comme précédemment (voir légende de la figure 19).

Les enregistrements sont réalisés en milieu normal, ND96.

Cette relation linéaire permet de donner pour Erev la valeur de -78 mV; en moyenne -83±5 mV (n=8). Cette valeur moyenne très proche de celle donnée par Peres et coll. (-84±9 mV) en 1985 et par Taglietti et coll. (-82±5 mV) en 1984, correspond donc bien à la valeur de la pile d'équilibre aux ions K⁺.

Ainsi en accord avec ces derniers auteurs, les caractéristiques de la réponse des ovocytes de cette classe confirment que des canaux potassiques voltage-dépendants s'expriment dans la membrane des ovocytes immatures de *Rana esculenta* et qu'ils sont activés pour un seuil de potentiel relativement bas. A partir de maintenant, ces canaux seront dénommés LVAC pour "Low Voltage activated Channels".

B- Deuxième classe de réponse.

Pour cette classe, la réponse correspond à l'activation de canaux s'activant par contre pour un haut seuil de potentiel. 10% de l'ensemble des lots d'ovocytes testés manifestent ce type de réponse, réponse dont les tracés de courant sont présentés dans la partie A de la figure 20. Le seuil de potentiel d'activation du courant sortant est de l'ordre de 0 mV, et le courant de désactivation au potentiel de -60 mV est de sens entrant. Ce courant sortant ne s'inactive pas, son amplitude et sa vitesse d'activation augmentent avec le potentiel. De même, après d'amples dépolarisations d'une durée de 975 ms, lorsque le potentiel retourne à -60 mV, le courant entrant de désactivation présente une amplitude instantanée étroitement liée au taux d'activation de la conductance à l'origine du courant sortant. Le fait que tous les courants de queue se désactivent selon une seule exponentielle dont la constante de temps est en moyenne de 73±5,3 ms (n=5), conduit à l'idée que vraisemblablement une seule conductance est activée lors des dépolarisations.

La relation courant-potentiel (illustrée dans la partie B de la figure 20) confirme bien que la conductance responsable du courant dynamique sortant, s'active pour un potentiel seuil de l'ordre de 0 mV. De plus, les tracés du courant de désactivation (partie C de la figure 20) montrent que Erev du courant, très largement activé par une ample dépolarisation de 975 ms de durée (amenant le potentiel membranaire à 40 mV à partir de -60 mV), se situe entre -10mV et 0 mV. La valeur de Erev, déterminée à partir de la relation linéaire

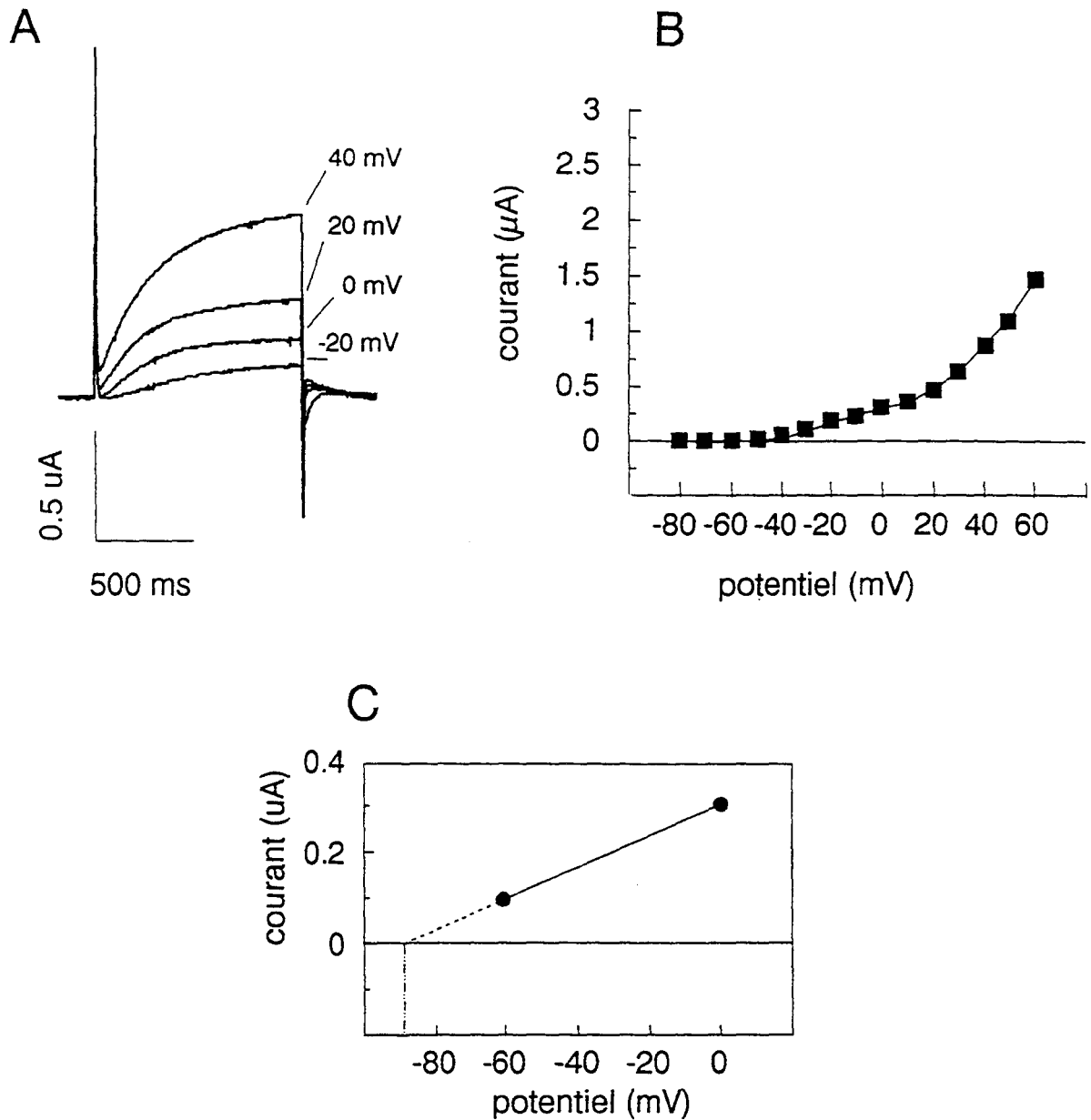


Figure 21: Mise en évidence de courants "bas seuil " et "haut seuil "

A- Famille de tracés de courant enregistrés suite à des dépolarisations successives, d'une durée de 975 ms, amenant le potentiel de membrane de -60 mV à -20, 0, 20 et 40 mV toutes les 30 sec. B- Relation courant-potentiel (l'amplitude du courant est mesuré en fin d'impulsion) C-Détermination du potentiel d'inversion du courant "bas seuil" activé par une dépolarisation amenant le potentiel de membrane de -60 mV à 0 mV (la relation liant le courant instantané au potentiel est obtenue comme précédemment).

Les enregistrements sont réalisés en milieu normal, ND96.

traduisant l'amplitude du courant instantané en fonction du potentiel (partie D de la figure 20) est de $-7,2\text{mV}$, elle est en moyenne de $-5 \pm 4,3 \text{ mV}$ ($n=8$). Cette valeur moyenne, étant très éloignée des valeurs des piles d'équilibre aux ions Cl^- , K^+ et Na^+ , laisse à penser que ce courant est porté par une autre espèce ionique, à moins que la sélectivité ionique des canaux par où s'écoule le courant soit médiocre. Il peut aussi être envisagé que cet ample courant sortant soit bien porté par une seule espèce d'ions mais qu'il entraîne, du fait de sa forte intensité, une modification de l'activité de ces ions tant au niveau intracellulaire qu'extracellulaire. Cependant, en 1984, Taglietti et coll. décrivent ce courant "haut seuil" et l'analyse de ses caractéristiques amène ces derniers auteurs à conclure que la membrane ovocytaire contient des canaux sodiques voltage-dépendants. Dans nos conditions expérimentales, ce courant "haut seuil" qui, pour l'instant dans ce mémoire, est dénommé Iout, apparaît ne pas être porté par les ions Na^+ quand sont prises en compte les considérations suivantes: (i) le seuil de potentiel d'activation de Iout, déterminé dans ce travail (0 mV) est beaucoup plus proche de celui qui peut être estimé à partir du travail de Peres et coll. (1985) que du seuil de 30 mV indiqué par Taglietti et coll. (1984); (ii) Erev du courant, porté par les ions Na^+ selon Taglietti et coll. (1984) est de 30 mV dans l'ovocyte de *Rana* alors que récemment l'activité des ions Na^+ , déterminée dans des ovocytes de même stade, par Keicher & Meech (1994) permet de donner pour E_{Na^+} (en prenant aussi en compte l'activité des ions Na^+ du milieu extracellulaire) une valeur de 80 mV , valeur identique à celle déterminée pour l'ovocyte de Xénope (Baud et coll., 1982). Ces canaux "haut seuil" dont l'activation permet le développement de Iout seront maintenant dénommés HVAC pour "High Voltage Activated Channels"

C- Troisième classe de réponse

La réponse des ovocytes de cette classe correspond, comme le montrent les tracés de courant, présentés dans la partie A de la figure 21, à l'activité des deux types de canaux, HVAC et LVAC, quand l'amplitude de la dépolarisation est bien sûr suffisante pour permettre de dépasser le seuil de potentiel d'activation des HVAC. 87% des lots

d'ovocytes testés manifestent cette réponse. En effet, suite à de faibles dépolarisations n'amenant le potentiel de membrane qu'à une valeur au plus de 0 mV, le courant de désactivation n'est que de sens sortant et traduit le fait que seuls les LVAC sont activés. Par contre, pour de fortes dépolarisations, par exemple pour celle conduisant le potentiel de -60 mV à 40 mV, comme les LVAC et HVAC sont activés, le courant de désactivation présente une composante entrante et une composante sortante dont les constantes de temps respectives, déterminées à partir des tracés de la figure 21, sont de 76 ms et 151 ms; ces valeurs étant très proches des moyennes déterminées quand seuls sont exprimés dans les ovocytes respectivement les HVAC ou les LVAC.

La courbe de la partie B de la figure 21 qui traduit la relation courant-potentiel (courant mesuré en fin d'impulsion) confirme bien l'activation du courant "bas seuil" dont le seuil de potentiel d'activation est de - 40 mV et du courant haut seuil (I_{out}) dont le seuil d'activation est de l'ordre de 10 mV. Comme la relation liant la valeur instantanée du courant bas seuil au potentiel est linéaire (voir figure 19) l'extrapolation à partir de la relation courant instantané-potentiel (partie C figure 21) donne pour E_{rev} une valeur de -85 mV. Par contre, E_{rev} de I_{out} ne peut être estimée avec exactitude dans la mesure où, lors d'une imposition de potentiel à 40 mV le courant activé en fin d'impulsion est égal à la somme des deux courants (bas seuil et I_{out}). Néanmoins, comme au potentiel 40 mV, l'amplitude de I_{out} est toujours bien plus grande que celle du courant bas seuil (voir figures 19 et 20), la valeur de E_{rev} de I_{out} peut être obtenue sans trop de risque d'erreurs. Ainsi à partir de la valeur du courant global dynamique au potentiel de 40 mV et de celle extrapolée du courant instantané de désactivation de I_{out} au potentiel de -60 mV (correspondant à la composante du courant de désactivation de sens entrant), l'estimation à partir de la relation "linéaire" donne pour E_{rev} une valeur de -8,3 mV. Cette valeur, malgré le risque d'erreurs, est proche de la valeur moyenne donnée ci-dessus pour E_{rev} de I_{out} ($-5 \pm 4,3$ mV, $n = 8$) quand seuls sont exprimés, à un fort taux, les canaux HVAC.

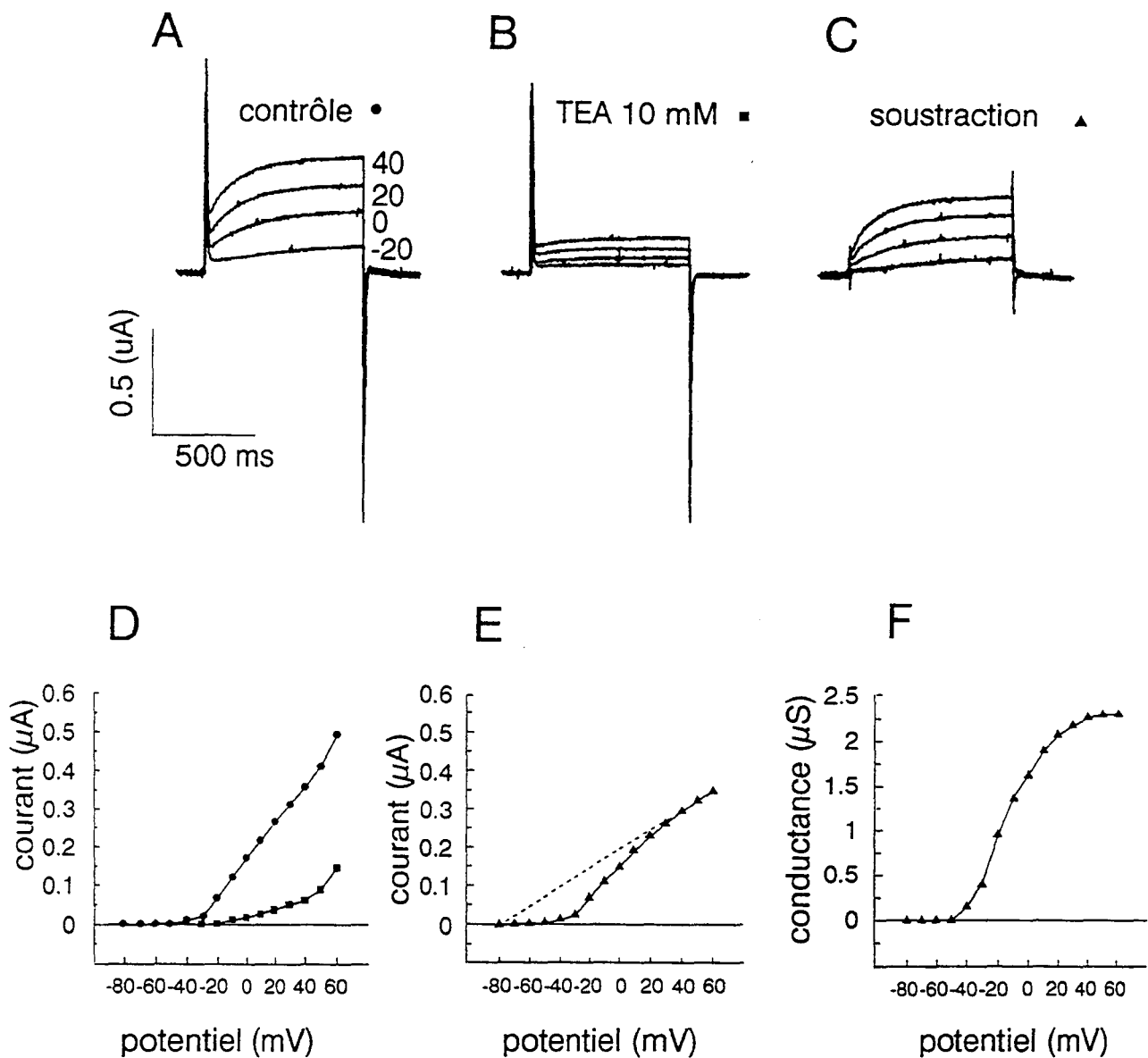


Figure 22: Blocage du courant "bas seuil" par les ions TEA en vue de son isolement et de la détermination des caractéristiques des canaux LVAC.

A- Famille de tracés de courant enregistrés suite à des dépolarisations successives, d'une durée de 975 ms, amenant le potentiel de membrane de -60 mV à -20, 0, 20 et 40 mV toutes les 30 sec en milieu normal, ND96. B- Famille de tracés de courant enregistrés dans les mêmes conditions qu'en A mais en présence de TEA (addition de 10 mM de TEA au ND96). C- Famille de tracés de courant correspondant à la fraction bloquée par le TEA (ces tracés sont obtenus en soustrayant la famille de tracés de la partie B de la famille de ceux de la partie A. D-Relations courant-potential en milieu Nd96 (rond) et en milieu ND96 additionné TEA (carré). E- Relation courant-potential exprimant la fraction de courant bloquée par le TEA (courant potassique) en fonction du potentiel, obtenue en soustrayant la courbe (carré) de la courbe (rond). F- Relation liant la conductance potassique à l'état stable au potentiel (pour chaque valeur de potentiel, la conductance est calculée à partir de l'équation $g_k = (I_k)/(E_i - E_k)$ avec $E_k = -85$ mV

II- DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES DES COURANTS "BAS SEUIL"

ET I_{out}

1°) Isolement du courant "bas seuil" et détermination de ses caractéristiques

Le courant "bas seuil" mis en évidence dans ce travail passant par les canaux LVAC, présente des caractéristiques identiques au courant, porté par les ions K^+ , décrit sur la même préparation (Peres et coll., 1985), à savoir: le même seuil de potentiel d'activation, le même potentiel d'inversion et l'absence d'inactivation dépendante ou non du voltage. Comme le courant potassique décrit par ces derniers auteurs est aussi bloqué, pour une large part, par les ions TEA^+ , ces ions TEA^+ sont donc utilisés dans ce travail pour tenter de bloquer la composante de courant "bas seuil" voltage-dépendante.

La figure 22 résume les effets du TEA à la concentration de 10 mM dans le milieu ND96 sur le courant activé par les dépolarisations s'écoulant majoritairement à travers les canaux LVAC. En effet, les ions TEA^+ réduisent fortement voire totalement le courant dynamique activé par les dépolarisations (Fig. 22 A et B). Les relations courant-potential sont illustrées par les courbes établies à partir des tracés de courant enregistrés en absence et en présence de TEA (figure 22 D). En présence de TEA, un faible courant dynamique est observé, il correspond probablement à la composante, I_{out} , faiblement exprimée et peut être à une fraction du courant bas seuil non bloquée par le TEA. La composante bloquée par les ions TEA^+ qui correspond au courant porté par les ions K^+ est obtenue en soustrayant les courants enregistrés en présence de TEA de ceux enregistrés en absence de TEA. La relation courant potassique- potentiel est illustrée par la courbe présentée à la figure 22 E. Il peut être constaté que le seuil de potentiel d'activation de la conductance potassique est de l'ordre de -40 mV et que le potentiel d'inversion, extrapolé est de l'ordre de - 85 mV. Connaissant le potentiel d'inversion et la valeur du courant potassique à l'état stable (en fin d'impulsion) la conductance peut être calculée et exprimée en fonction du potentiel membranaire (figure 22 F). La conductance potassique maximale atteint ainsi une valeur de 2,3 μS (figure 22 F), elle est en moyenne de $2,2 \pm 0,4 \mu S$ (n=8).

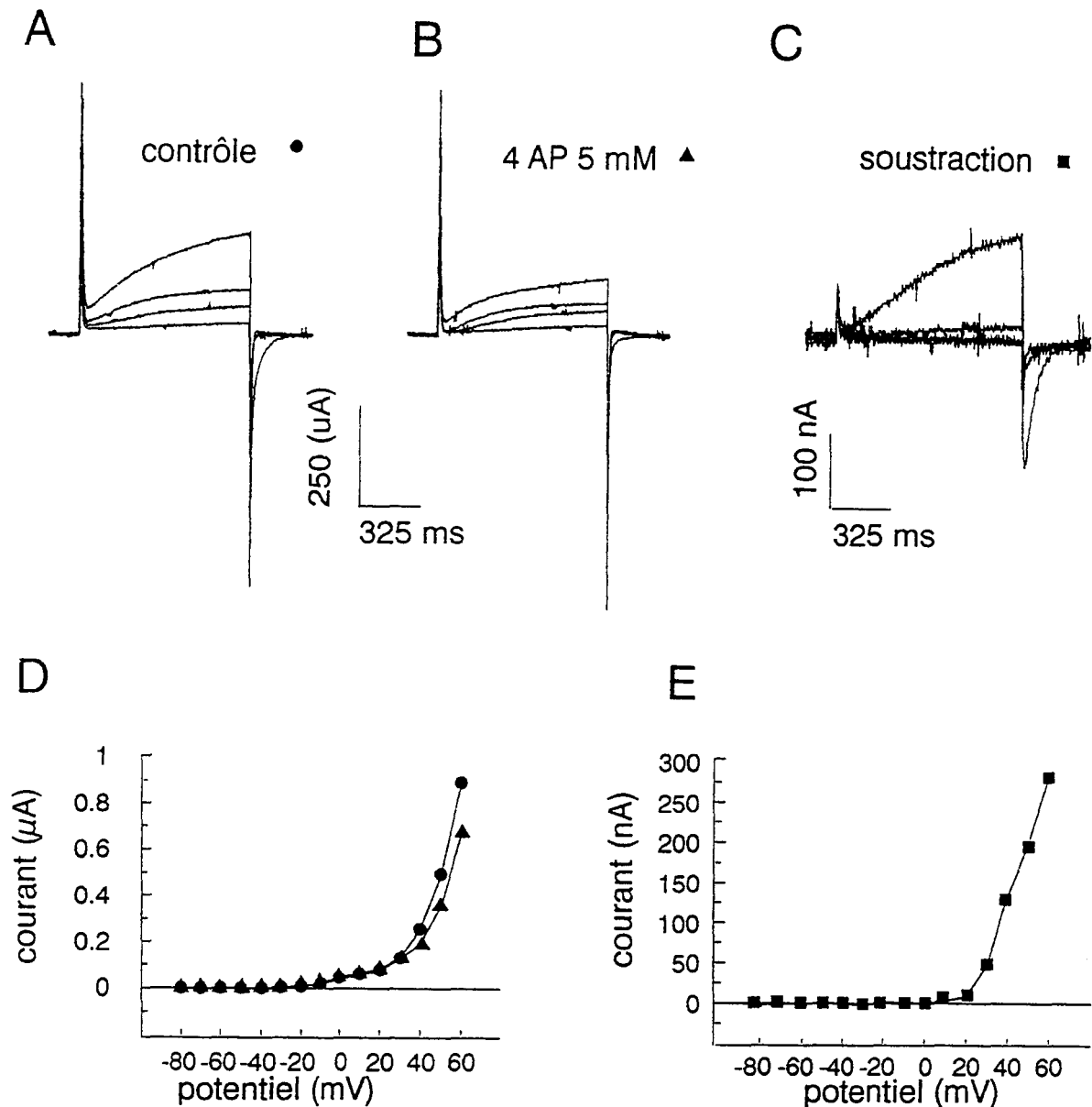


Figure 23: Blocage du courant "haut seuil" par la 4-AP en vue de son isolement et de la détermination des caractéristiques des canaux HVAC.

A- Famille de tracés de courant enregistrés suite à des dépolarisations successives d'une durée de 975 ms, toutes les 30 sec, amenant le potentiel de membrane de -60 mV à -20, 0, 20 et 40 mV en milieu normal, ND96. B- Famille de tracés de courant enregistrés dans les mêmes conditions qu'en A mais en présence de 4-AP (addition de 5 mM de 4-AP au milieu ND96). C- Famille de tracés de courant, correspondant à la fraction bloquée par la 4-AP (les tracés sont obtenus en soustrayant la famille de tracés de B de celle des tracés de A). D- Relations courant-potentiel en milieu normal, ND96 (rond) et en milieu ND96 plus 4-AP (triangle). E- Relation courant-potentiel exprimant la fraction de courant bloquée par la 4-AP (I_{out}) en fonction du potentiel en soustrayant la courbe (triangle) de la courbe (rond) de la partie D.

2°) Isolement de Iout et détermination de quelques unes de ses caractéristiques

La figure 23 résume les effets de la 4-aminopyridine (4-AP). Cette substance est un inhibiteur bien connu de divers types de canaux potassiques (Thomson, 1977; Hermann & Gorman, 1981; Meves & Pichon, 1975) et aussi de "canaux" par où s'écoulent des courants portés par les protons (Byerly et coll., 1984; Barish & Baud, 1984; Meech & Thomas, 1987). Les parties, A et B, de la figure montrent qu'à la concentration de 5 mM, la 4-AP réduit fortement le courant Iout sans affecter le courant potassique comme en témoigne la fraction de courant bloquée (partie C de la figure 23), fraction obtenue en soustrayant les tracés de courant enregistrés en présence de 4-AP de ceux enregistrés en absence de 4-AP (correspondant aux tracés des parties A et B de la figure 23). Egalement, les courbes courant-potentiel (figure 23 D) traduisent bien l'effet préférentiel de la 4-AP sur Iout puisqu'aucune différence entre les courbes n'apparaît dans la gamme de potentiels pour laquelle seuls sont activés les canaux potassiques (entre -40 mV et 20 mV). La courbe de la partie E de la figure 23 qui représente la relation liant la fraction de courant bloqué en fonction du potentiel traduit bien la classique évolution de la relation liant Iout au potentiel (voir figure 20 B).

La figure 24 présente, en les résumant, les effets des ions Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Cd^{2+} à la concentration de 1 mM (respectivement parties A, B et C) sur les ovocytes dont les canaux potassiques sont préalablement bloqués par 10 mM de TEA. Ainsi, lors de dépolarisations, les ovocytes (en absence de ces ions bivalents) ne développent que Iout. Les ions Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Cd^{2+} , connus pour bloquer les courants calciques, mais aussi à faible concentration les courants portés par les ions H^+ , bloquent presque totalement Iout qui se développe amplement dans les conditions normales au cours d'une dépolarisation de 100mV de 3 sec de durée (voir encarts de la figure 24). Au delà du potentiel de 40 mV une fraction de Iout n'est plus bloquée et cette fraction augmente avec l'amplitude de la dépolarisation comme le montrent les courbes courant-potentiel réalisées en présence de ces ions divalents inhibiteurs. L'inhibition de Iout s'effectue par le biais d'un déplacement du seuil d'activation de la conductance "haut seuil " (HVAC) vers des potentiels plus positifs, l'ampleur du déplacement du seuil dépendant aussi de la

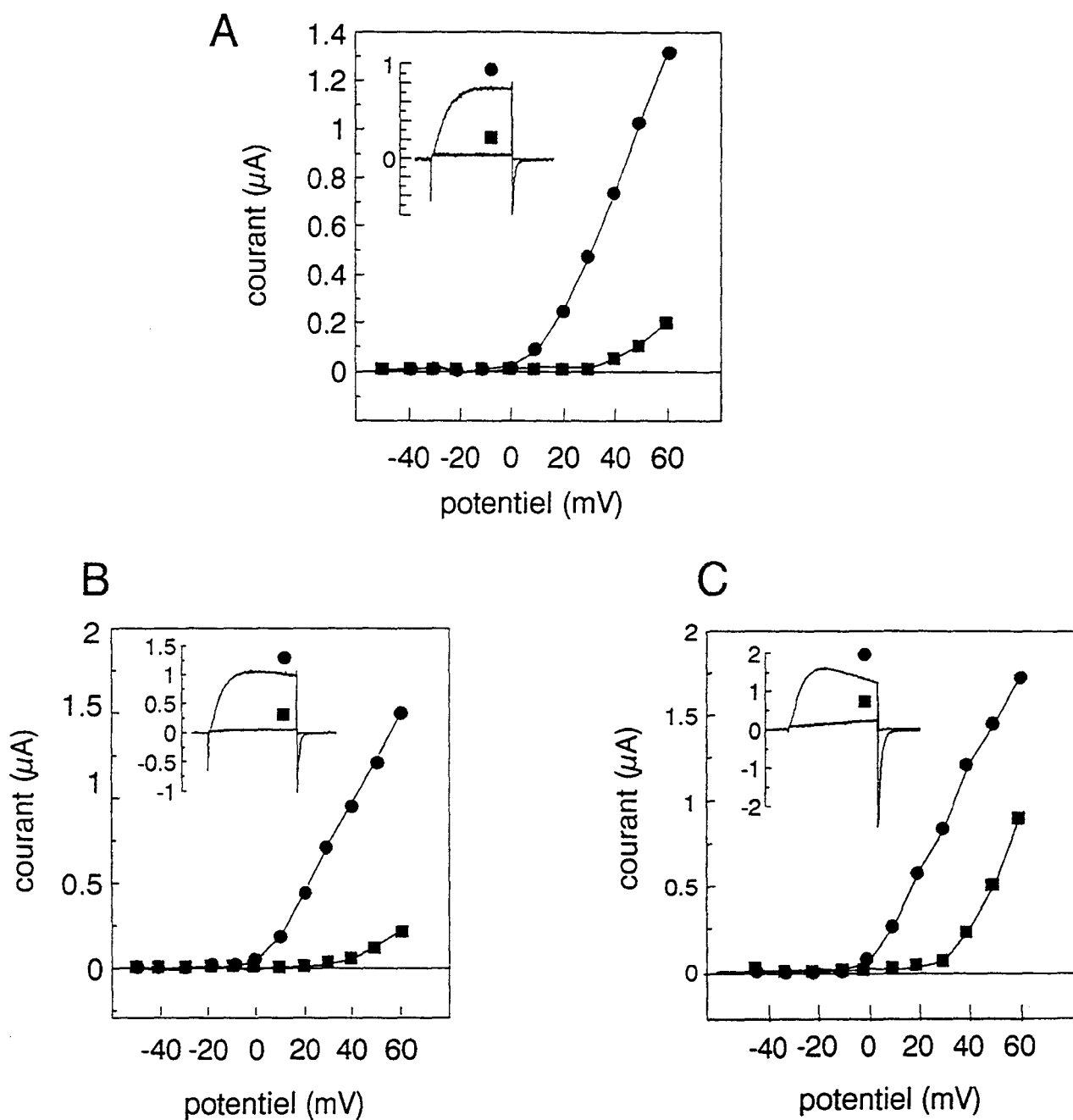


Figure 24: Inhibition par les ions Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Cd^{2+} de I_{out} d'ovocytes dont le courant "bas seuil" I_{k} est inhibé préalablement par les ions TEA^+ (10 mM).

Chaque partie de la figure présente en encart l'effet (carré) du Ni^{2+} (partie A), Zn^{2+} (partie B) et Cd^{2+} (partie C) sur I_{out} activé dans les conditions normales (rond) par une dépolarisation durant 3 sec amenant le potentiel de -60 mV à 40 mV et l'effet sur les relations courant-potential correspondantes (le courant étant mesuré en fin d'impulsion).

concentration des ions inhibiteurs (résultats non illustrés). Ainsi l'inhibition voltage-dépendante par ces cations divalents est conforme à la classique inhibition de la conductance proton, mise en évidence par de nombreux auteurs sur diverses préparations (pour revue, voir DeCoursey & Cherny, 1994).

En résumé seules deux conductances voltage-dépendantes, activées par les dépolarisations d'une durée n'excédant pas 1 sec, s'expriment dans l'ovocyte immature de *Rana esculenta*. La première, une conductance potassique, s'active à un bas seuil de potentiel, elle est bloquée par les ions TEA⁺ et correspond à celle précédemment décrite dans cette préparation (Peres et coll., 1985). La seconde, une conductance "haut seuil" s'active à un haut seuil de potentiel, elle est bloquée par la 4-AP et les ions Ni²⁺, Zn²⁺ et Cd²⁺. La nature ionique, étant quant à elle sujette à controverses, elle a fait l'objet d'une étude approfondie et ses principales caractéristiques sont développées dans la deuxième partie des résultats de ce mémoire.

Deuxième partie

CARACTERISATION DE LA CONDUCTANCE "HAUT SEUIL" DANS L'OVOCYTE IMMATURE DE *Rana esculenta*

Les résultats, obtenus dans la première partie de ce travail, montrent clairement l'existence d'une conductance "haut seuil" dans l'ovocyte immature de *Rana esculenta*. Le courant sortant engendré par l'activation de cette conductance dont le seuil de potentiel d'activation se situe, dans les conditions normales, à une valeur de 0mV, présente un potentiel d'inversion de l'ordre de -10 mV ne permettant pas d'identifier ce courant sortant à un courant porté par les ions K⁺, Na⁺ ou Cl⁻.

De plus, comme des divergences apparaissent entre nos résultats et ceux précédemment publiés sur le même modèle par Taglietti et coll. (1984) d'une part et comme cette conductance "haut seuil" est inhibée par les agents (4-AP, Ni²⁺, Zn²⁺ et Cd²⁺) connus pour bloquer des courants portés par les protons d'autre part, nous avons envisagé l'hypothèse selon laquelle le courant tout serait porté par les ions H⁺. Cette hypothèse s'avère exacte, elle est étayée par des arguments exposés dans l'article ci-après intitulé: "A voltage-dependent and pH-sensitive proton current in *Rana esculenta* oocytes" paru dans "Journal of Membrane Biology".

A Voltage-dependent and pH-sensitive Proton Current in *Rana esculenta* Oocytes

S. Humez, F. Fournier, P. Guilbault

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, SN3, Université des Sciences et Technologies de LILLE, 59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

Received: 21 November 1994/Revised: 22 May 1995

Abstract. Voltage clamp technique was used to study macroscopic ionic currents in *Rana esculenta* oocytes. Depolarization steps led to the activation of a single type of outward current (I_{out}) when contaminant potassium and calcium-dependent chloride currents were pharmacologically inhibited. The voltage threshold of I_{out} activation was 10 mV and this current, which did not inactivate, presented a deactivation time constant of 73 ± 21 msec ($n = 26$) corresponding to a membrane voltage of -60 mV. Its reversal potential (E_{rev}) was dependent on the magnitude of the depolarization and also on pulse duration. These changes in E_{rev} were thought to reflect intracellular ion depletion occurring during activation of the remaining outward current. Furthermore, the activation threshold of I_{out} was clearly affected by modifications in extracellular and intracellular H^+ concentrations. Indeed, intracellular alkalization (evoked by external application of ammonium chloride) or extracellular acidification induced a rightward shift in the activation threshold while intracellular acidification (evoked by external application of sodium acetate) or extracellular alkalization shifted this threshold toward a more negative value. Lastly, I_{out} was dramatically reduced by divalent cations such as Cd^{2+} , Ni^{2+} or Zn^{2+} and was strongly decreased by 4 Aminopyridine (4-AP), well-known H^+ current antagonists already described in many cell types. Therefore, it was suggested that the outward current was prominently carried by H^+ ions, which may play a key role in the regulation of intracellular pH and subsequent pH dependent processes in *Rana* oocyte.

Key words: *Rana esculenta* oocytes — H^+ current — pH — Voltage clamp

Correspondence to: P. Guilbault

Introduction

Amphibian oocytes display a wide variety of ion channels, namely: calcium (Ca^{2+}), potassium (K^+), chloride (Cl^-), sodium (Na^+) and proton (H^+) channels. The distribution of these channels depends on the type of oocyte and each type displays individual characteristics. For example, the Na^+ channel described in *Xenopus* oocytes (Baud, Kado & Marcher, 1982) is not found in any other amphibian oocytes. Ca^{2+} channels that were first analysed in *Xenopus* oocyte have also been reported in *Pleurodeles* oocytes but their electrical and pharmacological characteristics are quite different. *Pleurodeles* oocyte possesses a dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel (Oquadid et al., 1994) whereas *Xenopus* oocyte exhibits a Ca^{2+} channel insensitive to L or N Ca^{2+} channel blockers (Bourinet et al., 1992). Although the Ca^{2+} signaling features have been extensively studied in the past years, it is surprising to find that only few studies have been carried out on the means by which these oocytes regulate their internal pH. It has recently been reported that immature *Xenopus* oocyte can regulate its internal pH by a working Na/H exchange (Burckhardt, Kroll & Fromter, 1992). However this pathway is not ubiquitous and other mechanisms such as the activation of H^+ channels have been reported as a means of regulating the internal pH in *Ambystoma* oocytes (Barish & Baud, 1984) and even in other cell types (see for review DeCoursey & Cherny, 1994).

Here, we report the probable existence of a voltage dependent H^+ pathway in immature fully grown ovarian oocytes of *Rana esculenta*. The corresponding H^+ current is subjoined to the other currents already described in *Rana esculenta*: potassium and calcium-dependent chloride currents (Peres et al., 1985; Taglietti et al., 1984; Toselli et al., 1989). This H^+ current is similar to those described in *Ambystoma* oocyte and in other cells, for example, *Lymnaea stagnalis* and *helix aspersa* neu-

rones (Thomas & Meech, 1982; Byerly, Meech & Moody, 1984; Meech & Thomas, 1987), macrophages (Kapus et al., 1993), granulocytes (Demaurex et al., 1993) and skeletal muscle (Bernheim et al., 1993).

Materials and Methods

OOCYTE PREPARATION

Rana esculenta were purchased from Arthus Frères (85690 Notre Dame de Mont, France). Pieces of the ovary were surgically removed and individual oocytes were dissected in a ND96 physiological medium (in mM): NaCl, 96; KCl, 2; MgCl₂, 2; CaCl₂, 1.8 and N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 5; pH 7.45 NaOH. Oocytes with the largest diameter (1 mm) corresponding to stage VI (Dumont 1972) were selected. Without further treatment, single oocytes could be maintained for 2–6 days at 19° C in ND96 supplemented with 50 µg/ml gentamicin. This medium was renewed daily.

ELECTROPHYSIOLOGICAL MEASUREMENTS

In a 0.3 ml perfusion chamber, a single fully grown ovarian oocyte was impaled with two standard glass microelectrodes (0.5–2.0 MΩ resistance) filled with 3M KCl and maintained under voltage clamp conditions by using a Dagan 8500 amplifier (Minneapolis, MN). Stimulation of the preparation, data acquisition and analysis were performed using the pClamp5.5 software (Axon Instrument, Burlingame, CA). In addition, membrane currents were continuously displayed by means of the BIO 1000 software (Nortek, Villeneuve d'Ascq, France). Drugs used were applied externally by direct addition to the superfusate (flow rate: 3 ml · min⁻¹).

To determine reversal potential (E_{rev}), the leak subtracted current amplitude at the end of the depolarizing pulse was measured for each membrane potential (1st value). The corresponding instantaneous deactivation current (at the -60 mV holding potential) was determined by a digital fitting and extrapolation to time zero of the relaxation current (2nd value). These two values were plotted with their corresponding voltages. The potential for which the instantaneous current is zero corresponds to E_{rev} . This quick way of measuring E_{rev} was valid since the instantaneous current-voltage relationship was linear between -60 and +60 mV. This relation, presented in Fig. 1, was established in the customary way, which consists in stepping back to membrane potentials above and below the E_{rev} .

All the experiments were performed using media made by adding 10 mM tetraethylammonium chloride (TEACl) and 10 mM caffeine to the perfusate. TEA was used to prevent activation of the potassium current (IK⁺) described in *Rana esculenta* oocyte (Peres et al., 1985; Taglietti et al., 1984). Caffeine was used to prevent an oscillatory calcium-dependent chloride current (previously described by Toselli et al., 1989), activated by calcium release from the inositol 1,4,5 trisphosphate sensitive store (*unpublished data*).

Media were made as follows: (i) chloride-free medium, in mM: NaOH, 96; KOH, 2; MgOH₂, 2; CaOH₂, 1.8; TEAOH, 10; caffeine, 10 (pH 7.45 titrated with methane sulfonic acid) and (ii) sodium free medium, in mM: Choline Cl, 96; KCl, 2; MgCl₂, 2; CaCl₂, 1.8; TEACl, 10; caffeine, 10 (pH 7.45 with TEAOH).

Buffers used to obtain different pH values were used at 5mM concentration as follows: pH 8.95 and pH 8.05, EPPS (n(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-(3-propanesulfonic acid) pKa = 8.0);

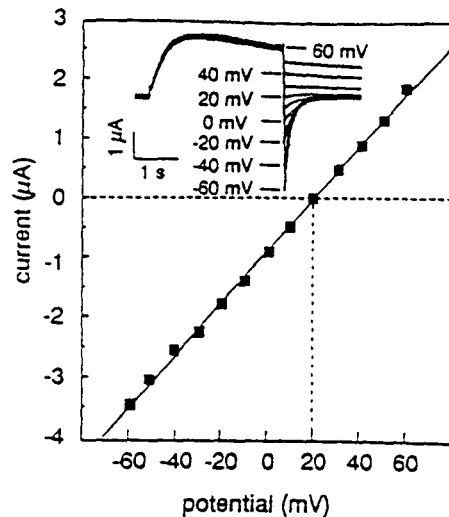


Fig. 1. Instantaneous remaining current as a function of the membrane potential in ND96 supplemented with TEACl (10 mM) and caffeine (10 mM). The outward current was activated by 120 mV depolarizing pulse from a holding potential of -60 mV. At the end of the pulse, the membrane potential was repolarized to various levels and the tails of current were recorded (inset). The instantaneous currents were extrapolated to time zero by measuring the deactivation time constant and the current 50 msec after the repolarizing pulse by using pClamp5.5 software. To facilitate extrapolations of the current tails to time zero (end of the depolarizing pulse), both the leakage and capacity current were automatically subtracted (pClamp5.5 software, P/N protocol).

pH 7.45, HEPES (1.8; N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; pKa = 7.5); pH 6.95, PIPES (Piperazine-n,n'-bis-(2-ethanesulfonic acid) pKa = 6.8).

The variability of the results was expressed as the standard error of the mean, with n indicating the number of oocytes contributing to the mean. Student's t -test was used for statistical analysis. The figures presented show current traces and curves which are representative of the mean. Electrical measurements were conducted on fully grown immature oocytes routinely voltage clamped at a holding potential (HP) of -60 mV.

Results

As illustrated in Fig. 2A, a depolarization step to 40 mV from -60 mV during 20 sec evoked an outward oscillatory current in ND96 medium supplemented with TEACl. TEA (10 mM) was used to block the outward K⁺ current already described in *Rana* oocytes (Peres et al., 1985). The oscillatory current has been described as a calcium-dependent chloride current (Toselli et al., 1989). Activation of this current is produced by calcium release from the InsP₃ sensitive stores (*unpublished data*). Caffeine (10 mM concentration), a well-known inhibitor of InsP₃-induced Ca release, blocked the chloride current. Under these conditions (ND96- TEA- caffeine) a large remaining outward current (I_{out}) was observed during

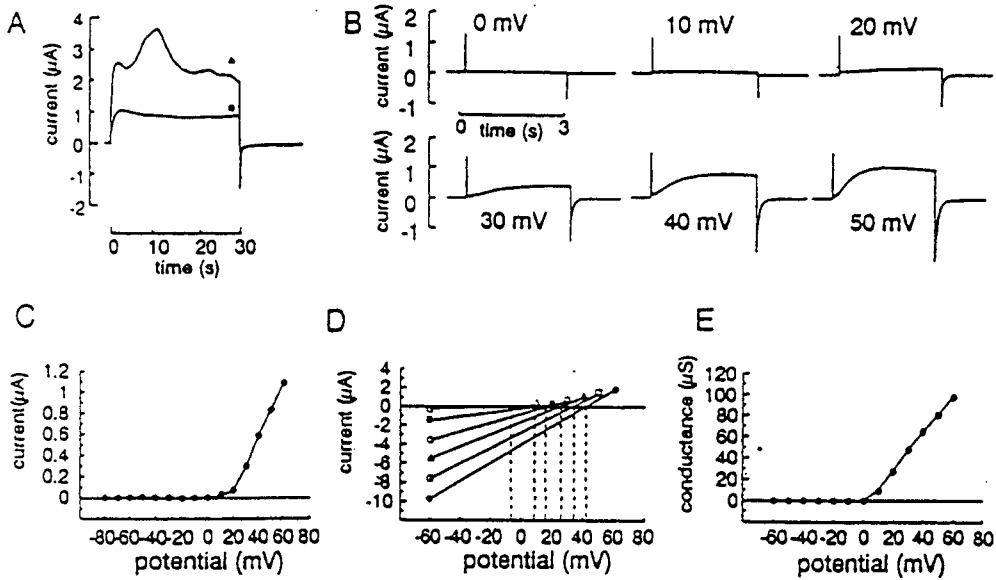


Fig. 2. Membrane currents elicited by depolarizations in immature *Rana esculenta* oocyte. (A) Currents recorded in ND96 medium supplemented by TEACl (10 mM) (▲). Depolarization to +40 mV from the -60 mV holding potential during 30 sec elicited an oscillatory calcium-dependent chloride current; it is blocked by application of caffeine (10 mM) (■). (B) Currents recorded after shifting membrane voltage from -60 mV to the potentials indicated during 3 sec in ND96 supplemented with TEACl (10 mM) and caffeine (10 mM). (C) Current-voltage relationship for the time-dependent currents shown in B. currents were measured at the end of the depolarizing pulses. (D) Determination of E_{rev} for each depolarizing pulse: amplitude of each dynamic current, measured at the end of the pulse and the corresponding amplitude of the instantaneous deactivation current were plotted with the potential. The potential at which the current is zero is E_{rev} value. (E) Conductance-voltage relationship obtained from the current amplitudes shown in C and corresponding reversal potentials determined in D.

adequate stimulation (Fig. 2A). The purpose of this study was to examine the characteristics of this current.

CHARACTERIZATION OF THE REMAINING I_{out}

Incremented 30-sec depolarizations of an oocyte bathed in modified ND96 medium from 0 to 60 mV elicited a time-dependent outward current. This current progressively increased for positive values >0 mV (Fig. 2B). Currents recorded for a membrane potential between 10 to 40 mV did not exhibit any apparent inactivation. However in this oocyte, at a 50 mV membrane potential, I_{out} reached a peak and then slowly declined. Such a decrease in current amplitude is clearly visible in other cases even for applied potentials more negative than 50 mV (Fig. 3A for example). This slight decrease was always partial and relatively slow as a function of time. After depolarizations strong enough to activate I_{out} , an inward deactivation current was recorded when the membrane potential returned to HP (-60 mV). Each deactivation current decayed with the same time constant (73 ± 21 msec; $n = 26$) and the instantaneous current-voltage relationship was linear (Fig. 1). These results taken together suggest that a single current could be activated during depolarization. Figure 2C shows the current-voltage relationship obtained from currents mea-

sured at the end of the 3-sec pulse from -80 to +60 mV. To determine E_{rev} of the activated I_{out} , current amplitude measured at the end of each depolarizing pulse and the corresponding instantaneous deactivation current were plotted vs. the membrane voltage (for more details, see Materials and Methods, Fig. 1). The potential value corresponding to zero current represents E_{rev} . The value of E_{rev} was determined for every voltage step-elicited current (Fig. 2D) and as illustrated, the slope of each linear relation increased with depolarization. This slope, which corresponds to the conductance, never reached a steady value for any of the potentials tested (from 10 to 60 mV). Furthermore, the instantaneous deactivation current linearly increased with potential. Figure 2D also shows that E_{rev} increased with depolarization magnitude. For a 3-sec depolarization at 40 mV, E_{rev} was 8.56 ± 6 mV ($n = 15$) and only -4.2 ± 5.7 mV ($n = 12$) for 1 sec; this difference was highly significant ($P < 0.001$) whatever the level or duration of the depolarization. Moreover, the deactivation time constant remained unchanged with the level of depolarization and with pulse duration. The change in E_{rev} , associated with the fact that a single current seems to be activated, led us to propose the existence of a phenomenon of accumulation and/or depletion subsequent to a voltage dependent activation of the dynamic conductance. This conductance was calculated for each depolarizing pulse by using the corresponding

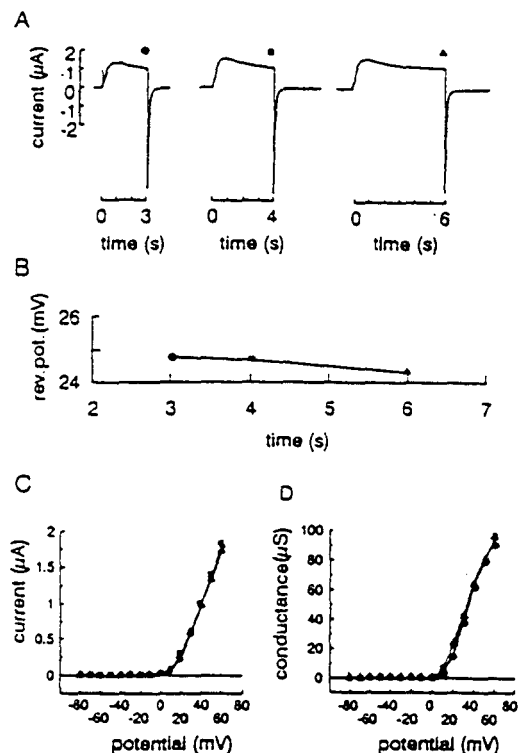


Fig. 3. Effect of pulse duration on current decay in ND96 supplemented with TEACl (10 mM) and caffeine (10 mM). (A) Successive depolarizations of 3, 4 and 6 sec to a membrane potential of +40 mV from a -60 mV holding potential. (B) Reversal potential values according to pulse duration (determined from the current traces shown in part A). Reversal potentials were determined as above (Fig. 2D). (C) Current-voltage relationship for 3- (●), 4- (■) and 6-sec (▲) pulse durations. (D) Conductance-voltage relationships obtained from the current amplitude presented in C (the corresponding reversal potential value, to calculate the conductance, was determined for each current recorded).

reversal potential. The likely sigmoidal conductance-voltage relationship, presented in Fig. 2E, corroborates the fact that the conductance was not maximal even for a 60 mV membrane potential. After fitting the conductance-voltage relationship by using the Boltzman equation, the deduced maximal conductance was estimated at 135 μS and the potential of half activation at 39 mV (Fig. 2E).

The decrease in current amplitude with pulse duration and the change in E_{rev} with the rate of activation have been interpreted as a consequence of an intracellular phenomenon of ionic depletion or accumulation. The decrease in current amplitude was not due to an inactivation process since the current amplitude, E_{rev} and the amplitude of the tail current were unchanged when the step duration was increased from 3 sec to 6 sec (Fig. 3A and B). Moreover, for all activation potentials, the current-voltage relationship (Fig. 3C) and the conductance-voltage relationship (Fig. 3D) were not modified. Thus,

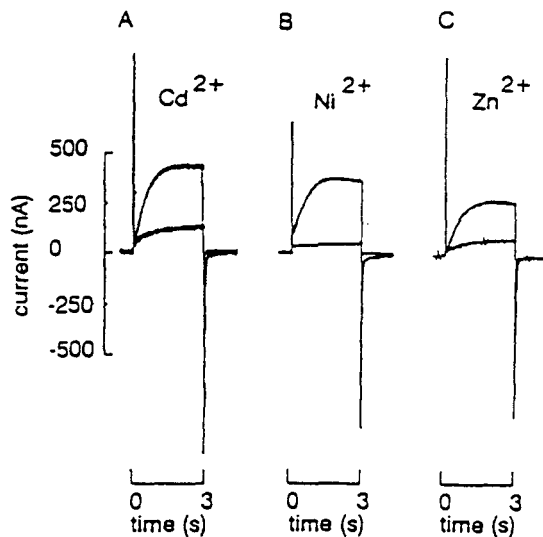


Fig. 4. Effect of heavy metals of ND96 supplemented with TEACl (10 mM) and caffeine (10 mM) on the current activated by a 3 sec depolarization to +40 mV from the -60 mV holding potential. (Cd^{2+} , Ni^{2+} or Zn^{2+} was used at a 1 mM concentration.)

Fig. 3 illustrates: (i) the absence of inactivation; (ii) saturation of ion accumulation/or ion depletion phenomenon over time.

BLOCKADE OF I_{out} BY HEAVY METALS

The effects on I_{out} of various divalent cations such as cadmium (Cd^{2+}), nickel (Ni^{2+}) and zinc (Zn^{2+}) used at 1 mM concentration are described in Fig. 4. In our study, these divalent cations led to a significant inhibition of I_{out} (on average $85 \pm 5\%$, $n = 7$; Fig. 4, A-C). The reduction in current amplitude induced by heavy metals operated by shifting the current-voltage relation in a rightward direction and consequently decreased the outward current for all potentials (*data not shown*). As previously reported, Cd^{2+} , Ni^{2+} or Zn^{2+} correspond to putative blockers of H⁺ conductance (Barish & Baud, 1984; Byerly et al., 1984; Meech & Thomas, 1987; Byerly & Suen, 1989; Mahaut-Smith, 1989; DeCoursey, 1991; Demaurex et al., 1993; Bernheim et al., 1993; Kapus et al., 1993). Moreover, 4-AP, also known as a H⁺ channel blockers (Meech & Thomas, 1987) strongly affected I_{out} (5 mM, $n = 5$, *data not shown*). As (i) the deactivation time constant of I_{out} was fitted by a monoexponential, (ii) the instantaneous current-voltage relationship was linear and (iii) the divalent cations led to a dramatic inhibition of I_{out} , this current is thought to be due to activation of a H⁺ conductance. Taking into account all the results mentioned above, we carried out an investigation to determine the ionic nature of I_{out} elicited in *Rana* oocytes with the idea that it could be related to a H⁺ current.

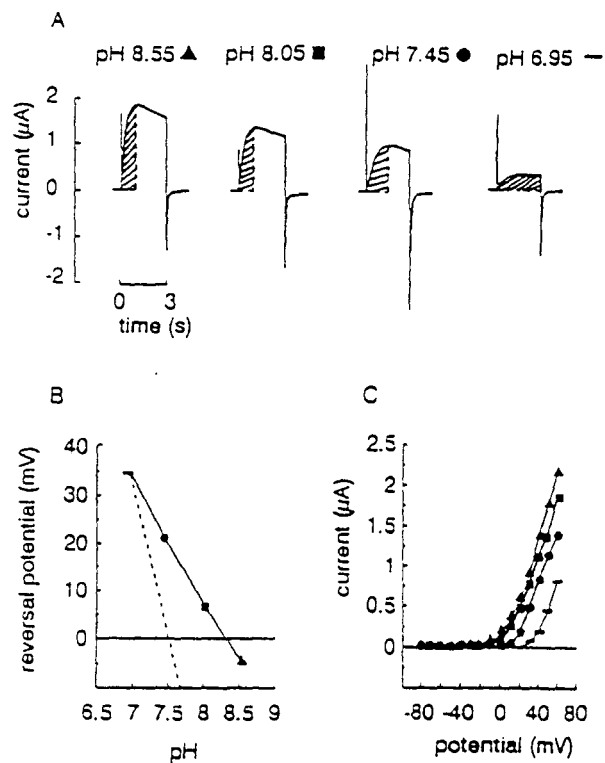


Fig. 5. Effect of changing external pH in ND96 supplemented with TEACl (10 mM) and caffeine (10 mM). (A) Effect of different external pHs on the current activated by a 3-sec depolarization to +40 mV from a -60 mV holding potential. External pH was changed around the 7.45 control value (●) to 8.05 (■), 8.55 (▲) and 6.95 (—). (B) Reversal potential, according to pH, determined as above for currents activated by a +40 mV imposed voltage shown in A, at pHs of 6.95 (—), 7.45 (●), 8.05 (■), 8.55 (▲). Slope of the relation linking reversal potential to pH is 30 mV; broken line represents the linear relation, in function of pH, expected by the Nernst equation. (C) Current-voltage relationships for different external pHs of 6.95 (—), 7.45 (●), 8.05 (■), 8.55 (▲).

EFFECT OF EXTERNAL pH ON I_{out}

External pH was modified around the control value of 7.45 to 8.05, 8.55 and 6.95 to produce an increase or decrease in the H⁺ chemical gradient. Currents recorded under these conditions are presented in Fig. 5A. The outward current amplitude was clearly increased when external pH increased. Inversely, I_{out} was reduced when pH was lower than the control value of 7.45. During the depolarizing pulse the progressive decrease of the current amplitude over time was more prominent and started earlier when pH was augmented (Fig. 5A). Graphical integrations from the beginning to the I_{out} peak (measured at pH 8.55, 8.05, 7.45, 6.95) are represented for each current by the hatched area in Fig. 5A. These integral values were nearly identical, indicating that the beginning of the decrease in current amplitude depended on the amount of charges flowing through the oocyte membrane. Interestingly, the deactivation time constant de-

creased when external pH was increased (83 msec for a 7.45 pH, 58 msec for a 8.05 pH and 54 msec for a 8.55 pH). Inversely, the deactivation time constant increased to 92 msec for a 6.95 pH. Variations in the current amplitude produced following external pH modifications are correlated to a modification of E_{rev} . Figure 5B illustrates the effects of external pH variations on E_{rev} . E_{rev} was shifted toward more negative values when pH was more alkaline (+6 mV for a 8.05 pH, -5 mV for 8.55 and +21 mV for the normal pH of 7.45). By contrast, E_{rev} was shifted toward a more positive potential value when pH was lower than 7.45 (it was 35 mV for a 6.95 pH). If I_{out} was carried by H⁺ ions, the shift in E_{rev} value expected by the Nernst equation would be of 58 mV for a change of one pH unit. In our experiments, the shift was only 30 mV (Fig. 5B). But despite this discrepancy, I_{out} was thought to be mainly carried by H⁺ ions because of the probable existence of an intracellular accumulation-depletion phenomenon. Indeed, such a situation could lead to a significant variation in E_{rev} associated with an important modification of I_{out} amplitude. In particular, depletion of intracellular H⁺ ions could explain the shift lower than 58 mV even if the current was very largely or exclusively carried by H⁺ ions. The fact that E_{rev} shifted with the rate of I_{out} activation (Fig. 2D) or with the pulse duration (<3 sec) argues strongly for such a depletion process. When external pH was alkaline, the H⁺ chemical gradient increased, leading to an increase in the current amplitude and to a significant H⁺ ion depletion during the depolarizing pulse. Thus, H⁺ depletion cannot bring about a shift of 58 mV. From these points, we postulate that H⁺ ions play a very significant role in the remaining outward current recorded in our conditions (ND96 supplemented with TEACl and caffeine). Finally, external pH alterations were also able to cause a change in the activation potential threshold (Fig. 5C), indicating that the biophysical properties of the molecular H⁺ carrier entity are also modified by the external H⁺ surrounding.

EFFECT OF INTERNAL pH ON I_{out}

To assess the involvement of H⁺ ions in I_{out} , the internal pH (pH_i) dependence of the current was analyzed at a clamped extracellular pH (7.45). Internal alkalization was performed by adding ammonium chloride (NH₄Cl, 20 mM concentration) to the control medium since such a 20 mM NH₄Cl concentration has been recently reported to produce an intracellular alkalization of about 0.4 pH unit in *Rana* oocyte (Keicher & Meech, 1994). On the other hand, and as already described by Bode et al. (1994), we used extracellular sodium acetate (NaCH₃COOH, 20 mM) to produce internal acidification. The extent of the internal pH variation brought about by NaCH₃COOH has not been yet determined in *Rana es-*

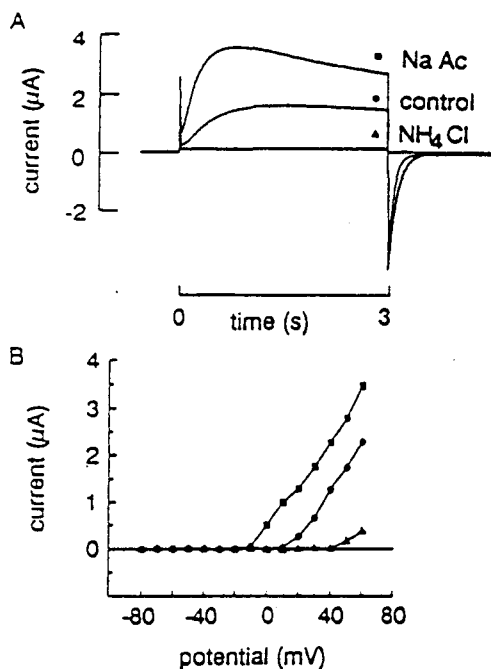


Fig. 6. Effect of internal pH modifications. (A) Effect of intracellular acidification by adding 20 mM of sodium acetate (■) and effect of intracellular alkalization by adding 20 mM of ammonium chloride (▲) on the current recorded in control conditions in ND96 supplemented with TEACl (10 mM) and caffeine (10 mM) (●). Currents were activated by a 3-sec depolarization to +40 mV from a -60 mV holding potential. (B) Corresponding current-voltage relationships at normal pH (●), intracellular acidification (■) and intracellular alkalization (▲). Currents were measured at the end of the depolarizing pulses.

culenta oocyte. However intracellular acidification obtained by adding 20 mM sodium acetate led to an increase in current amplitude (Fig. 6A). When the membrane potential returned to its initial value, the current deactivated more slowly. Indeed, the time constant in the presence of external sodium acetate was 124 ± 22 msec ($n = 7$) as compared to a control value of 73 ± 27 msec ($n = 26$). Furthermore, E_{rev} was modified, becoming more negative when the oocyte was challenged with 20 mM sodium acetate (*data not shown*). On the other hand, when the intracellular medium was alkalized by addition of NH₄Cl to the extracellular side, the current vanished (Fig. 6A). Therefore its time constant of deactivation and E_{rev} cannot be determined. These results corroborate the hypothesis that the H⁺ ions did carry the outward current. The beginning of the decrease in current magnitude occurring during the test pulse was observed earlier when the intracellular medium was acidified. These results are in agreement with the occurrence of an intracellular H⁺ ion depletion which can play a key role in the development and kinetics of I_{out} . The current-voltage relationship, presented in Fig. 6B, shows that the change in current amplitude was associated with a change in the activation potential threshold. This threshold evolved

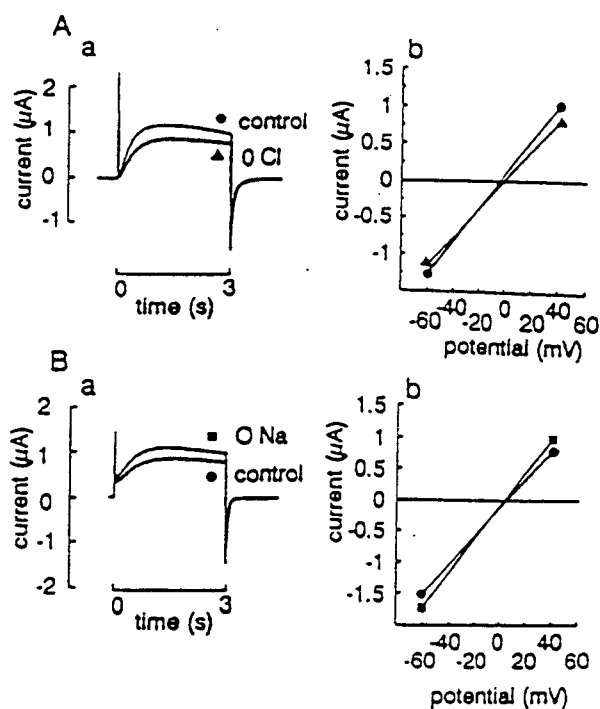


Fig. 7. Effect of Na⁺ removal or Cl⁻ removal on the high voltage activated current in ND96 supplemented with TEACl (10 mM) and caffeine (10 mM). (A) Effect of Cl⁻ removal (methane sulfonate ions instead of external Cl⁻ ions) on the activated current (a) and E_{rev} (b). (B) Effect of Na⁺ removal (choline ions instead of Na⁺ ions) on the activated current (a) and E_{rev} (b). Currents were activated by 3-sec depolarization to +40 mV from a -60 mV holding potential. Currents were measured at the end of the depolarizing pulses. Reversal potentials were determined as above.

from 10 mV in the control medium to -10 mV in the presence of external sodium acetate and to 50 mV in the presence of NH₄Cl.

INFLUENCE OF EXTERNAL Cl⁻, Na⁺ OR K⁺ CONCENTRATIONS ON I_{out}

Lastly, we investigated the possible participation of other ions species in the development of I_{out} . The substitution of external chloride ions by methane sulfonate led to a moderate decrease in the current amplitude and a slight modification of E_{rev} (Fig. 7A). ΔE_{rev} was $+3.6 \pm 3.1$ mV ($n = 20$). This slight shift was not significant and led us to rule out major participation of Cl⁻ ions in the depolarization-induced I_{out} . Moreover, substitution of sodium by choline resulted in an increase in the current amplitude associated with a discrete change in E_{rev} (ΔE_{rev} : -4.1 ± 2.2 mV, $n = 18$; see also Fig. 7B). As for the Cl⁻ ion situation, the shift in E_{rev} was not large enough to conclude in favor of sodium permeability. Substitution in the external medium of K⁺, Na⁺, and Cl⁻ by TEA⁺ and methane sulfonate did not significantly

affect either current amplitude or E_{rev} (data not shown), indicating that H⁺ ions carried the remaining current.

Discussion

Our results clearly demonstrate that depolarizations of the oocyte of *Rana esculenta* elicited a large outward dynamic current activated for positive membrane voltages, under conditions where K⁺ and Ca²⁺-dependent Cl⁻ currents are eliminated. The outward current presented only one component and did not display real inactivation. This current was significantly reduced by Cd²⁺, Ni²⁺ or Zn²⁺ and 4-AP, substances which are known to inhibit the H⁺ conductance. All the results, taken together, demonstrate that the current described was very close to the H⁺ currents described in other preparations (Barish & Baud, 1984; Byerly et al., 1984; Meech & Thomas, 1987; Byerly & Suen, 1989; Mahaut-Smith, 1989; DeCoursey, 1991; Demaurex et al., 1993; Bernheim et al., 1993; Kapus et al., 1993).

IONIC SELECTIVITY OF I_{out} ELICITED BY DEPOLARIZATION

In a classical way, to conclude in favor of ionic selectivity, for example H⁺ conductance, a change in the extracellular or intracellular pH of one unit must produce a 58 mV shift in E_{rev} . Our results indicate that if such a modification in the H⁺ external concentration was made, the shift in E_{rev} was only 30 mV. Furthermore in our conditions, it was not possible to demonstrate that other ions carried the outward current to any significant extent. Modification of the Na⁺ gradient had almost no effect on the current amplitude or on E_{rev} . Similar results have been described in the *Ambystoma* oocytes (Barish & Baud, 1984). In these two oocyte models, such a slight effect of Na⁺ withdrawal could be attributed to: (i) a weak contamination of the outward H⁺ current by a small membrane Na⁺ current; (ii) a small permeability to Na⁺ through the putative H⁺ channels. In this latter case, the Na⁺ permeability in *Rana* oocyte does not appear to be significant because of the discrete shift in E_{rev} obtained by Na⁺ removal. Moreover, it was not possible to obtain any deactivation characteristics corresponding to a Na⁺ current despite the fact that such a current has been described in the immature *Rana* oocyte (Taglietti et al., 1984). We have no explanation for this discrepancy, unless the stages of maturity of the oocytes can be somewhat different. Moreover, it must be noted that E_{Na} calculated from results of Keicher & Meech (1994) obtained on the fully grown ovarian oocytes of *Rana pipiens* is relatively high (80 mV). A similar value was found in the *Xenopus* oocyte (Baud et al., 1982). Under these conditions and contrary to the previous study carried out on *Rana esculenta* oocytes (Taglietti et al., 1984), I_{Na}⁺ activated for moderate depolarizations (to a

40 mV membrane potential) must undergo the inward direction. So in our opinion, no additional outward current carried by Na⁺ can overlap the H⁺ component.

Several papers have concluded in favor of the existence of a H⁺-selective conductance whose properties are similar to those described here, despite the fact that an E_{rev} shift lower than 58 mV was observed for one unit pH variation (see for review, DeCoursey & Cherny, 1994). In granulocytes for example, the reported shift was only 40 mV (Demaurex et al., 1993) and 30 mV in muscle myotube (Bernheim et al., 1993). In these two preparations, the intracellular H⁺ concentration was clamped by using high H⁺ buffer concentration. Nevertheless, in spite of the presence of internal H⁺ buffer, the observed shift inferior to 58 mV was attributed to a local change in H⁺ concentration underneath the membrane. Furthermore in myotubes and granulocytes, it was well demonstrated, when intracellular medium was not buffered, that activation of the H⁺ current led to a H⁺ intracellular depletion that caused an intracellular alkalization. This alkalization was correlated with a decrease in the current amplitude and to a shift in E_{rev} . On the other hand, a variation in E_{rev} to a value brought closer to 58 mV was determined in *Ambystoma* oocytes (Barish & Baud, 1984) and in macrophages (Kapus et al., 1994), two sets of experiments where no variation in internal H⁺ concentration was observed. Indeed, the pulse duration for the determination of E_{rev} in *Ambystoma* oocytes was short enough to exclude any H⁺ depletion and, in macrophage, internal pH was strongly buffered. However, in *Ambystoma* oocytes, H⁺ ion depletion was observable when applying large and/or long lasting pulses (Barish & Baud, 1984). Thus, one may postulate that in the *Rana esculenta* oocyte, the current activated by strong depolarizations is mainly carried by H⁺ ions and from now, this current will be called H⁺ current (IH⁺).

INTRACELLULAR H⁺ ION DEPLETION IN *RANA* OOCYTE

In *Rana esculenta* oocyte, E_{rev} varied with the depolarizing level and with pulse duration. In addition, the decrease in current amplitude observed during pulse application, which could not be attributed to a real inactivation, was a function of extracellular and intracellular pH. These results taken together argue for efficient H⁺ depletion which led to intracellular alkalization in this kind of oocyte. In fact, the more H⁺ current was activated, the more H⁺ ions flowed out of the oocyte and thus, the greater was the rise in the intracellular alkalization. Such a phenomenon of H⁺ depletion during IH⁺ activation is well documented (see for review, DeCoursey & Cherny, 1994). For example, in macrophages (Kapus et al., 1994), activation of the H⁺ current for 7 sec at an imposed voltage of +60 mV led to an alkalization near 1 pH unit when the intracellular medium is not

artificially buffered. For *Ambystoma* oocyte, H⁺ depletion is not observed for a 2-sec pulse at +60 mV (Barish & Baud, 1984). By contrast, for the same stimulation, H⁺ depletion was clearly seen in *Rana esculenta* oocyte. This discrepancy can be explained by the fact that the two oocyte models exhibited currents of comparable amplitude whereas their respective diameters are obviously different (1 mm for *Rana* and 2 mm for *Ambystoma*, giving a volume 8-fold higher for *Ambystoma*). Consequently, in view of these considerations, *Rana esculenta* oocyte might be more sensitive to intracellular H⁺ depletion than *Ambystoma* oocyte when they undergo the same experimental voltage clamp protocol. However, additional experiments with a direct evaluation of intracellular pH using fluorometric methods are needed to quantify the H⁺ depletion during depolarization.

PHYSIOLOGICAL RELEVANCE OF THE H⁺ CURRENT

The role of the H⁺ pathway is not known but the voltage-dependent H⁺ current can produce substantial changes in pH_i (Thomas & Meech, 1982; Demaurex et al., 1993; Kapus et al., 1993; DeCoursey & Cherny, 1994). It seems possible that H⁺ fluxes through these channels might contribute to some of the physiologically generated modifications in pH_i that have been reported in photoreceptors, skeletal muscle, fertilized eggs and during oocyte maturation (Brown, Meech & Thomas, 1976; Brown & Meech, 1979; Westerblad & Allen, 1992; Shen & Steinhardt, 1978; Webb & Nuccitelli, 1981; Lee & Steinhardt, 1981; Cicirelli, Robinson & Dennis Smith, 1983). In *Ambystoma* oocytes, during the first hours of progesterone-induced maturation, a depolarization associated with intracellular alkalization was reported (Baud & Barish, 1984). During the first 5 hr, the H⁺ current is clearly detectable. In this context, it may be suggested that the H⁺ current could play a pivotal role in the occurrence of intracellular alkalization. In *Rana esculenta* oocytes, the working H⁺ current described in this paper could be involved in a similar alkalization process during maturation. During cellular activation, a local intracellular accumulation of H⁺, decreasing internal pH_i, could shift the current-voltage characteristics of the H⁺ current to negative voltages in such a way that protons are extruded even at the resting potential. Another possibility is that H⁺ conductance can operate when the oocyte is depolarized: during its activation, the H⁺ current can create a relative proton sink below the membrane. This could generate a pulsing driving force facilitating H⁺ diffusion from the core toward the membrane. Further experiments would be necessary to approach the role of the H⁺ current during oocyte maturation and more generally to determine the regulation of intracellular pH in relation to the presence of the voltage-activated H⁺ current.

References

- Barish, M.E., Baud, C. 1984. A voltage-gated hydrogen ion current in the oocyte membrane of the Axolotl, *Ambystoma*. *J. Physiol.* 352:243-263
- Baud, C., Barish, M.E. 1984. Change in membrane hydrogen and sodium conductances during progesterone-induced maturation of *Ambystoma* oocytes. *Dev. Biol.* 105:423-434
- Baud, C., Kado, R.T., Marcher, K. 1982. Sodium channels induced by depolarization of the *Xenopus leavis* oocyte. *Proc. Natl. Sci. USA* 79:3188-3192
- Bernheim, L., Krause, R.M., Baroffio, A., Hamann, M., Kaelin, A., Bader, C.R. 1993. A voltage-dependent proton current in cultured human skeletal muscle myotubes. *J. Physiol.* 470:313-333
- Bode, H.P., Eder, B., Trautmann, M. 1994. An investigation on the role of vacuolar-type proton pumps and luminal acidity in calcium sequestration by nonmitochondrial and inositol-1,4,5-triphosphate-sensitive intracellular calcium stores in clonal insulin-secreting cells. *Eur. J. Biochem.* 222:869-877
- Bourinet, E., Fournier, F., Nargeot, J., Charnet, P. 1992. Endogenous *Xenopus*-oocyte Ca-channels are regulated by protein kinases A and C. *FEBS. Lett.* 299:5-9
- Brown, H.M., Meech, R.W. 1979. Light induced changes of internal pH in a barnacle photoreceptor and the effect of internal pH on the receptor potential. *J. Physiol.* 297:73-93
- Brown, H.M., Meech, R.W., Thomas, R.C. 1976. pH changes induced by light in a large *Balanus* photoreceptors. *Biophys. J.* 16:33a
- Burckhardt, B.C., Kroll, B., Fromter, E. 1992. Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus leavis* oocytes. *Pfluegers Arch.* 420:78-82
- Byerly, L., Hagiwara, S. 1982. Calcium currents in internally perfused nerve cell bodies of *Limnaea stagnalis*. *J. Physiol.* 322:503-528
- Byerly, L., Meech, R., Moody, W. 1984. Rapidly activating hydrogen ion currents in perfused neurones of the snail, *Limnaea stagnalis*. *J. Physiol.* 351:199-216
- Byerly, L., Suen, Y. 1989. Characterization of proton currents in neurone of the snail *Limnaea stagnalis*. *J. Physiol.* 413:75-89
- Cicirelli, M.F., Robinson, K.R., Dennis Smith, L. 1983. Internal pH of *Xenopus* oocytes: a study of the mechanism and role of pH changes during meiotic maturation. *Dev. Biol.* 100:133-146
- DeCoursey, T.E. 1991. Hydrogen ion current in alveolar epithelial cells. *Biophys. J.* 60:1243-1253
- DeCoursey, T.E., Cherny, V.V. 1994. Voltage-activated hydrogen ion currents. *J. Membrane Biol.* 141:203-223
- Demaurex, N., Grinstein, S., Jaconi, M., Schegel, W., Lew, D.P., Krause, K.H. 1993. Proton currents in human granulocytes: regulation by membrane potential and intracellular pH. *J. Physiol.* 466:329-344
- Dumont, J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus leavis* (Daudin) I. Stages of the oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136:153-180
- Kapus, A., Romarek, R., Yi Qu, A., Rotstein, O.D., Grinstein, S. 1993. A pH sensitive and voltage dependent proton conductance in the plasma membrane of macrophages. *J. Gen. Physiol.* 102:729-760
- Keicher, E., Meech, R. 1994. Endogenous Na⁺-K⁺ (or NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransport in *Rana* oocytes; anomalous effect of NH₄⁺ on pH_i. *J. Physiol.* 475:1:45-57
- Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A. 1977. Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones. *J. Physiol.* 270:545-568
- Lee, S., Steinhardt, R.A. 1981. pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus leavis*. *Dev. Biol.* 85:358-369

- Mahaut-Smith, M.P. 1989. The effect of zinc on calcium and hydrogen ion currents in intact snail neurons. *J. Exp. Biol.* 145:455-464
- Meech, R.W., Thomas, R.C. 1987. Voltage dependent intracellular pH in *Helix aspersa* neurones. *J. Physiol.* 390:433-452
- Ouadid, H., Browaeys-Poly, E., Vilain, J.P., Guilbault, P. 1994. Endogenous DHP-sensitive Ca²⁺ channels in *Pleurodeles* oocytes. *FEBS Lett.* 351:58-62
- Peres, A., Bernardini, G., Mancinelli, E., Ferroni, A. 1985. A voltage-dependent K⁺ channel controlling the membrane potential in frog oocytes. *Pfluegers Arch.* 403:41-46
- Shen, S.S., Steinhardt, R.A. 1978. Direct measurement of intracellular pH during metabolic depression of the sea urchin egg. *Nature* 272:253-254
- Taglietti, V., Tanzi, F., Romero, R., Simoncini, L. 1984. Maturation involves suppression of voltage-gated currents in the frog oocyte. *J. Cell. Physiol.* 121:576-588
- Thomas, R.C., Meech, R.W. 1982. Hydrogen ion currents and intracellular pH in depolarized voltage-clamped snail neurones. *Nature* 299:826-828
- Toselli, M., Taglietti, V., Tanzi, F., D'angelo, E. 1989. Calcium-dependent chloride currents in the immature oocyte of the frog, *Rana esculenta*. *Arch. Ital. Biol.* 127:69-80
- Webb, D.J., Nuccitelli, R. 1981. Direct measurement of intracellular pH changes in *Xenopus* eggs at fertilization and cleavage. *J. Cell. Biol.* 91:562-567
- Westerblad, H., Allen, D. 1992. Changes of intracellular pH due to repetitive stimulation of single fibres from mouse skeletal muscle. *J. Physiol.* 449:49-71

Troisième partie

FACILITATION DE LA LIBERATION DE Ca^{2+} DES STOCKS SENSIBLES A L'INSP₃ PAR L'ACTIVATION DE LA CONDUCTANCE PROTON DANS L'OVOCYTE IMMATURE DE RANA ESCULENTA

Comme des dépolarisations suffisamment amples et durables (30 sec) permettent le développement d'un courant sortant oscillant bloqué par la caféine (voir figure 2A, article de Humez et coll., 1995), la caractérisation, l'origine et le mode d'activation de ce courant sont maintenant envisagés dans cette troisième partie. Il s'agit d'un courant chlore Ca^{2+} dépendant, porté par les ions chlorure et dépendant de l'activité intracellulaire des ions Ca^{2+} . Son activation provient en effet de la libération de Ca^{2+} des stocks sensibles à l'InsP₃ suite à une alcalinisation intracellulaire consécutive à l'activation du courant proton. L'ensemble des résultats est présenté sous forme d'un article, ci-après, soumis au journal "Cellular Signalling".

InsP₃ dependent Ca²⁺ oscillations linked to activation of voltage dependent H⁺ conductance.

S. HUMEZ¹, T. COLLIN², F. MATIFAT², P. GUILBAULT¹ and F. FOURNIER¹

¹Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, UFR de Biologie, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq CEDEX and

²Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, Faculté des Sciences exactes et fondamentales, Université de Picardie Jules Verne, 80039 Amiens CEDEX 1, France

Running title: InsP₃ dependent Ca²⁺ oscillations and voltage dependent H⁺ conductance

Key words: oocytes, *Rana esculenta*, pH, H⁺ conductance, inositoltrisphosphate, Ca²⁺.

ABSTRACT

In normal medium supplemented with 10 mM tetraethylammonium chloride (TEACl), membrane depolarizations of immature *Rana esculenta* oocyte elicited an oscillatory outward current associated to a voltage dependent H⁺ current (I_H⁺). The voltage threshold of these oscillations was 22 ± 5 (n= 10). Oscillations were blocked by intracellular injection of ethylene glycol-O,O'-bis-(2-acetaminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), by application of 1 mM of 4-acetamido-4'-isocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS), by caffeine (1mM) and by intracellular injection of heparin suggesting that they arose from calcium release from inositoltrisphosphate (InsP₃) sensitive stores, monitored by a calcium dependent chloride current (I_{Cl}Ca²⁺). They were independent upon external calcium concentration and depolarizations did not affect the InsP₃ level. Ni²⁺, a I_H⁺ inhibitor, blocked oscillations. Extracellular alkalization, which lowers the voltage threshold of I_H⁺ and increased its amplitude, lowered the voltage threshold of oscillations and increased their amplitude whereas extracellular acidification produced opposite effects. We suggest that oscillations are linked to activation of I_H⁺ through a pH dependent sensitization of InsP₃ receptors.

INTRODUCTION:

Rana esculenta oocytes display a voltage dependent K^+ conductance and as well as a calcium dependent chloride conductance (1,2). In a recent study, we have demonstrated that this oocyte also displays a pH sensitive and voltage dependent H^+ current (I_{H^+} , 3). I_{H^+} is activated for potential values more positive than 0 mV at a 7.45 pH. Amplitude of I_{H^+} and its voltage threshold were sensitive to external and internal pH variations. To summarize, either extracellular alkalinization or intracellular acidification enhances I_{H^+} and shifts its voltage threshold to hyperpolarized membrane potential, whereas extracellular acidification or intracellular alkalinization produce opposite effects. In addition, we also show that activation of I_{H^+} was able to promote a strong intracellular H^+ depletion, i.e. an intracellular alkalinization. I_{H^+} isolation and its analysis were made in presence of TEACl (10 mM) to inhibit K^+ conductance and in the presence caffeine (10 mM) the well known inhibitor of Ca^{2+} release from $InsP_3$ sensitive stores precisely to inhibit the oscillatory current. In effect, depolarization of *Rana* oocytes evoked a large oscillatory outward current, which is blocked by this inhibitor. The purpose of this present study was to analyse this oscillatory current. We report hereby that the oscillatory outward directed current is activated by depolarization and reflects a calcium liberation from $InsP_3$ sensitive stores through a calcium dependent chloride current ($ICl_{Ca^{2+}}$). These $ICl_{Ca^{2+}}$ oscillations are independent upon activation of voltage dependent calcium channels and do not arise from any voltage mediated variations of the $InsP_3$ level. Finally, we postulate that I_{H^+} activation by depolarization was strongly linked to the facilitation of the Ca^{2+} release from $InsP_3$ sensitive stores, probably via the intracellular alkalinization produced by activation of I_{H^+} .

MATERIALS AND METHODS:

Rana esculenta were purchased from Arthus Frères (85690 Notre Dame de Mont, France). Pieces of the ovary were surgically removed and individual oocytes were dissected in ND96 solution (mM): NaCl, 96; KCl, 2; MgCl₂, 2; CaCl₂, 1.8 and N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES), 5; pH 7.45 titrated with NaOH. The oocytes with the largest diameter corresponding to the stage VI (Dumont 1972) were selected. Oocytes were treated for 2-3h with collagenase (type IVA; 2mg/ml in Ca²⁺ free medium to discard follicular cells. Oocytes were kept for 2-6 days at 19°C in the physiological solution supplemented with gentamicin (50 mg/ml).

Electrophysiological measurements were performed using the standard dual microelectrodes voltage clamp technique. Oocytes were placed in a recording chamber (300 µl) and impaled with electrodes filled with 3M KCl. Oocyte was maintained under voltage clamp conditions by using a Dagan 8500 amplifier (Minneapolis, USA). Stimulation of the preparation, data acquisition and analysis were performed using the pClamp 5.5 software (Axon Instrument, Burlingame, USA). In addition, membrane currents were continuously displayed using the BIO 1000 software (Nortek, Villeneuve d'Ascq, France). The ND96 solution supplemented with tetraethylammonium chloride (TEACl) at a 10 mM concentration was routinely used. Removal of extracellular calcium was compensated by adequate modification of cation concentration (Mg²⁺). For intracellular injection, an additional micropipette (3- 10 µm tip diameter) was used and all pressure injected compounds (heparin and EGTA) were dissolved in HEPES / KOH pH 7.35.

To determine InsP₃ level, oocytes were incubated overnight at 20° C in ND 96 supplemented with 10 µCi/ml of myo-(2-³H) inositol. After extensive washing, cells were preincubating for 3 minutes with 7.5 mM LiCl in ND96 medium. 15 oocytes were used for each experimental conditions. After the test, the reaction was stopped by the addition of perchloric acid to 0.5 M and oocytes were homogenised. After centrifugation to discard vitellus and lipids, cell extracts were neutralized with 1.5 M KOH in 75 mM

HEPES and applied to Dowex AG 1x8 columns (formate form). A first elution was performed using 0.4 M ammonium formate/0.1 M formic acid and a second using 1.2 ammonium formate/0.1 M formic acid to eluate firstly glycerophosphates, inositols monophosphates and inositols bisphosphates and secondly inositols trisphosphates and inositols tetrakisphosphates. The radioactivity of the fractions eluted was counted in a liquid scintillation counter. These experiments were made in triplicate.

The variability of the results was expressed as the standard deviation with n indicating the number of oocytes contributing to the mean

RESULTS AND DISCUSSION

Experiments were conducted in ND 96 medium supplemented with 10 mM TEACl (NDTEA) to prevent activation of the K^+ conductance currently observed in *Rana esculenta* oocytes (1)

DEPOLARIZATION INDUCES CALCIUM DEPENDENT CHLORIDE CURRENT OSCILLATIONS IN RANA OOCYTE.

Fig. 1 depicts typical current traces obtained in response to various voltage steps from a holding potential of -60mV. An oscillatory current appears from a threshold of +20mV. Moreover, a ramp protocol allowed us to precisely determine the voltage threshold of these oscillations at $+22 \pm 5$ mV ($n=10$; data not shown). These depolarization-induced oscillations were blocked when SITS (1mM, final concentration) was added to the superfusate ($n=6$; fig. 2A). Furthermore, the oscillations vanished when chloride ions were substituted with methane sulphonate ions in the external solution ($n=7$; data not shown). Intracellular injection of the calcium chelator EGTA (25 μ M, final concentration) led to a complete inhibition of the oscillatory current ($n=5$; fig. 2B) suggesting an involvement of internal calcium activity in the development of this outward current. These data led us to conclude that our oscillations are supported by a calcium dependent chloride conductance which has been previously described in *Rana* oocytes by Tosselli et al. (2). Our experimental conditions allow the already reported H^+ conductance (3) to develop in addition to IClCa. I_{H^+} clearly remains after chloride conductance blockade (fig.2).

In order to investigate the possible involvement of the intracellular calcium stores in the firing process of these oscillations, various putative antagonists of the InsP₃ receptor were tested. Either intracellular injection of heparin (50 μ g/ml final concentration) or superfusion of caffeine (1mM) totally blocked the oscillatory current. These latter results tend to demonstrate that the oscillations depend on a release from InsP₃-sensitive calcium pools.

Taken together, our results show that depolarization of *Rana* oocyte membrane promotes an increase in internal calcium activity mediated by the InsP₃ calcium stores.

DEPOLARIZATION INDUCED OSCILLATIONS DO NOT DEPEND EITHER ON INSP₃ FORMATION OR ON ACTIVATION OF CALCIUM ENTRY.

In order to test whether depolarization could lead to InsP₃ formation, we measured the level of this second messenger before and after depolarization. No significant changes were observed concerning InsP₃ level in both conditions (8132.5±486.9 cpm vs 8179± 457.7, n=3; table 1). This result ruled out the possible coupling between depolarization and phospholipase C activation as suggested by Vergara et al. (4). In *Xenopus* oocytes, either activation of heterologous voltage dependent calcium channels or enhancement of endogenous channels by expression of calcium channel β subunit sensitize InsP₃ dependent calcium signalling (5, 6, 7). In that respect, the extracellular calcium dependency of the oscillatory $I_{Cl_{Ca^{2+}}}$ was investigated. As illustrated in fig. 3, removal of extracellular calcium does not affect the development of the oscillatory current (n=16). In addition, depolarizing voltage steps approaching the calcium equilibrium potential (estimated at +90mV) or up to this potential still evoked calcium dependent chloride current oscillations (data not shown). These results clearly demonstrate that voltage dependent calcium channels do not seem to be implicated in the oscillatory process. Nevertheless, a sensitization of calcium release by membrane potential could occur via the calcium current activated by depletion of InsP₃ sensitive stores (I_{crac}) described in *Xenopus* oocytes (8). Such a sensitization of calcium release from InsP₃ sensitive pools only occurs when oocytes are preloaded with a non-hydrolysable analog of InsP₃ (8) suggesting that I_{crac} is not activated in resting oocytes (9). Bathing the *Rana* oocytes in a calcium-free solution did not prevent the appearance of the oscillatory current (data not shown). Taken together, our results provide strong evidence for total independence between oscillations and calcium entry.

POSSIBLE INVOLVEMENT OF THE VOLTAGE DEPENDENT H⁺ CONDUCTANCE IN TRIGGERING CALCIUM LIBERATION FROM INSP₃ SENSITIVE STORES.

It is now well demonstrated that calcium release from InsP₃ sensitive pools shows a clear pH dependency. Several authors have shown that binding of InsP₃ to its receptor increases with a rise in pH (10, 11, 12). In addition, a rise in pH also potentiates calcium release by increasing calcium sensitivity of InsP₃ sensitive pools (13). We recently reported that a depolarization up to 0mV activates a H⁺ current in *Rana* oocytes (3). Moreover, the development of the resulting current led to a strong intracellular H⁺ depletion which may cause a cellular alkalinization. In that respect, we investigated the relation between I_{H⁺} and the voltage induced calcium oscillations. Extracellular application of Ni²⁺, a well known H⁺ current inhibitor, prevents the development of the oscillatory pattern (n=7, fig. 4). This result allows us to drain out this hypothesis according to which ICl_{Ca}²⁺ could be directly regulated by pH. To confirm the implication of I_{H⁺} in the induction process of calcium release from InsP₃ sensitive stores, we tested the effects of various extracellular pH values. As shown in fig. 5, extracellular acidification from 7.45 to 6.45 shifted the voltage threshold of the oscillatory ICl_{Ca}²⁺ to roughly +30mV (n=6) and dramatically decreased its amplitude for the same potential. Inversely, extracellular alkalinization to pH 8,45 evoked a shift of the voltage threshold of the oscillatory current to 0mV (n=6) and clearly increased its amplitude. It is of interest to recall that I_{H⁺} presents the same reactivity in response to extracellular pH changes i.e. : i) shift of the voltage dependence threshold to the depolarizing values, decrease in the amplitude with extracellular acidification; ii) shift of the voltage threshold to hyperpolarizing values and increase in the amplitude with extracellular alkalinization (3). These data strongly suggest a correlation between I_{H⁺} activation and the appearance of ICl_{Ca}²⁺ oscillatory pattern. It is well demonstrated that I_{H⁺} activation in a variety of models including *Rana* oocytes induces a sustained H⁺ depletion which causes an intracellular alkalinization (for review, see 14). We therefore propose that an H⁺ depletion promoted by activation of I_{H⁺} could be the way by which depolarization sensitizes calcium release in our model. Alkalinization could act either i) by increasing the

calcium sensitivity of the InsP₃ receptor (13); or ii) by increasing the basal calcium leak of the InsP₃ sensitive stores (15, 16) and thus increase the calcium concentration around the InsP₃ receptor leading to a calcium sensitization process (17).

CONCLUSION

All the data presented in this study tend to demonstrate that in *Rana esculenta* oocytes, membrane depolarizations indirectly trigger Ca²⁺ release from InsP₃ sensitive stores. This Ca²⁺ release seems to be promoted by activation of the H⁺ conductance. So we suggest that the link between H⁺ current activation and Ca²⁺ release from the InsP₃ sensitive stores occur via the alkalinisation promoted by H⁺ current activation.

FIGURE LEGEND

Figure 1

Outward oscillatory current induced by depolarizations. Current traces recorded after shifting the membrane potential to the values indicated above the traces from a holding potential of -60 mV every 3 minutes, in ND 96 supplemented with 10 mM TEACl.

Figure 2

The oscillatory outward current induced by depolarization arises from calcium release from InsP_3 sensitive store monitored by $\text{ICl}_{\text{Ca}^{2+}}$. All experiments were performed in ND96 supplemented with TEACl (10 mM). Membrane potential was stepped from -60 mV to 40 mV during 32 s with a 3 min. period. A- effect of external application of SITS (1 mM) on the oscillatory current B- effect of intracellular injection of EGTA (25 μM , final intracellular concentration) C- effect of intracellular injection of heparin (50 $\mu\text{g/ml}$, final intracellular concentration).D- effect of external application of caffeine (1 mM).

Figure3

The oscillatory current did not depend upon the presence of external calcium. All experiments were performed in ND96 supplemented with TEACl (10 mM). The membrane potential was stepped from -60 mV to 40 mV during 32 sec. A- control trace. B- current oscillations recorded after 5 min of application of a calcium free medium supplemented with TEA (10 mM).

Figure 4:

Effect of Ni^{2+} (1 mM) on the oscillatory current. Effect of addition of 1 mM Ni^{2+} , a H^+ current blocker, on oscillation induced by a depolarization to 40 mV from -60 mV during 32 sec in the ND96 medium supplemented with TEA (10 mM).

Figure 5:

Amplitude and voltage threshold of the oscillatory current are sensitive to the extracellular pH. Iterative membrane potential pulses from -60 mV to -10, 0, 10, 20, 30 mV were performed every 3 minutes in ND96 supplemented with TEACl (10

mM) at various pH values. A- Currents recorded at pH 6.45. B- currents recorded at pH 7.45 . C- currents recorded at pH 8.45.

Table 1:

InsP₃ level was measured on Rana oocyte cytosolic extracts on control and depolarized conditions. Depolarized oocytes were voltage clamped at +40 for 60 seconds in ND supplemented with TEACl (10 mM). Results expressed in cpm± standard deviation are the mean of three distinct experiments. No significant changes were observed in terms of InsP₃ level.

REFERENCES:

1. Peres A., Bernardini G., Mancinelli E. and Ferroni, A. (1985) *Pflügers Arch.* **403**, 41-46.
2. Toselli M., Taglietti V., Tanzi F. and D'angelo E. (1989) *Archives Italiennes de Biologie* **127**, 69-80.
3. Humez S., Fournier F. and Guilbault, P. (1995) *J. Membrane Biol.* **147**, 207-215
4. Vergara J, Tsien R. Y. and Delay M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6352-6356
5. Yao, Y. and Parker J. (1992) *J. Physiol.* **458**, 319-338
6. Fournier F., Navarre P., Matifat F., Vilbert C., Collin T., Guilbault P., Brûlé G. and Marlot, D. (1994) *Cell Calcium* **15**, 411-422
7. Matifat F, Collin T., Humez S., Brûlé G. and Fournier F. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 440-446
8. Yao Y. and Parker I. (1994) *J. Physiol.* **476.1** 17-28
9. Petersen C.C.H. and Berridge M.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 32246-32253
10. Worley P.F., Baraban J.M., Supattapone S., Wilson V. and Snyder S.H.(1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12132-12136
11. Guillemette G. and Segui J.A. (1988) *Molecular endocrinology* **2**, 1249-1255
12. Joseph S.K., Rice H.L. and Williamson J.R. (1989) *Biochem. J.* **258**, 261-265
13. Tsukioka M., Iino M. and Endo M. (1994) *J. Physiol .* **475.3**, 369-375
14. DeCoursey T.E.and Cherny, V.V. (1994). *J. Membrane Biol.*. **141**: 203-223
15. Watanabe T, Lewis D, Nakamoto R., Kurzmack M., Fronticelli C. and Inesi G. (1981) *Biochemistry* **20**, 6617-6625
16. Parys J.B., Missiaen L., DeSmedt H. and Casteels R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 25206-25212
17. Bezprozvanny I., Watras J.and Erlich B.E.(1991) *Nature* **241**, 197-205

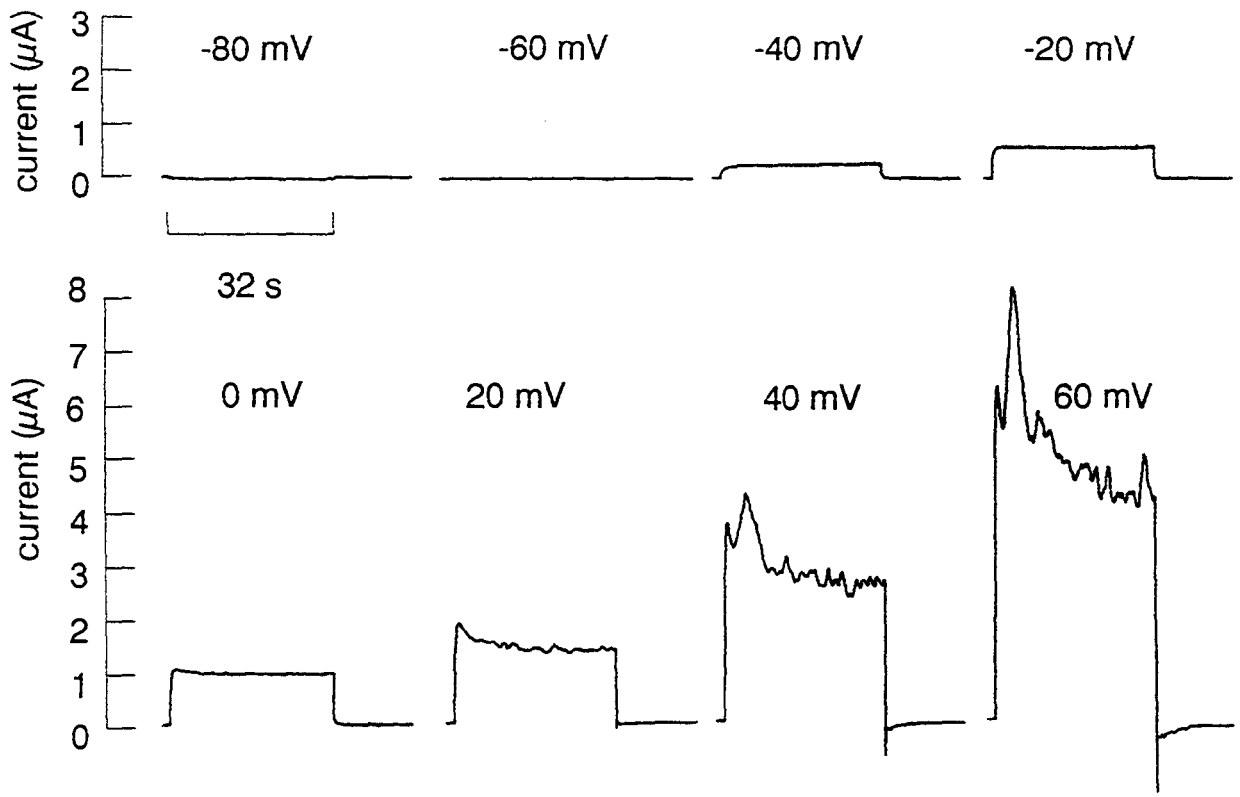


Figure 1

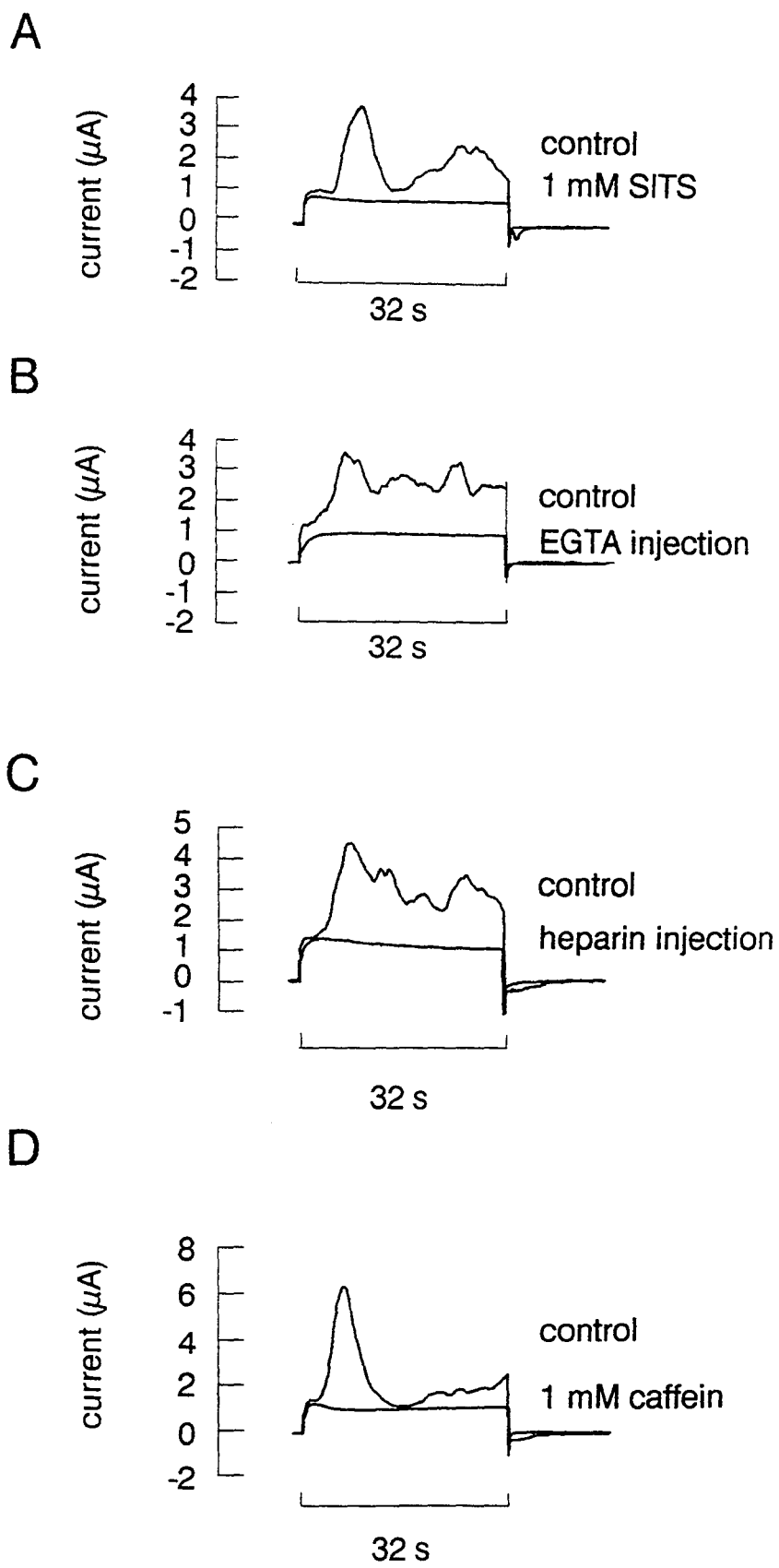


Figure 2

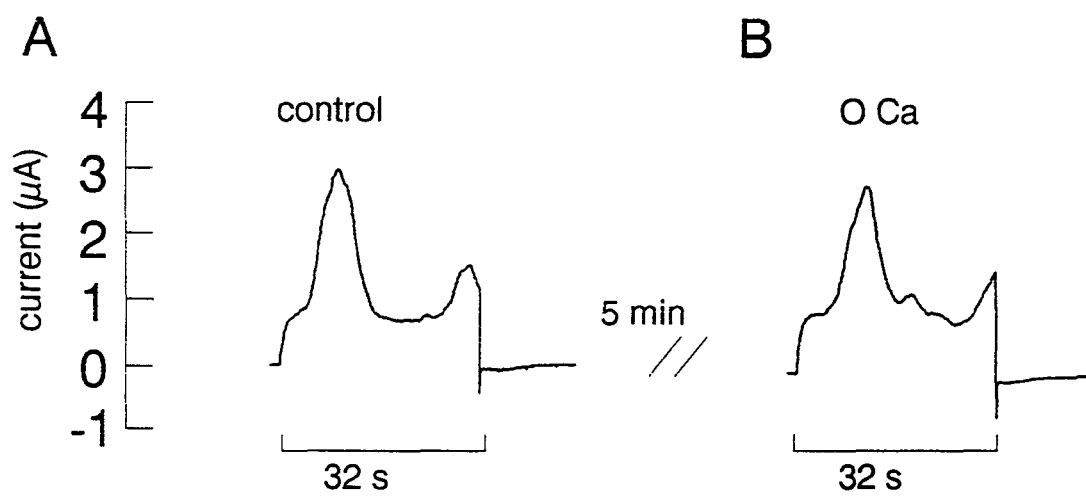


Figure 3

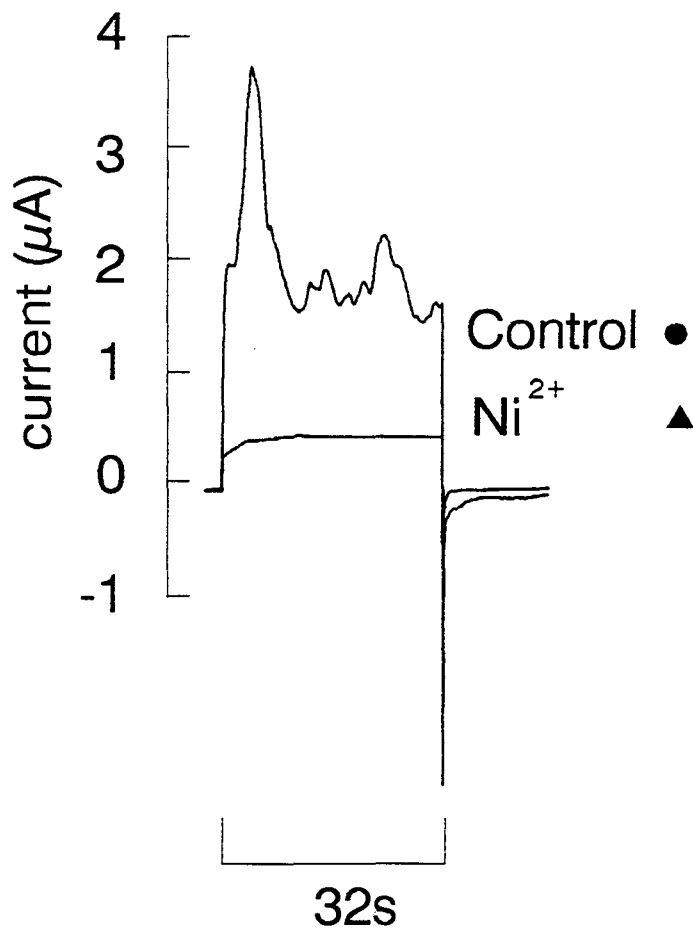


Figure 4

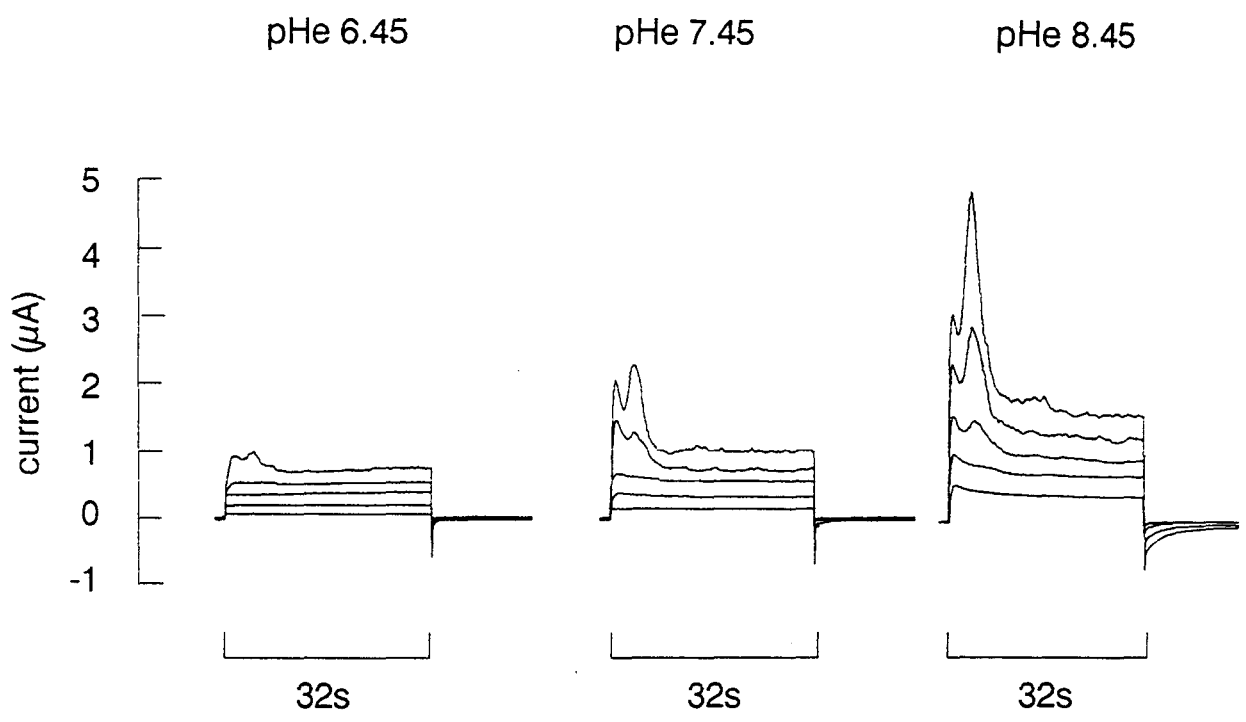


Figure 5

blank (cpm)	control (cpm)	depolarized (cpm)
41.1 ± 11.4	8 179 ± 457.7	8 132,5 ± 486,9

Tableau 1

Quatrième Chapitre: Conclusion Générale et Perspectives

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail a concerné d'une part la caractérisation d'une conductance voltage-dépendante sélective aux ions H^+ et d'autre part la relation liant l'alcalinisation du milieu intracellulaire qu'induit l'activation du courant sortant d'ions H^+ à la sensibilisation de la libération de Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique sensible à l'InsP₃.

Si, depuis quelques années, un nombre restreint d'Equipes de recherche travaille sur la conductance proton et son rôle dans la régulation du pH intracellulaire, il n'empêche qu'il existe maintenant à disposition un nombre important de données bibliographiques sur le sujet. Néanmoins, la valeur de la conductance unitaire ainsi que sa nature moléculaire ne sont pas encore connues, cette conductance n'est donc à l'heure actuelle qu'estimée, sa valeur serait de 10 fS. Quelques données récentes permettent cependant de confirmer qu'au moins dans les cellules des alvéoles pulmonaires, "le canal proton" posséderait deux états fermés et sa voltage-dépendance serait sous le contrôle du gradient de pH de part et d'autre de la membrane cellulaire et non plus sous le contrôle d'une valeur absolue de pH externe ou interne (Cherny et coll., 1995). Quant à la nature moléculaire de l'unité fonctionnelle de la conductance aux ions H^+ , elle reste encore très énigmatique puisque, par exemple, les résultats récents concernant le rôle que peut jouer la protéine gp91-phox, sont relativement contradictoires.

Dans ce cadre nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les aquaporines pourraient être le support moléculaire de la conductance proton. En effet, ces aquaporines sont des canaux particuliers, appelés canaux aqueux, elles pourraient ainsi correspondre sur le plan moléculaire aux canaux laissant passer les protons. Ces canaux aqueux, mis en évidence pour la première fois en 1992 (Preston et al, 1992), permettant le passage de l'eau, pourraient aussi laisser passer les protons, si est prise en compte la faible conductance unitaire estimée (10 fS). A l'appui de cette hypothèse, il peut être mentionné les travaux de Abrami et coll. (1995). En effet, lors du Congrès sur les "Canaux ioniques" qui s'est tout récemment déroulé en septembre 1995 en France, à La Londe les Maures, il a été précisé au cours d'exposés sur les aquaporines, que l'



ovocyte de Xénope est utilisé couramment comme modèle de recombplémentation pour des études visant à analyser le fonctionnement de ces molécules, puisque cet ovocyte n'exprime pas ou peu de canaux aqueux. A l'inverse, l'ovocyte de *Rana esculenta* exprime très fortement l'aquaporine (CHIP28). Rappelons aussi, qu'à l'inverse de l'ovocyte de *Rana esculenta*, l'ovocyte de Xénope ne possède pas de conductance proton voltage-dépendante. Dans ces conditions, si, est émise l'hypothèse que les aquaporines peuvent laisser s'écouler à travers elles un flux d'ions H^+ , il peut être proposé que dans l'ovocyte de *Rana esculenta*, le support moléculaire de la conductance proton pourrait bien être la molécule d'aquaporine. Il apparaît ainsi intéressant, puisque l'ovocyte de Xénope ne possède ni de conductance proton ni de canaux aqueux, de tester dans ce système de recombplémentation, l'expression de l'aquaporine CHIP28 en tentant de mettre en évidence un éventuel courant proton activé lors d'une dépolarisation conformément à nos résultats d'expériences réalisées sur l'ovocyte de grenouille.

Quant au rôle physiologique de la conductance proton, dans l'ovocyte de *Rana esculenta*, il reste totalement à découvrir. Il est toutefois bien connu qu'une alcalinisation intracellulaire se produit lors de la maturation des ovocytes d'amphibiens (Houle & Wasserman, 1983; Rezaï & Wasserman, 1994). A ce titre, il est possible de se demander si, dans l'ovocyte de grenouille, le "canal proton" activé notamment au cours de la dépolarisation par un modulateur positif, ne serait pas à l'origine de l'alcalinisation intracellulaire qui est aussi liée au processus de maturation. Dans cette perspective, il peut être envisagé l'étude de l'expression et de la régulation, du canal proton ainsi que son devenir durant les processus physiologiques de la maturation ovocytaire. En effet, dans l'ovocyte d'Ambystome, la conductance proton "disparaît" au cours de la maturation pour faire place à une conductance sodique (Baud & Barish, 1984). Cependant la disparition du courant porté par les protons lors de la maturation n'implique pas que le canal proton en tant que structure moléculaire ait disparu de la membrane cellulaire puisque, dans notre travail, est montré que l'alcalinisation du milieu intracellulaire, induite par l'application extracellulaire de NH_4Cl , déplace le seuil

de potentiel d'activation de la conductance dans le sens des potentiels positifs. Que peut-il alors se passer si, par des manoeuvres expérimentales appropriées, est induite une diminution de pH intracellulaire lors de la maturation?. Il est possible qu'un courant proton activé par la dépolarisation puisse encore se développer (ce qui reste à démontrer), impliquant dans ce cas la présence effective du canal proton dans la membrane ovocytaire.

Enfin, dans ce mémoire, est montré que l'alcalinisation intracellulaire engendrée par l'activation de la conductance proton, provoque une sensibilisation de la libération de Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique sensible à l' InsP_3 . Cette influence ne peut-elle pas encore s'exercer au cours de la maturation ou au cours des premiers stades de développement embryonnaire quand est justement observée une augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire?.

Quoiqu'il en soit, cette conductance proton qui était encore, il y a quatre ans, considérée comme anecdotique, secondaire dans les processus physiologiques, est maintenant de plus en plus prise en compte pour décrire pleinement les phénomènes de régulation du pH intracellulaire au même titre que les échangeurs et les pompes. Cette conductance est aussi prise en compte pour expliquer les divers processus de régulation du taux de Ca^{2+} intracellulaire.

Références

References:

Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C. G., Segal, A. W. 1991. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21 rac1. *Nature*. **353**: 668-670.

Abrami, L., Capurro, C., Ibarra C., Parisi, M., Buhler, J. M., Ripoche, P. 1995. Distribution of mRNA encoding the FA-CHIP water channel in amphibian tissues: effects of salt adaptation. *J. Memb. Biol.* **143**. 199-205.

Ahmed, Z., Connor, J. A. 1980. Intracellular pH changes induced by calcium influx during electrical activity in molluscan neurones. *J. Gen. Physiol.* **75**: 403-426

Alpern, R. J., Yamaji, Y., Cano, A., Horie, S., Miller, R. T., Moe, O. W., Preisig, P. A. 1993. Chronic regulation of the Na/H antiporter. *J. Lab. Clin. Med.* **122**: 137-140

Aickin, C. C. 1994a. Regulation of the intracellular pH in the smooth muscle of guinea-pig ureter: Na⁺ dependence. *J. Physiol.* **479.2**: 301-316

Aickin, C. C. 1994b. Regulation of the intracellular pH in the smooth muscle of guinea-pig ureter: HCO₃⁻ dependence. *J. Physiol.* **479.2**: 317-329

Aickin, C. C. 1994c. Regulation of intracellular pH in smooth muscle cells of the guinea-pig femoral artery. *J. Physiol.* **479.2**: 331-340

Arosen, P. S., Nee, J., Suhm, N. A. 1982. Modifier role of internal H⁺ in activating the Na⁺/H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicle. *Nature*. **299**: 161-163

Arosen, P. S. 1985. Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger. *Ann. Rev. Physiol.* **47**: 545-560

- Bahnson, T. D., Pando, S. J., Dionne, V. E. 1993. Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca^{2+} entry in preneuretic acinar cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 10808-10812.
- Barish, M. E., Baud, C. 1984. A voltage-gated hydrogen ion current in the oocyte membrane of the Axolotl, *Ambystoma*. *J. Physiol.* **352**: 243-263.
- Baud, C., Barish, M.E. 1984. Change in membrane hydrogen and sodium conductances during progesterone-induced maturation of *Ambystoma* oocytes. *Dev. Biol.* **105**: 423-434.
- Baud, C, Kado, R. T., Marcher, K. 1982. Sodium channels induced by depolarization of the *Xenopus leavis* oocyte. *Proc. Natl. Sci. USA.* **79**: 3188-3192.
- Beam, K. G., Knudson, C. M., Powel, J. A. 1986. A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. *Nature.* **320**: 168-170.
- Bernheim, L., Krause, R.M., Baroffio, A., Hamann, M., Kaelin, A., Bader, C.R. 1993. A voltage-dependent proton current in cultured human skeletal muscle myotubes. *J. Physiol.* **470**, 313-333.
- Berridge, M. J. 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature.* **361**: 315-325.
- Bers, D. M., Sliffel, V. M. 1994. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am. J. Physiol.* **264**: C 1587-1593.
- Bezprozvanny, I., Watras, J, Ehrlich, B. E. 1991. Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature.* **351**: 751-754.
- Bianchini, L., Pouyssegur, J. 1994. Molecular structure and regulation of vertebrate Na^+/H^+ exchangers. *J. Exp. Biol.* **196**: 337-345

- Biel, M., Hullin, R., Freundner, S., Singer, D., Dascal, N., Flockerzi, V., Hofman, F. 1991. Tissue-specific expression of high-voltage-activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur. J. Biochem.* **200**: 81-88.
- Bode, H. P., Eder, B., Trautmann, M. 1994. An investigation on the role of vacuolar-type proton pumps and luminal acidity in calcium sequestration by nonmitochondrial and inositol-1,4,5-triphosphate-sensitive intracellular calcium stores in clonal insulin-secreting cells. *Eur. J. Biochem.* **222**: 869-877.
- Boron, W. F., Boulpaep, E. L. 1983. Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of salamander-basolateral HCO₃⁻ transport. *J. Gen. Physiol.* **81**: 53-94
- Bourinet, E., Fournier, F., Nargeot, J., Charnet, P. 1992. Endogenous *Xenopus*- oocyte Ca-channels are regulated by protein kinases A and C. *FEBS. Lett.* **299**: 5-9.
- Brown, H. M., Meech, R. W. 1979. Light induced changes of internal pH in a barnacle photoreceptor and the effect of internal pH on the receptor potential. *J. Physiol.* **297**: 73-93.
- Brown, H. M., Meech, R. W., Thomas, R. C. 1976. pH changes induced by light in a large *Balanus* photoreceptors. *Biophysical journal.* **16**: 33a
- Burckhardt, B. C., Kroll, B., Fromter, E. 1992. Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus leavis* oocytes. *Pflügers Arch.* **420**: 78-82.
- Byerly, L., Hagiwara, S. 1982. Calcium currents in internally perfused nerve cell bodies of *Limnea stagnalis*. *J. Physiol.* **322**: 503-528.
- Byerly, L., Meech, R., Moddy, W. 1984. Rapidly activating hydrogen ion currents in perfused neurones of the snail, *Lymnea stagnalis*. *J. Physiol.* **351**: 199-216.

Byerly, L., Suen, Y. 1989. Characterization of proton currents in neurone of the snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Physiol.* **413**: 75-89.

Casavola, V., Reshkin, S. J., Murer, H., Helme-Kolb, C. 1992. Polarized expression of Na⁺/H⁺ exchange activity in LLC-PK1/PKE 20 cells: II. Hormonal regulation. *Pflügers Arch.* **420**: 282-289.

Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L., Perez-Reyes, E. 1993a. Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *J. Biol. Chem.* **268**: 3450-3555.

Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L., Perez-Reyes, E. 1993b. Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit. *J. Biol. Chem.* **268**: 12359-12366.

Caswell, A. H., Brant, N. R., Brunschwing, J. P., Purkerson, S. 1991. Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95.000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry.* **30**: 7507-7513.

Cherny, V. V., Simonova, M. V., Solokov, V. S., Markin, V. S. 1990. Transport of neutral form of amphiphilic drugs through a planar bilayer lipid membrane: the role of the pH gradient. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **23**: 17-25.

Cherny, V.V, Markin, V. S., DeCoursey, T. E. 1995. The voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient. *J. Gen. Physiol.* **105**: 861-896

Cicirelli, M. F., Robinson, K. R., Dennis Smith, L. 1983. Internal pH of *Xenopus* oocytes: a study of the mechanism and role of pH changes during meiotic maturation. *Dev. Biol.* **100**: 133-146.

Clapham, D. E. 1995. Calcium signalling. *Cell.* **80**: 259-268.

Cohen, M. E., Wesolek, J., Mc Cullen, J., Rys-Sikora, K., Pandol, S., Rood, R. P., Sharp, G. W. G., Donowitz. 1991. Carbachol- and elevated Ca^{2+} - activated translocation of functionally active protein kinase C to the brush border of rabbit ileal Na^+ absorbing cells. *J. Clin. Invest.* **88**: 855-963

Collin, T., Wang, J. J., Nargeot, J., Shwartz, A. 1993. Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel β subunit from normal human heart. *Cir. Reseach.* **72**: 1337-1344.

Collin, T., Lory, P., Taviaux, S., Courtieu, C., Guilbault, P., Berta, P., Nargeot, J. 1994. Cloning, chromosomal location and fonctionnal expression of the human voltage dependent calcium channel $\beta 3$ subunit. *Eur. J. Biochem.* **220**: 257-262.

Collins, J., Honda, T., Knobel, S., Bulus, N. M., Conary, J., Dubois, R., Ghishan, F. K. 1993. Molecular cloning, sequencing, tissue distribution, and fonctional expression of the Na^+/H^+ exchanger (NHE-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 3938-3942.

Counillon, L., Scholz, W., Lang, H. J., Pouysségur, J. 1993. Pharmacological characterization of stably transfected Na^+/H^+ antiporter isoforms using amiloride analogs of a new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Mol. Pharmacol.* **44**: 1041-1045.

Curnutte, J. T. 1992. Molecular basis of the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Immunodef. Rev.* **3** (2): 149-167.

Danoff, S. K., Ferris, C. D., Donath, C., Fischner, G. A., Munemitsu, S., Ullrich, A., Snyder, S. H., Roos, C. A. 1988. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors: distinct neuronal and nonneuronal forms derived by alternative splicing differ in phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 2951-2955.

Dascal, N. 1987. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ions channels. *Crit. Rev. in Biochem.* **22**: 317-387.

DeCoursey, T. E. 1991. Hydrogen ion current in alveolar epithelial cells. *Biophysical journal*. **60**: 1243-1253.

DeCoursey, T. E., Cherny, V. V. 1993. Potential, pH, and arachidonate gate hydrogen ion currents in human neutrophils. *Biophysical journal*. **65**:1590-1598

DeCoursey, T. E., Cherny, V. V. 1994 a. Voltage-activated hydrogen ion currents. *J. Membrane Biol.* **141**: 203-223

DeCoursey, T. E., Cherny, V. V. 1994 b. Na⁺/H⁺ antiport detected through hydrogen ion currents in rat alveolar epithelial cells and human neutrophils. *J. Gen. Physiol.* **103**: 755-785.

DeLisle, S., Pittet, D., Potter, B. L. V., Lew, P. D., Welsh, M. J. 1992. InsP₃ and Ins (1, 3, 4, 5)P₄ act in synergy to stimulate influx of extracellular Ca²⁺ in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* **262**: C1456-C1463.

Demaurex, N., Grinstein, S., Jaconi, M., Schegel, W., Lew, D. P., Krause, K. H. 1993a. Proton currents in human granulocytes: regulation by membrane potential and intracellular pH. *J. Physiol.* **466**: 329-344.

Demaurex, N., Schrenzel, J., Jaconi, M. E., Lew, D. P., Krause K. H. 1993 b. Proton channels, plasma membrane potential, and respiratory burst in human neutrophils. *Eur. J. Haematol.* **51**:309-312.

Demaurex, N., Grinstein, S. 1994. Na⁺/H⁺ antiport: modulation by ATP and rôle in cell volume regulation. *J. Exp. Biol.* **196**: 389-404.

Dumont, J. N. 1972. Oogenesis in *Xenopus leavis* (Daudin) I. Stages of the oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136**: 153-180.

Eklund, E. A., Marshall, M., Gibbs, J. B., Crean, C. D., Gabig, T. G. 1991. Resolution of a low molecular weight G protein in neutrophil cytosol required for NADPH oxidase activation and reconstitution by recombinant Krev-1 protein. *J. Biol. Chem.* **266**: 13964-13970.

Endo, M., Tanaka, M., Ogawa, Y. (1970). Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.* **228**: 34-36.

Ehrlich, B. E., Watras, J. 1988. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature.* **336**: 583-586.

Fadool, D. A., Ache, B. W. 1992. Plasma membrane inositol 1, 4, 5-trisphosphate-activated channels mediate signal transduction in lobster olfactory receptor neurons. *Neuron.* **9**: 907-918.

Ferris, C. D. Snyder, S. H. 1992. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-activated calcium channels. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 469-488.

Finch, E. A., Turner, T. J. Goldin, S.M. 1991. Calcium as a coagonist of inositol 1, 4, 5 trisphosphate-induced calcium release. *Science.* **254**: 443-446.

Fliegel, L., Fröhlich, O. 1993. The Na⁺/H⁺ exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. *Biochem. J.* **296**: 273-285

Foskett, J. K., Gunter-Smith, P. J., Melvin, J. E., Turner, R. J. 1989. Physiological localization of an agonist-sensitive pool of Ca²⁺ in parotid acinar cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 167-171.

Fosset, M., Jainovich E., Delpont, E., Lazdunski, M. 1983. (³H)nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **258**: 6086-6092.

Fournier, F., Navarre, P., Matifat, F., Vilbert, C., Collin, T., Guilbault, P., Brûlé, G., Marlot, D. 1994. Interaction between Ca^{2+} release from inositol trisphosphate sensitive stores and Ca^{2+} entry through neuronal Ca^{2+} channels expressed in *Xenopus* oocyte. *Cell Calcium*. **15**: 411-422.

Frelin, C., Vigne, P., Ladoux, A., Lazdunski, M. 1988. The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur. J. Biochem.* **174**: 3-14

Frey, G., Schläpfer, W. R. 1993. pH recovery from intracellular alkalinization in *Retzius* neurone of the leech central nervous system. *J. Physiol.* **462**: 627-643

Fujimoto, T., Nakade, S., Miyawaki, A., Mikoshiba, K. Ogawa, K. 1992. Localization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J. Cell. Biol.* **119**: 1507-1513.

Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., Mikoshiba, K. 1989. Primary structure and functional expression of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature*. **342**: 32-38.

Furuichi, T., Miyawaki, A., Maeda, N., Nakanishi, S., Nakagawa, T., Yoshiwa, S., Mikoshiba, K. 1992. Structure and function of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, in neuroreceptors, Ion channels and the brain (Kawai, N., Nakajima, T., Barnard, E., eds.) 103-111. Elsevier Science Publication, Amsterdam.

Furuichi, T., Kohda, K., Miyawaki, A., Mikoshiba, K. 1994. Intracellular channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**: 294-303.

Furuichi, T., Mikoshiba, K. 1995. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-mediated Ca^{2+} signalling in the brain. *Journal of neurochemistry*. **64**: 953-960.

Galione, A., Lee, H. C., Busa, W. B. 1991. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenate: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*. **253**: 1143-1146.

Garret, I. R., Boyce, B. F., Oreffo, R. O. C., Bonewald, L., Poser, J. Mundy G. R. 1990. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* **85**: 632-639.

Gilbert, D. L., Ehrenstein, G. 1970. Use of fixed charge model to determine the pK of the negative sites on the external membrane. *J. Gen. Physiol.* **55**: 822-825.

Gilly, W. F., Armstrong, C. M. 1982. Divalent cations and activation kinetics of potassium channels in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* **100**: 803-824

Girard, S., Clapham, D. 1993. Acceleration of intracellular calcium waves in xenopus oocyte by calcium influx. *Science*. **260**: 229-232.

Graber, M., DiPaola, J., Hsiang, F., Barry, C., Pastoriza, E. 1991. Intracellular pH in the OK cell. I. Identification of H^+ conductance and observations of buffering capacity. *Am. J. Physiol.* **261**: C1143-C1153

Grinstein, S., Rothstein, A. 1986. Mechanism of regulation of the Na^+/H^+ exchanger. *J. Memb. Biol.* **90**: 1-12

Grinstein, S., Rolin, D., Mason, M. J. 1989. Na^+/H^+ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochem. Biophys. Acta.* **988**: 73-97.

Guillemette, G., Balla, T., Baukal, A. J., Catt, K. J. 1988a. Characterization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors and calcium mobilization in hepatic plasma membrane fraction. *J. Biol. Chem.* **263**: 4541-4548.

Guillemette, G., Segui, J. A. 1988. Effects of pH, reducing and alkylating reagents on the binding and Ca^{2+} release activities of inositol 1, 4, 5-trisphosphate in the bovine adrenal cortex. *Molecular endocrinology*. **2**: 1249-1255.

Gutknecht, J., Tosteson, D. C. 1973. Diffusion of weak acids across lipid bilayer membranes: effect of chemical reactions in the unstirred layers. *Science*. **182**: 1258-1261

Hagiwara, N., Iwasawa, H., Kameyama, M. 1988. Contribution of two types of calcium currents to the pace maker potential of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol*. **395**: 233-253.

Hajjar, R. T., Bonventre, J. V. 1991. Oscillations of intracellular calcium induced by vasopressin in individual Fura2-loaded mesangial cell. *J. Biol. Chem*. **266**: 21589-21594.

Hardie, R. C., Minke, B. 1992. The *trp* gene is essential for light-activated Ca^{2+} channel in drosophila photoreceptors. *Neuron*. **8**: 643-651.

Heisler, S., Lambert, M. 1978. Dissociation of cyclic GMP synthesis from cholinergic-stimulated secretion of protein from rat exocrine pancreas. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. **56**: 395-399.

Henderson, L. M., Chappell, J. B., Jones, O. T. G. 1987. The superoxide-generating NADPH oxidase of the human neutrophils is electrogenic and associated with an H^+ channel. *Biochem. J*. **246**: 325-329

Henderson, L. M., Chappell, J. B., Jones, O. T. G. 1988. Internal pH changes associated with the activity of NADPH oxidase of human neutrophils. *Biochem. J*. **251**: 563-567

Henderson, L. M., Chappell, J. B. 1992. The NADPH-oxidase-associated H^+ channel is opened by arachidonate. *Biochem. J*. **283**: 171-175

Henderson, L. M., Banting, G., Chappell, J. B. 1995. The arachidonate-activable NADPH-oxidase-associated H⁺ Channel. Evidence that gp 91-phox functions as an essential part of the channel. *J. Biol. Chem.* **270**: 5909-5916

Hermann, A., Gorman, A. L. F. 1981. Effect of 4-aminopyridine on potassium currents in a molluscan neurone. *J. Gen. Physiol.* **78**: 63-86.

Hille, B. 1968. Charges and potentials at nerve surface: divalent ions and pH. *J. Gen. Physiol.* **51**: 221-236.

Hladky, S. B., Haydon, D. A. 1972. Ion transfer across lipid membrane in the presence of gramicidin A: I studies of the unit conductance channel. *Biochim. Biophys. Acta.* **274**: 294-312

Hille, B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA

Holevinski, K. O., Jow, F., Nelson, D. J. 1994. Elevation in intracellular calcium activates both chloride and proton currents in human macrophages. *J. Membrane Biol.* **140**: 13-30

Hoth, M., Penner, R. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* **355**: 353-355.

Houle, J.C., Wasserman, W.J. 1983. Intracellular pH plays a role in regulating protein synthesis in *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **97**: 307-312.

Hua, S., Tokimasa, T., Takasawa, S., Furuya, Y., Nohmi, M., Okamoto, H., Kukai, K. 1994. Cyclic ADP-ribose modulates Ca²⁺ release channels for activation by physiological Ca²⁺ entry in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron.* **12**: 1073-1079.

Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F., Flockerzi, V. 1992. Calcium channels β subunit heterogenicity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO. J.* **13**: 885-890.

Humez, S., Fournier, F., Guilbault, P. 1995. A voltage-dependent and pH-sensitive proton current in *Rana esculenta* oocytes. *J. Memb. Biol.* **147**: 207-215.

Iino, M. 1990. Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1, 4, 5- trisphosphate induced Ca^{2+} release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia coeaci. *J. Gen. Physiol.* **95**: 1103-1122.

Iino, M., Endo, M. 1992. Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5- trisphosphate- induced Ca^{2+} release. *Nature.* **360**: 261-265.

Irvine, R. F. 1990. " Quantal" Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates. A possible mechanism. *FEBS. Lett.* **263**: 5-9.

Irvine, R. F., Moor, R. M. 1986. Micro-injection of inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca^{2+} . *Biochem. J.* **240**: 917-920.

Irvine, R. F., Moor, R. M. 1987. Inositol (1, 3, 4, 5) tetrakisphosphate-induced activation of sea urchin eggs requires the presence of inositol trisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**: 284-290.

Irvine, R. F. 1992. Inositol phosphates and Ca^{2+} entry towards a proliferation or a simplification? *Faseb J.* **6**: 3085-3091.

Jacob, R., Merrit, J. E., Hallan, T. J., Rink, T. J. 1988. Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells. *Nature.* **335**: 40-45.

Jay, S. D., Sharp, A. H., Kahl, S. D., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., Campbell, K. P. 1991; Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel $\alpha 2$ -subunit and the associated δ peptide. *J. Biol. Chem.* **266**: 3287-3293.

Joseph, S. K., Rice H. L., Williamson, J. R. 1989. The effect of external calcium and pH on inositol trisphosphate-mediated calcium release from cerebellum microsomal fractions. *Biochemical Journal.* **258**: 261-265.

Kapus, A., Szaszi, K., Ligeti, E. 1992. Phorbol 12-myristate 13-acetate activates an electrogenic H^{+} -conducting pathway in the membrane of neutrophils. *Biochem. J.* **281**: 697-701.

Kapus, A., Susztak, K., Ligeti, E. 1993 a. Regulation of the electrogenic H^{+} channel in the plasma membrane of neutrophils: possible role of phospholipase A2, internal and external protons. *Biochem. J.* **292**: 445-450

Kapus, A., Romarek, R., Yi Qu, A., Rotstein, O. D., Grinstein, S. 1993 b. A pH sensitive and voltage dependent proton conductance in the plasma membrane of macrophages. *J. Gen. Physiol.* **102**: 729-760.

Kawanishi, T., Blank, L. M., Karoolunian, A. T., Smith, M. T., Tsien, R. Y. 1989. Ca^{2+} oscillations induced by hormonal stimulation of individual Fura2-loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **264**: 12859-12866.

Keicher, E., Meech, R. 1994. Endogenous Na^{+} - K^{+} (or NH_4^{+})- 2Cl^{-} cotransport in *Rana* oocytes; anomalous effect of NH_4^{+} on pHi. *J. Physiol.* **475**.1: 45-57.

Key, L. L., Ries, W. L., Taylor, R.G., Hays B. D., Pitzer, B. L. 1990. Oxygen derived free radicals in osteoclasts: the specificity and location of the nitroblue tetrazolium reaction. *Bone.* **11**: 115-119.

Khan, A. A., Steiner, J. P., Klein, M. G., Schneider, M. F., Snyder, S. H. 1992. IP₃ receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor. *Science*. **257**: 815-818.

Kidman, L. A., Meyer, T. 1993. Use of intracellular Ca²⁺ stores from rat basophilic leukemia cells to study the molecular mechanism leading to quantal Ca²⁺ release by inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Biochemistry*. **32**: 1270-1277.

Kostyuk, P. G, Krishtal, O. A.,1977. Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones. *J. Physiol*. **270**: 545-568.

Kim, S. Y., DeCoursey, T. E., Silver, M. R.1994. Ion channels in the human cell line TPH-1. *Biophys. J.* **66**.A328

Knaus, U. G., Heywoth, P. G., Evans, T., Curnutte, J. T., Bokoch, G. M. 1991. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science*. **254**: 1512-1515

Kuno, M, Gardner, P. 1987. Ion channels activated by inositol 1, 4, 5-trisphosphate in plasma membrane of human T lymphocytes. *Nature*. **326**: 301-304.

Lacerda, A. E., Kin, H. S., Ruth, P., Perez-Reyes, E., Flocherzi, V., Hofman, F., Brown, A. M. 1991. Normalization of current kinetics by interaction between the α 1 and β subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel. *Nature*. **352**: 527-530.

LaCour, M. 1989. Rheogenic sodium-bicarbonate co-transport accross the retinal membrane of frog retinal pigment epithelium. *J. Physiol*. **419**: 539-553.

Lechleiter, J., Girard, S., Peralta, E., Clapham. 1991. Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus leavis*. *Science*. **252**: 123-126.

- Lechleiter, J., Clapham, D. 1992. Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *Xenopus laevis* oocytes. *Cell*. **69**: 283-294.
- Lee, S., Steinhardt, R. A. 1981. pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **85**: 358-369.
- Lee, H. C., Aarhus, R., Graeff, R., Gurnack, M. E., Walseth, T. F. 1994. Cyclic ADP ribose activation of the ryanodine receptor is mediated by calmodulin. *Nature*. **370**: 307-309.
- Lee, H. C. 1994. Cyclic ADP-ribose: a new member of super-family of signalling cyclic nucleotides. *Cellular Signalling*. **6**: 591-600.
- Levitt, B. G., Decker, E. R., 1988. Electrostatic radius of gramicidin channel determined from voltage dependence of H⁺ ion conductance. *Biophys. J.* **53**: 33-38
- Lu, X., Xy, L., Meissner, G. 1994. Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* **269**. 6511-6516.
- Lückhoff, A., Clampham, D. E. 1992. Inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca²⁺ permeable channel. *Nature*. **355**: 356-358.
- Lyall, V., Belcher, T. S., Biber, T. U. L. 1992. Effect of changes in extracellular potassium on intracellular pH in principal cells of frog skin. *Am. J. Physiol.* **263**: F722-F730
- Ma, Y. H., Reusch, H. P., Wilson, E., Escobedo, J. A., Fantl, W. J., Williams, L. T., Ives, H. E. 1994. Activation of Na⁺/H⁺ exchange by platelet-derived growth factor involves phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C γ . *J. Biol. Chem.* **269**: 30734-30739

- Mahaut-Smith, M. P. 1989. The effect of zinc on calcium and hydrogen ion currents in intact snail neurons. *J. Exp. Biol.* **145**: 455-464.
- Matifat, F., Collin, T., Humez, S., Brûlé, G., Fournier, F. 1995. Sensitization of InsP₃-dependent calcium signalling through structural modification of voltage-dependent calcium channel: a physiological relevance of the calcium channel β subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**: 440-446.
- McPerson, P. S., Campbell, K. P. 1993. The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J. Biol. Chem.* **268**: 13765-13768.
- Meech, R.W., Thomas, R.C. 1987. Voltage dependent intracellular pH in *Helix Aspersa* neurones. *J. Physiol.* **390**: 433-452.
- Meves, H., Pichon, Y. 1975. Effects of 4-aminopyridine on the potassium current in internally perfused giant axons of the squid. *J. Physiol.* **251**: 60-72
- Meyer, T., Wensel, T., Stryer, L. 1990. Kinetics of calcium channel opening by inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Biochemistry.* **29**: 32-37.
- Mészáros, L. G., Bak, J., Chu, A. 1993. Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non skeletal type ryanodine Ca²⁺ channel. *Nature.* **364**: 76-79.
- Miadema, H., Felle, H., Prins, H. B. A. 1992. Effect of high pH on the plasma membrane potential and conductance in *Elodea densa*. *J. Memb. Biol.* **128**: 63-69
- Mignery, G., A., Newton, C. L., Archer, B. T., Südhof, T. C. 1990. Structure and expression of the rat inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **265**: 12679-12685.

Mignery, G. A., Johnson, P. A., Südhof, T. C. 1992. Mechanism of Ca^{2+} inhibition of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (InsP_3) binding to the cerebellar InsP_3 receptors. *J. Biol. Chem.* **267**: 7450-7455.

Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., Numa, S. 1989. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature.* **340**: 230-233.

Mikoshiba, K. 1993. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**: 86-89.

Minke, B., Selinger, Z. 1992. Inositol lipid pathway in fly photoreceptor: excitation, calcium mobilization and retinal degeneration. In Osborne N. N., Chader, G. J. eds. *Retinal research*. Pergamon Press, New York. **11**: 99-124

Missiaen, L., Taylor, C. W., Berridge, M. J. 1991. Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium store. *Nature.* **352**: 241-244

Missiaen, L., Taylor, C. W., Berridge, M. J. 1992a. Luminal Ca^{2+} promoting spontaneous Ca^{2+} release from inositol trisphosphate-sensitive stores in rat hepatocytes. *J. Physiol.* **455**: 623-640.

Missiaen, L., DeSmedt, H., Droogmans, G., Casteels, R. 1992b. Ca^{2+} release induced by inositol 1, 4, 5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca^{2+} in permeabilized cells. *Nature.* **357**: 599-602.

Missiaen, L., DeSmedt, H., Parys, J. B., Casteels, R. 1994. Ca^{2+} -activation of inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} release by cytosolic Ca^{2+} is loading dependent; *J. Biol. Chem.* **269**: 7238-7242.

Mitterdorfer, J., Froschmayr, M., Graber, M., Striessig, J., Glosmann, H. 1994. Calcium channels: the β -subunit increases the affinity of dihydropyridine and Ca^{2+} binding sites of the α_1 -subunit. *FEBS Lett.* **352**: 141-145.

Moolenaar, W. H. 1986. Effect of growth factors on intracellular pH regulation. *Ann. Rev. Physiol.* **48**: 363-376.

Muallén, S., Pandolfi, S. J., Beeher, T. J. J. 1989. Hormone-evoked calcium release from intracellular stores is a quantal process. *J. Biol. Chem.* **264**: 205-212.

Murer, H., Hopfer, U., Kinne, R. 1976. Sodium/proton antiport in brush border-membrane vesicles isolated from small intestine and kidney. *Biochem. J.* **154**: 597-604.

Nanda, D., Grinstein, S. 1991. Protein kinase C activates an H⁺ (equivalent) conductance in the plasma membrane of human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 10816-10820

Nanda, A., Grinstein, S., Curnutte, J. T. 1993. Abnormal activation of H⁺ conductance in NADPH oxidase-defective neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 760-764

Nanda, A., Romanek, R., Curnutte, J. T., Grinstein, S. 1994. Assessment of the contribution of the cytochrome b moiety of the NADPH oxidase to the transmembrane H⁺ conductance of leukocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 27280-27285

Nargeot, J., Charnet, P. 1994. Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Médecine et Science* **10** (12): 1296-1307.

Neuman, W. F., Neuman, M. W. 1988. The chemical dynamics of bone mineral, Chapter 2, University of Chicago press. Chicago.

Neely, A., Wei, X., Olcese, R., Birnbaumer, L., Stephani, E. 1993. Potentiation of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science.* **262**: 575-578.

Nishimura, S., Takeshima, H., Hofmann, A., Flockerzi, V., Inoto, K. 1993. Requirement of the calcium channel β subunit for functional conformation. *FEBS. Lett.* 324: 283-286.

Nordstöm, T, Rotstein, O. D., Romanek, R., Asotra, S., Heersche, J. N. M., Maloson, M. F., Brisseau, G., Grindtein, S. 1995. Regulation of cytoplasmic pH in osteoclasts; Contribution of proton pumps and a proton-selective conductance. *J. Biol Chem.* 270: 2203-2212

Ogawa, Y. 1994. Role of ryanodine receptors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 29: 229-274.

Olcese, R., Qin, N., schneider, T., Neely, H., Wei, X., Stephani, E., Birnbaumer, L. 1994. The amino terminus of a calcium channel β subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect of activation. *Neuron.* 13: 1433-1438.

Ouadid, H., Browaeys-Poly, E., Vilain, J. P., Guilbault, P. 1994. Endogenous DHP-sensitive Ca^{2+} channels in *Pleurodeles* oocytes. *FEBS lett.* 351: 58-62.

Oldershaw, K. A., Taylor, C. W. 1993. Luminal Ca^{2+} increases the affinity of inositol 1, 4, 5-trisphosphate for its receptor. *Biochem. J.* 292: 631-633.

Pandol, S. J., Schoeffield-Payne, M. S. 1990. Cyclic GMP mediated the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell. *J. Biol. Chem.* 265: 12846-12853.

Peral, M. J., Calonge, M. L., Ilundain, A. A. 1995a. Cytosolic pH regulation in chicken enterocytes: Na^{+} -independent regulatory cell alkalinization. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1233: 84-88.

Peral, M. J., Ilundain, A. A. 1995b. Proton conductance and intracellular pH recovery from an acid load in chicken enterocytes. *J. Physiol.* 484.1: 165-172.

- Parekh, A. B., Terlau, H., Stühmer, W. 1993. Depletion of InsP_3 stores activates a Ca^{2+} and K^+ current by means of a phosphatase and diffusible messenger. *Nature*. **364**: 814-817.
- Parker, I., Ivorra, I. 1990. Inhibition by Ca^{2+} of inositol trisphosphate mediated Ca^{2+} liberation: A possible mechanism for oscillatory release of Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 260-264.
- Parker, I., Miledi, R. 1987. Injection of inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate into *Xenopus* oocytes generates a chloride current dependent upon extracellular calcium. *Proc. Roy. Soc. Lond.* **232**: 59-70
- Parker, I, Yao, Y. 1991. Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. *Proc. Roy. Soc. Lond.* **246**: 269-274.
- Parys, J. B., Missiaen, L., DeSmedt, H., Casteels, R. 1993. Loading dependence of Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in the clonal cell line A7r5. *J. Biol. Chem.* **268**: 25206-25212.
- Peres, A., Bernardini, G., Mancinelli, E., Ferroni, A. 1985. A voltage-dependent K^+ channel controlling the membrane potential in frog oocytes. *Pflügers Arch.* **403**: 41-46.
- Perez-Reyes, E., Castellano, A., Kim, H. S., Bertrand, P., Bagstrom, E., Lacerda, A. E., Wei, X., Birnbaumer, L. 1992. Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J. Biol. Chem.* **267**: 1792-1797.
- Pertersen, C. C. H., Berridge, M. J. 1994. The regulation of capacitive calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 32246-32253.
- Phillips, A. M., Bull, A., Kelly, L. E. 1992. Identification of a drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron*. **8**: 631-642.

Pillai, R. P., Buesher, B. C., Pearse, D. B., Sylverster, J. T., Eichorn, G. L. 1986. ^{31}P NMR spectroscopy of isolated perfused lungs. *Magn. Reson. Med.* **3**: 467-472.

Powers, P. A., Liu, S., Hogan, K., Greeg, R. G. 1992. Skeletal muscle and brain isoforms of a β -subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.* **268**: 9275-9279.

Powers, P. A., Liu, S., Hogan, K., Gregg, R. G. 1993. Molecular characterization of the gene encoding the gamma subunit of the human skeletal muscle 1.4 dihydropyridine sensitive Ca^{2+} channel (CACNLG), cDNA sequence, gene structure, and chromosomal location. *J. Biol. Chem.* **268**: 9275-9279.

Pragnell, M., Sakamoto, J., Jay, S. D., Campbell, K. P. 1991. Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel β -subunit. *FEBS Letters.* **291**: 253-258.

Pragnell, M., DeWard M. D., Mori Y., Tanabe, T., Snutch, T. P., Campbell, K. P. 1994. Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α_1 -subunit. *Nature.* **368**: 67-70

Putney, JrJ. W., Bird, G. St. J., 1993. The inositol phosphate calcium signalling system in nonexcitable cells. *Endocrine Reviews.* **14**: 610-631.

Randriamampita, C., Tsien, R. Y. 1993. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature.* **364**: 809-814.

Randriamampita, C., Ciapa, B., Trautmann, A. 1991. Cyclic-GMP-dependent refilling of calcium stores in macrophages. *Pflügers Arch.* **417**: 633-637.

- Restrepo, D., Miyamoto, T., Bryant, B. P., Teeter, J. H. 1990. Odor stimuli trigger influx of calcium into olfactory neurons of the channel catfish. *Science*. **249**: 1166-1168.
- Reuvery, E., Twombly, D. A., Narahashi, T. 1993. Chlordiazepoxide block two types of calcium channels in neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. and Exp. Therap.* **264**: 22-28.
- Rezaï, K., Wasserman, W. J. 1994. Forskolin and methylxanthines block the increase in intracellular pH during meiosis in *Xenopus leavis* oocytes. *Biochem. Biophys. Resch. Commun.* **250**: 979-983.
- Roos, A., Boron, W. F. 1981. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* **61**: 296-434.
- Rosenfeld, M. R., Wong, E., Dalmau, J., Manley, G., Posner, J. B., Sher, E., Furneaux, H. M. 1993. Cloning and characterization of a Lambert-Eaton myastenic syndrome antigen. *Ann. Neurol.* **33**: 113-120.
- Ross, C. A., Meldolesi, J., Milner, T. A., Satoh, T., Supattapone, S., Snyder, S. Y. 1989. Inositol 1, 4, 5 -trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar purkinge neurons. *Nature*. **339**: 468-470.
- Rossier, M. F., Bird, GStJ., Putney, JW. 1991. Structural organization of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive organelle in rat liver. Evidence for linkage to the plasma membrane through actin microfilaments. *Biochem. J.* **274**: 643-650.
- Rouxel, F. P., Hilly, M., Mauger, J. P. 1992. Characterization of a rapidly dissociating inositol 1, 4, 5-trisphosphate-binding site in liver membranes. *J. Biol. Chem.* **267**: 20017-20023.
- Ruth, P., Röhrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H. E., Flockerzi, V., Hofmann, F. 1989. Primary structure of the β subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*. **245**: 1115-1118.

Schindler, H., Nelson, N. 1982. Proteolipid of adenosine triphosphate from yeast mitochondria forms proton selective channels in planar lipid bilayers. *Biochemistry*. **21**: 5787-5794.

Schoenkrecht, G., Junge, W., Lill, H., Engelbrecht, S. 1986. Complete tracking of proton flow in thylakoids. The unit conductance of CF₀ is greater than 10 fS. *FEBS lett.* **203**: 289-294

Shen, S. S., Steinhardt, R. A. 1978. Direct measurement of intracellular pH during metabolic depression of the sea urchin egg. *Nature*. **272**: 253-254.

Shrode, L. D., Putnam, R. W. 1994. Intracellular pH regulation in primary rat astrocytes and C6 glioma cells. *Glia*. **12**: 196-210

Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flokerzi, V., Hofman, F., Dascal, N. 1991. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science*. **253**: 1553-1557.

Stea, A., Duber, S. J., Pragnell, M., Leonard, J. P., Campbell, K. J., Snutch, T. P. 1993. A β -subunit normalizes the electrophysiological properties of a cloned N-type Ca²⁺ channel α 1-subunit. *Neuropharmacology*. **32**: 1103-1116.

Tanabe, T., Tkeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., Numa, S. 1987. Primary structure of the receptor for the calcium channel blocker from skeletal muscle. *Nature*. **328**: 313-318.

Tanabe, T., Beam, K. G., Powel, J. A., Numa, S. 1988. Restauration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature*. **336**: 134-139.

Tanabe, T., Beam, K. G., Adams, B. A., niidome, T., Numa, S. 1990. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical role for excitation-contraction coupling. *Nature*. **346**: 567-569.

Tanaka, Y., Hayashi, N., Kanedo, A., Ito, T., Horimo, M., Sasaki, Y., Kasahara, A., Fusamoto, H., Kamada, T. 1994. Characterization of signalling pathway to Na⁺/H⁺ exchanger. Activation with epidermal growth factor in hepatocytes. *Hepatology*. 20 (4): 966-974

Taglietti, V., Tanzi, F., Romero, R., and Simoncini, L. 1984. Maturation involves suppression of voltage-gated currents in the frog oocyte. *J. Cell. Physiol.* 121: 576-588.

Thomas, R. C. 1977. The role of bicarbonate, chloride and sodium ions in the regulation of intracellular pH in small neurones. *J. Physiol.* 273: 317-338.

Thomas, R. C. 1979. Recovery of pHi in snail neurones exposed to high external potassium. *J. Physiol.* 296: 77p

Thomas, R. C., Meech, R. W. 1982. Hydrogen ion currents and intracellular pH in depolarized voltage-clamped snail neurones. *Nature*. 299: 826-828.

Thompson, S. H. 1977. Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones. *J. Physiol.* 265: 465-488.

Thorn, P., Gerasimenko, O., Petersen, O. H. 1994. cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca²⁺ oscillations in pancreatic acinar cells. *EMBO. J.* 13: 2038-2043.

Titgat, J., Nilius, B., Vereecke, J., Carmeliet, E. 1988. The T type Ca²⁺ channel in guinea pig ventricular myocytes is sensitive to isoproterenol. *Pflügers Arch.* 411: 704-706.

Toselli, M., Taglietti, V., Tanzi, F., D'angelo, E. 1989. Calcium-dependent chloride currents in the immature oocyte of the frog, *Rana esculenta*. *Archives Italiennes de Biologie.* 127: 69-80.

- Tregear, R. T., Dawson, A. P., Irvine, R. F. 1991. Quantal release of Ca^{2+} from intracellular stores by InsP_3 : test of the concept of control Ca^{2+} release by intraluminal Ca^{2+} . *Proc. Roy. Soc. Lond.* **243**: 263-268.
- Tse, C. M., Brant, S. R., Walker, M. S., Pouysségur, J., Donowitz, M. 1992. Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding specific Na^+/H^+ exchanger isoform (NHE-3). *J. Biol. Chem.* **267**: 9340-9346
- Tse, C. M., Levine, S., Yung, C., Brant, S., Counillon, L. T., Pouysségur, J., Donowitz, M. 1993a. Structure function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na^+/H^+ exchanger gene family. *J. Membr. Biol.* **135**: 93-108.
- Tse, C. M., Levine, S., Yung, C., Brant, S., Pouysségur, J., Montrose, M., Donowitz, M. 1993b. Functional characteristics of a cloned epithelial Na^+/H^+ exchanger (NHE3): Resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 9110-9114.
- Tsukioka, M., Iino, M., Endo, M. 1994. pH dependence of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in permeabilized smooth muscle cells of the guinea-pig. *J. Physiol.* **475.1**: 369-375.
- VanDellen, C., Foti, M., Lew, D. P., Krause, K. H. 1993. Ca^{2+} and Mg^{2+} regulation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate binding in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 12443-12448.
- Varadi, G., Lory, P., Schultz, D., Varaldi, M., Schwartz, A. 1991. Acceleration of activation and inactivation kinetics by the β subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature.* **352**: 159-162.
- Vergara, J., Tsien, R. Y., Delay, M. 1985. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 6352-6356.
- Wakabayashi, S., Fafournoux, P., Sardet, C., Pouysségur, J. 1992. The Na^+/H^+ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signal and "H⁺ sensing" *Proc. Natl., Acad. Sci. USA.* **89**: 2424-2428

Walker, J. W., Somlyo, A. V., Goldman, Y. E. Somlyo, A. P., Trentham, D. R. 1987. Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Nature*. **327**: 249-252.

Watanabe, T., Lewis, D., Nakamoto, R., Kurzmack, M., Frontocelli, C., Inesi, G. 1981. Modulation of calcium binding in sarcoplasmic reticulum adenosinetrisphosphate. *Biochemistry*. **20**: 6617-6625.

Watras, J., Bezprozvanny, I., Erlich, B. E. 1991. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-gated channels in cerebellum: presence of multiple conductance states. *J. Neurosci*. **11**: 3239-3245.

Webb, D. J., Nuccitelli, R. 1981. Direct measurement of intracellular pH changes in *Xenopus* eggs at fertilization and cleavage. *J. Cell. Biol.* **91**: 562-567.

Wei, X. Y., Perez-Reyes, E., Lacerda, A. E., Schuster G., Brown, A. M., Birnbaumer, L. 1991. Heterologous regulation of the cardiac Ca^{2+} channel α_1 subunit by skeletal muscle β and γ subunits. *J. Biol. Chem.* **266**: 21943-21947.

Westerblad, H., Allen, D. 1992. Changes of intracellular pH due to repetitive stimulation of single fibers from mouse skeletal muscle. *J. Physiol.* **449**: 49-71.

Williams, M. E., Feldman, D. H., Cue, A. F., Brenner, R., Vilicelebi, G., Ellis, S. B., Harpold, M. M. 1992. Structure and functional expression of α_1 , α_2 and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron*. **8**: 71-84.

Woodhull, A. M. 1973. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* **61**: 687-708.

Worley, P. F., Baraban, J. M., Supattapone, S., Wilson, V., Snyder, S. H. 1987. Characterization of inositol trisphosphate receptor binding in brain. Regulation by pH and calcium. *J. Biol. Chem.* **269**: 32246-32453.

Yano, M., El-Hayek, R., Ikemoto, N. 1995. Conformational changes in the junctional foot protein/Ca²⁺ release channel mediate depolarization induced Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**: 3017-3021.

Yao, Y., Parker, I. 1992. Potentiation of inositol trisphosphate induced Ca²⁺ mobilization in *Xenopus* oocytes by cytosolic Ca²⁺. *J. Physiol.* **458**: 319-338.

Yao, Y., Parker, I. 1993. Inositol trisphosphate-mediated Ca²⁺ influx into *Xenopus* oocytes triggers Ca²⁺ liberation from intracellular store. *J. Physiol.* **468**: 275-296.

Yao, Y., Parker, I. 1994. Ca²⁺ influx modulation of temporal and spatial patterns of inositol trisphosphate mediated Ca²⁺ liberation in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **476.1**: 17-28

Yao, I., Choi, J., Parker, I. 1995. Quantal puffs of intracellular Ca²⁺ evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **482.3**: 533-553.

Yoo, S. H., Lewis, M. S. 1994. pH dependent interaction of an intracellular loop of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor with chromogranin A. *FEBS. Lett.* **341**: 28-32.

**SENSITIZATION OF InsP_3 -DEPENDENT CALCIUM SIGNALLING THROUGH STRUCTURAL
MODIFICATION OF VOLTAGE-DEPENDENT CALCIUM CHANNEL:
A PHYSIOLOGICAL RELEVANCE OF THE CALCIUM CHANNEL β SUBUNIT**

**Fabrice MATIFAT, Thibault COLLIN, Sandrine HUMEZ*, Gérard BRÛLE
and Franck FOURNIER*§**

**Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, Université de Picardie Jules Verne
Faculté des Sciences, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS CEDEX 1, FRANCE**

***Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université des Sciences et Technologies de Lille
UFR de Biologie, 59655 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX, FRANCE**

Received February 1, 1995

The expression in *Xenopus* oocytes of the human voltage-dependent Ca^{2+} channel (VDCC) β_2 subunit subtype ($h\beta_2$) enhances the endogenous Ca^{2+} channel activity. By using the native Ca^{2+} -dependent chloride conductance to monitor fast intracellular Ca^{2+} variations, we point out that the β -enhanced Ca^{2+} entry (T_1 component) is currently associated with a second delayed elevation of internal Ca^{2+} (T_2 component). Further experiments show that this additional component absolutely requires Ca^{2+} entry through the β -modulated channels although it directly derives from a Ca^{2+} release from intracellular inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP_3)-sensitive stores. Finally, our study demonstrates that InsP_3 -evoked response in oocytes is dramatically modified since it gains a new shape of voltage dependency directly derived from the β -modified Ca^{2+} influx. The main conclusion is that the spatiotemporal pattern of InsP_3 -dependent Ca^{2+} release may be closely influenced by the intrinsic characteristics of working VDCCs. © 1995 Academic Press, Inc.

The *Xenopus* oocyte represents the most convenient model to study the intrinsic properties of Ca^{2+} signalling linked to InsP_3 , since the release of intracellular stores was shown to be mediated by only one kind of store which is mobilizable by InsP_3 and regulated by cytoplasmic Ca^{2+} (1). This system has been widely used to express ion channels such as VDCCs either from tissue-purified RNA or from cloned cDNA. In that respect, previous studies using brain RNA-injected oocytes show that the Ca^{2+} entry which is primarily induced by activation of an acquired VDCC activity is correlated to a modulation of the Ca^{2+} release from InsP_3 -sensitive stores (2, 3). Although these experiments demonstrate that voltage-dependent Ca^{2+} entry is required for

§To whom correspondence should be addressed at Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université des Sciences et Technologies de Lille UFR de Biologie, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Fax: (33) 20 43 40 38.

0006-291X/95 \$5.00

Copyright © 1995 by Academic Press, Inc.

All rights of reproduction in any form reserved.

this functional coupling, they do not exclude the involvement of other partners, since tissue RNA can encode an heterologous population of modulatory proteins.

VDCCs are heteromultimers composed of at least three distinct subunits α_1 , α_2/δ and β (4). From several functional expression studies, it is now established that the VDCC activity is directed by the α_1 subunit, the function of which is regulated by the β subunit (5, 6). Moreover, several recent studies indicate that exogenous β subunits introduced in *Xenopus* oocyte increase the endogenous VDCC activity (5, 6, 7). Hence, the present study utilizes a VDCC β subunit as a physiological enhancer of the oocyte endogenous VDCC activity with the aim to evaluate the incidence of a direct increase in Ca^{2+} entry on the Ca^{2+} release process from InsP_3 -sensitive stores. Our data provide strong evidence for the establishment of a functional coupling between VDCCs and InsP_3 receptors solely by expression of a VDCC β subunit. These results bring new items about some subsequent implication of the Ca^{2+} channel β subunit in cellular Ca^{2+} signalling.

MATERIALS AND METHODS

PCR cloning of the h β_2 subunit

One isoform of the MysB subunits (type A; 8) was directly amplified from Hela cells polyA⁺ RNA using specific primers (5' end: CGATGGTCCAAACGGACATGTCC; 3' end: GCTCTACGTAGGCAGAGTCTGC) and Retrotherm DNA polymerase (Epicentre technology). The cycling procedure included: i) a pre-annealing to 57°C for 10 min; ii) a denaturation step to 94°C for 3 min iii) 30 cycles as follows: 57°C 1 min / 72°C 1 min / 94°C 30 sec; iv) a terminal amplification at 72°C for 10 min and v) a cooling at 4°C for overnight storage. Agarose gel electrophoresis of the PCR products showed a single 1.7 kb band which was further sequenced using the Sequenase kit (USB) according to manufacturer's instructions. The cDNA obtained was totally homologous to the MysB subunit (type A, 8). It has been named h β_2 since it shows very high similarities with the rat brain/heart β_2 subunit described by Perez-Reyes *et al.* (1992; 9). A further round of amplification was performed to add specific restriction sites required to insert the cDNA in an appropriate expression vector (primers used: 5' end: GGAATTCGATGGTCCAAACGG and 3' end: CCTTAAGGCTCTACGTAGG). The h β_2 cDNA was subcloned into the EcoRI site of the pSVK3 (Pharmacia) as reported elsewhere (7). The construct named pSVK3h β_2 was purified using Qiagen DNA purification kit which made it ready for subsequent injection in the germinal vesicle of *Xenopus* oocyte.

Oocytes preparation and maintenance

Pieces of adult *Xenopus laevis* ovary were surgically removed and dissected away in ND96 solution of the following composition: (in mM) NaCl 96, KCl 2, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1.8, HEPES 5, pH 7.4 with NaOH. Oocytes were then treated for 2-3h with collagenase (type IA; 2 mg/ml in Ca^{2+} -free medium) to discard follicular cells. 1 to 5 ng of the pSVK3h β_2 construct was injected in the germinal vesicle of each oocyte using a Nichiryo micropipette. Oocytes were kept for 2-6 days in ND96 medium supplemented with gentamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Electrophysiological measurements

Electrophysiological measurements were performed using the standard dual microelectrode voltage clamp technique. Oocytes were impaled with microelectrodes filled with 3M CsCl in a 100 μl recording chamber. Stimulation, data acquisition and off-line analysis were conducted on a personal computer running the pClamp software package (v. 5.7.1; Axon Instruments, Burlingame CA, USA). The ND96 solution was routinely used to monitor the internal Ca^{2+} variations and occasional modifications of extracellular Ca^{2+} were compensated by adequate modifications of the divalent cation concentration (Mg^{2+}). To record VDCC activity, oocytes were bathed in BaMS/TEA solution of the following composition: (in mM) Ba(OH)₂ 40, TEAOH 50, CsOH 2, HEPES 5, pH 7.4 with methane sulfonic acid. Therefore, the activity of

VDCCs was recorded as an inward Ba current (I_{Ba}). Leak subtraction was performed using the p/4 procedure. Drugs were applied by addition to the superfusate. An additional micropipette (3-10 μ m tip diameter) was used for intracellular injection. All injected compounds (InsP₃, heparin) were dissolved in HEPES 5 mM, pH 7.2 with KOH.

RESULTS

The $h\beta_2$ subunit was assayed in *Xenopus* oocytes for its ability to modulate endogenous VDCC activity (10). Barium currents were recorded in the presence of 40 mM Ba²⁺ in the bath (Fig. 1A). Two days after nuclear injection, amplitude of I_{Ba} was sevenfold higher in $h\beta_2$ -injected oocytes than in control oocytes (-94 ± 10 nA, $n = 13$ versus -13 ± 2 nA, $n = 17$). No change in activation threshold (-30 mV) or peak current ($+20$ mV) were detected following $h\beta_2$ expression (Fig. 1B). When control oocytes were bathed in normal ND96 medium, stepping the voltage from a holding potential at -100 mV to $+20$ mV elicited a transient outward current (T_1 component; 111 ± 7 nA, $n = 12$; Fig. 2A, upper traces) which is inhibited by Cd²⁺ (500 μ M; figure 2A upper traces). This current has been identified as a Ca²⁺-dependent chloride current (11). In oocytes injected with the pSVK3 $h\beta_2$ construct (Fig. 2A, lower traces) the outward current amplitude was significantly increased (873 ± 98 nA, $n = 10$) and an additional delayed transient component (T_2 component) could be clearly distinguished (1385 ± 239 nA, $n = 10$). This T_2 component spontaneously appeared in 70 % of the oocytes tested. As described earlier for brain RNA-injected oocytes (3), the outward current elicited by depolarization presents more commonly the additional delayed T_2 component. One may propose that Ca²⁺ entry through $h\beta_2$ -modified endogenous VDCCs can play a pivotal role in the occurrence of T_2 . Abolition of the Ca²⁺ entry either by suppressing external Ca²⁺ or applying the inorganic Ca²⁺ channel blocker Cd²⁺ (500 μ M, $n = 10$) inhibited both T_1 and T_2 components (Fig. 2A, lower traces). In order to clearly determine the link between T_2 component and the acquired increased VDCC activity, voltage-dependence properties of both T_1 and T_2 components were investigated. As depicted in fig. 2B, T_1 and T_2 describe the same voltage-dependence properties as I_{Ba} . Furthermore, the outward chloride current inactivates in a voltage dependent manner and the inactivation properties can be adequately correlated to these of the Ba²⁺ current (data not shown).

Caffeine, a well known inhibitor of the InsP₃ response (5 mM external concentration; 12) typically inhibited the T_2 component of the outward chloride current recorded in $h\beta_2$ -injected oocytes (Fig. 3A; $n = 8$). The same kind of inhibition was observed when low molecular weight heparin (50 μ g/ml final concentration), a competitive inhibitor of the InsP₃ receptor (13) was injected into oocytes (Fig. 3B; $n = 5$). Basically, both caffeine and heparin dramatically abolished T_2 component while no significant effect was ever detected on T_1 . Thus, T_2 component induced by Ca²⁺ entry through modified endogenous VDCCs appears to be linked to a Ca²⁺ release process from InsP₃-sensitive stores. In order to assess the involvement of InsP₃-dependent Ca²⁺ pools in the firing of T_2 , ponctual InsP₃ injections (15 fmol.) were performed in $h\beta_2$ -modified oocytes that did not spontaneously exhibit T_2 . These injections immediatly resulted in T_2 appearance (Fig. 3C, $n = 6$). With the aim to deduce the influence of the β subunit-induced VDCC activity enhancement on the quantitative properties of the InsP₃ Ca²⁺ signalling, we compared the voltage-dependence of the InsP₃ response obtained in control and pSVK3 $h\beta_2$ -

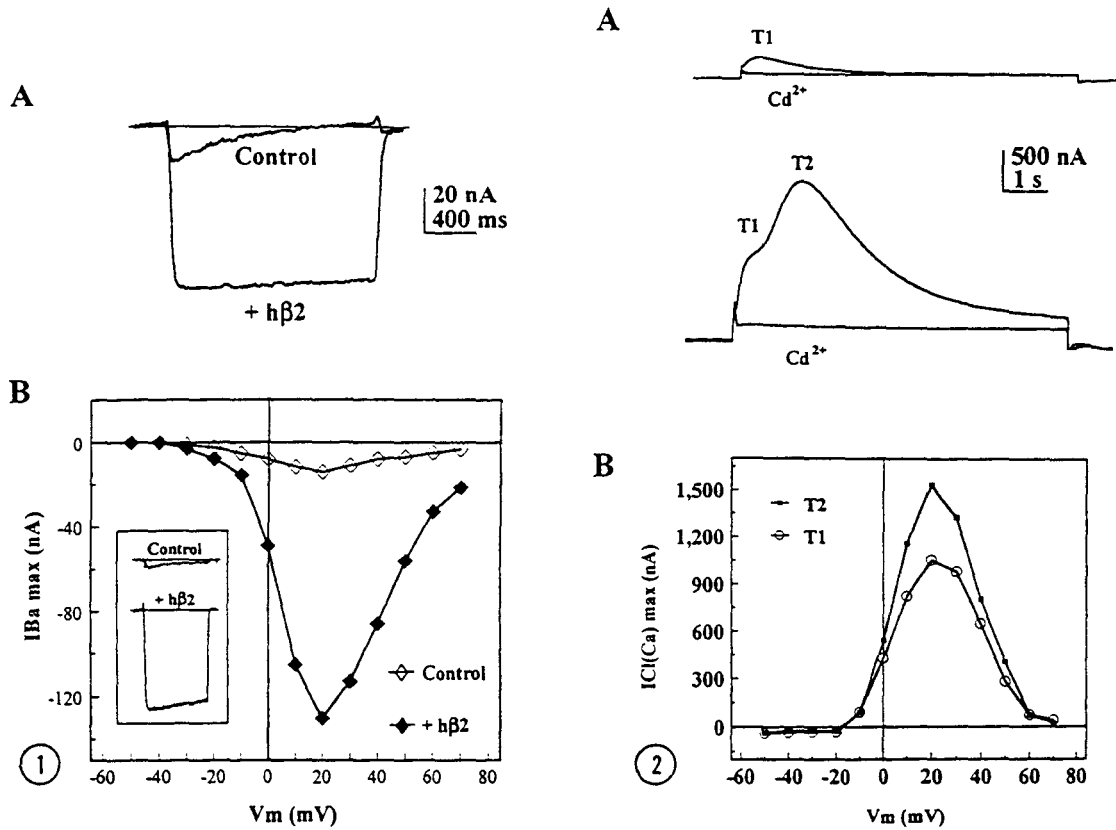


Figure 1. Functional expression of $h\beta_2$ in *Xenopus* oocytes.

Ba²⁺ currents were recorded in oocytes as described in Materials and Methods.

Leak and linear currents were subtracted using a p/4 protocol.

A: Current traces obtained by stepping membrane potential from -100 mV to +20 mV in non-injected (Control) and $h\beta_2$ -injected oocytes (+ $h\beta_2$).

B: Typical current amplitude plotted as a function of the test potential for uninjected (◇) and $h\beta_2$ -injected (◆) oocytes. Final current to voltage relationships were obtained by digitally subtracting each trace by its corresponding trace recorded in the presence of Cd²⁺ (500 μM).

Inset: current traces eliciting the maximal inward Ba²⁺ current in control and $h\beta_2$ -injected oocytes.

Figure 2. $h\beta_2$ expression triggers a second delayed chloride component : T₂.

A: Ca²⁺-dependent chloride currents recorded when oocytes were depolarized from -100 mV to +20 mV. The upper traces correspond to currents obtained in control oocytes and lower traces to currents recorded in $h\beta_2$ -injected oocytes. Note that both outward currents are blocked by external application of 500 μM Cd²⁺.

B: Superimposed current to voltage relationships obtained for the two chloride components. T₁ and T₂ clearly possess the same electrophysiological characteristics since they are activated at the same voltage threshold (-20 mV) and maximal currents are recorded for the same voltage value (+20 mV).

injected oocytes. In control oocytes, the specific net InsP₃ response (current before InsP₃ injection was digitally subtracted) consisted in a passive variation of the chloride current arising at both holding and depolarizing levels (Fig. 4, "uninjected oocyte" trace; n = 4). Only an outward rectification could develop in response to membrane voltage modification demonstrating

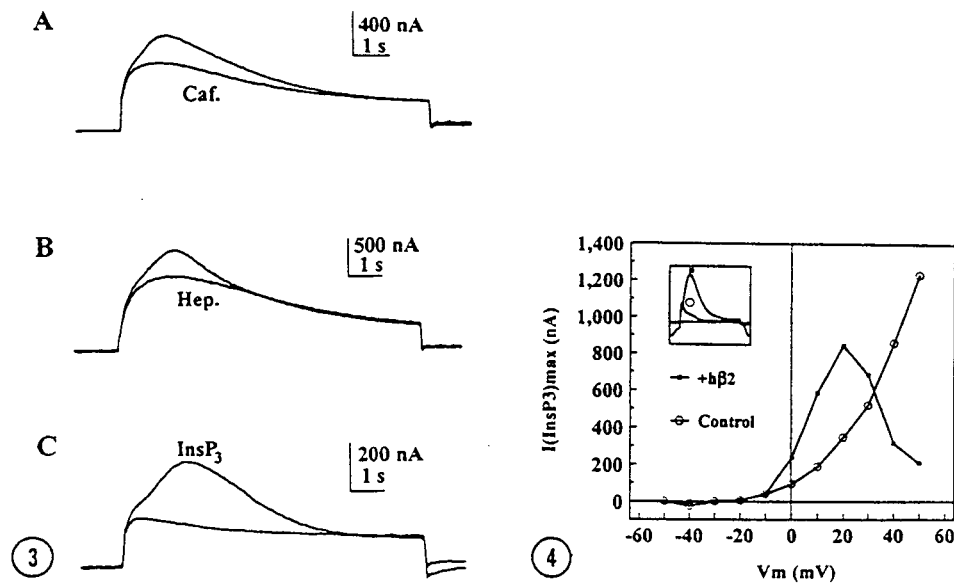


Figure 3 . Involvement of InsP_3 -sensitive stores in the occurrence of T_2 component in $h\beta_2$ -injected oocytes.

A, B: External application of 5 mM caffeine (A) and intracellular injection of heparin (B; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, final concentration) both abolished T_2 component without affecting T_1 component.

C: Injection of InsP_3 (15 fmol.) triggered T_2 component in $h\beta_2$ -injected oocytes that did not naturally elicit it.

Figure 4 . $h\beta_2$ VDCC-subunit confers a voltage-dependent pattern to InsP_3 signalling.

Superimposed current to voltage relationships obtained in control and in $h\beta_2$ -injected oocytes. The net InsP_3 response (I_{InsP_3}) was calculated by digitally subtracting the current recorded before InsP_3 injection (15 fmol.). The I-V curves were constructed by plotting the maximal amplitude of the InsP_3 -elicited outward current versus potential (\circ : uninjected oocyte; \blacksquare : $h\beta_2$ -injected oocyte).

that Ca^{2+} entry through native VDCCs had no significant influence on the InsP_3 response. Furthermore, no T_2 component was ever detected in control oocytes following InsP_3 injection as previously reported (3; data not shown). By contrast, when VDCC were structurally modified by expression of the $h\beta_2$ subunit, the increase of the rate of Ca^{2+} entry clearly affected the nature of the InsP_3 response. In these oocytes, the net InsP_3 response exclusively consisted in the appearance of T_2 and gained a new shape of voltage dependency that is closely related to that of $h\beta_2$ modified endogenous VDCCs (Fig. 4, $h\beta_2$ trace; $n = 6$).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first time that the human $h\beta_2/\text{MysB}$ Ca^{2+} channel β subunit is expressed in *Xenopus* oocyte. Various β subunit subtypes have been shown to qualitatively interact with the α_1 subunit of the different classes of VDCC. In that respect, the behaviour of *Xenopus* oocyte endogenous VDCCs is evidently affected by the $h\beta_2$ subunit.

The functional characteristics we observe totally corroborate these obtained with the rat β_2 subunit by Castellano and Perez-Reyes (1994; 14): increasing the barium current amplitude and slowing down the inactivation kinetics.

Although the molecular properties of the $\alpha 1/\beta$ interaction are now well established, only little is known about its intracellular consequences. A recent report (3) shows that Ca^{2+} entry through VDCCs expressed in oocyte, can positively modulate the Ca^{2+} release process from InsP_3 -sensitive stores. This Ca^{2+} release sensitization would occur only when the Ca^{2+} influx through plasma membrane is sufficiently extensive. The present study put forward the proposal that such a β subunit-mediated increase of VDCC-directed Ca^{2+} influx would constitute by itself the sufficient condition for this sensitization of the Ca^{2+} release.

Binding assays and functional reconstitution of InsP_3 receptors have demonstrated that binding of InsP_3 and opening of the Ca^{2+} channel are positively regulated by free Ca^{2+} (15). Therefore, a Ca^{2+} influx can trigger an InsP_3 -mediated Ca^{2+} release while the concentration of InsP_3 remains constant. This Ca^{2+} release which occurs in $h\beta 2$ -injected oocytes is attested by the development of the heparin/caffeine-sensitive T_2 component of chloride current.

An alternative hypothesis is that Ca^{2+} entry stimulates PLC generating tiny amounts of InsP_3 which could account for T_2 . As discussed by other investigators (2), this direct activation of PLC seems to be unlikely because of the smooth-graded shape of the T_2 current and of the propagation of Ca^{2+} into the oocyte. Nevertheless, no experimental arguments allow us to withdraw the idea of a partial involvement of a direct activation of PLC.

At the light of these elements, one may speculate that the coupling between VDCCs and InsP_3 -dependent Ca^{2+} pools may be due to an enlargement of the amount of Ca^{2+} ions in the immediate vicinity of the InsP_3 -dependent release site. This local enhancement of the Ca^{2+} concentration is thought to be more prominent near the $h\beta 2$ -modified VDCCs because of the dramatic increase in the ionic flow. Although the expected modification of inactivation parameters accounts for this coupling remains speculative, we cannot exclude that it may favorize local accumulation of Ca^{2+} by sustaining Ca^{2+} entry.

Finally, we also demonstrate that depolarization-induced Ca^{2+} influx through $h\beta 2$ -modified VDCCs directly influences the qualitative properties of the InsP_3 -dependent Ca^{2+} signalling. Indeed, the net InsP_3 -evoked response gains a new shape of voltage dependency which reflects that of modified endogenous VDCCs, suggesting that these latter could impart their excitable features to the Ca^{2+} release process (Fig. 4).

To date, only the direct effects of the β subunit expression in regard to Ca^{2+} channels biophysical and pharmacological properties have been investigated. The present article proposes a new insight into physiological incidence of β subunit since our results clearly demonstrate that β subunit allows VDCCs and InsP_3 -dependent Ca^{2+} stores to function in a synergistic and integrative pathway.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from la Région de Picardie and from le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Financial support to F.M. and S.H. came from le Biopôle Végétal and le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, respectively. The authors are indebted to Dr. J. Parys for critical reading of the manuscript and to Dr. P. Charnet for helpful discussions. We also thank J.P. Pozzo di Borgo and C. Chatelain for technical assistance.

REFERENCES

1. Parys, J.B., Sernett, S.W., DeLisle, S., Snyder, P.M., Welsh, M.J. and Campbell K.P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 18776-18782.
2. Yao, Y., and Parker J. (1992) *J. Physiol.* 458, 319-338.
3. Fournier, F., Navarre, P., Matifat, F., Vilbert, C., Collin, T., Guilbault, P., Brûlé, G., and Marlot, D. (1994) *Cell Calcium* 15, 411-422.
4. Snutch, T.P., and Reiner, P.B. (1992) *Cur. Op. Neurobiol.* 2, 247-253.
5. Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzy, V., Hofmann, F., and Dascal, N. (1991) *Science* 253, 1553-1557.
6. Hullin, R., Biel, M., Flockerzy, V., and Hofmann, F. (1992) *Trends Cardiovasc. Med.* 3, 48-53.
7. Collin, T., Lory, P., Taviaux, S., Courtieu, C., Guilbault, P., Berta, P., and Nargeot, J. (1994) *Eur. J. Biochem.* 220, 257-262.
8. Rosenfeld, M.R., Wong, E., Dalmau, J., Manley, G., Posner, J.B., Sher, E., and Furneaux, H.M. (1993) *Ann. Neurol.* 33, 113-120.
9. Perez-Reyes, E., Castellano, A., Kim, H.S., Bertrand, P., Baggstrom, E., Lacerda, A.E., Wei, X., and Birnbaumer, L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 1792-1797.
10. Williams, M.E., Feldman, D.H., McCue, A.F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis S.B., and Harpold, M.M. (1992) *Neuron* 8, 71-84.
11. Miledi, R. (1982) *Proc. R. Soc. Lond. (B)* 215, 491-497.
12. Parker, J., and Ivorra, I., (1991) *J. Physiol.* 433, 229-240.
13. Ghosh, T.K., Eis, P.S., Mullaney, J.M., Ebert, C.L., and Gill, D.L. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11075-11079.
14. Castellano, A., and Perez-Reyes, E. (1994) *Biochem. Soc. Trans.* 22, 483-488.
15. Callamaras, N., and Parker, I. (1994) *Cell Calcium* 15, 66-78.

