UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE U.F.R. DE BIOLOGIE

N° d'ordre :

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement le 27 septembre 2000 par

Marie DEBARBIEUX-DELEPORTE

EXPRESSION HETEROLOGUE D'ARN TOTAUX DE CHICOREE HYBRIDE "474" DANS L'OVOCYTE DE XENOPE : MISE EN EVIDENCE D'UN MECANISME D'HOMEOSTASIE CALCIQUE.

> Directeurs de thèse : Mme Natalia PREVARSKAYA Mr Jacques VASSEUR

JURY

Mr J. VASSEUR, Professeur à l'Université de Lille I	Président
Mme N. PREVARSKAYA, Professeur à l'Université de Lille I	Directeur
Mr J. PARYS, Professeur à l'Université de Leuven	Rapporteur
Mr T. COLLIN, Maître de Conférences à l'Université d'Amiens	Rapporteur
Mr P. THULEAU, Chargé de Recherches CNRS UPS 5546	Examinateur
Mme H. AHIDOUCH, Maître de Conférences à l'Université de Lille I	Examinateur
Mr B. DELBREIL, Maître de Conférences à l'Université de Lille I	Examinateur
Mr P. GUILBAULT, Professeur honoraire	Examinateur



A mes parents, A Antoine, J'adresse mes remerciements aux Membres du Jury pour leur aide et leur participation,

Monsieur le Président :

Mr Jacques VASSEUR, Professeur à l'Université de Lille I

Madame le Directeur :

Mme Natalia PREVARSKAYA, Professeur à l'Université de Lille I

Messieurs les Rapporteurs :

Mr Jan PARYS, Professeur à l'Université de Leuven (Belgique)

Mr Thibault COLLIN, Maître de Conférences à l'Université de Picardie Jules Vernes (Amiens)

Madame et Messieurs les Examinateurs :

Mr Patrice THULEAU, Chargé de Recherches au CNRS (UMR-UPS 5546, Castanet Tolosan)

Mme Halima OUADID-AHIDOUCH, Maître de Conférences à l'Université de Lille I

Mr Bruno DELBREIL, Maître de Conférences à l'Université de Lille I

Mr Pierre GUILBAULT, ancien Professeur à l'Université de Lille I

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance à Mme le Professeur Natalia Prevarskaya ainsi qu'à Mr le Professeur Jacques Vasseur qui ont bien voulu m'accueillir au sein de leurs Laboratoires et m'avoir ainsi permis de réaliser cette thèse.

J'exprime mes remerciements tout particulièrement à Mme Halima Ouadid-Ahidouch qui m'a beaucoup appris sur le plan scientifique et qui m'a toujours soutenue dans les moments difficiles.

J'adresse mes remerciements à Mr Bruno Delbreil pour avoir suivi et soutenu ces travaux de recherche.

Je remercie également Mme Nathalie Delpierre qui m'a formé au cours de mon DEA et de mes deux premières années de thèse. Je tiens à lui redire toute mon amitié pour son aide et son écoute.

Je remercie aussi Sandrine Humez-Eydoux pour son amitié constante au cours de ces années et pour m'avoir fait découvrir la recherche scientifique et le plaisir d'enseigner. J'exprime aussi ma gratitude à Pascal Mariot pour son aide, son soutien et son amitié.

Je voudrais aussi remercier tous les étudiants et toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de vivre ces quelques années et en particulier Fabien, Guillaume, Karine, Rachelle, Anne-Sophie, Isabelle et tous les autres... Je remercie spécialement Sophie pour son aide très efficace et très amicale en biologie moléculaire.

Merci à mes chères Xénopes pour leur aimable collaboration. Je leur demande de bien vouloir me pardonner pour tout le mal que je leur ai fait !

Merci à mes parents sans qui je n'aurais pu devenir ce que je suis. Merci également à mon grand frère et à ma petite soeur (qui n'est plus si petite à présent !).

Merci enfin à mon Antoine. Tu as toujours été auprès de moi même si parfois tu te demandais si je n'étais pas un peu f.... de faire cette thèse !

Ma dernière pensée sera pour Franck Fournier qui a su me faire découvrir et apprécier l'électrophysiologie.

ABA: Acide ABscissique **ABP: Auxin Binding Protein** AC: Adénylate Cyclase AMPc: Adénosine MonoPhosphate cyclique ANA: Acide NaphtylAcétique ATP: Adénosine TriPhosphate cADPR: Adénosine DiPhosphate Ribose cyclique BAPTA: 1,2-bis (2-Aminophenoxy)éthane- N,N,N',N'-Tetraacétique Acid BET: Bromure d'EThydium Ca^{2+} : ion calcium [Ca²⁺]i: concentration calcique intracellulaire CaMK: protéine Kinase activée par la Calmoduline CCE: Capacitative Calcium Entry ou EEC: Entrée Capacitative de Calcium CDPK: Calcium Dependent Protein Kinase CICR: Calcium-Induced-Calcium-Release CIF: Calcium Influx Factor **CRAC: Calcium Release Activated Channel** CsCl: Chlorure de Césium DAG: DiAcyl-Glycérol DMPC: Di-Méthyl-PyroCarbonate EDTA: Ethylène Diamine TétraAcétate EGTA: Ethylène Glycol TétraAcétate G: protéine GTP-binding GA: Gibbérellines GC: Guanylate Cyclase GCR: Récepteur Couplé aux protéines G GDP: Guanidine DiPhosphate GIT: Guanidium IsoThiocyanate GTP: Guanidine TriPhosphate H^+ : ion proton HEPES: HydroxyEthyl Piperazine EthaneSulfonic acid InsP₃: Inositol 1,4,5-triPhosphate 2IP: 6-diméthylallylamino purine MC0: Milieu de Culture des protoplastes NAD: Nicotinamide Adénosine Diphosphate ND96: Nathan Dascal 96 mM chlorure de sodium PCR: Réaction de Polymérisation en Chaîne pH: potentiel Hydrogène PiP₂: Phosphatidyl inositol 4,5-biPhosphate PKA: Protéine Kinase A PKC: Protéine Kinase C PLA2: Phospholipase A2 PLC: Phospholipase C SV: canaux de type "Slow Vacuolar" TEA: Tétraéthyl Ammonium TTX: TétrodoToXine U73122:1-(6{[17β-3 methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl] amino}hexil)-1H-pyrrole-2,5-dione U73343: 1-(6{[17β-3 methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl] amino}hexil-2,5-pyrrolidine-dione

SOMMAIRE

INTRODUCTION

LES DIFFERENTES VOIES DE REGULATION DU CALCIUM CHEZ LES PLANTES : IMPLICATION LORS DES SIGNAUX DE TRANSDUCTION

I) <u>LES MECANISMES D'HOMEOSTASIE CALCIQUE DES CELLULES VEGETALES</u>		
A I ES TO ANSDODTETIDS DE LA MEMBOANE DI ASMIOTIE	n 73	
1 Los másspismos permettent un influx de seleium	p 23	
1- Les mécanismes permettant un influx de calcium		
1.1- Les canaux calciques voltage-dépendants		
1.2- Les canaux mecanosensitifs	p 25	
2- Les mécanismes permettant un efflux de calcium	p 25	
2.1- Les ATPase calciques	p 26	
2.2- Les échangeurs calcium/proton	p 26	
B- LES TRANSPORTEURS DE LA VACUOLE	p 27	
1- Les mécanismes permettant une libération de calcium	p 27	
1.1- Les canaux calciques voltage-dépendants	p 27	
1.2- Les canaux calciques ligand-dépendants	p 28	
1.2.1- Les canaux sensibles à l'InsP ₃	p 28	
1.2.1.1- Structure et isoformes	p 28	
1.2.1.2- Régulations	p 30	
1.2.1.3- Les cellules végétales et l'InsP ₃	p 34	
1.2.2- Les canaux sensibles au cADPr	р 36	
2- Les mécanismes permettant une capture du calcium	р 36	
2.1- Les ATPase calciques	p 36	
2.2- Les échangeurs calcium/proton	p 36	
II) <u>LES SIGNAUX DE TRANSDUCTION CHEZ LES VEGETAUX</u>	p 39	
A- LES RECEPTEURS	p 40	
B- LES PROTEINES G		

p 14

C- LES PROTEINES KINASES ET PHOSPHATASES	p 42
D- LA VOIE DES PHOSPHOINOSITIDES	p 42
III) POLE DU CALCIUM DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL HORMONAL	
(UDZ L DO VIDCOTA UN	- 44
CHEZ LES VEGETAUX	p 44
METHODOLOGIE : L'OVOCYTE DE XENOPE COMME SYSTEME D'EXPI	RESSION
FONCTIONNELLE	
I) <u>GENERALITES SUR L'OVOCYTE DE XENOPE</u>	p 49
II) <u>CONDUCTANCES IONIQUES ENDOGENES DE L'OVOCYTE DE XENOPE</u>	p 50
A- LES CANAUX IONIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE	p 50
1- Les canaux sodiques	p 50
2- Les canaux potassiques	p 52
3- Les canaux chlorures	p 53
4- Les canaux calciques	p 54
5- Les canaux mécanosensitifs	p 55
B- LES CANAUX DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE	p 55
1- Le récepteur-canal InsP ₃	p 55
1.1- Isoforme et localisation	p 55
1.2- Signalisation calcique intracellulaire	р 56
1.3- Mécanisme d'activation	p 56
1.4- Inhibiteurs pharmacologiques	p 59
2- L'ATPase calcique	p 59
C- L'ENTREE CAPACITATIVE DE CALCIUM	p 60
1- Principe	p 60
2- Mécanismes d'activation	p 60
3- Mécanismes de régulation	p 64
4- Pharmacologie	p 67

SOMMAIRE	
III) <u>EXPRESSION HETEROLOGUE DE PROTEINES VEGETALES</u>	p 67
MATERIELS ET METHODES	p 69
I) MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE	p 70
A- OBTENTION DU CLONE « 474 » DE CHICOREE HYBRIDE	p 70
B- MULTIPLICATION DES VITROPLANTS PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE	
A PARTIR DE RACINES	p 70
II) EXTRACTION ET PURIFICATION DES ARN TOTAUX	p 70
III) PREPARATION DES OVOCYTES DE XENOPE	p 74
IV) INJECTION DANS LES OVOCYTES DE XENOPE	p 78
A- INJECTION DES ARN TOTAUX	p 78
B- INJECTION DE SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES	p 78
V) MESURES ELECTROPHYSIOLOGIQUES	p 78
A- PRINCIPES DE BASE D'ELECTROPHYSIOLOGIE	p 78
B- TECHNIQUE DE POTENTIEL IMPOSE A DEUX MICROELECTRODES	p 82
C- MILIEUX D'ENREGISTREMENT	p 84
D- ACQUISITION ET TRAITEMENT DES DONNEES	p 84
VI) <u>DOSAGE DES INSP₃</u>	p 85
VII) IDENTIFICATION DES ELEMENTS DE TRANSDUCTION CHEZ LA CHICOREE	
PAR LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	p 87
A- REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE	p 87
B- SEPARATION ET REVELATION DES PRODUITS DE PCR	p 92
C- LIGATION DE LA SEQUENCE D'INTERET ET CLONAGE	p 95

SOMMAIRE

D- SEQUENCAGE	p 95
E- ANALYSE DES RESULTATS	p 96
1- Analyse des séquences	p 96
2- Recherche d'homologies	p 96
VIII) TECHNIQUE D'IMAGERIE CALCIQUE SUR PROTOPLASTES	
DE CHICOREE HYBRIDE "474"	p 96
A- OBTENTION DES PROTOPLASTES DE CHICOREE HYBRIDE "474"	p 96
B- TECHNIQUE D'IMAGERIE CALCIQUE	p 98
RESULTATS	p 100
I) <u>CARACTERISATION DES COURANTS ENREGISTRES DANS LES OVOCYTES</u>	
DE XENOPE INJECTES AVEC LES ARN TOTAUX	p 101
A- CARACTERISATION DU COURANT SORTANT "NON-INACTIVANT" \mathbf{I}_{NI}	p 102
B- CARACTERISATION DU COURANT SORTANT "INACTIVANT" \mathbf{I}_{I}	p 105
C- SYNTHESE DES RESULTATS	p 112
II) <u>ORIGINE DU CALCIUM INDUISANT I_{ni}</u>	p 116
A- EFFET DE L'INJECTION INTRACELLULAIRE D'INSP3 DANS LES OVOCYTES	
DE XENOPE PREALABLEMENT INJECTES AVEC LES ARN TOTAUX ET DANS LES	
OVOCYTES CONTROLES	p 116
B- EFFET DE L'APPLICATION EXTRACELLULAIRE DE CAFEINE	
SUR LE DEVELOPPEMENT DE I _{NI}	p 119
C- MESURES DU TAUX D'INSP3 INTRACELLULAIRE	p 119
D- SYNTHESE DES RESULTATS	p 119
III) <u>MECANISME D'ACTIVATION DE LA PHOSPHOLIPASE C</u>	p 122
A- EFFET DE L'INHIBITION DE LA PHOSPHOLIPASE C	p 122
B- SYNTHESE DES RESULTATS	p 125

IV) <u>CARACTERISATION D'UN FRAGMENT DE PHOSPHOLIPASE C</u> <u>CHEZ LA CHICOREE HYBRIDE "474"</u>	p 129
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p 133
I) <u>DISCUSSION GENERALE</u>	p 134
II) <u>PERSPECTIVES</u>	p 136
A- IMPLICATION DE LA VOIE DES PHOSPHOINOSITIDES LORS DE L'INDUCTION	
DU PROCESSUS D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE CHEZ LA CHICOREE HYBRIDE "474"	p 136
B- ETUDE DES MECANISMES D'HOMEOSTASIE CALCIQUE SUR CELLULES ISOLEES	p 137
par imagerie calcique sur protoplastes	p 137
2- Etude des transporteurs ioniques des protoplastes de chicorée	-
par la technique du patch-clamp	p 140
C- UTILISATION DE L'OVOCYTE DE XENOPE COMME SYSTEME	
D'EXPRESSION FONCTIONNELLE	p 141
1- Expression hétérologue d'ARN totaux de feuilles de chicorée	
induites ou non en conditions embryogènes	p 141
2- Etude du fonctionnement de récepteurs hormonaux	
membranaires potentiellement néoexprimés	p 141
3- Identification moléculaire et expression hétérologue	
des éléments de transduction de la chicorée hybride "474"	p 141
CONCLUSION GENERALE	p 143

SOMMAIRE

BIBLIOGRAPHIE

.

p 145

INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1: Variations de la concentration en calcium intracellulaire des cellules végétales en réponse à divers stimuli extracellulaires	p 17
Tableau 2: Transporteurs ioniques de cellules végétales néoexprimés avec succès dans les ovocytes de Xénope	p 68
Tableau 3: Composition des milieux de culture et des solutions mères pour les milieux M17 et Heller	p 71
Tableau 4: Composition des tampons d'extraction des ARN totaux	p 72
Tableau 5: Composition du milieu de survie ND96 pour la préparation des ovocytes et des milieux d'incubation dépourvus en ions calcium ou chlorures	p 75
Tableau 6: Tableau de contingence 2x2 utilisé pour le test du χ^2	p 86
Tableau 7: Composition du tampon TBE 10 fois concentré	p 94
Tableau 8: Composition du milieu MC0 pour la préparation des protoplastes	p 97
Tableau 9: Comparaison de la séquence protéique du fragment de la PLC de chicorée hybride "474" avec celles contenues dans les banques de données	p 132

Figure 1: Signaux de transduction chez les plantes	p 16
Figure 2: Concentrations calciques des compartiments intracellulaires des cellules végétales	p 22
Figure 3: Représentation schématique de la structure du récepteur InsP ₃ des cellules animales	p 31
Figure 4: Illustration des mécanismes impliqués dans la régulation du récepteur-canal InsP ₃ des cellules animales	p 35
Figure 5: Illustration des mécanismes d'homéostasie calcique des cellules végétales	p 38
Figure 6: Illustration de la voie de signalisation des phosphoinositides des cellules animales	p 43
Figure 7: Schéma illustrant le signal de transduction de l'ABA lors d'un déficit hydrique	p 47
Figure 8: Schéma récapitulatif des conductances endogènes de l'ovocyte de Xénope	p 51

Figure 9: Organisation hiérarchisée de la signalisation calcique intracellulaire	p 57
Figure 10: Activation du récepteur-canal $InsP_3$ par fixation séquentielle de molécules d'InsP ₃ et d'ions calcium	p 58
Figure 11: Genèse d'une vague calcique	p 58
Figure 12: Illustration du couplage conformationnel entre les récepteurs-canaux $InsP_3$ de type III et les canaux CRAC de la membrane plasmique	p 62
Figure 13: Modèle d'activation de l'entrée capacitative : " Hypothèse CIF"	p 63
Figure 14: Modèle d'activation de l'entrée capacitative : "Hypothèse microrégion"	p 65
Figure 15: Mécanismes de régulation de l'entrée capacitative de calcium	p 66
Figure 16: Multiplication des vitroplants par embryogenèse somatique à partir de racines de chicorée hybride "474"	p 73
Figure 17: Obtention et sélection des ovocytes	p 76
Figure 18: Traitement des ovocytes par la collagénase	p 77
Figure 19: Analyse de l'amplitude des courants ioniques en fonction du potentiel de membrane et analyse des courants de queue	p 81
Figure 20: Schéma du montage électrophysiologique du potentiel imposé à deux microélectrodes	p 83
Figure 21: Amorces dégénérées choisies par le logiciel CODEHOP	p 88
Figure 22: Alignements des séquences protéiques de diverses phospholipases C spécifiques des phosphoinositides du règne végétal	p 89
Figure 23: Principe de la PCR	p 93
Figure 24: Cycles thermiques utilisés pour A-PCR avec amorces dégénérées et B-PCR avec amorces M13	p 94
Figure 25: Changement de cinétique du courant sortant enregistré au niveau d'un ovocyte injecté avec les ARN totaux de feuilles de chicorée	p 103
Figure 26: Propriétés électrophysiologiques du courant sortant Ini	p 104
Figure 27: Propriétés pharmacologiques du courant sortant Ini	p 106
Figure 28: Caractéristiques du courant sortant Ii	p 107

Figure 29: Dépendance du courant sortant I_i vis à vis des ions chlorures et calcium extracellulaires	p 109
Figure 30: Effet de l'application extracellulaire de La^{3+} sur le courant I_i et courbe d'activation du courant	p 111
Figure 31: Illustration des mécanismes induits par l'expression hétérologue des ARN totaux de feuilles de chicorée hybride "474" dans les ovocytes de Xénope	p 115
Figure 32: Le développement de I_{ni} peut être mimé par l'injection intracellulaire d'InsP ₃ dans des ovocytes contrôles	p 117
Figure 33: Effet de l'injection d'InsP ₃ dans des ovocytes contrôles et des ovocytes injectés des ARN totaux	p 118
Figure 34: Effet de l'application extracellulaire de caféine sur le développement de Ini	p 120
Figure 35: Mesures des taux d'InsP ₃	p 121
Figure 36: Implication des molécules d'InsP ₃ dans la libération de calcium des réserves intracellulaires	p 123
Figure 37: Effet de l'application extracellulaire d'U73122 et de son analogue inactif U73343 sur le développement de I_{ni}	p 124
Figure 38: Illustration du signal de transduction impliquant la voie des phosphoinositides induit par l'expression hétérologue des ARN totaux de feuilles de chicorée dans les ovocytes	p 128
Figure 39: Séparation en gel d'agarose des produits de PCR obtenus avec le couple d'amorces dégénérées sur diverses dilutions (1/10, 1/40, 1/80) des ADNc de feuilles de chicorée hybride "474"	p 130
Figure 40: Séquences nucléotidiques et protéiques des consensus de quatre clones correspondants à un fragment de PLC de chicorée hybride "474"	p 131
Figure 41: Imagerie calcique sur protoplastes de la chicorée "474"	p 138

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les plantes sont capables de s'adapter continuellement aux variations des conditions environnementales et de réagir à ces changements par diverses réponses physiologiques appropriées. L'ensemble des mécanismes intracellulaires mis en oeuvre est alors appelé « SIGNAUX DE TRANSDUCTION ». Ces signaux sont de plus en plus étudiés dans les cellules végétales et semblent être très proches des schémas de transduction déjà établis dans les cellules animales (figure 1, d'après Muto, 1992).

Les signaux de l'environnement tels que la lumière, la température, les variations de pression osmotique, sont perçus au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales par des récepteurs. Ces signaux sont ensuite propagés à l'intérieur de la cellule grâce à des seconds messagers qui conduisent, par des modifications protéiques ou l'activation de gènes, aux réponses physiologiques initiées par les stimuli.

De nombreuses études montrent le rôle primordial des ions calcium dans les signaux de transduction au cours de divers processus physiologiques chez les plantes (Bush, 1995; Webb *et al.*, 1996; Rudd et Franklin-Tong, 1999; Sanders *et al.*, 1999; White, 2000). En effet, des variations de la concentration de calcium intracellulaire, $[Ca^{2+}]i$, ont été détectées en réponse à divers stimuli extracellulaires dans de nombreux types cellulaires (tableau 1, d'après Bush, 1995). Ainsi, l'acide abscissique (ABA) provoque l'augmentation rapide de la $[Ca^{2+}]i$ des cellules de garde, conduisant à la fermeture des stomates (Gilroy *et al.*, 1990). Les variations de la $[Ca^{2+}]i$ sont impliquées également dans la réponse à de nombreux stress dus, par exemple, à des stimuli mécaniques ou à des changements de température (Knight *et al.*, 1991; Biyaseheva *et al.*, 1993).

Le processus physiologique auquel nous nous intéressons plus particulièrement est l'EMBRYOGENESE SOMATIQUE. Les cellules végétales, contrairement aux cellules animales, présentent la propriété d'être totipotentes : une cellule somatique étant susceptible d'être à l'origine d'une plante. Grâce aux techniques de culture *in vitro*, des cellules somatiques, même si elles sont initialement différenciées au sein du tissu, peuvent se dédifférencier puis s'engager vers la formation d'un embryon (Yeung, 1995). De telles cellules, dites embryogènes, subissent alors de nombreuses divisions mitotiques aboutissant à la formation d'un embryon somatique qui, une fois isolé, pourra donner naissance à une plante entière. Les différentes phases de développement des embryons somatiques sont très semblables à celles observées lors de l'embryogenèse zygotique au sein d'une graine (Zimmerman, 1993).



Figure 1 : Signaux de transduction chez les plantes (d'après Muto, 1992)

Stimuli	Types cellulaires	[Ca ²⁺]i	Références
Stimuli mécaniques	Cellules épidermiques de Tabac	Augmentation transitoire rapide	Knight <i>et al.</i> , 1991 Knight <i>et al.</i> , 1992
Basses températures	Cellules épidermiques de Tabac	Augmentation transitoire rapide	Knight <i>et al</i> ., 1991
Températures élevées	Protoplastes de mésophylle	Augmentation	Biyaseheva et al., 1993
H_20_2	Cellules de garde	Augmentation	McAinsh, 1994
Auxines	Cellules de racines	Diminution	Gehring et al., 1990
ABA	Cellules de garde	Augmentation	Gilroy <i>et al.</i> , 1990 McAinsh <i>et al.</i> , 1992 Staxen <i>et al.</i> , 1999
Lumière rouge	Protoplastes de mésophylle	Augmentation puis diminution	Shacklock et al., 1992

Tableau 1:Variations de la concentration en calcium intracellulaire des cellulesvégétales en réponse à divers stimuli extracellulaires

INTRODUCTION

L'embryogenèse somatique est un système performant de multiplication végétative des plantes. Mais, si le nombre d'études décrivant des espèces végétales capables de produire des embryons somatiques augmente chaque année (Kiyosue *et al.*, 1992), beaucoup d'espèces, voir de génotypes sont encore réfractaires. Cette limitation actuelle à révéler la capacité embryogène nous conduit à étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires du déterminisme embryogène des cellules somatiques qui demeurent encore mal connus.

Chez la chicorée hybride "474", que nous utilisons comme modèle expérimental, les embryons sont formés rapidement (en une dizaine de jours), en grand nombre et directement, que se soit à partir de cellules d'anthères, de styles ou de feuilles (Vasseur et al., 1995). Les meilleures conditions d'induction de l'embryogenèse somatique sont obtenues avec une température de 35°C. Le milieu d'induction contient des régulateurs de croissance ainsi que des composés glucidiques et azotés. Blervacq et al. (1994), ont montré que les explants de chicorée ainsi mis en culture présentaient des cellules en voie de réactivation. Ces cellules se caractérisent d'abord par une augmentation du diamètre du noyau et du nucléole, puis par un déplacement du noyau vers le centre de la cellule ainsi que par la mise en place de trabécules cytoplasmiques qui fragmentent la vacuole : les cellules sont dites alors embryogènes. De plus, on observe l'apparition de callose pariétale (polymère de β-1,3 glucane) entre le troisième et le quatrième jour de culture uniquement autour des cellules embryogènes, et ceci de manière transitoire puisqu'elle disparaît lors de la division de ces cellules (Guedira et al., 1990). La callose représente ainsi un marqueur précoce de l'embryogenèse somatique chez la chicorée. Son rôle serait d'isoler les cellules somatiques au sein du tissu afin de leur permettre de déclencher une nouvelle voie métabolique conduisant à la formation d'embryons somatiques.

A l'heure actuelle, un nombre croissant d'études montrent que certains mécanismes calciques interviendraient au cours du processus d'embryogenèse somatique. Ainsi, Timmers *et al.* (1989, 1996), ont décrit, grâce au marqueur fluorescent chlorotétracycline, une augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ situé à proximité de la membrane plasmique, ainsi qu'une activation locale de la calmoduline des cellules embryogènes de carotte. Dans ce même modèle, la hausse de la concentration en calcium dans le milieu de culture stimule le potentiel embryogène des cultures cellulaires (Jansen *et al.*, 1990).

En ce qui concerne le processus d'embryogenèse somatique de la chicorée hybride "474", une augmentation de [Ca²⁺]i, spécifique des cellules embryogènes, a été décrite par Verdus *et al.* (1993). L'utilisation d'EGTA, un chélateur des ions calcium et de vérapamil, un

INTRODUCTION

antagoniste des canaux calciques dépendants du potentiel, diminuent la formation des embryons somatiques (Duminy, 1993). Par ailleurs, chez *Catharanthus*, la formation de callose (marqueur précoce de l'embryogenèse somatique chez la chicorée hybride "474") est induite par une augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ probablement dûe à des variations de la perméabilité ionique membranaire (Kauss *et al.*, 1990).

Les cellules végétales, au même titre que les cellules animales, possèdent un large panel de mécanismes leur permettant de contrôler l'homéostasie calcique intracellulaire. Malgré la description de plus en plus importante des transporteurs calciques du règne végétal, l'implication de ces derniers au cours de processus physiologiques est peu rapportée dans la littérature.

Même si quelques travaux impliquent le Ca²⁺ au cours du processus d'embryogenèse somatique chez les plantes et chez la chicorée hybride "474", aucune étude ne décrit précisément les mécanismes ioniques responsables de l'homéostasie calcique des cellules de chicorée.

L'objectif de notre travail consiste en l'étude des modifications de l'homéostasie calcique apportées par l'expression fonctionnelle d'ARN totaux de feuilles de chicorée "474" dans les ovocytes de Xénope.

Ces travaux nous permettent d'établir les fondations d'une approche dynamique des signaux de transduction liés au calcium chez la chicorée. Ils nous amènent à discuter quant à l'implication de ces voies de signalisation au cours de processus physiologiques variés et en particulier l'embryogenèse somatique.

LES DIFFERENTES VOIES DE REGULATION DU CALCIUM CHEZ LES PLANTES :

IMPLICATION LORS DES SIGNAUX DE TRANSDUCTION

Le calcium étant un élément essentiel au bon fonctionnement physiologique des cellules végétales, la première partie de ce manuscrit consistera en la description précise des mécanismes d'homéostasie calcique de ces cellules ainsi que de leurs implications au cours des signaux de transduction.

I) LES MECANISMES D'HOMEOSTASIE CALCIQUE DES CELLULES VEGETALES

La cellule végétale comprend une paroi pectocellulosique, une membrane plasmique et un cytoplasme renfermant un noyau et divers organites. Ce cytoplasme est réduit à une mince couche périphérique du fait de la présence d'une volumineuse vacuole centrale. Le cytoplasme est délimité du côté externe par la membrane plasmique (ou plasmalemme) et de l'autre par la membrane vacuolaire (ou tonoplaste). La cellule est entourée d'une paroi pectocellulosique qui constitue une coque rigide. La vacuole constitue la réserve principale en ions minéraux et organiques, glucides et protéines.

Les concentrations calciques cytoplasmique, vacuolaire ou extracellulaire sont très différentes. En particulier, le Ca^{2+} libre (non lié à diverses protéines) est concentré d'un facteur 1000 dans le milieu intravacuolaire par rapport au milieu cytoplasmique (figure 2; Bush, 1995). Cette importante différence de concentration en Ca^{2+} de ces deux compartiments cellulaires ainsi que le maintien à un taux faible de la concentration calcique cytosolique ($[Ca^{2+}]i$) sont liés au rôle qu'exerce cet ion en tant que SECOND-MESSAGER. En effet, la concentration en Ca^{2+} libre cytoplasmique est maintenue à une valeur faible dans les conditions de repos et change rapidement en réponse à un stimulus. Ce changement rapide précède la réponse physiologique. Ceci implique que la cellule végétale ait une réserve de Ca^{2+} importante rapidement mobilisable. Cette réserve est constituée principalement par la vacuole.

La description des mécanismes régulant la [Ca²⁺] dans les divers compartiments intracellulaires nous permettra de **comprendre comment une cellule végétale utilise le calcium comme second messager dans la transduction des signaux extracellulaires**. Cette description sera organisée suivant la localisation cellulaire des divers mécanismes contrôlant l'homéostasie calcique au niveau de la membrane plasmique et du tonoplaste.



Seuls les mécanismes de la vacuole seront décrits dans le cadre de ce manuscrit afin d'illustrer les propriétés des membranes intracellulaires chez les végétaux. Ce choix est justifié par le fait que la vacuole est la réserve calcique la plus importante des cellules végétales par rapport au réticulum endoplasmique ou aux mitochondries (Rudd et Franklin-Tong, 1999).

A- LES TRANSPORTEURS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

Les transporteurs calciques de la membrane plasmique peuvent permettre soit un **influx** de Ca^{2+} (depuis le milieu extracellulaire vers le cytoplasme) soit un **efflux** de Ca^{2+} . Les transporteurs autorisant un influx de Ca^{2+} ont un rôle essentiel lors des signaux de transduction impliquant une augmentation rapide de la $[Ca^{2+}]i$. A l'inverse, les transporteurs permettant un efflux de Ca^{2+} depuis l'intérieur de la cellule vers l'extérieur ont pour fonction de maintenir la $[Ca^{2+}]i$ à une valeur faible en expulsant l'excès de Ca^{2+} suite à une réponse physiologique.

Notons que les canaux calciques situés sur la membrane plasmique des cellules animales sont multiples de par leur mode d'activation. On peut ainsi distinguer les canaux calciques dont l'activation dépend des variations du potentiel membranaire (Voltage Operated Channel ou VOC appelés aussi canaux voltage-dépendants) et les canaux dont l'ouverture est conditionnée par l'activation préalable d'un récepteur membranaire. L'activation de ce récepteur peut stimuler directement le canal calcique qui lui est couplé (Receptor Operated Channel ou ROC) ou alors indirectement par le biais de seconds messagers intracellulaires (Second Messenger Operated Channel ou SMOC). Notons l'existence d'un autre type de canal, nommé CRAC (Calcium Release Activated Channel), dont l'ouverture est dépendante de la vidange des réserves calciques intracellulaires.

Les canaux calciques de type ROC, SMOC et CRAC n'ont pas encore été décrits dans le règne végétal.

1- Les mécanismes permettant un influx de calcium

1.1- Les canaux calciques voltage-dépendants

Des études électrophysiologiques ont été réalisées sur des protoplastes (cellules végétales dépourvues de paroi) en utilisant la technique de patch-clamp en configuration cellule entière. Cette technique a permis la mise en évidence de canaux calciques dépendants du potentiel membranaire (voltage-dépendants) situés sur la membrane plasmique de protoplastes de carotte (Thuleau *et al.*, 1994a). Les auteurs ont montré que ces canaux sont activés par une dépolarisation de la membrane plasmique à partir d'un potentiel seuil situé aux alentours de -135 mV. Le potentiel d'inversion de ce courant se positionne à +30 mV, valeur qui correspond à la pile d'équilibre des ions Ca²⁺ dans les conditions ioniques utilisées. Ces courants calciques présentent une inactivation plus lente que celle des canaux calciques de type L des cellules animales. Les auteurs rapportent également un phénomène de "rundown" du courant calcique défini comme étant la diminution de l'amplitude du courant au cours du temps.

Les canaux calciques mis en évidence dans les protoplastes de carotte diffèrent de ceux du règne animal par rapport à leur potentiel seuil d'activation. Ce potentiel seuil est de 50 à 90 mV plus négatif dans les protoplastes que dans les cellules animales. Ce potentiel seuil très négatif est parfaitement adapté au potentiel de repos d'une cellule végétale qui se situe aux alentours de -150 à -200 mV (Bush, 1995). Le potentiel de repos est maintenu à cette valeur très négative principalement par l'expulsion active des protons *via* les H⁺-ATPase (Assmann et Haubrick, 1996).

Suite à cette première étude, les mêmes auteurs ont caractérisé le mode de régulation et plus précisément de recrutement (activation en fonction du potentiel) de ces canaux calciques (Thuleau *et al.*, 1994b). Une prédépolarisation préalable de la membrane plasmique des protoplastes induit un recrutement croissant des canaux. Plus la prédépolarisation est longue et élevée, plus le recrutement des canaux est important. Les auteurs suggèrent que les canaux calciques dépendants du potentiel de la membrane plasmique, initialement inactifs, sont régulés par des mécanismes qui doivent être induits par de longues prédépolarisations de la membrane plasmique. Afin d'élucider les bases biochimiques de ce phénomène de recrutement, les auteurs proposent l'intervention de modifications post-traductionnelles des canaux calciques. Cette hypothèse est cohérente avec les données établies chez les animaux où il a clairement été démontré le rôle des phosphorylations protéiques dans le recrutement et l'inactivation des canaux calciques voltage-dépendants (Artalejo *et al.*, 1992).

D'autres études ont mis en évidence également des canaux calciques voltagedépendants au niveau de cellules de racines de blé ou de seigle (White, 1994 ; Piñeros et Tester, 1995). L'incorporation de canaux sélectifs au Ca²⁺ (obtenus à partir de fractions enrichies de membrane plasmique) dans des bicouches lipidiques artificielles, conduit à l'enregistrement d'un courant calcique activé par dépolarisation (Piñeros et Tester, 1995).

Les stimuli physiologiques qui activent spécifiquement les canaux calciques voltagedépendants demeurent encore inconnus. Néanmoins, le rôle essentiel de ces canaux calciques dépendants du potentiel est de permettre un influx important de Ca²⁺ conduisant ainsi aux réponses physiologiques appropriées.

1.2-Les canaux mécanosensitifs

Une autre catégorie de canaux calciques membranaires permet un influx de Ca^{2+} dans les cellules végétales. Ces canaux sont de type mécanosensitifs et seraient liés à la transduction de signaux en relation avec l'osmorégulation (Cosgrove et Hedrich, 1991). Des stimuli extracellulaires pourraient être transférés à la membrane plasmique et donc aux canaux mécanosensitifs *via* des éléments du cytosquelette de type actine.

2- Les mécanismes permettant un efflux de calcium

Le maintien de la $[Ca^{2+}]i$ en deçà de 0,1 à 1 μ M est nécessaire à la fonction de second messager de cet ion. Cette valeur faible de $[Ca^{2+}]i$ est obtenue grâce à l'activité de transporteurs actifs de Ca²⁺ situés sur la membrane plasmique ou le tonoplaste des cellules végétales.

Il existe deux types de transporteurs actifs de Ca^{2+} que sont les ATPase calciques et les échangeurs Ca^{2+}/H^+ .

2.1- Les ATPase calciques

La littérature apporte de plus en plus d'éléments nous amenant à séparer les ATPase calcique des cellules végétales en deux groupes identiques à ceux décrits dans le règne animal.

Le premier type de Ca^{2+} -ATPase, situé habituellement au niveau du réticulum sarcoplasmique ou endoplasmique des cellules animales, possède une masse moléculaire de 100 à 120 KDa, n'est pas stimulé par la calmoduline et transporte deux ions Ca^{2+} pour l'hydrolyse d'une seule molécule d'ATP (Adénosine TriPhosphate). Le second type, principalement placé sur la membrane plasmique des érythrocytes, a une masse moléculaire de 134 à 140 KDa, est stimulé par la calmoduline et transporte un ion Ca^{2+} par molécule d'ATP hydrolysée (pour revue, voir Bush, 1995).

Chez les plantes, les transporteurs stimulés par la calmoduline se situent sur les membranes intracellulaires (réticulum endoplasmique et vacuole) et non sur la membrane plasmique (Gavin *et al.*, 1993). A l'inverse, les Ca^{2+} -ATPase qui fonctionnent indépendamment de la calmoduline ont été décrites sur la membrane plasmique des cellules végétales (Bush, 1992 ; Butcher et Evans, 1987 ; Gräf et Weiler, 1989 ; Olbe et Sommarin, 1991 ; Qui et Su, 1998 ; Rasi-Caldogno *et al.*, 1985).

Ces Ca²⁺-ATPase ont pour fonction d'expulser le Ca²⁺ en excès du cytoplasme et ainsi de maintenir la [Ca²⁺]i à une valeur faible.

2.2- Les échangeurs calcium/proton

Les échangeurs Ca^{2+}/H^{+} sont essentiellement décrits dans la littérature comme étant situés sur le tonoplaste des cellules végétales (Chanson, 1994). Néanmoins, Kasai et Muto (1990) décrivent l'existence d'un tel échangeur au niveau de la membrane plasmique des cellules de maïs.

Les échangeurs Ca²⁺/H⁺ constituent des transporteurs actifs secondaires à savoir qu'ils utilisent pour leur fonctionnement le gradient produit par un transporteur actif primaire grâce à l'hydrolyse de molécules d'ATP. La source d'énergie pour le fonctionnement de ces échangeurs est le gradient de pH préalablement établi par les H⁺-ATPase.

B- LES TRANSPORTEURS DE LA VACUOLE

La vacuole joue un rôle essentiel lors des signaux de transduction impliquant le Ca^{2+} . En effet, ce compartiment intracellulaire constitue la réserve de Ca^{2+} la plus importante pour la cellule végétale (pour revue, voir Rudd et Franklin-Tong, 1999). D'autres organites intracellulaires peuvent également remplir la fonction de stock calcique : le reticulum endoplasmique ou les mitochondries. Néanmoins, ces compartiments tiennent, du fait de leur taille, une place minoritaire par rapport à la vacuole dans la signalisation calcique intracellulaire. Les transporteurs calciques situés sur la membrane vacuolaire permettent soit un mouvement de Ca^{2+} depuis le milieu intravacuolaire vers le cytoplasme (mécanismes induisant une **libération** de Ca^{2+}) soit un mouvement de Ca^{2+} inverse (mécanismes permettant une **capture** du Ca^{2+}).

1- Les mécanismes permettant une libération de calcium

La membrane vacuolaire possède deux classes de canaux calciques permettant une libération importante de Ca^{2+} dans le cytoplasme en réponse à divers stimuli. Cette libération massive de Ca^{2+} engendre une augmentation rapide, locale et transitoire de la $[Ca^{2+}]i$ indispensable à la transduction des signaux extérieurs. Les canaux calciques en question sont soit activés par des variations du potentiel membranaire (voltage-dépendants) soit activés par la fixation d'un ligand (ligand-dépendants).

Il est à noter que l'existence des canaux calciques activés par le voltage au niveau d'une membrane intracellulaire constitue une particularité des cellules végétales. A l'inverse, les canaux calciques ligands-dépendants ont un fonctionnement proche du modèle animal.

1.1- Les canaux calciques voltage-dépendants

Des études électrophysiologiques par la technique du patch-clamp sur vacuoles isolées ont établi l'existence de canaux calciques dépendants du potentiel au niveau du tonoplaste des cellules végétales (Johannes *et al.*, 1992a et b; Ping *et al.*, 1992; Gelli et Blumwald, 1993; Allen et Sanders, 1994; Johannes et Sanders, 1995a et b). L'ensemble de ces travaux démontre que ces canaux calciques sont activés par une dépolarisation du tonoplaste (le potentiel cytoplasmique devenant plus négatif que le potentiel intravacuolaire). La

 $[Ca^{2+}]$ vacuolaire joue un rôle important dans la régulation de l'activité de ces canaux. De fait, l'ouverture du canal nécessite la présence de Ca²⁺ dans la lumière de la vacuole. En effet, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]$ intraluminal du micromolaire au millimolaire résulte en une nette hausse du nombre de canaux ouverts (Johannes et Sanders, 1995a).

A l'inverse, les effets régulateurs de la $[Ca^{2+}]i$ semblent moins clairement établis puisque certains auteurs ne rapportent aucun effet sur l'activité du canal (Johannes *et al.*, 1992b) alors que d'autres auteurs établissent un effet inhibiteur sur cette activité (Gelli et Blumwald, 1993).

Des études en patch-clamp sur des vacuoles isolées de cellules de garde, montrent l'existence d'une autre catégorie de canaux calciques voltage-dépendants dits canaux de type « SV », pour « Slow Vacuolar » (Ward et Schroeder, 1994).

1.2- Les canaux calciques ligand-dépendants

Deux types de canaux calciques ligands-dépendants co-existent au sein du tonoplaste : les canaux activés par la fixation de l'Inositol 1,4,5 Triphosphate (InsP₃) et les canaux activés par la fixation d'une molécule d'ADP ribose cyclique (cADPR), (Schumaker et Sze, 1987 ; Allen *et al.*, 1995).

1.2.1-Les canaux sensibles à l'InsP₃

Cette partie fait intervenir non seulement les données établies chez les végétaux mais également les travaux réalisés dans le domaine animal qui constituent une base de travail.

1.2.1.1- Structure et isoformes des récepteurs-canaux InsP₃ des cellules animales

Le canal calcique activé par la fixation de l'InsP₃ est également appelé "récepteurcanal" puisqu'il rempli une double fonction : celle de récepteur pour les molécules d'InsP₃ et celle de canal pour les ions Ca^{2+} .

Il existe trois types d'isoformes de récepteurs-canaux $InsP_3$: le récepteur de type I, de type II et de type III (Furuichi *et al.*, 1994).

Ces trois isoformes présentent une homologie de 60 à 70 % et diffèrent par leur localisation tissulaire (Bezprozvanny et Ehrlich, 1995 ; Patel *et al.*, 1999). Le récepteur de type I est principalement présent au sein du système nerveux central. Le récepteur de type II a été décrit au niveau du système nerveux central mais également dans les hépatocytes alors que le récepteur de type III est présent au sein des îlots pancréatiques, des reins et du système gastro-intestinal.

Les trois isoformes présentent des différences moléculaires qui leur confèrent des divergences du point de vue de leur régulation et de leur fonctionnement. Ainsi, l'isoforme de type II est deux fois plus sensible à l'InsP₃ que l'isoforme de type I alors que le récepteur de type III est approximativement dix fois moins sensible. Par ailleurs, les trois isoformes sont régulés différemment par le Ca²⁺, les protéines kinases et le pH (pour revue, voir Patel *et al.*, 1999). Ainsi, le Ca²⁺ inhibe la fixation de l'InsP₃ sur le récepteur de type I alors qu'il stimule cette fixation sur les isoformes de types II et III (Cardy *et al.*, 1997 ; Picard *et al.*, 1998).

Une étude récente établi également que l'isoforme de type II est impliqué dans des oscillations calciques régulières et durables alors que les types I et III engendrent des oscillations moins régulières et plus brèves (Miyakawa *et al.*, 1999).

Notons enfin que le récepteur-canal de type I serait lié à la propriété même de libération du Ca^{2+} alors que le récepteur-canal de type III serait plus particulièrement lié à l'activation de l'entrée capacitative de Ca^{2+} (Berridge, 1995).

Le récepteur-canal InsP₃, ainsi que son fonctionnement, sont bien connus chez les animaux et ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années (Berridge, 1993 ; Bezprozvanny, 1995 ; Mikoshiba, 1997 ; Patel *et al.*, 1999).

La protéine est un canal, sélectif au Ca^{2+} , situé au niveau des membranes intracellulaires (essentiellement le réticulum endoplasmique dans le cas des cellules animales). L'activation de ce canal, par la fixation de molécules d'InsP₃, engendre l'ouverture d'un pore sélectif au Ca²⁺ qui permet alors la diffusion des ions Ca²⁺ suivant leur gradient de concentration à savoir du milieu intraluminal vers le milieu cytoplasmique.

Des expériences réalisées après reconstitution du récepteur $InsP_3$ dans des bicouches phospholipidiques ont permis de déterminer la sélectivité relative du récepteur-canal au ions divalents (Bezprozvanny et Ehrlich, 1995). Les auteurs établissent la séquence suivante : $Ba^{2+}>Sr^{2+}>Ca^{2+}>Mg^{2+}$.

INTRODUCTION

Le récepteur-canal de type I est un tétramère constitué de quatre sous-unités de chacune 313 KDa. Chaque sous-unité contient 3 domaines fonctionnels (figure 3) :

→ un domaine extraréticulaire N-terminal hydrophile qui est le lieu de fixation du ligand. Yoshikawa *et al.* (1996) ont mis en évidence la nature du lieu de fixation de l'InsP₃ sur son récepteur. Il s'agirait de la partie constituée par les acides aminés 226 à 578 de la partie Nterminale de la protéine. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de mettre en évidence 10 résidus basiques (Arg et Lys) dans la formation d'une région chargée positivement susceptible d'interagir avec les charges négatives des phosphates de l'InsP₃.

→ Un domaine de couplage intermédiaire. Ce domaine régulateur comporte les sites consensuels de phosphorylation par diverses protéines kinases activés par l'AMPc (PKA) ou par le GMPc (PKG). Ce domaine régulateur possède également des sites de fixation au Ca²⁺, à la calmoduline ou à l'ATP (Michikawa *et al.*, 1996; Nakade *et al.*, 1994).

➔ Un domaine transmembranaire C-terminal qui possède 6 segments hydrophobes et constitue le pore du canal calcique (Furuichi *et al.*, 1989). La portion C-terminale la plus extrême se trouve en position cytosolique et interviendrait dans la tétramérisation du canal (Miyawaki *et al.*, 1991).

1.2.1.2- Régulations des récepteurs-canaux InsP3 des cellules animales

L'ouverture du canal est contrôlée par les molécules d'InsP₃, second-messager provenant de l'hydrolyse des phosphatidylinositol biphosphates par les phospholipases C. Marchant et Taylor (1997), suggèrent que la conformation fermée du canal est très stable et de fait peu susceptible d'être activée spontanément. Il semble qu'au moins 3 molécules (probablement 4) d'InsP₃ soient nécessaires à l'ouverture du canal en conformation stable.



Le Ca^{2+} tient un rôle essentiel dans la régulation de ces canaux calciques. Le récepteur-canal voit son activité modulée par la $[Ca^{2+}]i$ suivant une courbe en cloche avec une activité maximale pour une concentration en Ca^{2+} libre se situant entre 200 et 300 nM (Parker et Ivorra, 1990a). Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer les effets facilitateurs du Ca^{2+} sur le récepteur InsP₃:

 $rac{1}{2}$ le Ca²⁺ augmenterait le nombre de sites de liaison pour l'InsP₃ en se fixant sur un site spécifique du récepteur (Missiaen *et al.*, 1996),

La littérature rapporte également les mécanismes amenant le Ca^{2+} à inhiber le fonctionnement des récepteurs-canaux InsP₃. De récentes études montrent le rôle inhibiteur du Ca^{2+} cytosolique sur la fixation de l'InsP₃ aux récepteurs de type I (Picard *et al.*, 1998 ; Sipma *et al.*, 1999).

Les mécanismes inhibiteurs du Ca²⁺ cytosolique sur le récepteur font l'objet de plusieurs hypothèses :

 $rac{1}{2}$ le Ca²⁺ agirait directement sur le récepteur (Marshall et Taylor, 1994). Cette interaction est rendue en effet possible par l'existence de 7 sites cytosoliques de fixation au Ca²⁺ et de 1 site intraluminal sur le récepteur de type I (Sienaert *et al.*, 1997).

b l'inhibition du récepteur-canal serait due à une phosphatase qui serait activée par le calcium (Zhang et al., 1993).

✤ Danoff *et al.* (1988) ont postulé qu'une protéine annexe (calmédine) pourrait être le médiateur des effets négatifs du Ca²⁺ sur le récepteur InsP₃.

al., 1999 ; Michikawa *et al.*, 1999). En effet, les auteurs démontrent que l'inhibition du fonctionnement des récepteurs InsP₃ par le Ca²⁺ implique la calmoduline. Par ailleurs, notons que la calmoduline inhibe la fixation des molécules d'InsP₃ sur les récepteurs-canaux de type I indépendamment du Ca²⁺ (Sipma *et al.*, 1999). Les auteurs suggèrent que la partie N-terminale du récepteur possède des sites de fixation à la calmoduline.

La régulation du canal peut également être sous le contrôle de la [Ca²⁺] intraréticulaire, l'augmentation du degré de déplétion provoquant une diminution de la

sensibilité du canal à l'InsP₃ prévenant ainsi d'une déplétion trop importante en Ca²⁺ (Missiaen *et al.*, 1992). De plus Missiaen *et al.* (1994) montrent que le Ca²⁺ intraluminal peut se substituer au Ca²⁺ cytosolique afin de provoquer le relargage de Ca²⁺ en présence d'un taux constant d'InsP₃. Une hypothèse avancée est que les ions Ca²⁺ libérés du milieu intraluminal se fixent sur le site de stimulation cytosolique de récepteur-canal.

Les données établies dans la littérature concernent essentiellement le récepteur de type I qui a fait l'objet des principales études concernant la régulation des récepteurs $InsP_3$ par le Ca^{2+} . Notons néanmoins plusieurs études relatant un effet positif de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ sur la fixation d'InsP₃ aux récepteurs de type III (Yoneshima *et al.*, 1997 ; Cardy *et al.*, 1997). Par ailleurs, à l'inverse des types cellulaires exprimant de façon prédominante les récepteurs de type I, l'affinité des récepteurs pour l'InsP₃ augmente en présence de Ca^{2+} cytosolique dans les hépatocytes qui expriment principalement l'isoforme de type II (Picard *et al.*, 1998).

Il apparaît donc que les récepteurs sensibles à l'InsP₃ sont régulés par le Ca²⁺ cytosolique et intraluminal. Ainsi, les ions Ca²⁺ sont capables de potentialiser ou d'inhiber leur propre libération des réserves intracellulaires (pour revue, voir Parys *et al.*, 2000).

Le récepteur InsP₃ est également la cible de phosphorylations par différentes protéines kinases (PKA, PKC, CaMK...). Il semble selon plusieurs études que la phosphorylation des récepteurs-canaux entraîne une augmentation du relargage de Ca²⁺ (Nakade *et al.*, 1994; Matter *et al.*, 1993).

Le canal sensible à l'InsP₃ voit de plus son activité modulée par les variations de pH intracellulaire. En effet, une alcalinisation du milieu entraîne une sensibilisation du mécanisme de libération de Ca²⁺ (Tsukioka *et al.*, 1994). Une autre étude rapporte les effets variables des variations de pH sur l'activité des récepteurs-canaux InsP₃ selon qu'ils soient de type I ou III (De Smet *et al.*, 1999). L'isoforme de type I est plus sensible à l'InsP₃ au pH 6,8; alors que l'isoforme de type III est plus sensible au pH 7,5.

Enfin, le récepteur InsP₃ est modulé par la fixation de l'ATP dans son domaine régulateur. En effet, pour des concentrations en ATP inférieures à 4 mM, le récepteur est modulé positivement par l'ATP alors que pour des concentrations supérieures, l'ATP entre en compétition avec l'InsP₃ sur son site de fixation et empêche ainsi la libération de Ca²⁺ (Bezprozvanny et Ehrlich, 1993).

L'ensemble des mécanismes impliqués dans la régulation du canal sensible à l'InsP₃ est représenté en figure 4.

1.2.1.3- Les cellules végétales et l'InsP3

L'InsP₃ est clairement établi en tant que second messager dans le règne végétal depuis 1987 grâce à une étude réalisée par Schumaker et Sze. Ces auteurs ont démontré que l'InsP₃ est capable de provoquer la libération de Ca²⁺ à partir de la vacuole de cellules végétales. D'autres études ont confirmé ce résultat (Ranjeva *et al.*, 1988 ; Brosnan et Sanders, 1990 ; Johannes *et al.*, 1992a et b ; Gelli et Blumwald, 1993 ; Allen *et al.*, 1995 ; Calvert et Sanders, 1995). Il est également établi que la vacuole est le compartiment intracellulaire le plus sensible à l'InsP₃ devant le réticulum endoplasmique, les mitochondries ou l'appareil de Golgi (Canut *et al.*, 1993). Seule une étude rapporte une libération de Ca²⁺ par l'InsP₃ à partir du réticulum endoplasmique situé sous la membrane plasmique (Muir et Sanders, 1997).

Bien que de nombreux éléments tendent à prouver que l'InsP₃ est un élément essentiel de l'homéostasie calcique des cellules végétales, aucune étude ne décrit la caractérisation précise du récepteur-canal à l'InsP₃ dans ces cellules.

Quelques études rapportent néanmoins l'existence de récepteurs à l'InsP₃ de cellules végétales (Biswas *et al.*, 1995 ; Scanlon *et al.*, 1995 ; Dasgupta *et al.*, 1997). En particulier, les travaux de Biswas *et al.* décrivent une protéine, dont la forme native présente une masse moléculaire de 400 KDa, capable de fixer l'InsP₃. Après dénaturation, la masse moléculaire de la protéine est de 110 Kda. Les auteurs suggèrent, grâce à ce résultat, que la protéine est un homotétramère. De plus, la protéine est associée à une libération de Ca²⁺ lors de la fixation d'InsP₃ ; cette fixation étant inhibée par l'héparine.

Il semblerait donc que le récepteur à l'InsP₃ des cellules végétales présentent des caractéristiques communes avec le récepteur des cellules animales (structure homotétramérique, pharmacologie...). Néanmoins, des travaux sont encore nécessaires afin de caractériser précisément le récepteur InsP₃ des cellules végétales et de pouvoir ainsi établir une comparaison rigoureuse de ces récepteurs entre le règne animal et le règne végétal.

L'ouverture des canaux calciques sensibles à l'InsP₃ a été impliquée lors de la réponse à des stress osmotiques des cellules de racines de betterave (Allen et Sanders, 1994), ainsi que lors de la fermeture des stomates en réponse à l'ABA (Staxen *et al.*, 1999).



1.2.2- Les canaux sensibles au cADPr

Les canaux sensibles au cADPr constitue l'autre catégorie de canaux calciques vacuolaires activés par la fixation d'un ligand (Allen *et al.*, 1995). Ce second messager, produit par l'ADP ribosyl cyclase à partir du NAD (Nicotinamide Adénosine Disphosphate), se fixe à des récepteurs vacuolaires provoquant alors la **libération de Ca²⁺ vers le cytoplasme**. Chez les animaux, les récepteurs intracellulaires activés par le cADPR portent le nom de récepteur ryanodine (Berridge, 1997).

L'implication de ces canaux calciques a été proposée lors de la voie de transduction du signal induit par l'ABA dans les cellules de garde (Leckie et al., 1998).

2- Les mécanismes permettant une capture du calcium

L'activité de transporteurs actifs de calcium situés sur la membrane plasmique (voir partie A) ou le tonoplaste des cellules végétales contribue à la régulation de la $[Ca^{2+}]i$.

2.1- Les ATPase calciques

Les Ca^{2+} -ATPase situées sur le tonoplaste des cellules végétales, présentent la particularité d'être modulées par la calmoduline *via* des phosphorylations (Wang *et al.*, 1991; Gavin *et al.*, 1993). Le rôle de ces transporteurs vacuolaires est de recapter le Ca^{2+} à l'intérieur de la vacuole.

2.2- Les échangeurs calcium/proton

Ces transporteurs permettent au Ca^{2+} d'être expulsé du cytoplasme de la cellule soit vers l'extérieur de la cellule soit vers l'intérieur de la vacuole. Ces échangeurs apparaissent comme étant ubiquitaires et très actifs chez les végétaux (Bush et Sze, 1986 ; Blackford *et al.*, 1990 ; Chanson, 1994). Ils présentent une faible affinité pour le Ca²⁺ et une stoechiométrie de deux protons transportés pour un ion Ca²⁺. Leur fonction essentielle est d'accumuler le Ca²⁺ à l'intérieur de la vacuole.
Une illustration générale des transporteurs calciques des cellules végétales est rapportée en figure 5. Ce schéma regroupe l'ensemble des mécanismes précédemment décrits au niveau de la membrane plasmique et du tonoplaste des cellules.

L'ensemble des mécanismes d'homéostasie calcique précédemment décrits s'inscrivent dans le fonctionnement physiologique des cellules végétales et sont impliqués au cours de la transduction de nombreux signaux extracellulaires.



II) LES SIGNAUX DE TRANSDUCTION CHEZ LES VEGETAUX

Les plantes perçoivent de leur environnement des signaux *via* des récepteurs membranaires spécifiques. Une fois stimulés, ces récepteurs induisent une cascade d'événements conduisant à la modification de l'activité cellulaire ou à la régulation de gènes qui, en retour, amènent à la réponse biologique appropriée au stimulus d'origine. De nombreuses études sont réalisées afin de comprendre les mécanismes de transduction des signaux chez les plantes. Dans ce but, divers gènes codant pour des éléments des cascades de transduction ont été clonés. La littérature rapporte l'existence de gènes codant pour les protéines G, les protéines kinases et phosphatases, la calmoduline ou encore les récepteurs hormonaux (pour revue, voir Redhead et Palme, 1996).

Dans le règne animal, deux voies principales de transduction ont été décrites :

Ia voie de l'Adénylate Cyclase (AC) qui, stimulée par l'activation préalable d'un récepteur membranaire couplé aux protéines G (GTP-binding protein) conduit à la formation de l'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPc). L'AMPc active ensuite les protéines Kinases de type A (PKA).

La voie de la PhosphoLipase C (PLC) dont l'activation suit le même principe que précédemment : le second messager produit n'est plus l'AMPc mais l'InsP₃ et le DiAcyl Glycérol (DAG). L'InsP₃ conduit à la libération de Ca²⁺ des réserves intracellulaires tandis que le DAG active les Protéine Kinases de type C (PKC).

Il existe également les voies de la PhosphoLipase A2 (PLA2) et de la Guanylate Cyclase (GC) conduisant respectivement à la formation des seconds-messagers suivants : l'Acide Arachidonique (AA) et le Guanosine MonoPhosphate cyclique (GMPc).

Les voies AC et PLA2 ont été décrites en partie dans le règne végétal (Bolwell, 1995; Munnik *et al.*, 1998). Néanmoins, nous nous attacherons à la description de la voie de la PLC plus particulièrement impliquée dans les résultats obtenus au cours de notre travail.

La transduction des signaux chez les végétaux, comme chez les animaux, suit une trame précise : l'étape initiale est la perception et la reconnaissance du stimulus extracellulaire par un récepteur membranaire spécifique. La liaison entre ces récepteurs hormonaux et divers effecteurs intracellulaires, tels que les PLC, est réalisée grâce aux protéines G. Les effecteurs, alors stimulés, catalysent la production de seconds-messagers (InsP₃, DAG...) qui activent des protéines kinases ou phosphatases. Les phosphorylations et

déphosphorylations protéiques résultantes engendrent des modifications protéiques aboutissant aux réponses physiologiques appropriées.

A- LES RECEPTEURS

Plusieurs classes d'hormones végétales sont reconnues : l'éthylène, l'acide abscissique (ABA), les cytokinines, les auxines et les gibberellines (GA). Chaque famille hormonale est nécessaire au bon développement et fonctionnement de la plante. De plus en plus de travaux tendent à prouver que ces facteurs hormonaux sont perçus par les cellules grâce à des récepteurs membranaires (pour revue, voir Hooley, 1999).

La définition d'une hormone en physiologie animale est sans ambiguïté : c'est une substance organique sécrétée par des glandes endocrines et agissant à faible dose sur un organe ou un tissu électivement sensible à son action et dont elle règle le fonctionnement (Heller, 1990). Chez les végétaux, il n'existe pas de glandes endocrines et la notion d'hormone peut paraître moins évidente. Néanmoins, lors d'un déficit hydrique, l'ABA, produit en abondance dans les racines, est véhiculé vers les feuilles et provoque la fermeture des stomates. L'ABA se conduit donc comme une véritable hormone.

C'est pourquoi, chez les végétaux, pour qu'une substance puisse être qualifiée d'hormone, il faut qu'elle corresponde à certains critères, et en particulier être :

sendogène, c'est à dire synthétisée par l'organisme lui-même et non fournie par le milieu,

& oligodynamique, ce qui la distingue des substances trophiques (saccharose par exemple),

& vectrice d'une information qu'elle apporte à une cellule électivement sensible à son action et dont elle influence le fonctionnement.

Les récepteurs hormonaux végétaux les mieux caractérisés sont les récepteurs aux auxines (ABP pour « *Auxin Binding Protein* »). Ce type de récepteur a été identifié et cloné (pour revue, voir Redhead et Palme, 1996). Il en est ainsi de l'ABP de maïs, protéine de 40 à 45 KDa qui présente une forte affinité pour l'auxine. Le traitement des plantes par des anticorps spécifiques du récepteur inhibe généralement la croissance induite par l'auxine, ce qui confirme que les récepteurs sont bien impliqués dans la fixation de l'hormone.

B- LES PROTEINES G

La superfamille des protéines de liaison au GTP regroupe les protéines qui peuvent se lier et hydroliser le GTP. Elles interviennent dans la régulation de diverses réponses cellulaires. Cette superfamille comporte deux types de protéines: des protéines G hétéromériques et de petites protéines G monomériques. Les petites protéines G monomériques, d'un poids moléculaire compris entre 20 et 30 KDa, sont classées dans différentes sous-familles suivant la fonction qui leur est attribuée. Par exemple, les protéines de type Ras sont impliquées dans la régulation de la croissance et la différentiation alors que les protéines de type Rab régulent le transport des vésicules intracellulaires (Verma *et al.*, 1994 ; Redhead et Palme, 1996).

Les protéines G hétéromériques sont présentes chez tous les organismes et jouent un rôle essentiel dans la transduction des signaux extracellulaires. De nombreux travaux ont été réalisés amenant à une meilleure compréhension des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles de ces protéines chez les végétaux (Bischoff *et al.*, 1999).

Les protéines G hétéromériques sont formées de trois sous unités : α , β et γ . Elles permettent d'établir une liaison entre les récepteurs hormonaux et divers effecteurs intracellulaires tels que les phospholipases, les adénylate cyclases, les protéines kinases ou les canaux ioniques. La fixation d'un ligand extracellulaire à son récepteur membranaire provoque un changement de conformation de ce dernier. Ceci entraîne l'échange d'une molécule GDP par une molécule GTP sur la sous-unité α provoquant la libération du dimère $\beta\gamma$. La sous-unité α ainsi que le dimère $\beta\gamma$ engendrent l'activation des divers effecteurs précédemment cités (Berridge, 1993).

Récemment, plusieurs dizaines de protéines G ont été clonées chez les plantes (pour revue, voir Hooley, 1999). Elles semblent impliquées dans la transduction de nombreux signaux tels que la défense contre les pathogènes, les réponses aux lumières bleues et rouges, la transduction du signal de l'ABA au niveau des cellules de garde.

Chez la chicorée hybride "474", Randoux a mis en évidence deux ARNm codant pour des protéines qui présentent une homologie importante avec les protéines de liaison au GTP de type rab5. L'un de ces ARNm, détecté dès le premier jour de la cinétique d'embryogenèse, semble être corrélé à la mise en culture *in vitro* des explants (Randoux, 1999). Rappelons que les protéines G de type rab ne sont pas impliquées dans la transduction des signaux

extracellulaires mais, de par leur association avec les vésicules de sécrétion, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, elles semblent intervenir au cours du processus de sécrétion et des transports intracellulaires (Terryn *et al.*, 1993).

C- LES PROTEINES KINASES ET PHOSPHATASES

La nature de la réponse physiologique d'une cellule après l'initiation de la cascade de transduction dépend de la rapidité, de la sensibilité et de la spécificité des éléments impliqués. L'amplification et la spécificité d'une réponse dépend, entre autre, des modifications de l'état de phosphorylation de protéines intracellulaires. Ces modifications sont réalisées grâce aux protéines kinases et phosphatases. Chez les plantes, les phosphorylations (par les protéines kinases) et les déphosphorylations (par les protéines phosphatases) interviennent pour 99% sur des résidus sérine/thréonine et pour 1% sur des résidus tyrosine (Sopory et Munshi, 1998). Il existe différents types de protéines kinases chez les végétaux, à savoir : les protéines kinases dépendantes du Ca²⁺ (CDPK), les PKC activées par le DAG et le Ca²⁺, les PKA stimulées par l'AMPc et enfin les récepteurs membranaire à activité kinase (uniquement de type sérine/thréonine chez les plantes, les récepteurs de type tyrosine kinase n'ayant pas été mis en évidence dans le règne végétal ; Hardie, 1999).

Divers stimuli extracellulaires impliqueraient des changements de l'état de phosphorylation/déphosphorylation des protéines intracellulaires. De fait, les hormones végétales telles que les auxines ou l'ABA activeraient, au cours de leur signalisation intracellulaire, des protéines kinases et phosphatases et en particulier des protéines CDPK. De plus, les photorécepteurs des cellules végétales présenteraient une activité kinase (Sopory et Munshi, 1998).

D- LA VOIE DES PHOSPHOINOSITIDES

Chez les animaux, l'interaction de stimuli extracellulaires (tels que les hormones) avec leurs récepteurs membranaires stimulent l'activation de protéines G, qui en retour, activent les PLC spécifiques des phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PiP2), (pour revue, voir Berridge, 1993). L'ensemble des étapes de cette voie de transduction est illustré en figure 6.



Diverses études établissent clairement l'existence d'une telle voie de signalisation chez les végétaux (pour revue, voir Munnik *et al.*, 1998). En effet, plusieurs types de PLC ont été clonées, l'activité PLC (hydrolyse des PiP2) a été mise en évidence ainsi que le couplage entre les protéines G et les PLC. De plus, le second messager $InsP_3$ joue un rôle important dans la libération du Ca²⁺ des réserves intracellulaires (voir 1.2.1.3 de la première partie).

La voie des phosphoinositides serait impliquée dans les réponses physiologiques aux stress osmotiques (Gilroy *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1996) et aux mécanismes de défense contre les pathogènes (Walton, 1995).

III) <u>ROLE DU CALCIUM DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL HORMONAL CHEZ LES</u> <u>VEGETAUX</u>

Cette partie décrit le fonctionnement physiologique des différents acteurs des voies de transduction dans le cadre d'un exemple précis qu'est la réponse à l'ABA des cellules de garde. Compte tenu du fait que cette réponse est l'unique voie de transduction détaillée depuis la perception de l'hormone par son récepteur jusqu'à la réponse physiologique, ce modèle a été choisi afin d'illustrer la transduction du signal hormonal des cellules végétales.

En cas de déficit hydrique, l'ABA est synthétisé et provoque la fermeture des stomates, prévenant ainsi une perte d'eau excessive par la plante (Mansfield *et al.*, 1990). De fait, le rôle biologique de l'ABA est celui d'une hormone de détresse qui amène la plante à réagir contre les agressions telle que la sécheresse. Des études récentes ont permis de caractériser les étapes successives de l'action de l'ABA sur les cellules de garde, constituant ainsi un modèle très riche pour l'étude des mécanismes de transduction chez les végétaux.

Une des premières manifestations de l'ABA sur les cellules de garde est une augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ (Schroeder et Hagiwara, 1990; McAinsh *et al.*, 1992). Cette augmentation est suffisante pour induire la fermeture des stomates (Gilroy *et al.*, 1990).

Les différentes étapes peuvent être décrites de la manière suivante (schéma présenté en figure 7 et établi grâce aux travaux de Ward *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 1996; Assmann et Shimazaki, 1999; Staxen *et al.*, 1999) :

I'ABA se fixe à son récepteur membranaire de type GCR (récepteur couplé aux protéines
 G).

 \rightarrow L'activation des protéines G provoque dans un premier temps, par un mécanisme de couplage encore mal connu, un influx de Ca²⁺ depuis le milieu extracellulaire par des canaux

calciques membranaires. Il semble que les canaux calciques activés par une hyperpolarisation membranaire soient impliqués dans la réponse des cellules de garde à l'ABA (White, 2000).

→ L'activation des protéines G conduit également à la stimulation de la voie des phosphoinositides précédemment décrite et aboutissant à la formation d'InsP₃ (Staxen *et al.*, 1999) et d'autre part à l'activation des récepteurs intracellulaires sensibles au cADPR (Leckie *et al.*, 1998).

→ Le Ca^{2+} provenant de l'extérieur *via* les canaux calciques membranaires engendre l'activation de canaux potassiques dépendants du Ca^{2+} (de type VK) situés sur le tonoplaste. La sortie de K⁺ résultante provoque une dépolarisation de la membrane vacuolaire.

→ Cette dépolarisation de la membrane vacuolaire conduit à la stimulation des canaux calciques dépendants du potentiel de type SV. Le Ca^{2+} est alors libéré de la réserve intracellulaire vers le cytoplasme.

Il est à noter que le Ca^{2+} provenant de l'influx depuis le milieu extracellulaire active également les canaux SV par un processus communément appelé CICR (pour « *Calcium Induced Calcium Release* »). Ce processus concerne la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires par le Ca^{2+} lui-même.

→ L'ensemble de ces événements engendre l'augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ de la cellule de garde. Cette augmentation transitoire active des canaux anioniques et potassiques de la membrane plasmique. Il y a alors efflux de potassium et d'anion depuis le cytoplasme de la cellule vers le milieu extracellulaire qui s'accompagne d'une perte d'eau. Cette perte d'eau provoque une diminution de la turgescence des cellules et la fermeture des stomates.

→ L'ABA provoque également une augmentation du pH cytoplasmique grâce à l'expulsion des H⁺ par les H⁺-ATPase de la membrane plasmique. Cette alcalinisation du pH cytosolique conduit à l'activation des canaux potassiques membranaires contribuant ainsi à la sortie de K⁺ de la cellule.

Le signal de transduction de l'ABA dans les cellules de garde est complexe mais permet d'appréhender le rôle des différents types de transporteurs ioniques, et en particulier les mécanismes intervenant dans l'homéostasie calcique, au cours d'un processus physiologique depuis le stimulus de départ jusqu'à la réponse cellulaire. Il apparaît donc clairement que les mouvements ioniques interviennent dans les signaux de transduction des cellules végétales. Cependant, l'étude électrophysiologique des transporteurs ioniques des cellules végétales est rendue difficile par l'existence d'une paroi extracellulaire qui empêche tout accès direct à la cellule par la technique classique utilisant les microélectrodes. Une approche possible, hormis la technique de patch-clamp sur protoplastes (cellule végétale dépourvue de paroi), est la technique d'expression fonctionnelle utilisant l'ovocyte de Xénope.



METHODOLOGIE : L'OVOCYTE DE XENOPE COMME SYSTEME D'EXPRESSION

FONCTIONNELLE

I) GENERALITES SUR L'OVOCYTE DE XENOPE

Les ovocytes sont des cellules germinales stockées dans la cavité abdominale de l'animal et qui peuvent être prélevées par opération chirurgicale. Ces cellules présentent 6 stades de développement (I à VI) et sont situées à l'intérieur des lobes ovariens. Les expériences en électrophysiologie utilisent les ovocytes des stades V et VI qui présentent une séparation entre le pôle animal et le pôle végétatif bien délimitée (Dumont, 1972). Les ovocytes sont choisis à ce stade de développement car ils sont facilement injectables et leur "métabolisme cellulaire" est assez performant pour traduire des ARN exogènes.

L'ovocyte est une grande cellule dont le diamètre oscille entre 1 et 1,2 mm. Il est entouré d'une membrane vitelline (matrice glycoprotéique) qui confère à la cellule une certaine rigidité et qui l'aide à conserver sa forme sphérique. Cette membrane est entourée d'une couche de cellules folliculaires. La cellule ovocytaire présente une polarité particulière à savoir qu'elle se divise en deux hémisphères de couleurs différentes : l'hémisphère animal pigmenté en noir et l'hémisphère végétatif non pigmenté. La polarité se retrouve également à l'intérieur de la cellule. De fait, le noyau ainsi que le réticulum endoplasmique se situent dans l'hémisphère animal de même que la plupart des canaux chlorures endogènes (pour revue, voir Stühmer et Parekh, 1995).

Le système d'expression ovocytaire a été introduit en 1971 par Gurdon *et al.* en tant que système d'expression fonctionnelle. L'injection d'ADN exogène dans le noyau de l'ovocyte ou d'ARN exogène dans le cytoplasme conduit à l'expression de protéines fonctionnelles par la machinerie de transcription et de traduction ovocytaire. Au début des années 80, Miledi *et al.* démontrent qu'un récepteur-canal cholinergique peut-être exprimé dans le modèle ovocytaire suite à l'injection d'ARN messager (Miledi *et al.*, 1983). L'injection de divers ARNm résulte en l'expression de canaux ioniques activés par la fixation d'un ligand ou activés par des variations du potentiel membranaire (tel que le canal sodique voltagedépendant) ainsi que de récepteurs membranaires de type NMDA [N Methyl D Aspartate] et GABA [Acide γ Amino Butyrique], (pour revue, voir Sigel, 1990).

L'ovocyte de Xénope est devenu un modèle d'étude très puissant pour la compréhension des différents aspects de la structure et des fonctions des transporteurs ioniques et des récepteurs membranaires. Il existe plusieurs types d'études réalisables grâce à ce modèle :

→ l'analyse des propriétés de canaux et de récepteurs ayant subis une ou plusieurs mutation(s), par mutagenèse dirigée, dans le but d'appréhender leurs relations structurefonction,

l'étude des processus de modifications post-traductionnelles et de l'assemblage de canaux et de récepteurs à plusieurs sous-unités,

→ la comparaison des propriétés de canaux provenant de différents tissus,

→ la compréhension des mécanismes de régulation des canaux et récepteurs par divers seconds- messagers,

→ l'analyse fine des différents aspects du couplage récepteur/effecteur.

II) CONDUCTANCES IONIQUES ENDOGENES DE L'OVOCYTE DE XENOPE

A- LES CANAUX IONIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

Les conductances endogènes de l'ovocyte de Xénope sont à présent bien connues des électrophysiologistes (pour revue, voir Weber, 1999). La mise en place d'une « cartographie » précise des transporteurs ioniques membranaires ou intracellulaires de ce modèle d'expression est essentielle afin d'éviter toute erreur d'interprétation lors de l'expression hétérologue de protéines exogènes. L'ensemble des transporteurs ioniques décrits ci-dessous sont schématisés à l'aide de la figure 8.

1- Les canaux sodiques

Deux populations de canaux sodiques ont été caractérisées dans les ovocytes de Xénope.

La première population est formée de canaux voltage-dépendants activés par dépolarisation de la membrane plasmique à partir d'un seuil de -50 mV (figure 8, n°1). Ce courant sodique présente une cinétique d'activation et d'inactivation rapide (Bourinet *et al.*, 1992b). Il est inhibé par la tétrodotoxine (TTX) qui est l'outil pharmacologique classiquement utilisé afin de bloquer les canaux sodiques. Les auteurs spécifient que ce type de courant sodique sensible au TTX n'est que très rarement observé et uniquement chez quelques donneurs.



La seconde population de canaux sodiques membranaires a été décrite pour la première fois par Baud et al. (1982). Ces canaux sodiques, insensibles à la TTX, sont dépendants du voltage et sont activés par une dépolarisation de la membrane à partir d'un potentiel seuil de -20 mV (figure 8, n°2). Les cinétiques d'activation et d'inactivation de ce courant sont lentes. La particularité de ce courant sodique est qu'il nécessite plusieurs dépolarisations successives pour s'activer. Un mécanisme d'activation par phosphorylation a été proposé par Charpentier et al., en 1995. Les auteurs proposent qu'une dépolarisation soutenue de la membrane plasmique de l'ovocyte provoque une activation de la PLC qui, en retour, engendre une stimulation des PKC par production de DAG. Les PKC alors stimulées, activent les canaux sodiques par phosphorylation. Récemment, Bossi et al. (1998) et Charpentier et Kado (1999), ont montré un autre processus de régulation de l'activité de ces canaux sodiques par la [Ca²⁺]i. La diminution de la [Ca²⁺]i par l'injection de chélateurs, réduit significativement l'amplitude du courant sodique. A l'inverse, l'augmentation du taux de Ca²⁺ intracellulaire par libération de Ca²⁺ des réserves (par l'InsP₃ par exemple), potentialise le courant sodique. Des variations de la teneur en Ca²⁺ du milieu extracellulaire n'ont aucune influence sur le développement du courant.

2- Les canaux potassiques

Le potentiel de repos membranaire de l'ovocyte est maintenu par les flux d'ions K⁺ de part et d'autre de la membrane plasmique (pour revue, voir Weber, 1999). Trois types de canaux potassiques ont été décrits dans les ovocytes de Xénope.

Parker et Ivorra en 1990(b) rapportent l'existence de canaux potassiques activés par dépolarisation membranaire à partir d'un potentiel seuil de -20 mV (figure 8, n°3). Ce courant s'inactive au cours du temps et est inhibé par le TEA (TétraEthylAmmonium). Il est indépendant de la $[Ca^{2+}]$ extracellulaire ou cytoplasmique.

Deux autres types de courants potassiques ont été mis en évidence. L'un, activé par dépolarisation, est stimulé par une augmentation de $[Ca^{2+}]i$ (Krause *et al.*, 1996; figure 8, n°5). L'autre est activé suite à une hyperpolarisation de la membrane plasmique (Bauer *et al.*, 1996; figure 8, n°4).

3- Les canaux chlorures

La littérature rapporte plusieurs types de canaux chlorures présent sur la membrane plasmique des ovocytes de Xénope.

→ Des travaux démontrent l'existence d'une population de canaux chlorures activés par dépolarisation de la membrane plasmique à partir d'un potentiel seuil de -20 mV et activés par une augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ suite à l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques dépendants du voltage (Miledi, 1982 ; Barish, 1983), (figure 8, n°7).

→ Il existe par ailleurs d'autres types de courants portés par les ions chlorures et dépendants de la $[Ca^{2+}]i$ (figure 8, n°8). Le fonctionnement de ces canaux est primordial à analyser lorsque l'on désire étudier les variations de $[Ca^{2+}]i$. Hartzell en 1996 a mis en évidence deux courants chlorures activés suite à l'injection intracellulaire d'InsP₃ dans les ovocytes. Le premier courant est activé par le Ca²⁺ directement libéré des réserves, le second est stimulé par l'entrée capacitative de calcium consécutive à la vidange des stocks. Ces deux courants chlorures constituent **un index des variations calciques intraovocytaires**. De fait, lorsque les ions Ca²⁺ sont libérés du réticulum endoplasmique, l'expérimentateur visualise tout d'abord un premier type de courant chlorure (I_{STORE}) puis un second type lorsque l'entrée capacitative de Ca²⁺ a été activée (I_{CCE}). Il semble selon de récentes études (Kuruma et Hartzell, 1999, 2000 ; Callamaras et Parker, 2000) que les différents courants chlorures activés suite à la libération de Ca²⁺ par l'InsP₃ dans les ovocytes de Xénope impliquent un seul type de canal chlorure dont l'affinité vis à vis du Ca²⁺ varie en fonction du potentiel. Par ailleurs, Gomez-Hernandez *et al.* (1997) démontrent que la densité des canaux chlorures dépendants du Ca²⁺ est 10 fois plus élevé au pôle animal qu'au pôle végétatif.

Les courants chlorures dépendants du Ca^{2+} rapportés par Hartzell sont différents de ceux décrits par Barish (1983). En effet, ces derniers sont en moyenne dix fois plus faible que les courants décrits par Hatzell. De plus, la courbe courant-potentiel du courant chlorure des travaux de Barish présente une allure en cloche, avec un maximum aux alentours de 0 mV, qui reflète la courbe courant-potentiel du courant calcique dépendant du voltage. Les courants chlores décrits par Hatzell ne présentent pas de telles courbes courant-potentiel. Enfin, le potentiel de repos utilisé dans les travaux de Hartzell est de -35 mV, potentiel auquel les canaux calciques voltage-dépendants sont largement inactivés (Dascal *et al.*, 1992).

Les études précédentes utilisent les courants chlorures dépendants du Ca²⁺ comme index de la [Ca²⁺]i. Néanmoins, Parker et Yao (1994) montrent qu'il existe peu de correspondance entre les mesures du taux de Ca^{2+} cytosolique par des indicateurs fluorescents et les courants chlorures dépendants du Ca^{2+} de l'ovocyte de Xénope. En effet, les auteurs rapportent d'une part que lorsqu'une vague calcique parcours la cellule, les courants chlorures varient transitoirement et que d'autre part, lorsque la $[Ca^{2+}]i$ a atteint son maximum, les courants chlorures diminuent d'amplitude.

→ Parker et Miledi (1988), caractérisent une classe de canaux perméables au ions chlorures et activés par hyperpolarisation membranaire (potentiel seuil inférieur à -100 mV). L'activation de ces canaux ne nécessite pas la présence de Ca²⁺ dans le milieu extracellulaire (figure 8, n°9).

→ Peres et Bernardini en 1983 rapportent la présence de canaux chlorures activés par hyperpolarisation membranaire, mais dont le développement est strictement dépendant de la présence de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire (figure 8, n°10).

→ Plus récemment, une nouvelle catégorie de transporteur a été découverte à savoir des canaux chlorures dont l'activation est inhibée par la présence de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire (Weber *et al.*, 1995; figure 8, n°11).

4- Les canaux calciques

Il existe deux classes de canaux calciques dans la membrane plasmique de l'ovocyte de Xénope. La première classe est constituée de canaux calciques dépendants du potentiel (Bourinet *et al.*, 1992a). Ces canaux calciques voltage-dépendants présentent une pharmacologie différente de celle des canaux calciques voltage-dépendants classés (figure 8, $n^{\circ}6$).

La classification des canaux calciques voltage-dépendants montre une grande diversité (Nargeot et Charnet, 1994 ; Lynch, 1997 ; Moreno, 1999 ; Kostyuk, 1999 ; Ertel *et al.*, 2000). Ainsi, les expériences réalisées en patch-clamp ou en potentiel imposé à deux microélectrodes ont permis de discerner deux grands groupes de canaux calciques voltage-dépendants en fonction de leur seuil d'activation : les canaux de bas seuil (ou LVA pour Low Voltage Activated) et les canaux de haut seuil (HVA pour High Voltage Activated). Le premier groupe est constitué des canaux de type T, le second des canaux de type L, N, P, Q et R. En plus de la classification des canaux calciques voltage-dépendants en fonction de leurs propriétés biophysiques, il est possible de distinguer les canaux du point de vue de leur sensibilité vis à vis de divers outils pharmacologiques tels que les ions di- et tri-valents ou les

inhibiteurs peptidiques (toxines), (Mori *et al.*, 1996 ; Scholz, 1997). Les seuls inhibiteurs connus des canaux calciques voltage-dépendants de l'ovocyte de Xénope sont le Nickel et le Cadmium.

Une seconde catégorie de canaux calciques membranaire chez l'ovocyte, appelés canaux CRAC pour "*Calcium Release Activated Channel*", est impliquée dans le processus « d'entrée capacitative de calcium » dont le fonctionnement est détaillé ultérieurement (figure 8, n°13).

5- Les canaux mécanosensitifs

L'ovocyte de Xénope possède au niveau de sa membrane une densité particulièrement élevée de canaux mécanosensitifs (appelés aussi « stretch-activated channel »; figure 8, n°12). Ces canaux sont activés par l'application extracellulaire de pression positive ou négative (pour revue, voir Hamill et McBride, 1997). Ces auteurs proposent l'implication d'éléments du cytosquelette dans les mécanismes d'activation de ces canaux.

B- LES CANAUX DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

L'augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ est un signal primordial au cours de la transduction de nombreux signaux extracellulaires. La stimulation de cellules par des agonistes ne conduit que rarement à une augmentation soutenue et stable de la $[Ca^{2+}]i$ mais plutôt à des oscillations et des élévations ponctuelles. Il a été proposé que l'origine et la fréquence des oscillations calciques déterminent la nature des réponses biologiques (Thomas et Hanley, 1996; Berridge, 1997).

1- Le récepteur-canal InsP₃

1.1- Isoforme et localisation

Les stocks sensibles à l'InsP₃ constituent les seules réserves intracellulaires de Ca²⁺ de l'ovocyte de Xénope (figure 8, n°14). En effet, Parys *et al.* en 1992 démontrent, par des études d'immunofluorescence, la présence de récepteurs InsP₃ au niveau du réticulum endoplasmique de l'ovocyte et plus particulièrement dans une zone située sous la membrane plasmique et autour du noyau. Les auteurs caractérisent le récepteur comme étant de type I. Il semble également que l'hémisphère animal soit plus sensible à l'InsP₃ que l'hémisphère végétatif (Yao *et al.*, 1995). D'autre part, Mak et Foskett en 1997 révèlent la présence de récepteurs InsP₃ au niveau du noyau des ovocytes. D'autres expériences immunologiques et biochimiques indiquent l'absence de récepteurs Ryanodine (Parys *et al.*, 1992). La présence de récepteurs InsP₃ et l'absence de récepteurs Ryanodine dénotent l'importance primordiale des récepteurs InsP₃ dans la genèse et la propagation des oscillations et des vagues calciques intracellulaires dans l'ovocyte de Xénope.

1.2- Signalisation calcique intracellulaire

La signalisation calcique intracellulaire résultant de l'activation des récepteurs InsP₃ suivrait un schéma établi selon une hiérarchie précise représentée en figure 9 (Berridge, 1997; Sun *et al.*, 1998; Marchant *et al.*, 1999). En effet, il existe des événements impliquant l'ouverture d'un seul récepteur-canal. Ces événements <u>fondamentaux</u> sont appelés BLIPS (activité unitaire). Ces éléments unitaires engendrent la naissance d'un événement <u>élémentaire</u> impliquant l'ouverture d'un petit groupe de récepteurs InsP₃. Cette seconde étape porte le nom de PUFF (bouffée). Le dernier stade de la signalisation calcique intracellulaire liée aux récepteurs-canaux InsP₃ se situe au niveau <u>cellulaire</u> et forme ce que l'on appelle une vague calcique (WAVE).

1.3- Mécanisme d'activation

L'activation du récepteur-canal InsP₃ implique la présence d'une part, de molécules d'InsP₃ et d'autre part, d'ions Ca²⁺ dans le cytoplasme. Des études tendent à prouver que les ions Ca²⁺ et les molécules d'InsP₃ agiraient de concert afin de permettre aux récepteur-canaux de s'ouvrir (Marchant et Taylor, 1997; Callamaras *et al.*, 1998; Iino, 1999). L'hypothèse avancée par ces auteurs stipule l'ouverture des canaux en deux étapes. Les molécules d'InsP₃ conduisent tout d'abord à "l'initiation" des récepteurs en démasquant les sites de fixation du Ca²⁺. Les ions Ca²⁺ se lient alors aux récepteurs et provoquent leur ouverture (figure 10).

L'activation simultanée par le Ca^{2+} et l'InsP₃ des récepteurs engendre la libération de calcium des réserves. La cascade d'activation des récepteurs par le Ca^{2+} conduit alors à la genèse d'une vague calcique (figure 11).



57



Par ailleurs, une autre étude s'appuie sur le rôle inhibiteur du Ca^{2+} vis à vis des récepteurs InsP₃. Mak *et al.* (1998) suggèrent que les molécules d'InsP₃ activent les récepteurs-canaux en diminuant l'affinité du site inhibiteur du Ca^{2+} . Il y aurait ainsi suppression par l'InsP₃ de la phase d'inhibition dûe au Ca^{2+} .

1.4- Inhibiteurs pharmacologiques

Plusieurs molécules ont la capacité d'inhiber les récepteurs InsP₃, les plus utilisées sont l'héparine et la caféine (Berridge, 1991; Parker et Ivorra, 1991). L'héparine bloque l'ouverture du récepteur-canal en entrant en compétition avec l'InsP₃ sur son site de fixation (Bezprozvanny *et al.*, 1991).

La caféine, quant à elle, est communément utilisée afin de bloquer les libérations de Ca^{2+} des réserves intracellulaires grâce à l'InsP₃ chez l'ovocyte de Xénope. De fait, la caféine, à des doses allant de 0,1 à 10 mM, réduit ou abolit les oscillations calciques induites par l'injection intracellulaire d'InsP₃ dans les ovocytes (Parker et Ivorra, 1991). Notons que la caféine elle-même n'induit pas de libération de Ca²⁺ et que le site d'action de cette molécule est intracellulaire. En effet, l'injection intracellulaire de caféine inhibe plus efficacement la réponse InsP₃ que l'application extracellulaire (Parker et Ivorra, 1991).

2- L'ATPase calcique

Les mécanismes précédemment décrits au niveau du réticulum endoplasmique des ovocytes de Xénope permettent une libération de Ca^{2+} de cette réserve intracellulaire. Cette libération implique obligatoirement l'existence d'un transporteur permettant au Ca^{2+} d'être recapté par le réticulum. Ce transporteur est constitué de l'ATPase calcique, mécanisme actif nécessitant pour son fonctionnement l'hydrolyse de molécules d'ATP (figure 8, n°15). Les inhibiteurs de la Ca^{2+} -ATPase tel que la thapsigargine conduisent à la vidange des réserves en empêchant la capture du Ca^{2+} (Pozzan *et al.*, 1994).

C- L'ENTREE CAPACITATIVE DE CALCIUM

1- Principe

L'augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ en réponse à la hausse du taux d'InsP₃ se fait en deux phases : une première phase transitoire indépendante du Ca²⁺ externe et une seconde phase plus soutenue et dépendante de la $[Ca^{2+}]$ extracellulaire (Berridge, 1995). La phase précoce correspond à la libération de Ca²⁺ des réserves sensibles à l'InsP₃ et la phase retardée à une entrée soutenue de Ca²⁺ depuis le milieu extracellulaire. Putney en 1986 fut le premier à décrire ce phénomène et à proposer un modèle selon lequel l'entrée de calcium depuis le milieu extracellulaire (qu'il nomme Entrée Capacitative de Calcium : ECC) serait sensible à l'état des réserves intracellulaires de Ca²⁺. Ainsi, la vidange de ces réserves par l'InsP₃ provoquerait l'activation de canaux calciques membranaires responsables de l'entrée capacitative. Ces canaux sont appelés CRAC pour "*Calcium-Release-Activated-Channels*" (Hoth et Penner, 1993).

2- Mécanismes d'activation

Le problème majeur qui reste à élucider concernant l'entrée capacitative de calcium est son mode d'activation. Plusieurs études ont été réalisées permettant d'avancer plusieurs hypothèses :

→ un certain nombre d'études émettent l'hypothèse d'un <u>couplage conformationnel</u> qui implique un transfert de l'information depuis le réticulum endoplasmique jusqu'aux canaux CRAC par une interaction directe protéine-protéine (pour revue, voir Berridge, 1995). Ce modèle met en avant le rôle essentiel des récepteurs InsP₃ de type III qui, grâce à leur partie cytoplasmique volumineuse, permettent un couplage direct avec les canaux CRAC de la membrane plasmique (figure 12). Il semble que les récepteurs de type III soient d'avantage impliqués dans le couplage conformationnel que les récepteurs de type I qui joueraient un rôle plus particulier dans la libération de Ca²⁺. Ainsi, DeLisle *et al.* (1996), démontrent que la surexpression de récepteurs InsP₃ de type I dans les ovocytes de Xénope potentialise la libération de Ca²⁺ des réserves par l'InsP₃ mais n'influence en aucune façon l'entrée capacitative de calcium. A l'inverse, la surexpression de récepteurs de type III favorise l'entrée

INTRODUCTION

capacitative mais n'a aucun effet sur la vidange des stocks. Les mêmes auteurs démontrent également que les récepteurs de type III sont plus proches de la membrane plasmique que ceux de type I. Une autre étude avance un argument supplémentaire plaidant en faveur de l'existence d'un couplage conformationel entre la vidange des réserves et l'entrée capacitative de calcium : Petersen et Berridge en 1996, démontrent une colocalisation du relargage de Ca²⁺ des stocks et de l'entrée capacitative. En effet, la déplétion des réserves calciques intracellulaires de l'ovocyte de Xénope dans une région localisée provoque l'entrée capacitative de calcium *via* les canaux CRAC de la membrane plasmique exclusivement au sein de la même région.

→ Une autre hypothèse fréquemment émise concernant ce couplage implique, non plus l'interaction de deux protéines, mais la libération d'un <u>facteur diffusible</u> : la vidange du Ca²⁺ des réserves intracellulaires provoquerait la libération de ce facteur dans le cytoplasme qui activerait alors les canaux CRAC (Randriamampita et Tsien, 1993; Kim et Hanley, 1999; Putney et McKay, 1999). La nature de ce facteur diffusible, nommé CIF (pour "*Calcium Influx Factor*"), reste cependant mal connu (figure 13). Les résultats de plusieurs Laboratoires suggèrent néanmoins l'implication de l'hydrolyse de GTP au cours du couplage (Fasolato *et al.*, 1993; Bird et Putney, 1993; Berven *et al.*, 1995; Kim et Hanley, 1999; Putney et McKay, 1999).





→ La dernière hypothèse permettant d'expliquer le couplage "libération de Ca²⁺ / ECC" s'inspire du <u>modèle de sécrétion</u> des vésicules synaptiques. Ce modèle propose le schéma suivant : la libération du Ca²⁺ des réserves intracellulaires conduit à une fusion de vésicules cytoplasmiques, contenant les canaux CRAC, avec la membrane plasmique. Ces fusions membranaires engendrent une augmentation du nombre de canaux CRAC au sein de la membrane plasmique des cellules (Putney et McKay, 1999). De fait, Yao *et al.* (1999), démontrent le rôle fondamental de SNAP-25 (une protéine impliquée dans le processus de sécrétion des vésicules synaptiques) dans l'activation de l'entrée capacitative de calcium de l'ovocyte de Xénope. Ce mécanisme qui s'inspire du modèle de sécrétion est rapporté également dans d'autres types cellulaires (Patterson *et al.*, 1999).

L'activité tyrosine kinase serait également impliquée dans l'activation des canaux CRAC. En effet, la génistéine (inhibiteur de l'activité tyrosine kinase) bloque l'activation des canaux CRAC de l'ovocyte (pour revue, voir Parekh et Penner, 1997).

Les mécanismes d'activation de l'entrée capacitaitve de calcium décrits ci-dessus ne sont pas ubiquitaires. Il est donc difficile d'en établir une liste exhaustive et de privilégier l'une ou l'autre hypothèse.

3- Mécanismes de régulation

A ce tableau déjà complexe s'ajoute les mécanismes de régulation des canaux CRAC. Les ions Ca^{2+} et les protéines kinases tiennent un rôle important dans la régulation de l'ECC (Petersen et Berridge, 1994). Une faible activité des PKC ainsi qu'une faible $[Ca^{2+}]$ cytosolique potentialisent l'activité des canaux CRAC. A l'inverse, lorsque l'activité des PKC augmente et lorsque la $[Ca^{2+}]$ devient importante, les canaux CRAC sont alors inhibés (figure 15).



Figure 14: Modèle d'activation de l'entrée capacitative : "Hypothèse microrégion" (d'après Barritt, 1998)

A- cellule non-activée

B- cellule activée par fixation extracellulaire d'un ligand sur un récepteur membranaire lié à la voie des phosphoinositides :

1- libération de Ca²⁺ des réserves intracellulaires par activation des récepteurs-canaux InsP₃,

2- la diminution de la concentration calcique intraluminale engendre l'entrée de Ca^{2+} dans la lumière du réticulum *via* les pompes Ca^{2+} -ATPase,

3- le taux de Ca²⁺ dans la zone sous-membranaire, délimitée sur le schéma, diminue à son tour conduisant ainsi à une entrée de Ca²⁺ depuis le milieu extracellulaire par les canaux calciques CRAC membranaires.



4- Pharmacologie

Les canaux CRAC des ovocytes de Xénope possèdent une pharmacologie restreinte dont l'élément principal est l'ion lanthane. Cet ion trivalent est l'inhibiteur le plus puissant connu à ce jour de l'entrée capacitative de calcium de l'ovocyte (Gillo *et al.*, 1996). Plus récemment, Lomax *et al.* (1998), rapportent l'effet inhibiteur sur l'entrée capacitative de diverses ω -conotoxines (GVIA, MVIIA, MVIIC).

III) EXPRESSION HETEROLOGUE DE PROTEINES VEGETALES

L'étude directe des transporteurs ioniques et des récepteurs membranaires des cellules végétales est rendue difficile par l'existence de nombreux couplages entre les cellules *via* les plasmodesmes. D'autres difficultés s'ajoutent à ce constat : la paroi qui entoure les cellules végétales est d'une telle rigidité qu'elle interdit tout accès direct à la membrane plasmique. De plus, la vacuole occupe une grande partie de l'espace intracellulaire des cellules végétales. Enfin, les cellules végétales sont de petite taille, ce qui ne facilite pas leur étude par les méthodes électrophysiologiques (Schroeder, 1994).

De récentes recherches dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis le clonage de nombreuses protéines végétales et plus particulièrement de transporteurs ioniques. Les chercheurs ont donc été amenés à utiliser des vecteurs d'expression fonctionnelle, tel que l'ovocyte de Xénope, pour l'étude du fonctionnement et des caractéristiques des protéines identifiées. Quelques protéines ont été exprimées avec succès dans l'ovocyte de Xénope, il apparaît que ces protéines ont conservé leurs propriétés natives. Pour la première fois, Boorer *et al.* (1992), rapportent l'expression fonctionnelle du transporteur H⁺/hexose d'*Arabidopsis thaliana* dans l'ovocyte. D'autres transporteurs ioniques ont été étudiés par la même méthode (tableau 2).

67

Transporteurs ioniques	Matériel génétique utilisé	Références
Canaux potassiques	ARNc ARN polyA ARN polyA	Schachtman <i>et al.</i> , 1992 Cao <i>et al.</i> , 1992 Brandt et Fisahn, 1998
Canal chlore	ADNc	Lurin et al., 1996
Cotransporteur H ⁺ /hexose	ARNc	Boorer et al., 1992
Transporteur nitrate	ARNc	Tsay et al., 1993

 Tableau 2: Transporteurs ioniques de cellules végétales néo-exprimés avec succès dans les ovocytes de Xénope

MATERIELS ET METHODES

I) MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE

A- OBTENTION DU CLONE « 474 » DE CHICOREE HYBRIDE

Le matériel végétal utilisé pour notre étude est un clone « 474 » de chicorée hybride issu du croisement entre Cichorium intybus var. sativum et Cichorium endivia var. latifolia.

Les plantules de chicorée hybride «474 » se développent à partir d'embryons directement issus de styles (Dubois *et al.*, 1988). Afin de maintenir la conformité du clone, les plantes sont acclimatées et de nouveaux styles sont prélevés et placés dans les conditions d'induction à l'embryogenèse somatique (voir ci-dessous). La nouvelle population clonale issue de cette culture sera utilisée pour la régénération *in vitro* pendant un an.

B- MULTIPLICATION DES VITROPLANTS PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE A PARTIR DE RACINES

Les racines sont cultivées dans le milieu de base M17 liquide correspondant au milieu de Murashige et Skoog (1962) modifié et dilué au demi (tableau 3). Les racines sont placées dans ce milieu M17 contenant 45 mM de saccharose, à l'obscurité, à 35° C et sous agitation (agitateur Gehrardt, 70 tpm). Après une dizaine de jours, les embryons somatiques, encore fixés aux fragments racinaires, sont transférés dans une solution de Heller (tableau 3) contenant 15 mM de saccharose pendant 5 jours à la lumière, à 20° C et sous agitation (Dubois *et al.*, 1988). Les embryons somatiques les plus développés sont alors repiqués en boîtes de Pétri puis en tubes sur une solution de Heller gélosée (à 6 g.l⁻¹ d'Agar) contenant 15 mM de saccharose. La conversion des embryons somatiques en plantules s'effectue en chambre climatisée (photopériode 12h lumière à 24° C / 12h obscurité à 20° C) et dure de 1 à 2 mois (figure 16).

II) EXTRACTION ET PURIFICATION DES ARN TOTAUX

La technique d'extraction des ARN totaux dérive de celle décrite par Chirgwin *et al.* en 1979. Les fragments foliaires congelés sont finement broyés puis solubilisés dans un tampon d'homogénéisation GIT [isothiocyanate de guanidium] (tableau 4).

Composés	Milieu de culture M17	Milieu de culture Heller
	(pour 1 litre)	(pour 1 litre)
Macroéléments :		
solution stock 10x concentrée	100 ml	100 ml
Microéléments de Heller	1 ml	1 ml
Glutamine	250 mg	
Vitamines (Morel et	10 ml	10 ml
Wetmore)		
Inositol	100 mg	500 mg
2-iP	0,5 mg	
ANA	0,02 mg	
KH ₂ PO ₄	85 mg	
Fe-EDTA	19,5 mg	19,5 mg
Saccharose	15 g	5 g
Agar		6 g (pour le milieu gélosé)

Solution stock Macroéléments x10 (mg/l)	M17	Heller
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1850	2500
$CaCl_2$, $2H_2O$	2200	750
NH4NO3	8250	
KCl	7500	7500
NaNO ₃		6000
NaH ₂ PO ₄		1080

Microéléments Heller (1953)	mg/l
$ZnSO_4$, $7H_2O$	1
H ₃ BO ₄	1
MnSO ₄	0,075
$CuSO_4$, $5H_2O$	0,03
AlCl ₃	0,03
NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,01
KI	0,01

Vitamines de Morel et Wetmore (1951)	mg/l
Pantothénate de Ca ²⁺	1
Thiamine	1 .
Acide Nicotinique	1
Pyridoxine	1
Biotine	0,01

<u>Tableau 3</u> : <u>Composition des milieux de culture et des solutions mères pour les milieux</u> <u>M17 et Heller</u>

Composition du tampon GIT	pour 4 extractions
GIT (isothiocyanate de guanidium)	23,6325 g
Acétate de sodium 3M, pH 6	0,4175 ml
β-mercaptoéthanol	0,4175 ml
H ₂ O traitée au DMPC (diméthyl pyrocarbonate)	QSP 50 ml

Composition du tampon CsCl	pour 4 extractions
CsCl (chlorure de césium)	43,186 g
Acétate de sodium 3M, pH 6	0,373 ml
H ₂ O traitée au DMPC	QSP 45 ml

Tableau 4 : Composition des tampons d'extraction des ARN totaux


Après homogénéisation, la solution obtenue est soumise à une centrifugation (15000g, 10 min, 4°C) pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite prélevé et déposé sur une solution de Chlorure de Césium (tableau 4). Une ultracentrifugation (125000g, 21h, 20°C) permet de séparer les ARN totaux des autres macromolécules. Ces ARN sont ensuite précipités dans une solution d'acétate de sodium additionnée d'éthanol absolu (18h d'incubation). Après centrifugation (10000g, 5 min, 4°C), le culot d'ARN totaux est asséché puis repris dans de l'eau ultra-pure stérile à une concentration finale de 5 mg/ml.

Le dosage des ARN totaux est réalisé par mesure d'absorbance en spectrométrie UV. Une unité d'absorbance à 260 nm (A260) correspond à 40 μ g d'ARN totaux par ml de solution (Maniatis *et al.*, 1982). La présence de polysaccharides dans l'extrait d'ARN est estimée à 230 nm (A230) tandis que l'absorbance à 280 nm (A280) quantifie les contaminations protéiques. Les rapports A260/A280 et A260/A230 doivent être proches de 2 pour que l'échantillon d'ARN soit de bonne qualité.

III) PREPARATION DES OVOCYTES DE XENOPE

Les femelles adultes de *Xenopus laevis*, (animalerie du CRBM: Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire du CNRS de Montpellier), sont anesthésiées par immersion dans une solution de tricaïne méthane sulfonate à 2%. Des lobes ovariens sont prélevés et placés dans un milieu physiologique de référence ND96, pH 7,45 avec NaOH (tableau 5). Ils sont ensuite dilacérés manuellement en petits groupes de 4 à 5 ovocytes (figure 17).

Toutes les couches externes, à l'exception de l'enveloppe vitelline, sont éliminées par un traitement à la collagénase (Boehringer, 2 mg/ml) dans le milieu ND96 dépourvu en calcium pendant 2h à température ambiante et sous agitation. Ce traitement enzymatique permet de supprimer les cellules folliculaires et de faciliter l'implantation des microélectrodes (figure 18).

Les ovocytes isolés et non lésés aux stades V et VI (classification de Dumont, 1972) sont transférés dans un milieu ND96 additionné de gentamycine (Sigma, 50 μ g/ml) et placés dans un incubateur à 19°C.

Composition du milieu ND96	mM
NaCl	96
CaCl ₂	1,8
KCl	2
MgCl ₂	2
HEPES	5

Composition du milieu d'incubation dépourvu en ions chlorures	mM
NaOH	96
KOH	2
MgOH ₂	2
CaOH ₂	1,8
HEPES	5
pH 7,45 avec acide methane sulfonique	

Composition du milieu d'incubation dépourvu en ions calcium	mM
NaCl	96
KCl	2
MgCl ₂	2
EGTA	1
HEPES	5
pH 7,45 avec NaOH	

.

<u>Tableau 5 : Composition du milieu de survie ND96 pour la préparation des ovocytes et des milieux d'incubation dépourvus en ions calcium ou chlorures</u>

75







1 mm

Figure 17 : Obtention et sélection des ovocytes (Photographies d'après Ceriotti et Colman, 1995)

A- Xenopus laevis femelle adulte anesthésiée (les flèches indiquent la localisation des incisions)

- B- Portion d'ovaire
- C- Ovocytes impropres à l'injection
- D- Ovocytes sélectionnés pour l'injection



IV) INJECTION DANS LES OVOCYTES DE XENOPE

A- INJECTION DES ARN TOTAUX

Les ovocytes sont injectés grâce à une micropipette de verre, dont le diamètre n'excède pas 15 µm, adaptée à une pipette digitale NICHIRYO série 800. Des aliquots de 60 nl d'une solution d'ARN totaux à la concentration de 5 mg/ml sont injectés au niveau de la région équatoriale de l'ovocyte. Des ovocytes non-injectés ou injectés avec de l'eau stérile servent de témoins négatifs.

Les ovocytes sont ensuite incubés à 19° C dans le milieu ND96 additionné de gentamycine (50 µg/ml, Sigma). Ce milieu est renouvelé chaque jour. Les ovocytes sont testés entre 3 et 6 jours d'incubation.

B- INJECTION DE SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES

L'injection dans l'ovocyte de substances pharmacologiques diverses est réalisée à l'aide du même dispositif expérimental. Le volume injecté dans le cytoplasme de la cellule est d'environ 40 nl et les concentrations finales dans l'ovocyte sont calculées en estimant la dilution dans le volume d'un ovocyte qui est de 1 μ l. Au cours de nos expériences, nous avons injecté deux types de solutions dans les ovocytes :

40 nl d'une solution d'InsP₃ (Sigma) à la concentration de 1 mM dissout dans de l'HEPES 5 mM au pH 7,2 ajusté avec KOH. La concentration finale dans les ovocytes est de 50 μ M. 40 nl d'une solution de K₄.BAPTA (Sigma) à la concentration de 25 mM dissout dans de l'HEPES 5 mM au pH 7,2 ajusté avec KOH. La concentration finale dans les ovocytes est de 1 mM.

V) MESURES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

A- PRINCIPES DE BASE D'ELECTROPHYSIOLOGIE

L'électrophysiologie est l'étude de l'activité des canaux ioniques et des transporteurs membranaires par la mesure des courants ioniques portés par les ions qui traversent les canaux ioniques. Ces canaux sont des protéines qui forment des pores au travers des membranes cellulaires. Ils jouent un rôle prépondérant dans la physiologie des cellules animales et végétales. Ainsi, les canaux ioniques interviennent dans des processus physiologiques très variés comme la transduction des signaux extracellulaires, la prolifération ou l'excitation cellulaire.

Pour l'électrophysiologiste, un canal est une résistance au travers de laquelle peut se dissiper un courant. L'intensité du courant (Ix) traversant l'ensemble des canaux x d'une cellule est :

$$Ix = gx \times [Vm - Vx]$$

où :

 I_x est le courant porté par l'ion x

 g_x est la conductance (ou perméabilité) de la cellule à l'ion x. "g" est l'inverse de la résistance. La loi décrite dérive donc directement de la loi d'Ohm V= RI.

 V_m - V_x est le gradient électrochimique pour l'ion x

V_m est le potentiel membranaire imposé par l'expérimentateur

 $V_{\rm x}$ est le potentiel (ou pile) d'équilibre de l'ion x défini par l'équation de Nernst :

$$V\mathbf{x} = \frac{R \times T}{z \times F} \times Ln\left[\frac{Xe}{Xi}\right]$$

où :

R est la constante des gaz parfaits

T est la température absolue

z est la valence de l'ion x

F est la constante de Faraday

 X_e et X_i sont respectivement les concentrations extra et intracellulaires de l'ion x de part et d'autre de la membrane.

Le courant traversant l'ensemble des canaux d'une cellule est donc proportionnel à la perméabilité de la membrane à l'ion donné ainsi qu'au gradient électrochimique de l'ion. Ce gradient dépend de la valeur du potentiel imposé par l'expérimentateur et de la valeur de la pile d'équilibre de l'ion concerné. La valeur de la pile d'équilibre est définie par la valence de l'ion (gradient électrique) et par les concentrations de l'ion de part et d'autre de la membrane (gradient chimique). Afin d'étudier les propriétés électriques d'une cellule, différentes valeurs fixes de potentiel sont appliquées et le courant est mesuré pour chaque potentiel. Cette technique est appelée potentiel imposé (« voltage-clamp »). Dans le cas de l'ovocyte de Xénope, nous utilisons la technique de potentiel imposé à deux microélectrodes.

Au cours de nos expériences nous avons réalisé deux types de protocoles de potentiel imposé couramment utilisé par les électrophysiologistes :

Etude de la dépendance des courants ioniques en fonction du potentiel de membrane : lorsque la membrane d'une cellule (dans notre étude, l'ovocyte de Xénope), maintenue à un potentiel imposé (-35 mV), est brusquement dépolarisée par un échelon de potentiel ; des courants ioniques qui transitent par les canaux voltage-dépendants sont activés. L'amplitude du courant dépend de la valeur du potentiel appliqué à la membrane et du gradient électrochimique de l'ion qui porte le courant (figure 19A). La mesure des variations de l'amplitude du courant ionique en fonction du potentiel de membrane (ou relation courbe « courant-potentiel » encore appelée « I-V ») est l'une des premières études à réaliser (figure 19B).

b La seconde étude concerne l'analyse des courants de queue. Afin de déterminer la nature ionique d'un courant, il est possible de définir le potentiel d'inversion du courant (correspondant à la pile d'équilibre de l'ion qui porte le courant dans le cas d'un courant porté par un seul ion). Les courants de queue permettent de déterminer le potentiel d'inversion d'un courant et par la même la nature ionique de celui-ci. L'analyse des courants de queue est nécessaire à la détermination du potentiel d'inversion d'un courant lorsque ce potentiel d'inversion est inférieur au potentiel seuil d'activation du courant. Le « courant de queue » est défini comme étant, en terme de courant, la réponse spécifique générée par les processus de déactivation d'un courant voltage-dépendant. A la cessation du saut de potentiel, le courant décroît (« relaxe ») suivant un processus dépendant du temps. Le courant de queue est représenté par le courant de « relaxation ». L'amplitude du courant de queue peut être mesuré à partir de segments d'enregistrements suffisamment longs pour décrire correctement le décours du courant (figure 19C et D). Le sens de la décroissance du courant de queue constitue un indicateur graphique du sens du courant à un potentiel donné. Dans le cas d'un courant qui se désactive pour des valeurs de potentiel incluant la valeur du potentiel d'inversion, le courant de queue constitue un indicateur du potentiel d'inversion. Ces courants donnent les informations nécessaires pour la construction de la relation « I-V » du courant de queue (figure 19C et D).



Figure 19 : Analyse de l'amplitude des courants ioniques en fonction du potentiel de membrane et analyse des courants de queue

A- Courant enregistré au niveau d'un ovocyte injecté avec les ARN totaux de feuilles de chicorée soumis à une hyperpolarisation de -35 à -140 mV pendant 1 seconde suivi d'une dépolarisation à 0, +20 et +60 mV pendant 1 seconde également.

B- Courbe Courant-Potentiel reliant l'amplitude du courant aux différentes valeurs de potentiel imposé.

C- Protocole de potentiel imposé permettant d'analyser les courants de queue. Le potentiel est amené de -35 mV à -140 mV puis à +60 mV avant de prendre plusieurs valeurs allant de -65 à +5 mV.

D- Courants de queue du courant et courbe Courant-Potentiel des courants de queue.

Grâce à cette relation, nous pouvons aisément déterminer le potentiel d'inversion du courant étudié et ainsi avoir une idée de la nature ionique de ce courant. La valeur du potentiel pour laquelle le courant de queue enregistré sera nul, correspondra à la valeur du potentiel d'inversion.

L'activation et l'inactivation des courants ioniques font également l'objet d'une analyse précise. Dans le cadre de notre étude, les courbes d'activation et d'inactivation des courants suivent:

 \Rightarrow soit une fonction monoexponentielle: $y = y_0 + A e^{(x-x_0)/\tau}$

 \Rightarrow soit une fonction biexponentielle: $y = y_0 + A_1 e^{(x-x_0)/\tau_1} + A_2 e^{(x-x_0)/\tau_2}$

B- TECHNIQUE DE POTENTIEL IMPOSE A DEUX MICROELECTRODES

L'ovocyte est placé dans une cuve expérimentale et perfusé avec le milieu ND96. La cellule est testée du point de vue de l'expression des transporteurs ioniques à l'aide de la technique classique de voltage imposé à deux microélectrodes. Dans ce dispositif expérimental (figure 20), la membrane ovocytaire est traversée par une microélectode de potentiel et par une microélectrode de courant, toutes deux remplies de KCl 3M et présentant une résistance de 0,5 à 0,7 MQ.

La technique utilisée 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. Le potentiel de membrane est mesuré à l'aide de la microélectrode de potentiel et d'une microélectrode de référence au contact du milieu extracellulaire. Chacune mesure un potentiel par rapport au potentiel de la terre. La différence entre ces deux potentiels correspond au potentiel transmembranaire (Vm). Dans les conditions de potentiel imposé, l'amplificateur opérationnel (Dagan TEV-200, Minneapolis, USA) compare à chaque instant Vm au potentiel Vi (potentiel imposé par l'expérimentateur) et injecte, par l'intermédiaire de la microélectrode de courant, le courant nécessaire pour annuler la différence (Vi-Vm). Ce courant est recueilli et mesuré aux bornes d'une résistance de valeur connue. Il reflète le courant membranaire global, c'est à dire la somme algébrique des courants ioniques s'écoulant au travers des différents types de canaux ioniques membranaires.



Chaque type de courant, reflétant l'activité d'une seule classe de canaux ou de transporteurs ioniques, peut ensuite être étudié de manière spécifique en tenant compte :

- de ses propriétés biophysiques,

- de sa sélectivité ionique (modification du milieu ionique externe baignant l'ovocyte au cours du test électrophysiologique),

- de sa pharmacologie (utilisation d'inhibiteurs spécifiques).

Le fonctionnement du dispositif expérimental est géré par ordinateur à l'aide du programme clampex du logiciel d'exploitation PClamp (version 5.5, Axon instrument, Burlingame, USA).

C- MILIEUX D'ENREGISTREMENT

La composition des milieux d'incubation utilisés au cours de nos études est détaillée dans le tableau 5. Ces milieux sont élaborés à partir du milieu de référence ND96 dépourvu selon le cas d'ions chlorures ou d'ions calcium.

Les milieux peuvent être également additionnés de diverses substances telles que :

♦ 5 mM de caféine (Sigma),

 10μ M de U73122 = 1-(6{[17\beta-3 methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl] amino}hexil)-1Hpyrrole-2,5-dione ou 10 μ M de U73343 = 1-(6{[17\beta-3 methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl] amino}hexil-2,5-pyrrolidine-dione (Calbiochem).

L'ensemble de ces solutions est amené à un pH de 7,45 avec NaOH.

D- ACQUISITION ET TRAITEMENT DES DONNEES

Les données électrophysiologiques sont analysées grâce au programme clampfit du logiciel d'exploitation PClamp (version 5.5, Axon instrument). Les figures ont été réalisées grâce au logiciel Origin (version 5.0, Microcal Software Inc.).

L'amplitude des courants enregistrés est exprimée sous la forme : Moyenne \pm erreur standard, avec n : nombre d'ovocytes testés et N : nombre d'animaux utilisés pour l'expérience.

La présence des courants enregistrés suite à l'injection des ARN totaux de feuilles de chicorée dans les ovocytes ainsi que les effets de divers agents pharmacologiques sont comparés en utilisant le test du χ^2 . Ce test est employé afin de comparer deux pourcentages grâce à un tableau de contingence 2 X 2 (tableau 6). On calcule tout d'abord les effectifs théoriques par la méthode habituelle (total des lignes multiplié par total des colonnes, divisé par total général). On forme ensuite :

 $\chi^2 = \Sigma [(o-c)^2/c]$ (o = observé et c = calculé),

pour l'ensemble des quatre cases.

Si $\chi^2 < 3,84$; la différence n'est pas significative (à 5%).

Si $\chi^2 \ge 3,84$; la différence est significative et le degré de signification est lu dans la table de χ^2 pour *1* degré de liberté (NB : la méthode n'est valable que si les effectifs calculés sont supérieurs ou égaux à 5).

VI) DOSAGE DES INSP3 (INOSITOL 1,4,5 TRIPHOSPHATE)

La procédure pour les mesures de la production des InsP₃ comporte plusieurs étapes. Les ovocytes (témoins et injectés des ARN totaux de feuilles de chicorée hybride « 474 ») sont injectés avec 40 nl d'une solution de myo-(2-3H) Inositol à 1250 μ Ci/ μ l (Amersham pharmacia). Après 12 h d'incubation, la membrane ovocytaire est amenée à un potentiel de +60 mV pendant 1.2 seconde à partir du potentiel imposé de repos de -35 mV. Suite à cette dépolarisation, le métabolisme des InsP₃ est immédiatement interrompu par broyage des ovocytes dans 1 ml de tampon contenant 0,1 M d'acide formique / 0,4 M de formate d'ammonium. La fraction soluble obtenue après centrifugation à 35000g pendant 10 mn est déposée sur une colonne Dowex 1x8 (formate forme, BioRad). La colonne est lavée avec 6 ml du tampon. Pour éluer les InsP₃, on applique à la colonne une solution contenant 0,1 M d'acide formique / 0,7 M de formate d'ammonium. La radioactivité est mesurée par un compteur β après avoir ajouté du liquide scintillant aux éluats. Les résultats pour les ovocytes injectés des ARN totaux sont exprimés en pourcentage d'augmentation par rapport au témoin (ovocytes contrôles).

	Nombre d'ovocytes présentant le courant	Nombre d'ovocytes ne présentant pas le courant	Total
Effet du solvant (DMSO, eau)	C ₁	NC ₁	$C_1 + NC_1$
Effet de l'inhibiteur (U73122, caféine)	C ₂	NC ₂	$C_2 + NC_2$
Total	$C_1 + C_2$	$NC_1 + NC_2$	

<u>Tableau 6</u> : <u>Tableau de contingence 2 X 2 utilisé pour le test du χ^2 </u>

VII) <u>IDENTIFICATION DES ELEMENTS DE TRANSDUCTION CHEZ LA CHICOREE PAR LES</u> <u>TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE</u>

A- REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (POLYMERASE CHAIN REACTION : PCR)

La PCR est une technique utilisée afin d'amplifier le nombre de copies d'une région spécifique d'ADN dans le but d'analyser ce fragment disponible alors en quantité suffisante.

La première étape consiste à choisir des amorces oligonucléotides synthétiques capables de s'hybrider aux bornes de la séquence désirée et de réaliser les réplications qui assureront la multiplication de la séquence encadrée par les amorces. Pour pouvoir réaliser cette opération, il est donc indispensable de connaître au préalable la séquence que l'on désire amplifier. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à la mise en évidence d'une séquence correspondant aux phospholipases C specifiques des phosphoinositides (dont nous avons démontré le rôle primordial au cours de nos travaux) au sein de la population d'ADN complémentaire (ADNc) de feuilles de chicorée hybride "474". Pour cela, nous avons déterminé des amorces dégénérées (figure 21), grâce au logiciel CODEHOP [COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers], à partir de blocks conservés de l'alignement protéique de phospholipases C specifiques des phosphoinositides de plusieurs espèces végétales (trois séquences de Glycine max, trois séquences de Solanum tuberosum, deux séquences de Arabidopsis thaliana, et une séquence de Nicotiana rustica, Vigna unguiculata et Brassica napus). Les amorces dégénérées ont été choisies à partir des blocks de séquences protéiques les plus conservés (figure 22). Notre étude a été réalisée à partir des amorces dégénérées choisies à partir des séquences protéiques suivantes : acides aminés 421 à 440 et acides aminés 556 à 584 (figure 22).

Le nombre de copies de la séquence choisie est doublé à chaque réplication et son augmentation est donc exponentielle.



Glycine max Vigna ungui. Nicotiana rus Glycine max Glycine max Arabidopsis f Brassica n. Solanum t. Solanum t. Solanum t. Arabidopsis f	10 -MATHNYKVFSCFI sMGSYRVCVCF' MTSKQTYSVCFCW 	20 NRKFTITEPKP IRKFRVTEAEP RRRFKLALAEA RRRFRYTASEA RRRFRYTASEA RRRFRVLAAEA QRKFKLKEAEA	30 PPPDVQKAFSE PSDVKEAFKK PSEIKTLFNE PREIKTIFEK PRDVKTLFDK PADIKNLFKR PADIKNLFRR	40 SFSDGASSMS2 SFSDGASSMS2 SYAENGNQMNS SYSEN-ELMT1 SYSEN-GVMTY SYSEN-GVMTY SYSDDSGVMS7 SYSDN-GVMS2 SFSEN-GIMT2 SFSEN-GIMT2 MS1 * .	50 ADQLLRFLHD AEHLLRFLAE SEQLLKFLIE SSHLKRFLVD ATHLRSFLAE /DHLHRFLID /DHLQRFLID /QNLHRFLIE AENLHRFLIE AEHLCKFLKD 5DELLRFVSE .* *: :	60 HQRETDC HQGEVDC VQGETLF VQRQEKA VQRQDKA VQKQDKA IQKEKNA VQKEENA VQGEENV VQGEENV VQGEENV
Glycine max Vigna ungui. Nicotiana rus Glycine max Arabidopsis f Brassica n. Solanum t. Solanum t. Solanum t. Arabidopsis f	70 SAEDSNRILDSIIQ TVSDSEQILQQ STVGDADVIVRQILQ TEEDAQAIIDSFRH TEEEAQAIIDGHKH TREDAQSIINSASS SLDNAEAIINNHGG TLEDAHAIMNNLHD TKEEAETVMESALK CGLDYVQDIFHSVKH	80 SRKQNDTNAEC SRK KRHP FHRRG LSIFHR LLHRN LLHSN DSKQ LKILNI LVHEHLN HNVFH	90 CDHHTDNNNNG EDGETG ITKLTRQT SG SG 	100 SLSLDEFFRFI FDLHDFFHFI LALEDFHHFI SLNLESFFNYI SLHLDAFFKYI SLHLDAFFKYI SLHLDAFFKYI SLHLDAFFKYI SLNLDGFFRYI VHLNAFYRYI	110 j LFLVDFN D LQENDLN V FNTDLN P FSDDN - PPL FGDNN PP LFGDSN PPL LFGDSN - PPL LFSDLN - VSI LFSDLN - VSI LFSDTN - SPL	120 PLKSQV PLKSQV PINYKV LPSHGV LPSLGV LALHEV LALHEV DPKLGI NSKLGI STDKKV PMSGQV :
Glycine max Vigna ungui. Nicotiana rus Glycine max Arabidopsis f Brassica n. Solanum t. Solanum t. Solanum t. Arabidopsis f	130 HHDMNAPLSHYFIY HHDMNAPISHYFIY SHHDMNAPLSHYFIY HQDMSSPLSHYFIY HQDMSSPLSHYFIY HQDMDAPISHYFIF HQDMDAPISHYFIY HDMNAPLSHYFIY HHDMTAPLSHYFIY CHHDMKAPLSHYFVY	140 IGHNSYLTGNQ IGHNSYLTGNQ IGHNSYLTGNQ IGHNSYLTGNQ IGHNSYLTGNQ IGHNSYLTGNQ IGHNSYLTGNQ IGHNSYLTGNQ IGHNSYLTGNQ	150 LSSDCSDVPI LSSDCSDAPI LSSDCSDVPI LSSDCSDVPI LSSDCSEVPI LSSDCSEVPI LSSDCSDVPI LSSDCSDVPI LSSDCSDVPI LNSDCSDVPI	160 IKALQRGVRV IKALQRGVRV IKALKKGVRV INALEKGVRV IDALKKGVRV IDALKKGVRV IQALQRSVRV IQALHRGVRV VQALRKGVKV :.***:	170 / /IELDLWPNS /IELDLWPNS /IELDIWPNS /IELDIWPNS /IELDIWPNS /IELDIWPNS /IELDIWPNS /IELDLWPNS /IELDLWPNS	180 IKDDID NKDDID DKDDIH SKDSID SKDNVD NKNDID DKDDIE SKDNVD SGNAAE : .
Glycine max Vigna ungui. Nicotiana ru: Glycine max Arabidopsis f Brassica n. Solanum t. Solanum t. Solanum t. Arabidopsis f	190 VVHGRTLTAPVSLI SVLHGRTVTTPVELI VLHGRTLTSPVALI VLHGRTLTSPVALI VLHGRTLTSPVELI VLHGRTLTSPVELI VLHGTLTAPVALI ILHGGTLTPPVELI tVRGTLTSHEDLQ : ** *:*. *	200 QCLKSIKEYAF RCLKSIKEYAF RCLKSIKCHAF KCLRSIKCHAF KCLRSIKCHAF KCLRSIKEHAF KCLKSIKEHAF QCLKSIKEHAF KCLTAIKDNAF :** :*: **	210 VKSDYPVIIT VKSQYPLVIT VASPYPVVIT VASEYPVVIT OVSDYPVVVT SASEYPVVIT TVSEYPVVIT VASEYPVIIT HVSDYPVIIT	220 CLEDHLTPFL CLEDHLTPDL CLEDHLTPDL CLEDHLTPDL CLEDHLTPDL CLEDHLTPDL CLEDHLTPDL CLEDHLTPDL CLEDHLTPDL	230 AKVAEMIAQ AKVAEMIAQ AKVAEMITQ AKVAEMITQ AKVAEMITQ SKVAEMVTE SKVAEMITQ DAKAAEMITQ DAKAAEMITQ DAKAAEMVTQ DAQVAKMLTK **:* ::	240 j VFGDML VFGELL TFGEML TFGDIL IFGEIL IFGEIL TFGDML VFGDIL TYRGML : :*

۰.

	250	260	270	280	290	300
			}		1	
Glycine max	YFPQA-DSLTEFP	TPESLKGRIL	ISTKPPKEYL	ESKQFK -	• D	SDSERES
Vigna ungui.	HYPQT-DSLTEFP	SPESLKGRIL:	ISTRPPREFL	ES		SEKES
Nicotiana rus	sFVPES-DSLKECP	TPEELKHRII	ISTKPPKEYL	EASAST - -	· T	ASKERRN
Glycine max	FTPNS-ESVKEFP	SPESLKKRII	ISTKPPKEYL	EAKEKEKGDDS	QHEKEKGDD	SEHGKAS
Glycine max	FAPTS-ESLKEFP	SPESLKGRII	ISTKPPKEYL	EAKEVQ -	EKEEE	SQQEKPA
Arabidopsis t	LFTPPVGESLKEFP	SPNSLKRRII	ISTKPPKEYK	EGKDVE	· V	VQKGKDL
Brassica n.	FTPPVGESLKEFP	SPNSLKRRII	ISTKPPKEYK	EGKDED	· V	VQKGKAL
Solanum t.	FSPSESLKELP	SPESLRKRVM	ISTKPPKEYL(QSKEVKEK		DD
Solanum t.	FSSDSCLKEFP	SPESLKRRVL	ISTRPPREYL	QAKEVNETG	A	-MKGTDQ
Solanum t.	FTCGA-ECLSEFP	SPESLKGRII	ISTKPPKEYLI	ESKKPSEKD	· NG	SQKGKKS
Arabidopsis t	FRRVS-ESFKHFP	SPEELKGKIL:	ISTKPPKEYL	ESKTVH		-TTRTPT
	*	:*:.*: ::::	*******	:.		
	310	320	330	340	350	360
Glycine max	TEEGSLSP	CVIPELEAVD	EKLNGSDLDEI	EGLNARDKKSI	QQSAPEYKR	LITIHAG
Vigna ungui.	AEEVSS		LREI	NADEQRTI	NKRAPEYKR	LITIHAG
Nicotiana rus	SSSQRSNCSEDDVW	GAEPSSLTAN	QEENEKSDSDI	NFEDDDDSSHR	PQLASAYKR	LIAIHAG
Glycine max	GEDEAWGKEVPSL	KGGTIEDYKDI	NNVDEDLNDEI	EE-FDESDKSH	IHNEAPEYRH	LIAIHAG
Glycine max	DDEEAWGKEVPSL	RGGTISDYKN	IEDDDVLDDEI	ED-IDEAEKSR	QDAADEYRR	LIAIHAG
Arabidopsis t	GDEEVWGREVPSF	IQRNKSEAKDI	OLDGNDDDDDI	DDDEDKSK	INAPPQYKH	LIAIHAG
Brassica n.	GDEEVWGREVPSF	IERNKSGDKDI	OLDDEEDNDEI	DDDVEKFK	KNAPPQYKH	LIAIHAG
Solanum t.	TKKEAE	- QDDVDI	EEEDEDEDEDI	DEEDPKSE	KKAASEYKR	LIAIHAG
Solanum t.	TDTEAWGREVSDI	KAR YNDKDI	DSDEGEADDSI)EĒDPTSQ	QNTAPEYRR	LIAIHAG
A A A A A A	OBBUALION DI ODI					

	210	120	220	340	350	200
	1			I		
Glycine max	TEEGSLSP	CVIPELEA	AVDEKLNGSDL	DEEGLNARD	KKSDQQSAPE	YKRLITIHAG
Vigna ungui.	AEEVSS		L	RENADE	QRTDNKRAPE	YKRLITIHAG
Nicotiana ru	SSQRSNCSEDD	/WGAEPSSL1	FANQEENEKSD	SDNFEDDDD	SSHRPQLASA	YKRLIAIHAG
Glycine max	GEDEAWGKEVPS	SLKGGTIEDY	YKDNNVDEDLN	DEEE-FDESI	DKSHHNEAPE	YRHLIAIHAG
Glycine max	DDEEAWGKEVPS	SLRGGTISDY	YKNIEDDDVLD	DEED-IDEA	EKSRQDAADE	YRRLIAIHAG
Arabidopsis	tGDEEVWGREVPS	GFIQRNKSEA	AKDDLDGNDDD	DDD DDEI	OKSKINAPPQ	YKHLIAIHAG
Brassica n.	GDEEVWGREVPS	SFIERNKSGI	OKDDLDDEEDN	DED DDVI	EKFKKNAPPQ	YKHLIAIHAG
Solanum t.	TKKEAE	 QDI	OVDEEEDEDED	EDDEEDI	PKSEKKAASE	YKRLIAIHAG
Solanum t.	TDTEAWGREVSI	DIKAR YNI	KDDSDEGEAD	DSDEEDI	PTSQQNTAPE	YRRLIAIHAG
Solanum t.	SEEKAWGAEISI	DLSQKMIAYS	SENKDNGECQD	DEADSHHEN	PNIQQNIAPE	YKHLIAIQAG
Arabidopsis	tVKETSWNR		V.	ANKILEE	YKDMESEAVG	YRDLIAIHAA
					•••	*: **:*:*.

	370	380	390	400	410	420
			1	ļ		
Glycine max	KPKGHVKHHL	NNVGG-VKRL	SLSEQELEKA	SATYGSDIVR	FTQKNIIRV	PKGTRVTSSN
Vigna ungui.	KPKGEIQDEL	KAAGN-VRRL	SLSEQALEKA	SESYGADVVR	FTHNNILRV	PKGTRLNSSN
Nicotiana ru	SKPKGGLKEAL	KVDPDKVRRL	SLSEQALÈKA	AESHGTEIVR	FTQRNILRV	PKGTRFNSSN
Glycine max	KPKGGLVECL	KVDPEKVRRL	SLSEQQLEKA	AINYGQQIVR	FTQRNILRVY	PKGTRIDSSN
Glycine max	KPKGGLTECL	KVDPDKVRRL	SLSELQLEKA	AETHGKEIVR	FTQRNILRVY	PKGTRITSTN
Arabidopsis	tKPKGGITECL	KVDPDKVRRL	SLSEEQLEKA	AEKYAKQIVR	FTQHNLLRI	PKGTRVTSSN
Brassica n.	KPKGSITACL	KVDPDKVRRL	SLSEEQLEKA	AEKYAKQIVR	FTQQNLLRI	PKGTRVTSSN
Solanum t.	KGKGGLSDWL	RVDLNKVRRL	SLSEPELEKA	VDTHSKEIIR	FTQQNLLRIY	PKGIRVDSSN
Solanum t.	KGKGGLSDWL	RVDPDKVRRL	SLSEQELGKA	VVTHGKEIIR	FTQRNILRIY	PKGIRFDSSN
Solanum t.	KSKGPTSEWL	TVDPIKVKRI	SLNEEKLINV	ALNHGKDLIR	FTQRNLLRIY	PKGMRVDSSN
Arabidopsis	tNCKDPSKDCL	SDDPEKPIRV	SMDEQWLDTM	VRTRGTDLVR	FTQRNLVRI	PKGTRVDSSN
	: *. *	*:	*:.* * .	:::*	**:.*::*:*	**** *. *:*

430	440	450	460	470	480
		1		l	1

Glycine max	YRPHIGWMYGAQMVAFNMQGHGKSLWYMQGMFRANGGCGYVKKPAFLIEKGPHNEVFDPK
Vigna ungui.	YKPHIGWTYGAQMVAFNMQGHGKSLWYMQGMFRSNGGCGYVKKPNFLIQKGPQDEVFDPK
Nicotiana ru	s YKPLIGWMHGAQMVAFNMQG YGRALWLMHGMFSSNGGCGYVKKPDFLLNVGPNNEVFDPK
Glycine max	YNPLIGWMHGAQMVAFNMQGYGRSLWLMHGMFRANGGCGYVKKPNFLLETGPDDEVFNPK
Glycine max	YNPLIGWMHGAQMVAFNMQGYGRSLWLMQGMFKANGGCGYVKKPDLLLKVGPNNEVFDPR
Arabidopsis	t YNPLVGWSHGAQMVAFNMQG YGRSLWLMQGMFRANGGCGYIKKPDLLLKSGSDSDIFDPK
Brassica n.	YNPLVGWSHGAQMVAFNMQGYGRSLWLMQGMFRANGGCGYIKKPDILLKGGSDSDIFDPK
Solanum t.	YDPFVGWMHGAQMVAFNMQGYGRSLWLMHGMFRANGGCGYVKKPDLLLKAGPNNEVFDPT
Solanum t.	YNPFNAWTHGAQMVAFNMQGYGRSLWLMHGMFRGNGGCGYVKKPDILLKAGPNNEVFDPE
Solanum t.	YNPLMGWMHGAQMVAFNMQGHGRPLWLMQGMFKANGGCGYVKKPELLLKTDANNEVHDPK
Arabidopsis	t YDPHVGWTHGAQMVAFNMQG HGKQLWIMQGMFRGNGGCGYVKKPRILLDEHTLFDPC
	* * .* :*********:*: ** *:*** .****:*** :*: :.:*

,

.

- -

	490	500	510	520	530	540
	ļ	1	ł			1
Glycine max	RALPVKKTLKVK	VYMGNGWSSI	OFSKTHFDSFSF	PDFYTKVCIVG	VPADKANKK	rkviqdn
Vigna ungui.	IALPVKKTLKVK	VYLGKGWSLI	OFSPSDFDSYSF	PDFYVKVCIVG	VPADMIKKK	ISVISNN
Nicotiana ru	SAKLPVKKTLKVK	VYMGDGWHLI	OFKQTHFDLYSF	PDFYTRVGIAG	VPADEIMKK	TKTKEDK
Glycine max	AKLPVKTTLKVT	VYMGEGWYYI	OFKHTHFDQYSF	PDFYTRVGIAG	VPNDTIMKR	TKAIEDN
Glycine max	SHLPVKTTLKVT	IYMGEGWFLI	OFKHTHFDKFSF	PDFYARVGIAG	VPNDTVMKK	FEKVEDN
Arabidopsis	tATLPVKTTLRVI	VYMGEGWYFI	OFRHTHFDQYSF	PDFYTRVGIAG	VPGDTVMKK	FKTLEDN
Brassica n.	TTLPVKTTLRVT	IYMGEGWYFI	OFRHTHFDQYSF	PDFYTRVGIAG	VPADTVMKK	TKTLEDN
Solanum t.	ANLPVKTTLKVT	VYMGDGWDKI	OFDQTHFDTYSF	PDFYAKLGIAG	VPADEVKKR?	TKTMDDN
Solanum t.	ANLPVKTTLKVI	VFMGEGWYYI	OFEHTHFDAYSF	PDFYARIGIAG	VDADIVMKK	TKTLEDN
Solanum t.	RLLSVKTTLKVK	VYMGKGWHLI	OFKRTHFDAYSF	PDFYVKIGIAG	VAADSRVKK	TKAIEDN
Arabidopsis	tKRFPIKTTLKVK	IYTGEGWDLI	OFHHTHFDQYSF	PDFFVKIGIAG	VPRDTVSYR	FETAVDQ
	:.:*.**:*.	:: *.**	** :.** :**	***:.:: *.*	* * :	*. ::
	550	560	570	580	590	600
					ļ	
Glycine max	WFPVW-DEEFEF	PLTVPELALI	LRIEVREYDKHE	KDDFGGQTCLP	ISELRSGFR	
Vigna ungui.	WFPVW-NEEFDF	PLTVPELALI	LGIEVREDDKHQ	KDDFGGQTCLP	VSELKSGFR-	
Nicotiana ru	ISWTPVW-DEEFTF	PLTVPELALI	LRIEVHEYDMSE	KDDFAGQTCIP	VSELKPGIH	
Glycine max	WLPTW-NEAFEF	PLT VPELALI	LRIEVHEYDMSE	KDDFGGQTCLP	IWELRSGIR-	
Glycine max	WSPSW-NQVFKF	PLA VPELALI	LRVEVHEYDMSE	KDDFGGQTCLP	WELRSGIR	
Arabidopsis	tWIPAW-DEVFEF	PLTVPELALI	GRLEVHEYDMSE	KDDFGGQTCLP	WELSEGIR-	
Brassica n.	WVPSW-DEVFEF	PLTVPELALI	LRLEVHEYDMSE	KDDFGGQTCLP	WELQEGIR-	
Solanum t.	WIPSW-DEQFEF	PLTVPELALI	LRIKVLDYNLSD	KDEFAGQTCLP	VAELRQGIR-	
Solanum t.	WIPTW-DEQFEF	PLTVPELALI	LRVEVHEYDMSE	KDDFAGQTCLP	VSELRQGIR-	
Solanum t.	WIPIW-NDEFEF	PLTVPELALI	LRVEVHEYDMSE	IDDFGGQTCIP	VSELRTGIR-	
Arabidopsis	tWFPIWGNDEFLF	QLSVPELALI	LWFKVQDYDNDT	QNDFAGQTCLP	RPELKSGVR	PSGFTIE
	* * * :: * *	* : * * * * * * *	* . : * : :	::*.****:*	** *.:	
	610	620	630			
		1	1			
Glycine max	AVPLFDQKGEQL	KSVKLI	MRFQFK			
- Vigna unqui.	SVPLYDEKGDKY	KSVKLI				
Nigebiene w		0 0 0 0 1 1				

Vigna ungui. SVPLYDEKGDKYK----SVKLLMRFQFR--Nicotiana rusAVPLCDRKGEKYS----SARLLMRFEFI--Glycine max AIPLHSQKGDKYN----TVKLLMRFEFINN Glycine max AVPLYSRKGDKYA----NVKLLMHFEFI--Arabidopsis tAFPLHSRKGEKYK----SVKLLVKVEFV--Brassica n. SFPLHNRKEEKYK----SVKLLVKVEFV--Solanum t. AVPLYDRKGEKYS----SVKLLMRFEFI--Solanum t. AVPLYDRKGEKYN----SVKLLMRFEFI--Solanum t. AVPLYNEKGEKYP----SVKLLMRFEFI--Solanum t. AVPIYNEKGEKYP----SVKLLMRFEFVK-Arabidopsis tQQGLQEHEASRHVRLGSSLYVSLNLVFFPK : ..: : : : : : : : : : : : : : : : *

Figure 22 : <u>Alignements des séquences protéiques de diverses Phospholipases C</u> <u>spécifiques des phosphoinositides du règne végétal</u> (*Glycine max, Vigna unguiculata, Nicotiana rustica, Arabidopsis thaliana, Brassica napus, Solanum tuberosum*).

Les couples d'amorces (représentés en gras) ont été choisis au sein de régions protéiques conservées: (acides aminés 136 à 180 et 215 à 240), (acides aminés 421 à 440 et 556 à 584).

La réalisation pratique de la PCR se déroule en trois étapes :

 ७ une première étape de dénaturation : l'ADN contenant le segment à amplifier est chauffé à une température supérieure à sa Tm (température de dénaturation), dans notre cas la température est de 94°C,

Ia température est ensuite abaissée à une valeur inférieure (55°C) à la température de dénaturation des amorces afin que les amorces puissent s'hybrider avec l'ADN dénaturé,

♣ on augmente ensuite la température (72°C) afin de permettre à la DNA polymérase (thermostable) de répliquer l'ADN dans des conditions optimales.

Ces trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation) constituent un cycle au cours duquel la quantité d'ADN a été doublé. Ces cycles sont renouvelés 20 à 50 fois suivant le but poursuivi par l'expérimentateur. L'ensemble des étapes est reporté en figure 23 et en figure 24A.

B- SEPARATION ET REVELATION DES PRODUITS DE PCR

Les produits de PCR sont séparés selon leur taille par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 1,2 % dans un tampon TBE 0,5X (tableau 7), contenant du bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/ml de gel. Aux 5 µl des différents échantillons est additionné 1 µl de tampon de charge 6X concentré (bleu de bromophénol 0,25%, saccharose 40%). Les échantillons, ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (1 kb Ladder, Gibco BRL) sont déposés dans les puits. Le témoin négatif de la manipulation est réalisé dans les mêmes conditions que les échantillons, l'ADNc étant remplacé par de l'eau stérile. L'ADN chargé négativement migre vers l'anode, entraîné par un champ électrique conduit par le tampon TBE dont le gel est recouvert. Le bleu de bromophénol contenu dans le tampon de charge permet de suivre la migration qui est réalisée à un voltage constant de 100 V. Le BET, agent mutagène et indicateur fluorescent qui s'intercale entre les bases nucléiques des molécules d'ADN, permet la visualisation du résultat sous ultra-violets.

92





Figure 23 : Principe de la PCR (réaction de polymérisation en chaîne)



Composition du tampon TBE 10X	quantité
Tris	108 g
Acide borique	55 g
EDTA 0,5M, pH 6,8	40 ml
H ₂ O	qsp 1 l

Tableau 7 : Composition du tampon TBE 10 fois concentré

C- LIGATION DE LA SEQUENCE D'INTERET ET CLONAGE

Après avoir réalisé une purification des produits de PCR par le système QIAquick ("kit for PCR purification" de QUIAGEN), les séquences d'ADN sont insérées dans le plasmide pGEM-T dans le but de cloner les produits de PCR ("pGEM-T Vector System" de PROMEGA). La Taq polymérase ajoute un A à l'extrémité 3' des produits de PCR à la fin de chaque réaction. Le plasmide est linéaire et comporte un T non complémenté à ses extrémités; la réaction de ligation utilise cette particularité.

La transformation des cellules bactériennes compétentes JM109 (PROMEGA) est ensuite réalisée avec les produits de ligation. Après étalement et incubation à 37°C pendant 16 heures, la sélection des transformants est basée sur la couleur des colonies (sélection blanc-bleu). Chez les transformants, l'ADN exogène s'est inséré dans le gène codant pour la β galactosidase, ce qui empêche l'obtention de la protéine fonctionnelle. Les bactéries sont cultivées en présence du substrat chromogène de la β -galactosidase : le X-Gal. Les bactéries transformées sont incapables de métaboliser ce substrat et restent blanches alors que les bactéries non transformées sont de couleur bleue.

D- SEQUENCAGE

Une PCR, utilisant les amorces dégénérées définies pour notre étude, est réalisée sur les produits clonés afin d'effectuer la vérification de la ligation de la séquence d'intérêt. Une seconde PCR est ensuite mise en oeuvre utilisant des amorces M13 qui encadrent la séquence d'ADN d'intérêt (figure 24B).

Les produits clonés sont ensuite séquencés suivant la méthode de Sanger (ABIPrism Dye Primer Cycle Sequencing Core Kit, PERKIN-ELMER) puis soumis à un analyseur de séquence automatique (Li-Cor, dNA SEQUENCER Long readir 4200).

E- ANALYSE DES RESULTATS

1- Analyse des séquences

Les séquences vectorielles sont éliminées des séquences brutes obtenues et les séquences correspondant aux amorces dégénérées choisies sont recherchées. Les séquences sont ensuite traduites grâce à EXPASY (EXpert Protein Analysis SYstem).

2- Recherche d'homologies

Les séquences protéiques sont alors comparées avec les séquences enregistrées dans diverses bases de données (SWISS PROT, TrEMBL, TrEMBL NEW) par l'intermédiaire du logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

VIII) <u>TECHNIQUE D'IMAGERIE CALCIQUE SUR PROTOPLASTES DE CHICOREE HYBRIDE</u> "474"

A- OBTENTION DES PROTOPLASTES DE CHICOREE HYBRIDE "474"

Le protocole suivi est celui de Sidikou-Seyni *et al.* en 1992 avec des modifications. Des plantules ayant séjourné deux à trois semaines en tubes sont utilisées. Les feuilles sont coupées à la base du collet et l'épiderme inférieur est lacéré en fins lambeaux de 2 à 4 mm. Le tout est placé dans une boîte de Pétri de 55 mm de diamètre contenant 10 ml de milieu de macération et scellée par du parafilm.

Le milieu de macération est le milieu MC0 (tableau 8) contenant du mannitol, agent osmotique indispensable pour éviter l'éclatement des protoplastes libérés, ainsi que des enzymes assurant la digestion des parois pecto-cellulosiques :

- une cellulase Cayla 345L, 1 à 3 mg/ml de MC0
- une pectinase Cayla M2L, 0,5 mg/ml de MC0

Ces enzymes sont mélangées au milieu MC0 qui est ensuite stérilisé sur filtre Minisart 0,2 μ m. Les boîtes sont placées dans une étuve à 30°C, à l'obscurité, avec agitation douce pour une durée de 4 à 18 h. Une agitation manuelle rotative toutes les 2 h facilite la libération des protoplastes.

Macroéléments	KNO3	950 mg/ml
	$MgSO_4$, $7H_2O$	185 mg/ml
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	440 mg/ml
	KH2PO4	85 mg/ml
Microéléments de Heller	voir tableau 3	1 ml/l
	Fe-EDTA	19,5 mg/l
Vitamines de Morel et Wetmore	voir tableau 3	10 ml/l
	saccharose	10 g/l
	glutamine	375 mg/l
Osmoticum	mannitol	90 g/l
Tampon	MES	3 mM soit 586 mg/l
	pH	5,4

Tableau 8 : Composition du milieu MC0 pour la préparation des protoplastes

Après la macération, une filtration sur tamis d'acier de 80 μ m de taille de vide de maille permet de séparer les protoplastes des débris de feuilles et une première centrifugation 15 mn à 100 g en tube Falcon de 14 ml conduit à l'obtention d'un culot de protoplastes, ainsi qu'à un anneau en surface. Le reste du surnageant est éliminé dans le but d'enlever les enzymes de la préparation.

Trois lavages successifs dans le milieu MC0 sont ensuite nécessaires pour obtenir un culot de protoplastes purifiés où les enzymes et les débris cellulaires ont été éliminés. A chaque lavage, le milieu est éliminé après une centrifugation de 10 min à 100 g.

B- TECHNIQUE D'IMAGERIE CALCIQUE

De nombreuses sondes fluorescentes permettent de mesurer la concentration en ions Ca^{2+} libres intracellulaires. Pour notre travail, nous avons utilisé le fura-2 sous sa forme libre, sonde calcique synthétisée en 1985 par Grynkiewicz *et al*.

Les protoplastes obtenus sont placés pendant 2h à température ambiante dans notre milieu d'incubation MC0 à pH 4,5 supplémenté par le fura-2 libre à la concentration finale de 50 μ M (protocole inspiré de Bush et Jones, 1987).

La liaison du Ca²⁺ sur la molécule de fura-2 libre provoque un déplacement du spectre d'excitation sans modification du spectre d'émission. Le fura-2 libre de Ca²⁺ présente un pic d'émission de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation λ =380 nm alors que le fura-2 saturé en Ca²⁺ présente un pic d'émission de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation λ =340 nm. Le pic de fluorescence est mesuré dans tous les cas à 510 nm. Ainsi, une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire se traduit par une augmentation de l'émission de fluorescence à 510 nm lorsque le fura-2 est excité à 340 nm et par une diminution de l'émission de fluorescence mesurée pour ces deux longueurs d'ondes d'excitation peut être calculé et utilisé comme mesure directe du Ca²⁺ libre.

Sur le système d'imagerie calcique, les différentes longueurs d'ondes émises par la lampe à ultraviolets sont sélectionnées par un monochromateur. La lumière est alors renvoyée vers la préparation grâce à un miroir dichroïque. Les cellules chargées en fura-2 émettent de la fluorescence et celle-ci est transmise au travers du miroir vers une caméra CCD (Caméra

Digitale, 12 bits). A ce niveau, l'intensité lumineuse est transformée en signal numérique et quantifiée par un programme Quanticell QC900.



RESULTATS

Les ovocytes injectés avec les ARN totaux de feuilles de chicorée sont testés par la technique électrophysiologique classique de voltage-imposé à deux microélectrodes entre 3 et 6 jours après l'injection.

Le prélèvement chirurgical des ovocytes d'un Xénope conduit à l'élaboration d'une série de manipulations sur plusieurs ovocytes du même lot. Chaque série de manipulations nécessite l'utilisation de témoins dont l'analyse est renouvelée pour chaque lot d'ovocytes et chaque jour :

ARN totaux ou ayant subi l'injection d'un volume équivalent d'eau stérile,

by des ovocytes préinjectés depuis au moins 3 jours avec les ARN totaux et n'ayant fait l'objet d'aucun traitement supplémentaire. Cette catégorie d'ovocyte est très importante à analyser puisqu'elle constitue le témoin positif (c'est à dire les ovocytes présentant les courants néo-exprimés). Le nombre d'ovocytes présentant les courants néo-exprimés diffère suivant les saisons et les animaux. Les résultats présentés ci-dessous ont été réalisés à partir de lots d'ovocytes dont le témoin positif se situe entre 70 et 100 % d'ovocytes développant les courants nouvellement exprimés,

Iorsque cela s'avère nécessaire, des témoins complémentaires sont utilisés (l'analogue inactif du produit pharmacologique employé ou le solvant utilisé pour la dissolution du produit).

I) <u>CARACTERISATION DES COURANTS ENREGISTRES DANS LES OVOCYTES DE XENOPE</u> INJECTES AVEC LES ARN TOTAUX

L'ovocyte de Xénope est un système d'expression fonctionnelle des ARN totaux de feuilles de chicorée. En effet, suite à l'injection des ARN totaux de feuilles de chicorée dans les ovocytes, nous enregistrons des courants ioniques qui, sur les ovocytes contrôles ne sont pas détectables.

Le protocole de voltage imposé choisi afin de mettre en évidence les courants ioniques néo-exprimés consiste en un « double-créneau ». La membrane ovocytaire, initialement maintenue à un potentiel de -35 mV, est amenée à une valeur de -140 mV pendant 1 seconde, puis à un potentiel de +60 mV pendant 1 seconde également. La valeur de -35 mV a été choisie d'une part, afin de maintenir la membrane dans des conditions proches du potentiel transmembranaire de repos de l'ovocyte et, d'autre part, afin de s'affranchir des canaux

calciques endogènes inactifs à ce potentiel. Ce protocole, illustré en figure 25A, est répété toutes les 40 secondes, et n'engendre **aucun courant membranaire au niveau d'un ovocyte témoin** (figure 25A). A l'inverse, au niveau d'un ovocyte injecté avec les ARN totaux et utilisé comme exemple représentatif, le même protocole de voltage imposé conduit à l'enregistrement d'un **courant sortant de forte amplitude** (2300 nA) présentant une allure complexe (figure 25B-F). Au cours de la première stimulation, on observe un courant sortant qui ne **s'inactive pas** au cours du temps (figure 25B). Après 40 secondes, l'amplitude du courant augmente (3200 nA) sans changement notable de cinétique (figure 25C). La cinétique du courant se modifie ensuite graduellement : 80, 120 et 160 secondes après la première stimulation (figure 25D-F).

Ce courant sortant enregistré au niveau des ovocytes injectés avec les ARN totaux de feuilles de chicorée est formé en fait de deux composantes distinctes :

 \Rightarrow une première composante qui ne s'inactive pas au cours du temps. Ce courant sera nommé par la suite I_{ni} pour « courant (I) non-inactivant (ni) ».

 \Rightarrow une seconde composante qui s'inactive au cours de la durée du pulse nommé I_i pour « courant (I) inactivant (i) ».

A- CARACTERISATION DU COURANT SORTANT "NON-INACTIVANT" I_{NI}

Afin d'étudier le courant « non-inactivant », on applique à la membrane ovocytaire des créneaux de potentiel imposé allant de -35 mV à +60 mV durant 1,2 seconde.

Ce protocole a été choisi afin d'isoler la composante I_{ni} de la composante I_i qui n'est jamais observée dans ces conditions. Ce protocole n'induit aucun courant dynamique au niveau des ovocytes contrôles (n=32, N=9; figure 26A). A l'inverse, ce créneau de potentiel conduit à l'enregistrement du courant sortant I_{ni} au niveau des ovocytes injectés des ARN totaux. Le courant présente une cinétique d'activation biexponentielle (τ_1 = 68,7 ± 15,5 ms; τ_2 = 467,2 ± 65,3 ms; n=12, N=2; figure 26B). L'amplitude moyenne de I_{ni} est de 2915 ± 848 nA à +60 mV (n=11, N=2) et diminue de moitié en $t_{1/2}$ = 86 ± 47 secondes (n=13, N=2; figure 26B-C). L'amplitude du courant s'annule complètement en 153 ± 64 secondes (n=11; N=2). Etant donné le "run-down" (diminution de l'amplitude du courant au cours du temps) de I_{ni} , il est difficile de déterminer le potentiel d'inversion du courant. Pour cette raison, nous avons utilisé des outils pharmacologiques pour la détermination de la nature ionique de I_{ni} .



Figure 25 : Changement de cinétique du courant sortant enregistré au niveau d'un ovocyte injecté avec les ARN totaux de feuilles de chicorée

A- Courant sortant enregistré au niveau d'un ovocyte contrôle soumis au protocole de voltage imposé -140 à +60 mV (n=32, N=9).

B à F- Courant sortant enregistré dans les mêmes conditions de voltage imposé chez un ovocyte injecté des ARN totaux. La cinétique du courant change graduellement au cours du temps. Au début de l'expérience (B) et 40 secondes après (C), le courant ne s'inactive pas au cours du pulse. 80 (D), 120 (E) et 160 (F) secondes après le début de l'expérience, le courant sortant augmente d'amplitude et présente une cinétique d'inactivation de plus en plus marquée.

103



Figure 26 : Propriétés électrophysiologiques du courant sortant Ini

A- Ovocyte contrôle soumis à une dépolarisation de -35 à +60 mV pendant 1,2 seconde (n=32, N=9).

B- Ovocyte injecté des ARN totaux soumis au même protocole de voltage imposé toutes les

40 secondes. La figure illustre la diminution d'amplitude du courant au cours du temps (« run-down »); n=11, N=2.

C- Courbe retraçant la cinétique du run-down de Ini enregistré sur un ovocyte.

La substitution des ions chlorures par les ions méthane-sulfonates du milieu extracellulaire provoque l'abolition complète du courant (n=5, N=2; figure 27A).

L'ovocvte de Xénope possédant une importante densité de canaux chlorures dépendants du Ca²⁺ (Miledi, 1982 ; Barish, 1983 ; Miledi et Parker, 1984 ; Hartzell, 1996 ; Gomez-Hernandez et al., 1997; Kuruma et Hartzell, 1999 et 2000; Callamaras et Parker, 2000), nous avons cherché à déterminer la dépendance de I_{ni} vis à vis du Ca²⁺. L'élimination des ions Ca²⁺ du milieu extracellulaire n'a pas d'effet sur l'amplitude du courant Ini (n=12, N=3; figure 27B). L'amplitude moyenne de Ini et la cinétique de « run-down » du courant sont similaires en milieu de référence ND96 et en milieu dépourvu d'ions Ca^{2+} (2915 ± 848 nA, $t_{1/2} = 86 \pm 47$ secondes; n=11, N=2 pour I_{ni} enregistré en milieu ND96 et 3772 ± 1507 nA, $t_{1/2} = 78 \pm 43$ secondes; n=12, N=3 pour I_{ni} enregistré en milieu dépourvu d'ions Ca²⁺). La perfusion extracellulaire du milieu dépourvu de Ca²⁺ pendant 10 minutes n'a aucun effet sur les ovocytes contrôles soumis au même protocole de voltage imposé. Afin d'évaluer le rôle des ions Ca²⁺ intracellulaires sur le développement de Ini, nous avons injecté du BAPTA (40 nl d'une solution à 25 mM), chélateur puissant des ions Ca²⁺, dans les ovocytes. Nous avons comparé ensuite le nombre d'ovocytes présentant Ini lorsque le BAPTA a été injecté (n=19, N=4) et lorsque le chélateur n'a pas été injecté (n=28, N=4). L'injection de BAPTA réduit significativement de 76% (P<0,001) le nombre d'ovocyte présentant Ini (figure 27C).

Nous déduisons de ces résultats que I_{ni} est un courant porté par les ions chlorures et fortement dépendant du Ca²⁺ intracellulaire.

B- CARACTERISATION DU COURANT SORTANT "INACTIVANT" \boldsymbol{I}_{I}

Suite au run-down total de I_{ni} , chaque ovocyte est soumis au protocole de potentiel imposé identique à celui appliqué en figure 25. Ce protocole induit alors le courant sortant présentant une cinétique d'inactivation au cours du pulse : I_i .

Cette composante présente une activation rapide monoexponentielle (τ = 47,6 ± 13,6 ms; n=17, N=3) et une inactivation biexponentielle (τ_1 = 219 ± 38,6 ms; τ_2 = 398,1 ± 16.5 ms; n=6, N=2; figure 28B). L'amplitude moyenne de I_i est de 4461 ± 1605 nA à +60 mV (n=13, N=2). Ce courant n'est jamais observé au niveau des ovocytes contrôles (figure 28A).



Figure 27 : Propriétés pharmacologiques du courant sortant Ini

Le courant est induit par le protocole de voltage imposé amenant la membrane ovocytaire de -35 à +60 mV pendant 1,2 seconde.

A- Effet de la substitution des ions chlorures du milieu extracellulaire par les ions méthanesulfonates. Enregistrement obtenu en milieu de référence (ND96) et en milieu dépourvu des ions chlorures (OCl) ; n=5, N=2.

B- Effet de l'application extracellulaire d'un milieu dépourvu d'ions Ca^{2+} et additionné d'EGTA. Notons que le rundown du courant en conditions de référence et en milieu dépourvu de calcium sont similaires (n=12, N=3).

C- L'injection intracellulaire de 40 nl de K₄. BAPTA à la concentration de 25 mM conduit à l'abolition totale du courant I_{ni} .

. . .



Figure 28 : Caractéristiques du courant sortant Ii

A- Courant enregistré au niveau d'un ovocyte témoin soumis à une hyperpolarisation de -35 à -140 mV pendant 1 seconde suivi d'une dépolarisation de -140 à +60 mV pendant 1 seconde également (n=32, N=9).

- B- Courants I_i enregistrés à 0, +20 et +60 mV à partir de -140 mV (n=13, N=2).
- C- Courbe Courant-Potentiel de I_i.
- D- Courants de queue de Ii et courbe Courant-Potentiel des courants de queue.

RESULTATS

La figure 28C illustre la courbe reliant l'amplitude maximale du courant en fonction du potentiel imposé choisi par l'expérimentateur (dans le cas présent, le potentiel imposé au cours de la seconde partie du protocole varie de -35 à +65 mV).

A l'aide de cette courbe courant-potentiel (cf. : Matériels et Méthodes), nous pouvons déterminer le seuil d'activation pour I_i aux alentours de -25 mV (-22,3 \pm 7 mV ; n=8, N=2).

Afin de déterminer le potentiel d'inversion du courant et ainsi la nature ionique du courant (cf. : Matériels et Méthodes), nous observons les courants de déactivation (ou courants de queue) lorsque le potentiel imposé prend différentes valeurs suite au créneau d'imposition à +60 mV. Le courant de queue suivant le test à +60 mV est clairement de sens entrant à -25 mV et de sens sortant à +5 mV (figure 28D). A partir de la courbe courant-potentiel reliant le potentiel imposé à l'amplitude du courant de queue, nous pouvons déterminer la valeur du potentiel d'inversion du courant I_i à -13,6 ± 8,2 mV (n=11, N=3). Ce potentiel d'inversion étant très proche de celui des ions chlorures dans nos conditions ioniques (-20 mV), nous suggérons donc que le courant sortant est porté principalement par les ions chlorures. De plus, la substitution des ions chlorures du milieu extracellulaire par les ions méthane-sulfonates provoque la disparition totale du courant I_i (n=7, N=2 ; figure 29A).

A l'inverse de I_{ni} qui est activé par le Ca²⁺ d'origine **intracellulaire**, le développement du courant I_i est dépendant du Ca²⁺ **extracellulaire**. En effet, le courant est absent lorsque les ovocytes sont placés en milieu extracellulaire dépourvu d'ions Ca²⁺ (n=13, N=2 ; figure 29B). La perfusion extracellulaire du milieu dépourvu d'ions Ca²⁺ pendant 10 minutes est sans effet sur les ovocytes contrôles soumis au même protocole.

L'ensemble de ces résultats démontrent qu'un influx de Ca²⁺ est nécessaire à l'activation de I_i. Notre interprétation est la suivante :

 $rac{1}{5}$ le développement de I_{ni} dépendant uniquement du Ca²⁺ intracellulaire, nous pouvons supposer que les ions Ca²⁺ en question proviennent des réserves intracellulaires,

a la vidange des réserves intracellulaires de Ca²⁺ provoquant classiquement un influx de Ca²⁺ depuis le milieu extracellulaire ("Entrée Capacitative de Calcium"), nous pouvons supposer également que cet influx de Ca²⁺ est nécessaire au développement de I_i.

108


Figure 29: Dépendance du courant sortant I_i vis à vis des ions chlorures et calcium extracellulaires

Les ovocytes sont soumis à une hyperpolarisation de -35 à -140 mV pendant 1 seconde suivi d'une dépolarisation de -140 à +60 mV pendant 1 seconde également.

A- Effet de la substitution des ions chlorures du milieu extracellulaire par les ions méthanesulfonates. Enregistrement obtenu en milieu de référence (ND96) et en milieu dépourvu des ions chlorures (OCl) ; n=7, N=2.

B- Effet de l'application extracellulaire d'un milieu dépourvu d'ions Ca²⁺ (n=13, N=2).

Ainsi, le Ca^{2+} libéré des stocks calciques intracellulaires activerait I_{ni} qui, en retour, stimulerait l'entrée capacitative de calcium responsable de l'activation de I_{i} .

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utiliser l'inhibiteur le plus drastique de l'entrée capacitative de calcium au niveau des ovocytes de Xénope à savoir l'ion lanthane : La^{3+} (Gillo *et al.*, 1996 ; Yao et Tsien, 1997). L'application extracellulaire de La^{3+} à la concentration de 100 μ M conduit à l'abolition totale du courant I_i sortant (n=12, N=3 ; figure 30A).

Pour confirmer le rôle de l'entrée capacitative de calcium, nous avons regardé l'effet de l'augmentation du gradient de Ca²⁺ sur l'amplitude du courant I_i (figure 30B). Au cours de cette expérience, la membrane ovocytaire est tout d'abord hyperpolarisée à différentes valeurs de potentiel (allant de -35 à -135 mV) puis dépolarisée à +60 mV. Le courant I_i est activé à +60 mV seulement lorsqu'il y a eu hyperpolarisation préalable à des valeurs inférieures à -50 mV. Ce résultat est clairement montré grâce à la courbe courant-potentiel, reliant l'amplitude du courant I_i à +60 mV aux différentes valeurs de potentiel hyperpolarisant imposé (figure 30B).





Les ovocytes sont soumis à une hyperpolarisation de -35 à -140 mV pendant 1 seconde suivi d'une dépolarisation de -140 à +60 mV pendant 1 seconde également.

A- Courants enregistrés en conditions de référence (ND96) et lorsque le La^{3+} est additionné au milieu de perfusion extracellulaire (La^{3+}); n=12, N=3.

B- La courbe d'activation de I_i est obtenue en hyperpolarisant la membrane à différents potentiels allant de -35 à -135 mV pendant 1 seconde puis en dépolarisant la membrane à +60 mV. Le courant mesuré à +60 mV pour chaque ovocyte a été normalisé (n=7, N=3).

RESULTATS

C- SYNTHESE DES RESULTATS

L'ensemble des résultats précédemment exposé nous permet de proposer une explication concernant la nature du courant I_{ni} . Ce courant est un **courant chlorure activé par le Ca²⁺ libéré des réserves intracellulaires**. Plusieurs arguments nous permettent d'avancer cette explication :

⇒ Le courant est porté par les ions chlorures du fait que la substitution de ces ions du milieu extracellulaire conduit à l'abolition totale du courant.

 \Rightarrow Le développement de I_{ni} est indépendant du Ca²⁺ extracellulaire puisque le courant se développe même si les ions Ca²⁺ sont absents du milieu de perfusion.

 \Rightarrow Le courant nécessite du Ca²⁺ intracellulaire pour son essor : en effet, l'injection intracellulaire de BAPTA (chélateur des ions Ca²⁺) empêche tout développement de I_{ni}.

 \Rightarrow L'amplitude de I_{ni} décline de moitié en 86 ± 47 secondes. Cette diminution de l'amplitude du courant pourrait refléter la cinétique de libération du Ca²⁺ des réserves intracellulaires.

Plusieurs données nous permettent d'établir la nature du second courant I_i , à savoir qu'il s'agit d'un courant porté par les ions chlorures et activé par le Ca²⁺ provenant de l'entrée capacitative :

 \Rightarrow **I**_i est un courant chlorure puisque la substitution des ions chlorures du milieu extracellulaire empêche tout développement de ce courant. De plus, le potentiel d'inversion du courant I_i est proche du potentiel d'inversion des ions chlorures.

 \Rightarrow A l'inverse de I_{ni}, I_i nécessite absolument pour son développement la présence d'ions Ca²⁺ dans le milieu de perfusion.

 \Rightarrow La libération de Ca²⁺ des réserves intracellulaires conduit à l'activation d'un influx de Ca²⁺ depuis le milieu extracellulaire ("Entrée Capacitative de Calcium"). Ce phénomène est clairement démontré dans les ovocytes de Xénope par Putney en 1990. Au cours de notre travail, nous avons montré que le second courant I_i ne se développe qu'après l'apparition du premier courant I_{ni}. Ce dernier étant le reflet du relargage de Ca²⁺ des stocks intracellulaires, nous pouvons supposer que I_i est le reflet de l'entrée capacitative de Ca²⁺. $\Rightarrow Le \text{ courant } I_i \text{ est visualisé à +60 mV lorsque la membrane ovocytaire a été soumise au préalable à un potentiel imposé hyperpolarisant inférieur à -50 mV. Cette donnée a été clairement établie par Hartzell en 1996 concernant l'entrée capacitative de calcium dans l'ovocyte. Cette hyperpolarisation préalable est nécessaire afin d'établir un gradient électrochimique suffisant permettant au Ca²⁺ d'entrer de façon massive dans le cytoplasme. Cette entrée de Ca²⁺ aboutit à la stimulation des courants chlorures dépendants du Ca²⁺.$

 \Rightarrow Le courant I_i est complètement inhibé par l'application extracellulaire de La³⁺ connu comme étant l'inhibiteur le plus puissant de l'entrée capacitative de l'ovocyte de Xénope (Yao et Tsien, 1997).

En résumé, nous avons démontré, par la technique de potentiel imposé à double microélectrodes, que la dépolarisation de la membrane plasmique conduit à l'enregistrement de deux conductances ioniques dans les ovocytes ayant subit une injection des ARN totaux de feuilles de chicorée hybride "474". Ces deux courants ne sont pas détectables sur les ovocytes contrôles dans les mêmes conditions. Ces deux courants ioniques sont le reflet d'une part :

→ de la libération de calcium des réserves intracellulaires, et d'autre part :

→ de l'entrée capacitative de calcium.

Ces variations de [Ca²⁺]i sont visualisées *via* « l'Index chlore calcium dépendant » de l'ovocyte de Xénope (cf. : "Introduction").

L'ensemble de ces résultats sont présentés à l'aide d'un schéma récapitulatif illustré en figure 31.

Les données exposées ci-dessus ont fait l'objet d'une publication à "Journal of Membrane Biology" jointe au manuscrit en annexe 1.

« A Calcium Homeostasis Mechanism Induced by Heterologous Expression of Total RNA from Chicory Leaves in Xenopus Oocytes »

M.Debarbieux^{1,2}, H. Ouadid-Ahidouch¹, N. Delpierre², J. Vasseur² and N. Prevarskaya¹. J. Membrane Biol. 167, 25-33 (1999)



Figure 31: Illustration des mécanismes induits par l'expression hétérologue des ARN totaux de feuilles de chicorée hybride "474" dans les ovocytes de Xénope

La dépolarisation membranaire induit par un mécanisme indéterminé la libération du Ca^{2+} des réserves intracellulaires. Cette libération de Ca^{2+} engendre l'activation de courants chlorures dépendants du Ca^{2+} : (i) un canal chlorure activé directement par le Ca^{2+} libéré est activé. On enregistre alors I_{ni} [1].

La vidange du Ca²⁺ des réserves active ensuite l'entrée capacitative de calcium (ECC) via des canaux calciques membranaires (CRAC). CCE entraîne une augmentation de la [Ca²⁺]i conduisant à l'activation d'autres canaux chlorures dépendants du Ca²⁺: (ii) un canal chlorure activé par le Ca²⁺ interne et dépendant du Ca²⁺ extracellulaire est activé. On enregistre alors I_i[2].

II) ORIGINE DU CALCIUM INDUISANT I_{NI}

L'ensemble des résultats déjà exposés montre clairement l'existence d'un mécanisme participant à la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires suite à une dépolarisation membranaire des ovocytes injectés avec des ARN totaux. Néanmoins, le mécanisme par lequel s'opère cette libération demeure inconnu. Nous avons exposé précédemment (cf.: "Introduction") les différents processus permettant au Ca^{2+} d'être libéré des réserves internes des cellules végétales. Parmi ces mécanismes, la voie de signalisation empruntant les phosphoinositides semble être la plus répandue. Nous nous sommes donc intéressé à l'implication de cette voie dans le relargage de Ca^{2+} mis en évidence dans notre travail.

A- EFFET DE L'INJECTION INTRACELLULAIRE D'INSP₃ DANS LES OVOCYTES PREALABLEMENT INJECTES AVEC LES ARN TOTAUX ET DANS LES OVOCYTES CONTROLES

La figure 32A illustre le courant I_{ni} décrit auparavant au niveau des ovocytes injectés des ARN totaux. L'injection intracellulaire d'InsP₃ dans des ovocytes contrôles engendre un courant I_{STORE} d'amplitude moyenne 7220 ± 1660 nA, n=20, N=2. Ce courant possède les mêmes propriétés que I_{ni} (figure 32C). La partie B de la figure montre l'absence totale de courant au niveau des ovocytes témoins soumis aux mêmes conditions de potentiel imposé mais sans injection d'InsP₃.

L'InsP₃ est injecté à nouveau dans des ovocytes témoins après le run-down complet de I_{STORE} ($t_{1/2}=54,8 \pm 17$ sec, n=12, N=2) et **aucun courant n'est alors enregistré suite à cette seconde injection** (n=12, N=2; figure 33A-b). Nous nous sommes alors intéressé à l'effet d'une injection d'InsP₃ après le run-down complet de I_{ni} . La figure 33B-c montre que cette injection n'entraîne l'enregistrement que d'un faible courant sortant d'une amplitude moyenne de 1650 ± 1781 nA (n=18, N=2).

Ces données nous permettent d'avancer l'hypothèse selon laquelle la libération de calcium, requise pour l'activation de I_{ni} , fait intervenir des éléments de la cascade de transduction impliquant l'InsP₃. En effet, l'injection d'InsP₃ après le run-down de I_{ni} est pratiquement inefficace. La seconde injection de l'InsP₃ au niveau des ovocytes témoins est quant à elle totalement inefficace.



Figure 32 : <u>Le développement de I_{ni} peut être mimé par l'injection intracellulaire d'InsP₃</u> dans des ovocytes contrôles

Les ovocytes sont soumis à une dépolarisation de -35 à +60 mV pendant 1,2 seconde toutes les 15 secondes.

A- Diminution de l'amplitude du courant I_{ni} dans les ovocytes injectés des ARN totaux de feuilles de chicorée. (a) première stimulation, (b) run-down total du courant.

B- Courant enregistré au niveau des ovocytes contrôles avant l'injection d'InsP₃.

C- Courant enregistré au niveau des ovocytes contrôles après l'injection d'InsP₃. (a) courant I_{STORE} d'amplitude moyenne 7220 ± 1600 nA (n=20 ; N=2), (b) run-down total du courant.



Figure 33 : Effet de l'injection d'InsP₃ dans des ovocytes contrôles et des ovocytes injectés des ARN totaux

Les ovocytes sont soumis à une dépolarisation de -35 à +60 mV pendant 1,2 seconde toutes les 15 secondes.

A- Partie supérieure: courants enregistrés (a) après une première injection d' $InsP_3$ dans un ovocyte contrôle et (b) après une seconde injection d' $InsP_3$.

Partie inférieure: courbe représentant l'évolution du courant chlore I_{STORE} enregistré chez un ovocyte contrôle subissant deux injections d'InsP₃ (représentés par des flèches)

B- Partie supérieure: courants enregistrés (a) lors de la première dépolarisation d'un ovocyte injecté avec des ARN totaux, le courant I_{ni} est à son amplitude maximale; (b) après le run-down complet de I_{ni} et (c) après injection d'InsP₃. L'amplitude moyenne du courant enregistré est alors de 1650 ± 1781 nA (n=18, N=2).

Partie inférieure: courbe représentant l'évolution du courant chlore enregistré chez un ovocyte préalablement injecté des ARN totaux et subissant une injection d'InsP₃.

B- EFFET DE L'APPLICATION EXTRACELLULAIRE DE CAFEINE SUR LE DEVELOPPEMENT DE \mathbf{I}_{NI}

La caféine est connue pour inhiber le récepteur à l'InsP₃ de l'ovocyte de Xénope (Parker et Ivorra, 1991 ; Hague *et al.*, 2000). La figure 34A illustre le courant I_{ni} ainsi que la diminution de son amplitude au cours du temps. L'application extracellulaire de caféine à la concentration de 5 mM pendant 20 minutes réduit significativement, par rapport aux conditions contrôles en milieu ND96, le nombre d'ovocytes présentant I_{ni} de 85% (n=39, N=4 ; P<0,001 ; figure 34B).

C- MESURES DU TAUX D'INSP3 INTRACELLULAIRE

Les résultats acquis nous conduisent à impliquer la voie de signalisation de l'InsP₃ dans l'activation des canaux chlorures des ovocytes préalablement injectés avec les ARN totaux. Nous avons donc voulu savoir si le métabolisme de l'InsP₃ est modifié dans des ovocytes préalablement injectés avec les ARN totaux et ayant subit une dépolarisation membranaire par rapport à des ovocytes contrôles ayant, eux aussi, subit la même dépolarisation. Après une dépolarisation de -35 à +60 mV, le métabolisme des InsP₃ est stoppé et le taux d'InsP₃ est mesuré. Les mesures réalisées au niveau des ovocytes injectés des ARN totaux montrent une très nette augmentation du taux d'InsP₃ (245 ± 14%, n=21, N=2 ; figure 35) par rapport aux ovocytes témoins (100 ± 5%, n=9, N=2 ; figure 35).

D- SYNTHESE DES RESULTATS

Des études ont suggéré que la production d'InsP₃ peut dépendre du potentiel membranaire dans les cellules animales (Ganitkevich et Isenberg, 1993 et 1996; Charpentier *et al.*, 1995; Gromada et Dissing, 1996; Audigier *et al.*, 1998; Nilsson, 1998). Les travaux de Ganitkevich et Isenberg décrivent la modulation de la production d'InsP₃ dans le sens d'une augmentation lors d'une dépolarisation. Les auteurs avancent l'hypothèse d'une sensibilité des protéines G ou des phospholipases C aux variations de potentiel membranaire. A l'inverse, une hyperpolarisation membranaire entraîne une diminution de l'hydrolyse des PiP₂, et donc de la production d'InsP₃ (Itoh *et al.*, 1990).





Par ailleurs, des travaux, réalisés sur des cellules musculaires, montrent qu'une dépolarisation membranaire induite par l'application extracellulaire d'une forte concentration de KCl, conduit à un changement de configuration des PiP₂. Ces molécules seraient alors plus susceptibles d'être transformées par les PLC en InsP₃. Il en résulte donc une augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ (Best et Bolton, 1986).

Au vu des résultats acquis au cours de notre travail et des données bibliographiques, nous proposons que la dépolarisation imposée à la membrane des ovocytes injectés avec les ARN totaux de feuilles de chicorée engendre une production d'InsP₃ (figure 36).

III) MECANISME D'ACTIVATION DE LA PHOSPHOLIPASE C

Les études précédemment citées (Ganitkevich et Isenberg, 1993 et 1996) nous amènent à penser que la dépolarisation membranaire peut induire une production d'InsP₃ via l'activation de la PLC. Afin d'appréhender l'implication de la PLC dans la production d'InsP₃, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de cet enzyme.

A- EFFET DE L'INHIBITION DE LA PHOSPHOLIPASE C

L'application extracellulaire de U73122, un inhibiteur spécifique de la PLC, à la concentration de 10 μ M (dans DMSO 1/1000 pendant 30 minutes) réduit significativement, par rapport aux conditions contrôles, le nombre d'ovocytes présentant I_{ni} de 52 % (n=47, N=4; P<0,001; figure 37A).

Afin de vérifier que l'action de l'U73122 est bien spécifiquement ciblée sur la PLC, nous avons utilisé un analogue structural très proche de l'U73122 (U73343) qui est inefficace sur l'activité de la PLC. L'application de U73343 (10 μ M dans DMSO 1/1000 pendant 30 minutes) n'a aucun effet sur le nombre d'ovocytes présentant le courant I_{ni} (n=38, N=4; figure 37B). L'incubation en DMSO 1/1000 pendant 30 minutes d'ovocytes injectés des ARN totaux n'a également aucune influence sur le nombre d'ovocyte développant le courant I_{ni} par rapport aux ovocytes incubés en ND96 (n=33, N=4; figure 37C).

122



Figure 36: Implication des molécules d'InsP₃ dans la libération de calcium des réserves intracellulaires

L'ensemble des événements reportés ci-dessus sont identiques à ceux décrits précédemment en <u>figure 31</u>. L'élément nouveau est constitué par le fait que la libération de Ca^{2+} est induite par l'InsP₃.

. . .



Figure 37 : Effet de l'application extracellulaire d'U73122 et de son analogue inactif U73343 sur le développement de I_{ni}

Les ovocytes injectés des ARN totaux de feuilles de chicorée sont soumis à une dépolarisation de -35 à +60 mV pendant 1,2 seconde toutes les 15 secondes.

A- Courant enregistré après incubation extracellulaire des ovocytes en U73122 (10 μ M) pendant 30 minutes (n=47, N=4).

B- Courants enregistrés après incubation extracellulaire des ovocytes en U73343 (10 μ M) pendant 30 minutes. L'amplitude moyenne est de 7640 ± 1950 nA (n=38, N=4). (a) première stimulation, (b) run-down complet de I_{ni}.

C- Courants enregistrés après incubation extracellulaire des ovocytes en DMSO 1/1000 pendant 30 minutes. L'amplitude moyenne est de 8340 ± 2160 nA (n=33, N=4). (a) première stimulation, (b) run-down complet de I_{ni}.

RESULTATS

B- SYNTHESE DES RESULTATS

Ces résultats démontrent que le développement de I_{ni} peut être mimé par l'injection intracellulaire d'InsP₃ dans les ovocytes témoins. De plus, nous avons démontré que l'injection d'InsP₃ après le run-down de I_{ni} est pratiquement inefficace. La seconde injection de l'InsP₃ au niveau des ovocytes témoins est, quand à elle, totalement inefficace. Plusieurs explications sont possibles afin d'éclaircir ces données :

 $\Rightarrow \text{ les réserves de Ca}^{2^+} \text{ intracellulaires peuvent être respectivement vides ou quasiment vides après la première injection d'InsP₃ dans les ovocytes témoins ou après le développement puis le run-down de I_{ni} au niveau des ovocytes préalablement injectés avec les ARN totaux,$

 \Rightarrow des éléments de la cascade de transduction impliquant l'InsP₃ peuvent être inactivés (par exemple les récepteurs-canaux activés par l'InsP₃ sont susceptibles d'être moins sensibles à l'InsP₃).

Nous proposons donc l'implication de l'InsP₃ dans le relargage de Ca²⁺ qui provoque le développement du courant I_{ni}. Afin de confirmer cette hypothèse nous avons utiliser un inhibiteur des récepteur-canaux sensibles à l'InsP₃, à savoir la caféine. L'application extracellulaire de cet inhibiteur réduit considérablement le nombre d'ovocytes présentant le courant I_{ni}. De plus, les mesures réalisées au niveau des ovocytes injectés des ARN totaux montrent une très nette augmentation du taux d'InsP₃ par rapport aux mesures exécutées dans les ovocytes témoins.

Afin d'élucider le mécanisme par lequel la dépolarisation induit la production d'InsP₃, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de la PLC qui pourrait être l'élément sensible aux variations de potentiel membranaire au cours d'une production d'InsP₃. L'application extracellulaire de cet inhibiteur (U73122) réduit significativement le nombre d'ovocytes présentant le courant I_{ni} .

Il est à souligner que l'U73122 est un inhibiteur des PLC spécifiques des phosphoinositides dans les cellules animales comme dans les cellules végétales (Staxen *et al.*, 1999). Ceci confirme le fait que l'U73122 est un inhibiteur ubiquitaire qui trouve sa spécificité dans le monde animal et dans le monde végétal.

L'ensemble de ces données nous conduit à penser que la dépolarisation transmembranaire, imposée aux ovocytes préalablement injectés des ARN totaux,

engendre la production d'InsP₃ via l'activation de la PLC. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer ce résultat :

⇒ Charpentier *et al.* en 1995, ont proposé le fait qu'une dépolarisation <u>itérative</u> de la membrane ovocytaire résulte en l'activation de la PLC endogène à l'ovocyte qui catalyse l'hydrolyse des PiP₂ produisant alors l'InsP₃ et le DAG. Au cours de notre étude, une <u>simple</u> dépolarisation de -35 à +60 mV n'induit aucun courant dans des ovocytes contrôles mais engendre un courant sortant de forte amplitude, à savoir I_{ni}, au niveau des ovocytes préalablement injectés des ARN totaux de feuilles de chicorée.

Une explication possible est que l'expression hétérologue des ARN totaux de feuilles de chicorée conduit à des modifications de la PLC endogène de l'ovocyte de Xénope (telles que des changements conformationnels ou des modifications posttraductionnelles) résultant en une augmentation de sa sensibilité aux variations de potentiel.

 \Rightarrow La plupart des éléments impliqués dans la cascade de transduction des phosphoinositides, tels que les protéines G, les PiP₂ ou simplement les PLC, ont des équivalents structuraux ou fonctionnels chez les plantes. Il a d'ailleurs été clairement établi que les tissus végétaux sont capables de dégrader et d'élaborer les inositols phosphates produits par l'action de la PLC (cf. : "Introduction"). De plus, Staxen *et al.* (1999) démontrent que l'U73122 est un inhibiteur spécifique de l'activité des phospholipases C spécifiques des phosphoinositides chez les plantes.

Une autre explication peut être avancée : l'injection des ARN totaux de chicorée provoque l'expression d'une nouvelle PLC d'origine végétale. Cette PLC serait sensible aux variations de potentiel. En résumé, notre travail nous a permis de mettre en évidence un mécanisme d'homéostasie calcique révélé suite à l'injection des ARN totaux extraits à partir de feuilles de chicorée hybride "474" dans les ovocytes de Xénope. Ce mécanisme implique la voie des phosphoinositides et plus spécifiquement la PLC.

Un schéma général des données obtenues au cours de nos expériences est reporté en figure 38.

Les résultats exposés ci-dessus font l'objet d'une publication soumise jointe au manuscrit en annexe 2.

« InsP₃-mediated Calcium Release induced by Heterologous Expression of Total Chicory Leaf RNA »

M. Debarbieux-Deleporte^{1,2,*}, B. Delbreil², T. Collin³, P. Delcourt¹, J. Vasseur², N. Prevarskaya¹, and H. Ouadid-Ahidouch¹



Figure 38: Illustration du signal de transduction impliquant la voie des phosphoinositides induit par l'expression hétérologue des ARN totaux de feuilles de chicorée dans les ovocytes

L'ensemble des événements reportés ci-dessus sont identiques à ceux décrits précédemment en <u>figures 31 et 36</u>. L'élément nouveau est constitué par le fait que la dépolarisation membranaire de l'ovocyte induirait l'hydrolyse des PiP2 par la PLC en InsP₃ et en DAG.

IV) <u>CARACTERISATION D'UN FRAGMENT DE PHOSPHOLIPASE C CHEZ LA CHICOREE</u> <u>HYBRIDE "474"</u>

Les résultats obtenus par les techniques électrophysiologiques sur les ovocytes de Xénope mettent en avant un mécanisme d'homéostasie calcique impliquant la PLC. Nous nous sommes donc engagé dans la voie de la caractérisation des PLC chez la chicorée hybride "474".

Les phospholipases C spécifiques des phosphoinositides d'origine végétale révèlent de fortes homologies de séquences qui nous ont permis de définir des amorces dégénérées à partir des séquences conservées (cf : "Matériel et Méthodes").

Les résultats acquis, grâce à la technique de PCR à partir d'une population d'ADNc de feuilles de chicorée hybride 474 et des amorces dégénérées, montrent l'amplification d'une bande de 0.4 Kb qui correspond à la taille attendue d'après les amorces choisies (figure 39).

Nous avons cloné et séquencé les fragments d'ADN amplifiés par PCR. Le séquençage a été réalisé sur quatre clones. L'alignement des séquences protéiques et nucléotidiques des quatre clones nous a permis de former deux groupes de deux séquences identiques et ainsi de définir deux consensus. Il est à noter que les variations des séquences nucléotidiques sont silencieuses puisque les deux consensus correspondent à la même séquence protéique. En effet, plusieurs codons peuvent correspondre au même acide aminé et dans le cas présent les codons TAC et TAT correspondent tous deux à l'acide aminé tyrosine (Y) et les codons GTC et GTT correspondent tous deux à l'acide aminé valine (V). Les alignements nucléotidiques et protéiques des deux consensus sont représentés en figure 40.

Les résultats obtenus démontrent une forte homologie de séquence entre les fragments amplifiés et diverses phospholipases C spécifiques des phosphoinositides du règne végétal. Le pourcentage d'identité correspond aux acides aminés <u>identiques</u> alors que le pourcentage d'homologie correspond aux acides aminés <u>de la même famille</u>. Les degrés d'homologie sont présentés dans le tableau 9. Les comparaisons établissent jusqu'à 87 % d'homologie entre le fragment de PLC de la chicorée et la PLC de *Brassica napus*. Notons que si les pourcentages d'homologies oscillent aux alentours de 85 % pour les PLC d'origine végétale, ils ne sont que de 49 % pour les PLC d'origine animale ou humaine. Il semble donc que les séquences protéiques des PLC végétales et animales soient différentes et que la PLC de chicorée hybride "474" soit bien de la famille des PLC végétales.

129



Figure 39 : Séparation en gel d'agarose des produits de PCR obtenus avec le couple d'amorces dégénérées sur diverses dilutions (1/10, 1/40, 1/80) des ADNc de feuilles de chicorée hybride "474"

RESULTATS

					10			20			3	0			40			50			60)
00001521	1	000		 הרה	 	-		. .	 	 300/0	 CMW		- -		A.C.A.	 TC7					 ~	60
201131321	+	G	A	0	M	V	A	F	X	M	H	G	Y	G	Ř	S	L	W	V	M	0	00
cons1319	1	GGA	GCT	CAAZ	ATG	GTT(GCT	TTT	AAY	ATG	CAT	GGG	TAT	GGA.	AGA	rca	СТА	TGG	GTG	ATG	CÃA	60
		G	A	Q	м	v	A	F	х	М	H	G	Ŷ	G	R	S	L	W	V	М	Q	
					70			80			٩	0		1	00			110			120	, ,
					í			••••	1					1		,
cons1521	61	GGA.	ATG	rtc <i>i</i>	AGG	GCC	AAT	GGT	GGT	TGT	GGA	TAC	GTA.	AAG.	AAA	ccc	GAT	ATT	ĊТА	ATG	AGA	120
1210	61	G	M	F	R	A	N	G	G	C	G	Y	V	K	K	P	D	I	L	M	R	1 2 0
CONSI319	01	GGA	M	F	R	aCU/ A	N	GGT G	G	LGI C	GGA G	Y	U V	AAG. K	K	P	GAT D	T	UTA T.	M	B	120
		Û		-		n		0	Ŭ	Ŭ	0	•	•			-	U	-	-			
				13	30			140			15	0		1	60			170			180)
00001521	121	 C7 C		2001020		22.00	 2010	$\frac{1}{2}$	 CTT				.). Iomci) A C M	 CmC		CTT A	$ \dots \rangle$		190
201131521	121	D	P	V	E	D	P	R	V	T	L	P.	V	K	M	T	L	K	V	T	V	100
cons1319	121	GAC	CCTC	GTT.	rtt(GAT	CCT	AGA	GTT.	ACA	TTA	ССТ	GTT	AAA	ATG.	ACT	стс	AAG	GTA	ACCO	GTG	180
		D	P	v	F	D	P	R	V	Т	L	₽	v	K	М	Т	L	K	v	Τ	V	
				19	90			200			21	0		2	20			230			240	1
			• • •		[!				۱	•••				1			. .		· · ·		
cons1521	181	TAT.	ATG	GGT(GAA	GGA.	rgg	TAT	TAT	GAT	TTT	TCA	CAT	ACA	CAT	rTŦ	GAT	GCA	TAC	TCA	CT	240
CODS1319	181	Y	M	G	E CAAC	G	W	ץ ידע די	Y TAT	D Cat	F.	S TCA	H	T	H TATU	F. F.	D	A GC A	Y TAC	S TCA(502	240
0001010	101	Y	М	G	Е	G	W	Y	Y	D	F	S	H	Т	Н	F	D	A	Y	S	Ρ	210
												_		_								
			,	25	50 '			260		1	27	0		2	80 1			290		r	300	
cons1521	241	CCA	GAT	FTC	rac <i>i</i>	ACAZ	AGG	GTT	GGA.	ATT	GCG	GGA	GTA	СсТ	GCG	GAT	ACT	ATA	ATG	AAG	AGA	300
		Ρ	D	F	Y	Т	R	V	G	I	A	G	V	Ρ	A	D	Ţ	I	М	K	R	
cons1319	241	CCA	GATI		FAC	ACA	AGG	GTT	GGA.	ATT	GCG	GGA	GTA		GCG	GAT	ACT	ATA	ATG.	AAG2	AGA	300
		r	D	Г	1	T	ĸ	v	G	Ŧ	M	G	v	P	A	D	Ţ	т	M	r	ĸ	
				32	10			320			33	0		3	40			350			360	1
	201							. . D 70 mi		••												200
CONS1521	301	ACA.	K K	306 <i>!</i> 2	T	E	D D	AAT N	TGG. W	T	p D	S	W	NI NI	E	SAG E	Ŧ	GAA E	ULL T	O AG	T.	360
cons1319	301	ACA	AAG	GCGI	ATTO	GAG	GAC.	AAT	TGG.	ATT	ccĠ	TCT	TGG	TAA	GAA	GAG	- TTT	GAA	TTC	CÂG	ſΤG	360
		Т	ĸ	А	I	Е	D	N	W	I	Ρ	S	W	N	E	Ε	F	E	F	Q	L	
				2-	70			380			30	0										
			.	، د ا	, . 	.					اور اد.											
cons1521	361	ACA	GTA(Ст	SAA	TG	GCT	CTG	CTG	TGG.	ATT	GΑ	392									
	201	T	V	P	E	L	A	L	L	W	I	~ *	202									
CONSISIS	100	T	V	P	E	L	A	L	L	W	I	340	592									

Figure 40 : Séquences nucléotidiques et protéiques des consensus de quatre clones (n°15 et 21, n°13 et 19) correspondants à un fragment de PLC de chicorée hybride "474" Les séquences codant les amorces dégénérées sont notées en gras. Les acides aminés

correspondants apparaissent au-dessous de chaque codon.

Organisme	Appelation et n°accession	Identité (%)	Homologie (%)			
Brassica napus	Phosphoinositide-specific phospholipase C >tr/Q9XEK4	77	87			
Glycine max	idem >tr/Q43443	80	85			
Glycine max	Phosphatydylinositol- specific phospholipase C >tr/Q43439	80	85			
Glycine max	Phosphoinositide-specific phospholipase C >tr/Q43444	72	83			
Glycine max	idem >tr/Q43442	69	77			
Arabidopsis thaliana	Phosphoinositide-specific phospholipase C-like protein >tr-newCAB87848	78	87			
Arabidopsis thaliana	Phosphoinositide-specific phospholipase C >tr/Q39033	76	86			
Solanum tuberosum	idem >tr/O49952	75	84			
Solanum tuberosum	idem >tr/O49951	72	81			
Solanum tuberosum	Phosphatydylinositol-4,5- bisphosphate phosphodiesterase >tr/O49950	69	82			
Pisum sativum	Phospholipase C >tr/O24297	74	86			
Nicotiana tabacum	idem >tr-new/AAF33824	72	86			
Nicotiana rustica	Phosphatydylinositol-4,5- bisphosphate phosphodiesterase >tr/O49902	70	77			
Nicotiana rustica	Phosphoinositide-specific phospholipase C >tr/P93341	70	77			
Homo sapiens	Phospholipase C >tr/Q15111	33	49			
Drosophila melanogaster	Phosphoinositide-specific phospholipase C >sp/P13217	32	49			

Tableau 9 : Comparaison de la séquence protéique du fragment de la PLC de chicorée hybride"474" avec celles contenues dans les banques de données (SWISS-PROT, Tr-EMBL, Tr-EMBLNEW)

-

133

DISCUSSION GENERALE

PERSPECTIVES

I) DISCUSSION GENERALE

Notre travail s'articule autour d'un élément essentiel au fonctionnement d'une cellule, qu'elle soit animale ou végétale: le **calcium** en tant que second messager ubiquitaire. Grâce à l'approche utilisant l'ovocyte de Xénope comme système d'expression fonctionnelle, nous avons pu mettre en évidence un mécanisme d'homéostasie calcique. A l'aide d'outils pharmacologiques appropriés et du dosage des molécules d'InsP₃, nous avons pu démontrer l'activation d'une signalisation intracellulaire basée sur la voie des phosphoinositides dans les ovocytes injectés avec les ARN totaux de feuilles de chicorée. Les résultats mettent en évidence deux types de courants chlorures dans les ovocytes préalablement injectés avec les ARN totaux par rapport aux ovocytes contrôles, et ceci après dépolarisation membranaire. Le premier courant est activé par le Ca²⁺ libéré des réserves intracellulaires et le second courant est activé par l'influx de Ca²⁺ via les canaux CRAC. Nous montrons que le relargage de Ca²⁺ est induit par l'InsP₃ et que la PLC est impliquée dans l'initiation de la cascade de transduction. En effet, la dépolarisation membranaire engendre une augmentation du taux d'InsP₃ via l'activation d'une PLC. Nous avançons donc l'hypothèse d'une PLC d'origine végétale qui montre une sensibilité aux variations de potentiel membranaire.

Ce résultat suscite de nombreuses réflexions quant à l'implication de cette voie de signalisation au cours de processus physiologiques variés, et en particulier l'embryogenèse somatique, chez la chicorée hybride "474".

Chez les plantes, les transports ioniques interviennent dans de nombreux processus physiologiques : régulation stomatique (Schroeder et Hagiwara, 1990), polarisation et fécondation de *Fucus* (Roberts et Brownlee, 1995), réponses aux stress (Cowan, 1994). Le calcium semble jouer un rôle primordial dans les phénomènes de transduction des signaux (Poovaiah et Reddy, 1993). En effet, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ chez les plantes, est un des phénomènes inducteurs initiaux lié aux processus de modification cellulaire provoqués par différents stimuli tels que les contacts mécaniques, les variations de température ou l'action d'hormones comme l'auxine (Bush, 1995). Les ions Ca^{2+} sont impliqués également dans le processus d'embryogenèse somatique des cellules végétales (Timmers *et al.*, 1989 et 1996; Jansen *et al.*, 1990) et en particulier chez la chicorée embryogène "474" (Verdus *et al.*, 1993), (voir partie "Introduction").

Malgré les multiples travaux suggérant le rôle primordial du Ca²⁺ au cours de l'embryogenèse somatique des cellules végétales, aucune donnée n'existe concernant la caractérisation précise des mécanismes contrôlant l'homéostasie calcique de ces cellules. En particulier, aucun travail visant à caractériser les conductances ioniques chez la chicorée "474" n'a été décrit dans le littérature. Il va donc de soi que l'étude de l'implication des conductances ioniques au cours de l'embryogenèse somatique reste également à élucider.

Grâce à notre travail, nous pouvons suggérer un rôle important de la PLC, et plus généralement de la voie de transduction dont cet enzyme est l'effecteur, au cours de la transduction des signaux chez la chicorée.

Une étude récente démontre clairement l'implication des phospholipases C spécifiques des phosphoinositides dans la fermeture des stomates consécutive à l'action de l'ABA sur les cellules de garde (Staxen *et al.*, 1999). Les auteurs rapportent l'existence d'oscillations calciques intracellulaires au niveau de cellules perfusées par l'ABA et montrent que le mécanisme par lequel l'ABA génère ces oscillations est lié aux phospholipases C. Ce travail démontre sans ambiguïté le rôle primordial des phospholipases C au cours d'un phénomène physiologique au sein du règne végétal.

Au vu de ces résultats et des données établies dans le cadre de notre étude, il serait judicieux de rechercher le rôle éventuel des phospholipases C (et par la même du Ca^{2+}) au cours d'autres processus physiologiques et plus particulièrement lors des mécanismes d'induction embryogène chez la chicorée "474".

Sachant que de nombreux facteurs peuvent être impliqués au cours des stades précoces de l'embryogenèse somatique tels que la température, les stress mécaniques (blessure, agitation) ou l'application d'hormones végétales, de nombreuses questions peuvent se poser mais l'une d'elles permet de refléter globalement les objectifs poursuivis :

Sequels sont les événements cellulaires ou moléculaires spécifiques conditionnant la mise en oeuvre du processus embryogène ?

Les résultats obtenus au cours de ce travail appellent à discuter également de la signification de la sensibilité apparente de la PLC aux variations de potentiel membranaire. Les cellules végétales sont-elles soumises à des stimuli amenant à des variations de la polarité membranaire? De nombreux stimuli extracellulaires tels que les auxines (Bates et Goldsmith, 1983; Marten *et al.*, 1991), l'ABA (Ishikawa *et al.*, 1983) ou la lumière (Spalding et Cosgrove, 1989, 1992) induisent en effet une dépolarisation membranaire.

Ces dépolarisations sembleraient être induites par une inhibition des H⁺-ATPase ou par l'activation de canaux K⁺ (pour revue, voir Schroeder et Hedrich, 1989; Tester et McRobbie, 1990). Ces dépolarisations membranaires seraient associées à des variations de la $[Ca^{2+}]i$ (Felle, 1988; Leonard et Helper, 1990; Ranjeva *et al.*, 1992). Par ailleurs, des dépolarisations membranaires à des valeurs supérieures à +50 mV ont été décrites chez les plantes (Williamson et Ashley, 1982). De plus, dans le cadre de leurs travaux, Thuleau *et al.* (1994a et b) rapportent la nécessité d'une dépolarisation de la membrane plasmique des protoplastes de carotte afin d'obtenir un recrutement croissant des canaux calciques dépendants du voltage.

Il apparaît donc que la dépolarisation de la membrane plasmique des cellules végétales soit un phénomène largement répandu dans la transduction des signaux de l'environnement. La sensibilité au voltage de la PLC que nous avons décrite pourrait donc prendre part à l'initiation d'une cascade de transduction chez la chicorée.

Les travaux entrepris ayant permis d'établir les bases d'une approche dynamique des signaux de transduction chez la chicorée hybride "474", de nombreuses perspectives se présentent.

II) PERSPECTIVES

A- IMPLICATION DE LA VOIE DES PHOSPHOINOSITIDES LORS DE L'INDUCTION DU PROCESSUS D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE CHEZ LA CHICOREE HYBRIDE "474"

Afin d'appréhender l'implication éventuelle du mécanisme d'homéostasie calcique qui a été mis en évidence au cours de notre étude à partir de feuilles de jeunes plantules (donc non induites en conditions embryogènes), dans le mécanisme d'induction du processus embryogène, il serait possible d'additionner au milieu de culture des substances connues pour inhiber la voie des phosphoinositides. Ainsi, nous pourrions analyser l'influence de l'adjonction d'U73122 dans le milieu d'induction sur le développement et le nombre des embryons somatiques. Cette approche nécessite l'utilisation de témoins appropriés permettant une interprétation précise des résultats (par exemple, l'utilisation de l'analogue inactif U73343 de l'U73122). Il sera indispensable également de réaliser les mêmes expériences sur une variété de chicorée non-embryogène qui nous servira de témoin.

B- ETUDE DES MECANISMES D'HOMEOSTASIE CALCIQUE SUR CELLULES ISOLEES

1- Visualisation des variations de calcium intracellulaire par imagerie calcique sur protoplastes

L'imagerie calcique sur cellules isolées est une technique utilisée dans le règne animal et dans le règne végétal (cette technique est utilisée essentiellement sur cellules isolées et non sur un tissu végétal intact). Elle permet d'appréhender de façon précise, directe et **dynamique** les variations intracellulaires de la concentration en divers ions (H^+ ou Ca²⁺). La sonde fluorescente utilisée, le fura-2, permet d'analyser et de quantifier la nature des **variations calciques** intracellulaires en réponse à divers stimuli.

Des résultats préliminaires sont représentés en figure 41. Ils concernent un début de développement de la technique d'imagerie calcique sur une préparation de protoplastes de chicorée hybride "474". La figure 41A illustre une préparation de protoplastes issus de feuilles de chicorée. Au centre de l'image, nous visualisons un protoplaste sphérique dont l'hémisphère droit est empli de chloroplastes. La partie B de la figure montre la même préparation soumise à une longueur d'onde d'excitation λ =340 nm. Chaque protoplaste, et en particulier celui du centre de l'image, présente une forte fluorescence correspondant à **l'autofluorescence de la chlorophylle** contenue dans les chloroplastes. Il est indispensable de **masquer** cette autofluorescence si l'on désire visualiser le signal calcique. L'élimination de cette autofluorescence (les pics d'émission de fluorescence de la chlorophylle se situent entre 680 et 750 nm) est réalisée à l'aide d'un filtre de bande passante 510 ± 40 nm qui permet de visualiser spécifiquement l'émission de fluorescence du fura-2 à 510 nm. La figure 41C montre clairement l'élimination de l'autofluorescence chlorophyllienne des protoplastes grâce au filtre.

Le problème de l'autofluorescence étant résolu, il s'agit à présent de charger les cellules avec la sonde fura-2 qui nous permettra de visualiser les variations de la $[Ca^{2+}]i$. La figure 41D illustre **la charge d'un protoplaste avec la sonde fluorescente** en présence du filtre 510 ± 40 nm. Lorsque le protoplaste est stimulé par une longueur d'onde λ =340 nm, la fluorescence émise correspond à la sonde fura-2 liée au calcium.



Figure 41: Imagerie calcique sur protoplastes de la chicorée "474"

- A: Préparation de protoplastes
- B: Autofluoresence des protoplastes due à la chlorophylle
- C: Elimination de l'autofluorescence par un filtre 510 \pm 40 nm
- D: Protoplaste de chicorée chargé avec la sonde fura-2. Conditions de charge: fura-2 libre 50 μ M, pH 4, 2h, objectif 100, filtre 510 ± 40 nm.

Les images présentées constituent des essais préliminaires à la mise au point de la technique d'imagerie calcique sur protoplastes de chicorée hybride "474" qui ouvre de larges perspectives :

Quels sont les mécanismes impliqués dans l'homéostasie calcique des protoplastes de chicorée?

Grâce à l'utilisation d'outils pharmacologiques appropriés, il sera possible de mettre en évidence les mécanismes permettant au calcium d'être libéré des réserves intracellulaires (en particulier la vacuole). Par exemple, l'utilisation de thapsigargine (molécule stimulant la vidange des stocks calciques intracellulaires chez les animaux par inhibition des Ca²⁺-ATPase du réticulum endoplasmique), nous permettra éventuellement de visualiser la libération des ions Ca²⁺ depuis la vacuole vers le cytoplasme de la cellule et ainsi d'étudier les modalités de cette libération (par l'InsP₃, le cADPR, les canaux calciques voltages-dépendants...).

bé Découlant directement des informations obtenues lors de la première étape de l'étude, la technique d'imagerie calcique nous permettra d'aborder *la transduction de signaux hormonaux ou physiques extracellulaires d'un point de vue dynamique*. Ainsi, il sera possible d'analyser les modalités d'action de divers stimuli impliqués en particulier dans le processus d'embryogenèse somatique tels que les stress mécaniques, osmotiques, les variations de température ou l'application extracellulaire d'hormones végétales.

Des études ont déjà été réalisées concernant la réponse à l'ABA des cellules de garde. Ainsi, Staxen *et al.*, en 1999 ont utilisé des cellules de garde isolées chargées en fura-2. Les cellules ont ensuite été perfusées par de l'ABA à différentes concentrations en présence ou non d'U73122. Les auteurs rapportent la genèse d'oscillations calciques intracellulaires en réponse à l'application extracellulaire d'ABA. Ils démontrent également que ces oscillations calciques prennent naissance par la voie des phosphoinositides puisque l'application d'U73122 empêche leur développement.

La technique d'imagerie calcique sur protoplastes isolés de feuilles de chicorée "474" ouvre de nombreuses possibilités quant à une meilleure compréhension des mécanismes de transduction des signaux extracellulaires liés en particulier au phénomène d'embryogenèse somatique tels que les variations de température, les stress mécaniques, osmotiques et hormonaux.

2- Etude des transporteurs ioniques des protoplastes de chicorée par la technique du patch-clamp

Ces dernières années, la technique du patch-clamp (Hamill et al., 1981), a été étendue à d'autres systèmes que les cellules animales à savoir les bactéries, les champignons et les plantes.

L'avantage de cette technique est la possibilité d'étudier le mécanisme de fonctionnement d'une seule cellule vivante, ou même d'un seul canal ionique dans un fragment de membrane avec un accès pharmacologique aux faces externes et internes de la membrane. Cette technique est très performante et constitue une approche efficace pour l'identification des étapes biochimiques impliquées dans une réponse donnée.

Les études de patch-clamp sur cellules végétales isolées ont permis de mieux comprendre le fonctionnement des transporteurs ioniques et des mécanismes de transduction des signaux chez les plantes (Thuleau *et al.*, 1994a et b ; Ward et Schroeder, 1994 ; McRobbie, 1997 ; Leckie *et al.*, 1998).

Il serait intéressant d'appliquer cette technique aux protoplastes de chicorée hybride "474" afin d'établir une cartographie de leurs transporteurs ioniques et de leurs éléments de transduction.

Notons que les travaux réalisables sur cellules isolées (par les techniques d'imagerie calcique et de patch-clamp) ne permettront pas d'attribuer tel ou tel type de mécanisme au processus d'embryogenèse somatique. En effet, il est impossible, à ce jour, de différencier les protoplastes issus de cellules qui deviendront embryogènes des protoplastes issus de cellules non-embryogènes. De plus, jusqu'à présent, la modélisation du passage protoplaste de chicorée à embryon somatique n'a pas encore été établie.

C- UTILISATION DE L'OVOCYTE DE XENOPE COMME SYSTEME D'EXPRESSION FONCTIONNELLE

1- Expression hétérologue d'ARN totaux de feuilles de chicorée induites ou non en conditions embryogènes

Notre étude s'est basée jusqu'à présent sur l'expression hétérologue d'ARN totaux extraits de feuilles non induites en conditions embryogènes.

Il serait intéressant d'analyser les courants néo-exprimés suite à l'injection d'ARN totaux extraits de feuilles de chicorée à différents stades du processus d'embryogenèse somatique. Des différences qualitatives et/ou quantitatives pourraient se manifester et il sera alors indispensable de raisonner en terme de spécificité du signal en faisant la preuve de la relation au processus embryogène. Cela nous conduira à utiliser comparativement un matériel végétal qui ne présente pas la propriété de produire des embryons somatiques.

2- Etude du fonctionnement de récepteurs hormonaux membranaires potentiellement néo-exprimés

Sachant que le modèle ovocytaire permet l'expression de plusieurs structures de manière concomitante, il est possible que l'injection des ARN totaux engendre l'expression de récepteurs hormonaux dans la membrane ovocytaire. L'application extracellulaire d'hormones végétales (telles que l'ANA ou l'ABA) sur les ovocytes préalablement injectés avec les ARN, permettra, le cas échéant, d'appréhender le fonctionnement de ces récepteurs. Ainsi, la fonctionnalité du récepteur à l'ABA, hormone végétale connue pour augmenter la [Ca²⁺]i (McAinsh *et al.*, 1992), pourrait être analysée *via* l'index chlore Ca²⁺-dépendant de l'ovocyte de Xénope.

3- Identification moléculaire et expression hétérologue des éléments de transduction de la chicorée hybride "474"

Plusieurs points seraient intéressants à développer au vu des résultats obtenus (voir partie "Résultats"):

by parvenir à la séquence complète de la PLC dans le but de réaliser l'expression
fonctionnelle de la protéine dans le modèle ovocytaire (par injection dans le noyau de
l'ovocyte de la séquence nucléotidique préalablement insérée dans un vecteur d'expression
adapté ou par injection directe dans le cytoplasme des ARNm codant pour cette séquence). La
séquence complète de la PLC peut être obtenue par la technique de Race-PCR (Rapid
Amplification of CDNA Ends) : cette technique permet l'amplification préférentielle des
extrémités 5' ou 3' d'un ADNc codant pour un gène donné. Le principe consiste à modifier
l'une des extrémités de l'ADNc, par exemple par une queue poly-C, et d'utiliser pour la PCR
une amorce spécifique du gène d'intérêt et une amorce poly-G dans le cas présent.

Cette approche permettra de mieux comprendre le fonctionnement des PLC végétales et leur implication dans le signal de transduction lié à la libération de calcium des réserves intracellulaires. Une perspective possible est également de réaliser une étude de la relation *structure-fonction* de la protéine en utilisant la technique de mutagenèse dirigée sur la séquence nucléotidique,

b dans le but de définir le rôle des phospholipases C spécifiques des phosphoinositides au cours des stades précoces de l'embryogenèse somatique chez la chicorée, il serait intéressant d'analyser l'expression de cette PLC au cours de ces premiers stades (jour 1 à jour 5). La stratégie adoptée peut utiliser la méthode quantitative de northern blot : l'hybridation de sondes spécifiques peut être réalisée sur une population d'ARN extraits de feuilles de différents stades précoces de l'embryogenèse somatique. Cette approche quantitative nous permettra d'analyser l'évolution de la présence des PLC au cours des stades précoces de l'embryogenèse somatique et ainsi d'appréhender le rôle de cet élément de transduction dans ce processus.

CONCLUSION GENERALE

L'étude des conductances ioniques à partir d'un matériel végétal, grâce aux techniques électrophysiologiques, est relativement peu répandue. En particulier, aucun travail à notre connaissance, visant à caractériser les conductances ioniques chez la chicorée, n'a été décrit dans la littérature.

Nous avons analysé, pour la première fois, les modifications de l'homéostasie calcique apportées par l'expression fonctionnelle d'ARN totaux de feuilles de chicorée dans les ovocytes de Xénope. Nous avons démontré que cette expression hétérologue induit la libération de Ca²⁺ des réserves intracellulaires par les récepteurs InsP₃ et que la PLC est impliquée dans l'initiation de la cascade de transduction.

Ces résultats ont été obtenus grâce au couplage des techniques de biologie moléculaire et de l'utilisation du vecteur d'expression fonctionnelle qu'est l'ovocyte de Xénope. Il serait intéressant à présent d'utiliser ces approches afin d'étudier d'autres composants des signaux de transduction depuis les récepteurs membranaires jusqu'aux transporteurs ioniques.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat possèdent un caractère original et novateur.

L'approche adoptée a permis d'établir une passerelle entre le règne végétal et le règne animal.

Les résultats obtenus ouvrent de larges perspectives quant à une meilleure compréhension des signaux de transduction des cellules végétales amenant à une approche dynamique des processus physiologiques des cellules végétales.
BIBLIOGRAPHIE

Allen, G.J., Sanders, D. 1994. Two voltage-gated, calcium release channels coreside in the vacuolar membrane of broad bean guard cells. *Plant Cell* 6: 685-694.

Allen, G.J., Muir, S.R., Sanders, D. 1995. Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* **268** : 735-737.

Artalejo, C.R., Rossie, S., Perlman, R.L., Fox, A.P. 1992. Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca²⁺ current facilitation in chromaffin cells. *Nature* **358(6381)**: 63-66.

Assmann, S.M., Haubrick, L.L. 1996. Transport proteins of the plant plasma membrane. Curr. Opin. Cell Biol. 8(4): 458-67.

Assmann, S.M., Shimazaki, K.I. 1999. The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol.* **119(3)**: 809-16.

Audigier, S.M.P., Wang, J.K.T., Greengard, P. 1998. Membrane depolarization and carbamoylcholine stimulate phosphatidylinositol turnover in intact nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 2859-2863.

Barish, M.E. 1983. A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. J. Physiol. **342**: 309-325.

Barritt, G.J. 1998. Does a decrease in subplasmalemmal Ca^{2+} explain how store-operated Ca^{2+} channels are opened? *Cell Calcium.* 23(1): 65-75.

Bates, G.W., Goldsmith, M.H.M. 1983. Rapid response of the plasma membrane potential in oat coleoptiles to auxin and other weak acids. *Planta* **159** : 231-237.

Baud, C., Kado, R.T., Marcher, K. 1982. Sodium channels induced by depolarization of the *Xenopus laevis* oocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79** : 3188-3192.

Bauer, C.K., Falk, T., Schwarz, J.R. 1996. An endogenous inactivating inward-rectifying potassium current in oocytes of *Xenopus laevis*. *Pflügers Arch - Eur. J. Physiol.* **432** : 812-820.

Berridge, M.J. 1991. Caffeine inhibits inositol-trisphosphate-induced membrane potential oscillations in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.* **244**: 57-62.

Berridge, M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 361: 315-321.

Berridge, M.J. 1995. Capacitative calcium entry. Biochem.J. 312: 1-11.

Berridge, M.J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. J. Physiol. 499(2): 291-306.

Berven, L.A., Crouch, M.F., Katsis, F., Kemp, B.E., Harland, L.M., Barritt, G.J. 1995. Evidence that the pertussis toxin-sensitive trimeric GTP-binding protein G_{i2} is required for agonist- and store-activated Ca²⁺ inflow in hepatocytes. J. Biol. Chem. **270**: 25893-25897.

Best, L., Bolton, T.B. 1986. Depolarisation of guinea-pig visceral smooth muscle causes hydrolysis of inositol phospholipids. *Arch. Pharm.* **333**: 78-82.

Bezprozvanny, I., Watras, J., Ehrlich, B.E. 1991. Bell-shaped calcium-response curves of $Ins(1,4,5)P_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* **351**: 751-754.

Bezprozvanny, I., Ehrlich, B.E. 1993. ATP modulates the function of inositol (1,4,5)trisphosphate-gated channels at two sites. *Neuron* 10: 1175-1184.

Bezprozvanny, I. 1995. Theoretical analysis of calcium wave propagation based on inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor functionnal properties. *Cell Calcium* 16: 151-166.

Bezprozvanny, I., Ehrlich, B.E. 1995. The inositol 1,4,5 trisphosphate (InsP₃) receptor. J. Mb. Biol. 145: 205-216.

Bird, G., Putney, J.W. 1993. Inhibition of thapsigargin-induced calcium entry by microinjected guanine nucleotide analogues. Evidence for the involvement of small G-protein in capacitiative calicum entry. *J. Biol. Chem.* **268** : 21486-21488.

Bischoff, F., Molendijke, A., Rajendrakumar, C.S., Palme, K. 1999. GTP-binding proteins in plants. Cell Mol. Life Sci. 55(2): 233-256.

Biswas, S., Dalal, B., Sen, M., Biswas, B.B. 1995. Receptor for myo-inositol trisphosphate from the microsomal fraction of *Vigna radiata*. *Biochem. J.* **306(3)**: 631-636.

Biyaseheva, A.E., Molotkovskii, Y.G., Mamonov, L.K. 1993. Increase of free Ca^{2+} in the cytosol of plant protoplasts in response to heat stress as related to Ca^{2+} homeostasis. *Russian Plant Physiology* **40**: 613-618.

Blackford, S., Rea, P.A., Sanders, D. 1990. Voltage sensitivity of H⁺/Ca²⁺ antiport in higher plant tonoplast suggests a role in vacuolar calcium accumulation. *J. Biol. Chem.* **265** : 9617-20.

Blervacq, A.S., Dubois, T., Dubois, J., Vasseur, J. 1994. First divisions of somatic embryogenic cells in *Cichorium* hybrid "474". *Protoplasma* **186** : 163-168.

Bolwell, G.P. 1995. Cyclic AMP, the reluctant messenger in plants. *Trends Biochem. Sci.* 20: 492-495.

Boorer, K.J., Forde, B.G., Leigh, R.A., Miller, A.J. 1992. Functional expression of a plant plasma membrane transporter in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* **302** : 166-168.

Bossi, E., Centinaio, E., Moriondo, A., Peres, A. 1998. Ca²⁺-dependence of the depolarization-inducible Na⁺ current of *Xenopus* oocytes. J. Cell. Physiol. 174: 154-159.

Bourinet, E., Fournier, F., Nargeot, J., Charnet, P. 1992a. Endogenous *Xenopus* oocyte Cachannels are regulated by protein kinases A and C. *FEBS Lett.* **299(1)**: 5-9.

Bourinet, E., Nargeot, J., Charnet, P. 1992b. Electrophysiological characterization of a TTXsensitive sodium current in native *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.* **250** : 127-132. Brandt, S., Fisahn, J. 1998. Identification of a K⁺ channel from potato leaves by functional expression in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell Physiol.* **39(6)** : 600-606.

Brosnan, J.M., Sanders, D. 1990. Inositol triphosphate-mediated Ca^{2+} release in beet microsomes is inhibited by heparin. *FEBS Lett.* **260** : 70-72.

Bush, D.S. 1992. Regulation of cytosolic calcium by gibberellic acid and abcisic acid in the cereal aleurone. *Plant Physiol.* 99: 38.

Bush, D.S. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 95-122.

Bush, D.S., Jones, R.L. 1987. Measurement of cytoplasmic calcium in aleurone protoplasts using indo-1 et fura-2. *Cell Calcium* 8: 455-472.

Bush, D.S., Sze, H. 1986. Calcium transport in tonoplast and endoplasmic reticulum vesicles isolated from cultured carrot cells. *Plant Physiol.* 80: 549-555.

Butcher, R.D., Evans, D.E. 1987. Calcium transport by pea root membranes I. Purification of membranes and characteristics of uptake. *Planta* 172: 265-272.

Callamaras, N., Marchant, J.S., Sun, X-P, Parker, I. 1998. Activation and co-ordination of InsP₃-mediated elementary Ca^{2+} events during global Ca^{2+} signals in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **509(1)**: 81-91.

Callamaras, N., Parker, I. 2000. Ca²⁺-dependent activation of Cl⁻ currents in *Xenopus* oocytes is modulated by voltage. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **278(4)** : C667-75.

Calvert, C.M., Sanders, D. 1995. Inositol trisphosphate-dependent and -independent Ca²⁺ mobilization pathways at the vacuolar membrane of *Candida albicans. J.Biol.Chem.* 270(13): 7272-7280.

Canut, H., Carrasco, A., Rossignol, M., Ranjeva, R. 1993. Is the vacuole the richest store of inositol triphosphate mobilisable calcium in plant cell ? *Plant Sci.* **90** : 135-143.

Cao, Y., Anderova, M., Crawford, N.M., Schroeder, J.I. 1992. Expression of an outwardrectifying potassium channel from maize mRNA and complementary RNA in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell* **4**: 961-969.

Cardy, T.J.A., Traynor, D., Taylor, C.W. 1997. Differential regulation of types I and III inositol trisphosphate receptors by cytosolic Ca²⁺. *Biochem. J.* **328** : 785-793.

Ceriotti, A., Colman, A. 1995. mRNA translation in *Xenopus* oocytes. *Methods in Molecular Biology* **37**: 151-177.

Chanson, A. 1994. Characterization of the tonoplast Ca^{2+}/H^{+} antiport system from maize roots. *Plant Physiol. Biochem.* **32(3)**: 341-346.

Charpentier, G., Béhue, N., Fournier, F. 1995. Phospholipase C activates protein kinase C during induction of slow Na current in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch.* **429** : 825-831.

Charpentier, G., Kado, R.T. 1999. Induction of Na⁺ channel voltage sensitivity in *Xenopus* oocytes depends on Ca²⁺ mobilisation. J. of Cellular Physiol. 178: 258-266.

Chirgwin, J.M., Przybgla, A.E., Mac Donald, R.J., Rutter, W.J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294.

Cosgrove, D.J., Hedrich, R. 1991. Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **186**: 143-153.

Cowan, A.K. 1994. Plant stress. Encyclopedia of Agricultural Science 3: 359-368.

Danoff, S.K., Supattapone, S., Snyder, S.H. 1988. Characterization of a membrane protein from brain mediating the inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding by calcium. *Biochem. J.* **254**: 701-705.

Dascal, N., Lotan, J., Karni, E., Gigi, A. 1992. Calcium channel currents in *Xenopus* oocytes injected with rat skeletal muscle RNA. J. Physiol. Lond. **450**: 469-490.

Dasgupta, S., Dasgupta, D., Chatterjee, A., Biswas, S., Biswas, B.B. 1997. Conformationnal changes in plant $InsP_3$ receptor on interaction with different myo-inositol trisphosphate and its effect on Ca^{2+} release from microsomal fraction and liposomes. *Biochem. J.* **321(2)** : 355-360.

Debarbieux, M., Ouadid-Ahidouch, H., Delpierre, N., Vasseur, J., Prevarskaya, N. 1999. A calcium homeostasis mechanism induced by heterologous expression of total RNA from chicory leaves in *Xenopus* oocytes. *J. Membrane Biol.* **167** : 25-33.

DeLisle, S., Blondel, O., Longo, F.J., Schnabel, W.E., Bell, G.I., Welsh, J. 1996. Expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors changes the Ca²⁺ signal of *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* **270** : C1255-C1261.

De Smet, P., Parys, J.B., Vanlingen, S., Bultynck, G., Callewaert, G., Galione, A., De Smedt, H., Missiaen, L. 1999. The relative order of InsP₃ sensitivity of types 1 and 3 InsP₃ receptors is pH dependent. *Pflügers Arch.* **438** : 154-158.

Dubois, T., Dubois, J., Guedira, M., Vasseur, J. 1988. Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium* : effets de la température et origine des embryoïdes. *C. R. Acad. Sci. Paris* **307** : 669-675.

Duminy, A. Etude de la callose en relation avec l'embryogenèse somatique des feuilles de *Cichorium*. Importance des ions Ca²⁺. DEA soutenu en 1993 à l'Université de Compiègne. 53 pages.

Dumont, J.M. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis*. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136**: 153-179.

Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perz-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., Catterall, W.A. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25(3)**: 533-535.

Fasolato, C., Hoth, M., Matthews, G., Penner, R. 1993. Ca^{2+} and Mn^{2+} influx through receptor-mediated activation of non-specific cation channels in mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **90**: 3068-3072.

Felle, H. 1988. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in Zea mays coleoptiles. Planta 174: 495-499.

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

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

Ganitkevich, V.Y., Isenberg, G. 1993. Membrane potential modulates inositol 1,4,5trisphosphate-mediated Ca²⁺ transients in guinea-pig coronary myocytes. J. Physiol. 470: 35-44.

Ganitkevich, V.Y., Isenberg, G. 1996. Effect of membrane potential on the initiation of acetylcholine-induced calcium transients in isolated guinea pig coronary myocytes. *American Heart Association* **78** (4): 717-723.

Gavin, O., Pilet, P-E., Chanson, A. 1993. Tonoplast localization of a calmodulin-stimulated Ca²⁺-pump from maize roots. *Plant Sci.* **92**: 143-150.

Gehring, C.A., Irving, H.R., Parish, S.W. 1990. Effects of auxine and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87: 9645-9649.

Gelli, A., Blumwald, E. 1993. Calcium retrieval from vacuolar pools. *Plant Physiol.* 102: 1139-1146.

Gillo, B., Sealfon, S.C., Minke, B. 1996. Pharmacology of a capacitative Ca²⁺ entry in *Xenopus* oocytes. J. Phot. Chem. 35: 77-82.

Gilroy, S., Read, N.D., Trewavas, A.J. 1990. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346** : 769-771.

Gomez-Hernandez, J.M., Stuhmer, W., Parekh, A.B. 1997. Calcium dependence and distribution of calcium-activated chloride channels in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. Lond.* **502** : 569-574.

Gräf, P., Weiler, E.W. 1989. ATP-driven Ca²⁺-transport in sealed plasma membrane vesicles prepared by aqueous two-phase partitioning from leaves of *Commelia communis*. *Physiol. Plant.* **75** : 469-478.

Gromada, J., Dissing, S. 1996. Membrane potential and cytosolic free calcium levels modulate acetylcholine-induced inositol phosphate production in insulin-secreting BTC3 cells. *Biochimica Biophysica Acta* **1310**: 145-148.

Grynkiewicz, R., Poenie, M., Tsien, R.Y. 1985. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260: 3440-3450.
Guedira, M., Dubois, J., Vasseur, J. 1990. Direct somatic embryogenesis in roots of Cichorium: is callose an early marker ? Ann. Bot. 65: 539-545.

Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177-182.

Hague, F., Matifat, F., Brûlé G., Collin, T. 2000. Caffeine exerts a dual effect on capacitative calcium entry in *Xenopus* oocytes. *Cell Signal.* **12(1)** : 31-35.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100.

Hamill, O.P., McBride Jr., D.W. 1997. Mechanogated channels in *Xenopus* oocytes : different gating modes enable a channel to switch from a phasic to a tonic mechanotransducer. *Biol. Bull.* **192 :** 121-122.

Hardie, D.G. 1999. Plant protein serine/threonine kinases : classification and functions. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 97-131.

Hartzell, H.C. 1996. Activation of different Cl⁻ currents in *Xenopus* oocytes by Ca²⁺ liberated from stores and by capacitative Ca²⁺ influx. J. Gen. Physiol. **108**: 157-175.

Heller, R. 1990. Physiologie végétale. 2. développement. Edition Masson. Abrégés.

Hooley, R. 1999. A role for G proteins in plant hormone signalling? *Plant Physiol. Biochem.* **37(5)**: 393-402.

Hoth, M., Penner, R. 1993. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. J. Physiol. 465: 359-386.

Iino, M. 1999. Dynamic regulation of intracellular calcium signals through calcium release channels. *Mol. Cell. Biochem.* **190**: 185-190.

Ishikawa, H., Aizawa, H., Kishira, H., Ogawa, T., Sakata, M. 1983. Plant Cell Physiol. 24: 769-772.

Itoh, T., Seki, N., Suzuki, S., Ito, S., Kajikuri, J., Kuriyama, H. 1992. Membrane hyperpolarization inhibits agonist-induced synthesis of inositol 1,4,5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery. *J. Physiol.* **451** : 307-328.

Jansen, M.A.K., Booij, H., Schel, J.H.N., de Vries, S.C. 1990. Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 9: 221-223.

Johannes, E., Brosnan, J.M., Sanders, D. 1992a. Calcium channels in the vacuolar membrane of plants : multiple pathways for intracellular calcium mobilization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **338 :** 105-112.

Johannes, E., Brosnan, J.M., Sanders, D. 1992b. Parallel pathways for intracellular Ca²⁺ release from the vacuole of higher plants. *Plant J.* **2**: 97-102.

Johannes, E., Sanders, D. 1995a. Lumenal calcium modulates unitary conductance and gating of a plant vacuolar release channel. J. Mem. Biol. 146: 211-224.

Johannes, E., Sanders, D. 1995b. The voltage-gated Ca²⁺-release channel in the vacuolar membrane of sugar beet resides in two activity states. *FEBS Lett.* **365 :** 1-6.

Kasai, M., Muto, S. 1990. Ca^{2+} pump and Ca^{2+}/H^+ antiporter in plasma membrane vesicles isolated by aqueous two-phase partitioning from corn leaves. *J. Mem. Biol.* **114** : 133-142.

Kauss, H., Waldmann, T., Quader, H. 1990. Ca²⁺ as a signal in the induction of callose synthesis. *Nato. ASI.* **H47**: 117-131.

Kim, H.Y., Hanley, M.R. 1999. Calcium influx factor (CIF) as a diffusible messenger for the activation of capacitative calcium entry in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cells* **9(3)**: 326-332.

Kiyosue, T., Satoh, S., Kamada, H., Harada, H. 1992. Immunological detection of an embryogenic cell protein (ECP31) during stress induced somatic embryogenesis in carrot. *Can. J. Bot.* **70**: 651-653.

Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., Trewavas, A.J. 1991. Transgenic plant aequorine reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352** : 524-526.

Knight, M.R., Smith, S.M., Trewavas, A.J. 1992. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 4967-4971.

Kostyuk, P.G., 1999. Low-voltage-activated channels : achievements and problems. *Neuroscience* 92(4): 1157-1163.

Krause, J.D., Foster, C.D., Reinhart, P.H. 1996. *Xenopus laevis* oocytes contain endogenous large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Neuropharmacology* **35(7)** : 1017-1022.

Kuruma, A., Hatzell, H.C. 1999. Dynamics of calcium regulation of chloride currents in Xenopus oocytes. Am. J. Physiol. 276: C161-75.

Kuruma, A., Hatzell, H.C. 2000. Bimodal control of a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel by different Ca²⁺ signals. J. Gen. Physiol. 115(1): 59-80.

Leckie, C.P., McAinsh, M.R., Montgomery, L., Priestley, A.J., Staxen, I., Webb, A.A.R., Hetherington, A.M. 1998. Second messengers in guard cells. J. Exp. Bot. 49: 339-349.

Lee, Y., Choi, Y.B., Suh, S., Lee, J., Assmann, S.M., Joe, C.O., Kelleher, J.F., Crain, R.C. 1996. Abscisic acid-induced phosphoinositide turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiol.* **110**: 987-996.

Leonard, R.T., Helper, P.K. 1990. Calcium in plant growth and development. Current Tropics in Plant Physiol. American Society of Plant Physiologists, Rockville, M.D. 4.

Lomax, R.B., Herrero, C.J., Garcia-Palomero, E., Garcia, A.G., Montiel, C. 1998. Capacitative Ca^{2+} entry into *Xenopus* oocytes is sensitive to ω -conotoxins GVIA, MVIIA and MVIIC. *Cell Calcium* 23(4): 229-239.

Lurin, C., Geelen, D., Barbier-Brygoo, H., Guern, J., Maurel, C. 1996. Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel. *Plant Cell* 8: 701-711.

Lynch, C. 1997. Voltage-gated calcium channels. *Anesthesia : Biologic Foundations* chapter 12 : 163-195.

Mak, D.D.M., Foskett, J.K. 1997. Single-channel kinetics, inactivation, and spatial distribution of inositol trisphosphate (InsP₃) receptors in *Xenopus* oocyte nucleus. *J. Gen. Physiol.* **109**: 571-587.

Mak, D.O., McBride, S., Foskett, J.K. 1998. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca^{2+} channel by ligand tuning of Ca^{2+} inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95(26)** : 15821-5.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982. Molecular cloning : a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.*

Mansfield, T.A., Hetherington, A.M., Atkinson, C.J. 1990. Some current aspects of stomatal physiology. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 55-75.

Marchant, J.S., Callamaras, N., Parker, I. 1999. Initiation of $InsP_3$ -mediated Ca^{2+} waves in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **18(19)** : 5285-5299.

Marchant, J.S., Taylor, C.W. 1997. Cooperative activation of $InsP_3$ receptors by sequential binding of $InsP_3$ and Ca^{2+} safeguards against spontaneous activity. *Current Biology, Research paper.* 7: 510-518.

Marshall, I.C.B., Taylor, C.W. 1994. Two calcium-binding sites mediate the interconversion of liver inositol trisphosphate receptors between three conformationnal states. *Biochem. J.* **301**: 591-598.

Marten, I., Lohse, G., Hedrich, R. 1991. Plant growth hormones control voltage-dependent activity of anion channels in plasma membrane of quard cells. *Nature* **353** : 758-762.

Matter, N., Ritz, M.F., Freyermuth, S., Rogue, P., Malviya, A.N. 1993. Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorylation of nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and accelerated calcium release by inositol 1,4,5-trisphosphate from isolated rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* **268**: 732-736.

McAinsh, M.R. 1994. Effects of oxidative stress on stomatal behaviour and guard cell cytosolic free Ca^{2+} . *Plant Physiol.* **105**: 101.

McAinsh, M.R., Brownlee, C., Hetherington, A.M. 1992. Visualizing changes in cytosolicfree calcium during the response of stomatal guard cells to abscisic acid. *Plant Cell* **4** : 1113-1122.

McRobbie, E.A.C. 1997. Signalling in guard cells and regulation of ion channel activity. J. Exp. Bot. 48: 515-528.

Michikawa, T., Miyawaki, A., Furuichi, T., Mikoshiba, K. 1996. Inositol 1,4,5 trisphosphate receptors and calcium signaling. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10(1)**: 39-55.

Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiroaka, M., Yamada, M., Furuichi, T., Mikoshiba, K. 1999. Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of the cerebellar type I Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor. *Neuron* 23: 799-808.

Mikoshiba, K. 1997. The InsP₃ receptor and intracellular Ca^{2+} signaling. *Current opinion in Neurobiol.* 7: 339-345.

Miledi, R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.* **B215**: 491-497.

Miledi, R., Parker, J., Sumikawa, K. 1983. Recording of single gamma-amino butyrate and acetylcholine-activated receptors channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.* **218**: 481-484.

Miledi, R., Parker, J., 1984. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **357**: 173-183.

Missiaen, L., DeSmedt, H., Droogmans, G., Casteels, R. 1992. 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. Co-activation of inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} release by cytosolic Ca^{2+} is loading-dependent. J. Biol. Chem. 269 : 7238-7242.

Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H., Sienaert, I., Bootman, M.D., Casteels, R. 1996. Control of the calcium release induced by *myo*-inositol trisphosphate and the implication in signal transduction. *In Subcellular Biochemistry, edited by Biswas N.Y.* **26**: 59-95.

Missiaen, L., Parys, J.B., Weideman, A.F., Sipma, H., Vanlingen, S., De Smet, P., Callwaert, G., De Smedt, H. 1999. The bell-shaped Ca²⁺ dependence of the InsP₃ induced Ca²⁺ release is modulated by Ca²⁺/Calmoduline. J. Biol. Chem. **274(20)**: 13748-13751.

Miyakawa, T., Maeda, A., Yamazawa, T., Hirose, K., Kurosaki, T., Iino, M. 1999. Encoding of Ca^{2+} signals by differential expression of InsP₃ receptor subtypes. *The EMBO J.* **18(5)** : 1303-1308.

Miyawaki, S.I., Furuichi, T., Ryou, Y., Yoshikawa, S., Nakagawa, T., Saitoh, T., Mikoshiba, K. 1991. Structure-function relationships of the mouse inositol 1,4,5 trisphosphate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88: 4911-4915.

Moreno, D.H. 1999. Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels. Ann. N.Y. Acad. Sci. 868: 102-117.

Mori, Y., Mikala, G., Varadi, G., Kobayashi, T., Koch, S., Wakamori, M., Schwartz, A. 1996. Molecular pharmacology of voltage-gated dependent calcium channels. *Jpn. J. Pharmacol.* **72**: 83-109.

Muir, S.R., Sanders, D. 1997. Inositol 1,4,5 triphosphate-sensitive Ca²⁺ release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiol.* **114**: 1511-1521.

Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. 1998. Phospholipid signalling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1389**: 222-272.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

Muto, S. 1992. Intracellular Ca²⁺ messenger system in plants. Int. Rev. Cytol. 142: 305-345.

Nakade, S., Rhee, S.K., Hamanaka, H., Mikoshiba, K. 1994. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of an immunoaffinity-purified homotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (type I) increases Ca²⁺ flux in reconstituted lipid vesicles. J. Biol. Chem. **269**: 6735-6742.

Nargeot, J., Charnet, P. 1994. Diversité moléculaire des canaux calciques : du gène à la fonction. *Médecine/Sciences* 10: 1293-1308.

Nilsson, H. 1998. Interactions between membrane potential and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Acta Physiol. Scand.* 164: 559-566.

Olbe, M., Sommarin, M. 1991. ATP-dependent-calcium transport in wheat root plasma membrane vesicles. *Physiol. Plant* 83: 535-543.

Parekh, A.B., Penner, R. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiological reviews* 77(4): 901-927.

Parker, I., Ivorra, I. 1990a. Inhibition by Ca^{2+} of inositol triphosphate-mediated Ca^{2+} liberation: a possible mechanism for oscillatory release of Ca^{2+} . *Pro. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87: 260-264.

Parker, I., Ivorra, I. 1990b. A slowly inactivating potassium current in native oocytes of *Xenopus laevis. Proc. R. Soc. Lond.* **B238**: 369-381.

Parker, I., Ivorra, I. 1991. Caffeine inhibits inositol triphosphate-mediated liberation of intracellular calcium in *Xenopus* oocytes. J. Physiol. 433: 229-240.

Parker, I., Miledi, R. 1988. A calcium-independent chloride current activated by hyperpolarization in *Xenopus* oocytes. *Proc. Rev. Soc. Lond.* 233: 191-199.

Parker, I., Yao, Y. 1994. Relation between intracellular Ca²⁺-activated Cl⁻ current in *Xenopus* oocytes. *Cell Calcium* **15(4)** : 276-88.

Parys, J.B., Sernett, S.W., DeLisle, S., Snyder, P.M., Welsh, M.J., Campbell, K.P. 1992. Isolation, characterization and localization of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor protein in *Xenopus leavis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **267(26)** : 18776-18782.

Parys, J.B., Sienaert, I., Vanlingen, S., Callewaert, G., DeSmet, P., Missiaen, L., De Smedt, H. 2000. Regulation of Inositol 1,4,5 trisphosphate-induced Ca²⁺-release by Ca²⁺. The molecular basis of calcium action in Biology and Medicine. Kluwer Academic Publishers 233-244.

Patel, S., Joseph, S.K., Thomas, A.P. 1999. Molecular properties of inositol 1,4,5 triphosphate receptors. *Cell Calcium* **25(3)**: 247-264.

Patterson, R.L., Van Rossum, D.B., Gill, D.L. 1999. Store-operated Ca²⁺ entry : evidence for a secretion-like couling model. *Cell* **98** : 487-499.

Peres, A., Bernardini, G. 1983. A hyperpolarization-activated chloride current in Xenopus leavis oocytes under voltage-clamp. Pflügers Arch. 399: 157-159.

Petersen, C.C.H., Berridge, M.J. 1994. The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. J. Biol. Chem. 269(51): 32246-32253.

Petersen, C.C.H., Berridge, M.J. 1996. Capacitative calcium entry is colocalised with calcium release in *Xenopus* oocytes : evidence against a highly diffusible calcium influx factor. *Pflügers Arch.* **432** : 286-292.

Picard, L., Coquil., J.F., Mauger, J.P. 1998. Multiple mechanisms of regulation of the inositol 1,4,5 trisphosphate receptor by calcium. *Cell Calcium* **23(5)** : 339-348.

Piñeros, M., Tester, M. 1995. Characterization of a voltage-dependent Ca²⁺-selective channel from wheat roots. *Planta* **195** : 478-488.

Ping, Z., Yabe, I., Muto, S. 1992. Voltage-dependent Ca²⁺ channels in the plasma membrane and the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica Biophysica Acta*. **1112** : 287-290.

Poovaiah, B.W., Reddy, A.S.N. 1993. Calcium and signal transduction in plants. Crit. Review in Plant Sci. 12: 185-211.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., Meldolesi, J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Revue* 74(3): 595-636.

Putney, J.W. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. Cell Calcium 7: 1-12.

Putney, J.W. 1990. Capacitative calcium entry revisited. Cell Calcium. 11: 611-624.

Putney, J.W., McKay, R.R. 1999. Capacitative calcium entry channels. Bioessays 21: 38-46.

Quan-Sheng Qui, Xue-Feng Su. 1998. The influence of extracellular side Ca²⁺ on the activity of the plasma membrane H⁺-ATPase from wheat roots. *Aust. J. Plant Physiol.* **25**: 923-328.

Randoux, B. Modifications dans l'expression des gènes au cours de l'embryogenèse somatique chez un hybride de chicorée. Identification de gènes codant pour une protéine de liaison au GTP. Doctorat soutenu le 25 nov. 1999 à l'Université des Sciences et Technologies de Lille I. 136 pages.

Randriamampita, C., Tsien, R.Y. 1993. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* **364(6440)** : 809-814.

Ranjeva, R., Carrasco, A., Boudet, A.M. 1988. Inositol triphosphate stimulates the release of calcium from intact vacuoles isolated from *Acer* cells. *FEBS Lett.* **230** : 137-141.

Ranjeva, R., Graziana, A., Mazars, C., Thuleau, P. 1992. Transport and receptor proteins of plant membranes. *Plenum Press New York In Cooke D.T. and Clarkson, D.T. eds.* 145-153.

Rasi-Caldogno, F., Pugliarello, M.C., De Michelis, M.I. 1985. Electrogenic transport of protons driven by the plasma membrane ATP-ase in membrane vesicles from radish. Biochemical characterization. *Plant Physiol.* 77: 200-205.

Redhead, C.R., Palme, K. 1996. The genes of plant signal transduction. Crit. Rev. Plant Sci. 15(5-6): 425-454.

Roberts, S., Brownlee, C. 1995. Calcium influx, fertilisation potential and egg activation in *Fucus serratus*. *Zygote* **3**: 191-197.

Rudd, J.J., Franklin-Tong, V.E. 1999. Calcium signaling in plants. Cell. Mol. Life Sci. 55: 214-232.

Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F. 1999. Communicating with calcium. *The Plant Cell* 11: 691-706.

Scanlon, C.H., Martinec, J., Rolph, C.E., Lumsden, P.J. 1995. Characterization of inositol 1,4,5 trisphosphate receptors from *Chenopodium rubrum*. *Biochem. Soc. Trans.* 23(4): 574S.

Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J., Anderson, J.A., Gaber, R.F. 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT₁ cDNA. *Science* **258**: 1654-1658.

Scholz, H. 1997. Pharmacological aspects of calcium channel blockers. Cardiovascular Drugs and Therapy. 10: 869-872.

Schroeder, J.I. 1994. Heterologous expression and functional analysis of higher plant transport proteins in Xenopus oocytes. *A Companion to Methods in Enzymology* **6**: 70-81.

Schroeder, J.I., Hagiwara, S. 1990. Repetitive increases in cytosolic Ca^{2+} of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca^{2+} permeable channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 87: 9305-9309.

Schroeder, J.I., Hedrich, R. 1989. Involvement of ion channels and active transport in osmoregulation and signaling of higher plant cells. *Trends Biochem. Sci.* 14: 187-192.

Schumaker, K.S., Sze, H. 1987. Inositol 1,4,5-triphosphate releases Ca²⁺ from vacuolar membrane vesicles of oat roots. J. Biol. Chem. 262: 3944-3946.

Shacklock, P.S., Read, N.D., Trewavas, A.J. 1992. Cytosolic free calcium mediates red lightinduced photomorphogenesis. *Nature* **358**: 753-755.

Sidikou-Seyni, R., Rambaud, C., Dubois, J., Vasseur, J. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Cichorium intybus* L. x *Cichorium endivia* L. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* **29**: 83-91.

Sienaert, I., Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J.B., Sipma, H., Casteels, R. 1997. Molecular and functional evidence for a multiple Ca²⁺-binding domains in the type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **272** : 25899-25906.

Sigel, E. 1990. Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. J. Mem. Biol. 117: 201-221.

Sipma, H., De Smet, P., Sienaert, I., Vanlingen, S., Missiaen, J.B., De Smedt, H. 1999. Modulation of $InsP_3$ binding to the recombinant ligand-binding site of the type I $InsP_3$ receptor by Ca^{2+} and calmoduline. J. Biol. Chem. 274(17): 12157-12162.

Sopory, S.K., Munshi, M. 1998. Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signaling in plants. *Critical Rev. Plant Sci.* 17(3): 245-318.

Spalding, E.P., Cosgrove, D.J. 1989. Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta* **178** : 407-410.

Spalding, E.P., Cosgrove, D.J. 1992. Mechanism of blue-light-induced membrane depolarization in etiolated cucumber hypocotyls. *Planta* **188** : 199-205.

Staxen, I., Pical, C., Montgomery, L.T., Gray, J.E., Hetherington, A.M., McAinsh, M.R. 1999. Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 1779-1784.

Stühmer, W., Parekh, A.B. 1995. Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Single-Channel Recording, Second Edition, edited by Plenum Press, N.Y.* Chapter 15: 341-355.

Sun, X-P., Callamaras, N., Marchant, J.S., Parker, I. 1998. A continuum of InsP₃-mediated elementary Ca²⁺ signalling events in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **509.1**: 67-80.

Terryn, N., Van Montagu, M., Inzé, D. 1993. GTP-binding proteins in plants. *Plant Mol. Biol.* 22: 143-152.

Tester, M., McRobbie, E.A.C. 1990. Cytoplasmic calcium affects the gating of potassium channels in the plasma membrane of *Chara corallina* : a whole-cell study using calcium channel effectors. *Planta* **180** : 569-581.

Thomas, D., Hanley, M.R. 1996. Evaluation of calcium influx factors from stimulated Jurkat T-lymphocytes by microinjection into *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **270** : 6429-6432.

Thuleau, P., Ward, J.M., Ranjeva, R., Schroeder, J.I. 1994a. Voltage-dependent calciumpermeable channels in the plasma membrane of a higher plant cell. *EMBO J.* **13** : 2970-2975.

Thuleau, P., Moreau, M., Schroeder, J.I., Ranjeva, R. 1994b. Recruitment of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels in carrot cells. *EMBO J.* 13: 5843-5847.

Timmers, A.C.J., De Vries, S.C., Schel, J.H.N. 1989. Distribution of membrane-bound calcium and activated calmodulin during embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). *Protoplasma* **153**: 24-29.

Timmers, A.C.J., Reiss, H.D., Bohsung, J., Traxel, K., Schel, J.H.N. 1996. Localization of calcium during somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). *Protoplasma* **190** : 107-118.

Tsay, Y-F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., Crawford, N.M. 1993. The herbicide sensitivity gene CHL 1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inductible nitrate transporter. *Cell* **72** : 705-713.

Tsukioka, M., Iino, M., Endo, M. 1994. pH dependence of inositol 1,4,5 trisphosphateinduced Ca^{2+} release in permeabilized smooth muscle cells of the guinea-pig. *J. Physiol. Lond.* 475: 369-375. Vasseur, J. Dubois, J., Hilbert, J-L., Couillerot, J-P. 1995. Somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium* species). In : biotechnology in agriculture and forestry, 31, somatic embryogenesis and synthetic seed II. *Bajaj Y.P.S. Ed, Springer-Verlag Heidelberg* 126-137.

Verdus, M-C., Dubois, T., Dubois, J., Vasseur, J. 1993. Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. *Ann. Bot.* **72**: 375-383.

Verma, D.P.S., Cheon, C.I., Hong, Z. 1994. Small GTP-binding proteins and membrane biogenesis in plants. *Plant Physiol.* 106: 1-6.

Walton, T.J. 1995. Inositol lipid signal transduction in phytoalexin elicitation. *Biochem. Soc. Trans.* 23(4): 862-867.

Wang, M., Duijn, B.V., Schram, A.W. 1991. Abscisic acid induces a cytosolic calcium decrease in barley aleurone protoplasts. *FEBS Lett.* 278: 69-74.

Ward, J.M., Schroeder, J.I. 1994. Calcium-activated K^+ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* **6**: 669-683.

Ward, J.M., Pei, Z-M., Schroeder, J.I. 1995. Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* 7: 833-844.

Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Taylor, J.E., Hetherington, A.M. 1996. Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Advances in Botanical Research* 22: 45-96.

Weber, W.M. 1999. Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis* : recent developments. J. Memb. Biol. 170: 1-12.

Weber, W.M., Liebold, K.M., Reifarth, F.W., Clauss, W. 1995. Infuence of extracellular Ca²⁺ on endogenous Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch.* **429** : 820-824.

White, P.J. 1994. Characterization of a voltage-dependent cation channel from the plasma membrane of rye (*Secale cereale* L.) roots in planar lipid bilayers. *Planta* 193: 186-193.

White, P.J. 2000. Calcium channels in higher plants. B. B. A. 1465: 171-189.

Williamson, R.E., Ashley, C.C. 1982. Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in alga *Chara*. *Nature* **296(5858)** : 647-650.

Yao, Y., Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M., Tsien, R.Y. 1999. Activation of store-operated Ca²⁺ current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* **98** : 475-485.

Yao, Y., Choi, J., Parker, I. 1995. Quantal puffs of intracellular Ca²⁺ evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. J. Physiol. **482(3)**: 533-553.

Yao, Y., Tsien, R.Y. 1997. Calcium Current activated by depletion of calcium stores in Xenopus oocytes. J. Gen. Physiol. 109: 703-715.

Yeung, E.C. 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. *Kluwer* Acad. Publishers T.A. Thorpe editor "In vitro embryogenesis in plants".

Yoneshima, H., Miyawaki, A., Michikawa, T., Furuichi, T., Mikoshiba, K. 1997. Ca^{2+} differentially regulates the ligand-affinity states of type I and type III inositol 1,4,5 trisphosphate receptors. *Biochem. J.* **322**: 591-596.

Yoshikawa, F., Morita, M., Monkawa, T., Michikawa, T., Furuichi, T., Mikoshiba, K. 1996. Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. J. Biol. Chem. 271: 18277-18284.

Zhang, B., Zhao, H., Muallem, S. 1993. Ca^{2+} -dependent kinase and phosphatase control inositol 1,4,5 trisphosphate-mediated Ca^{2+} release. Modification by agonist stimulation. J. Biol. Chem. 268: 10997-11001.

Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis : a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 85: 1411-1423.

ANNEXES

ANNEXE 1

"A CALCIUM HOMEOSTASIS MECHANISM INDUCED BY HETEROLOGOUS EXPRESSION OF TOTAL RNA FROM CHICORY LEAVES IN *XENOPUS* OOCYTES"

M. DEBARBIEUX, H. OUADID-AHIDOUCH, N. DELPIERRE, J. VASSEUR AND N. PREVARSKAYA

JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGIE 167 : 25-33 (1999).

A Calcium Homeostasis Mechanism Induced by Heterologous Expression of Total RNA from Chicory Leaves in *Xenopus* Oocytes

M. Debarbieux^{1,2}, H. Ouadid-Ahidouch¹, N. Delpierre², J. Vasseur², N. Prevarskaya¹

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire, SN₃, Université des Sciences et Technologie de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France ²Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogenèse Végétale, SN₂, Université des Sciences et Technologie de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received: 22 May 1998/Revised: 2 October 1998

Abstract. Xenopus oocytes were injected with total RNA from chicory leaf tissues and then examined by the voltage-clamp technique.

A double-step voltage protocol was used, with an initial hyperpolarization step from the holding potential of -35 to -140 mV followed by a second depolarization step to +60 mV. Two different outward currents were observed, one noninactivating (I_{ni}) , and one inactivating (I_i) . Only the noninactivating outward current (I_{ni}) could be induced by depolarization from -35 to +60 mV. The mean amplitude of I_{ni} was 2915 ± 848 nA (n = 11). This current, carried by chloride ions, declined nearly to the baseline in 153 ± 64 sec (n = 13), and was highly dependent on intracellular calcium. After the rundown of I_{ni} , the same oocyte was depolarized from -140 to +60mV. This protocol induced an inactivating outward current (I_i) with a mean amplitude of 4461 \pm 1605 nA (n = 13). I_i was also carried by chloride ions and dependent on extracellular calcium. I_i was strongly inhibited by 100 μ M extracellular La³⁺.

These two types of chloride currents were also observed after IP₃ injection in control oocytes. I_{ni} and I_i were not observed in noninjected oocytes or waterinjected oocytes.

We suggest that the expression of total chicory leaf tissue RNA in *Xenopus* oocytes reveals a calcium homeostasis mechanism responsible for calcium mobilization from internal stores and subsequent calcium entry.

Key words: Plant — Cichorium — Xenopus oocytes — Calcium — Chloride conductances — Voltage-clamp

Introduction

a se and the second a

Many physiological plant signal transduction processes involve calcium ions as a key element. Variations in cytosolic free calcium concentrations in response to a variety of external stimuli have been observed in several cell types (for reviews, see Bush, 1995; Webb et al., 1996). Numerous studies have reported that calcium may be involved in higher plant somatic embryogenesis (Timmers, De Vries & Schel, 1989; Jansen et al., 1990; Overvoorde & Grimes, 1994). In vitro somatic embryogenesis has been defined as a process producing an embryo from a somatic cell. Somatic embryogenesis provides a valuable system for studying early embryo development events in plants. In carrots, an increase in cytosolic calcium concentration has been described during somatic embryo development from the late globular to the torpedo-shaped stage (Timmers et al., 1996). In the chicory hybrid "474", embryogenic cells were characterized, in leaf tissues after five days of culture, by accumulation of calcium in the vacuole (Verdus et al., 1993) and by a callose deposit in the cell wall (Guedira, Dubois & Vasseur, 1990). This callose deposit may be triggered by calcium as shown in Catharenthus roseus (Kauss, Waldmann & Quader, 1990).

No electrophysiological data about calcium homeostasis in *Cichorium* have been published so far. However some calcium transport systems have been described in other plant cell types. Two major pathways for calcium increase in the cytosol have been shown, i.e., entry from the extracellular compartment (apoplast) through the plasma membrane and/or release from internal stores, mainly through the tonoplast (vacuolar membrane). Studies have provided evidence for the existence of mechanosensitive calcium channels (Cosgrove & Hedrich, 1991) and voltage-gated calcium channels in

Correspondence to: M. Debarbieux

the plasma membrane (White, 1993, 1994; Thuleau et al., 1994a,b; Piñeros & Tester, 1995, 1997). Several different calcium transport systems have been described in the tonoplast: a ligand-gated calcium channel, activated by IP₃ (Inositol 1,4,5-trisphosphate) (Schumaker & Sze, 1987; Ranjeva, Carrasco & Boudet, 1988; Alexander et al., 1990; Brosnan & Sanders, 1990; Johannes, Brosnan & Sanders, 1992; Canut et al., 1993; Allen, Muir & Sanders, 1995; Muir et al., 1997), an IP₃-sensitive Ca²⁺ store other than the vacuole has been reported (Muir & Sanders, 1997), a voltage-gated calcium channel (Johannes, Brosnan & Sanders, 1992; Ping, Yabe & Muto, 1992; Gelli & Blumwald, 1993; Allen & Sanders, 1994; Ward & Schroeder, 1994; Ward, Pei & Schroeder, 1995) and a cyclic-ADP-Ribose (cADPR)-gated pathway (Allen et al., 1995; Muir et al., 1997).

Xenopus oocytes have provided a powerful heterologous expression system for animal as well as plant genetic material. Several studies have already been published showing the expression in *Xenopus* oocytes of plant transport proteins, including a KAT₁ potassium channel (Schachtman et al., 1992; Cao et al., 1992), a chloride channel (Lurin et al., 1996), a nitrate transporter (Tsay et al., 1993), and an H⁺/hexose cotransporter (Boorer et al., 1992).

In the present study, we suggest for the first time that the expression of total RNA from chicory leaf tissues in *Xenopus* oocytes reveals a calcium homeostasis mechanism responsible for calcium mobilization from internal stores and subsequent calcium entry from the external medium.

Materials and Methods

PLANT MATERIAL AND CULTURE CONDITIONS

The chicory hybrid clone "474" (*Cichorium intybus* L. × *Cichorium endivia* L.) was propagated in vitro from styles by somatic embryogenesis as previously described by Dubois et al., 1988. Plantlets were grown on Heller medium containing 15 mM sucrose, in a growth chamber with a 12 hr light/12 hr dark regime. The temperature was 22°C/24°C with a cool-white fluorescent light (50 μ M · m⁻² · sec⁻¹). Leaves were delicately cut off four to six week-old plantlets and put into liquid nitrogen for RNA extraction.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF TOTAL RNA

The total RNA extraction method was derived from Chirgwin et al., 1979. Leaves stored in liquid nitrogen at -70° C were ground to a powder using a mortar and pestle, then solubilized in GIT buffer (isothiocyanate guanidium 4 M; β -mercapto-ethanol 0.1 M; sodium acetate 25 mM, pH 6). After centrifugation (15,000 × g, 10 min, 4°C), the supernatant was settled in a cesium chloride solution (5.7 M) with potassium acetate (25 mM), pH 6. After ultracentrifugation (125,000 × g, 21 hr, 20°C), the RNA pellet was solubilized in a sodium acetate solution (0.3 M) and precipitated by adding ethanol (v/v 0.3:0.7) for 18 hr at -20°C. The pellet was drained after centrifugation (10,000 × g, 5 min, 4° C) and, finally, suspended in sterile water. All solutions, except the final sterile water, were treated with DMPC (dimethyl pyrocarbonate v/v 1:100).

OOCYTE PREPARATION

Ovaries were dissected from tricaine methane sulphonate-anaesthetized female *Xenopus laevis* (CRBM Montpellier, France). Ovarian follicles were removed and oocytes were isolated in normal Ringer (ND96), without calcium, containing 2 mg/ml collagenase A (Boehringer, France). Stage V and VI oocytes (Dumont classification, 1972) were selected for electrophysiological measurements. Oocytes were injected with 60 nl of a 5 mg/ml solution of total RNA from *Cichorium* leaves. Noninjected oocytes were used as negative control; oocytes injected with sterile water had a behavior similar to that of noninjected oocytes (as previously described by Fournier et al., 1989; Tomaselli et al., 1990; Schroeder et al., 1994; Tosco et al., 1989). Oocytes could be maintained for 2–6 days at 19°C in a ND96 medium containing (in mM): NaCl, 96; KCl, 2; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 2; HEPES, 5; pH 7.45 with NaOH; and supplemented with 50 μ g/ml gentamicin.

ELECTROPHYSIOLOGICAL MEASUREMENTS

Electrophysiological measurements were performed from day three to day five after injection, using the standard two-microelectrode voltageclamp technique with the TEV-200 amplifier (Dagan Instruments, Minneapolis, MN). Oocytes were placed in a recording chamber (300 μ l) and impaled with 3 M KCl-filled electrodes (0.5–1.5 M Ω resistance). In all experiments, oocytes were depolarized every 40 sec from -35 or -140 mV to different test potentials for 1 sec or 1.2 sec. Stimulation of the preparation, data acquisition and analysis were performed using pCLAMP software (ver. 5.5, Axon Instruments, Burlingame, CA).

SOLUTIONS

Solutions were applied externally by addition to superfusate (gravitydriven superfusion).

We used: (i) a chloride-free medium (in mM): NaOH, 96; KOH, 2; MgOH₂, 2; CaOH₂, 1.8; HEPES, 5; pH 7.45 titrated with methane sulfonate; (ii) a calcium-free medium (in mM): NaCl, 96; KCl, 2; MgCl₂, 2; HEPES, 5; EGTA, 1; pH 7.45 with NaOH.

INTERNAL PERFUSION

Oocytes were impaled with a third additional micropipette (Nichiryo Digital Micropipette). We injected 40 nl of a 25 mM solution of K_4 . BAPTA or 1 mM IP₃, dissolved in HEPES KOH (pH 7.2), to give, respectively, a final calculated concentration in the oocyte of 1 mM or 50 μ M.

ANALYSIS

Results were expressed as mean \pm SE, *n* indicating the number of oocytes tested and *N* the number of frog donors.

Results

MEMBRANE CURRENTS IN XENOPUS OOCYTES Injected with Total RNA from Cichorium Leaves

The double-step voltage protocol designed to reveal membrane currents in oocytes consisted of an initial hy-



Fig. 1. Change of outward current kinetics recorded on oocytes injected with total RNA from *Cichorium* leaf tissues. (A) Typical outward current evoked from -140 to +60 mV in a noninjected oocyte (n = 32, N = 9). (B-F) Typical traces of the outward current induced by depolarizing pulses from -140 to +60 mV lasting 1 sec. The kinetics of the outward current gradually changed over time. (B) At the start of the test and (C) after 40 sec, the current did not inactivate. (D) 80 sec, (E) 120 sec and (F) 160 sec later, the outward current inactivated and increased in amplitude.

an ann an Callan Chaile an Ann an Ann a'

perpolarization step from the holding potential of -35 mV (resting potential of oocytes 3 days after incubation in ND96 medium) to -140 mV, followed by a second depolarization step to +60 mV. This protocol was repeated every 40 sec. In noninjected oocytes, this doublestep voltage protocol induced only a small outward current at +60 mV (Fig. 1A). In Xenopus oocytes injected with total RNA from Cichorium leaves, a large outward current was observed under the double-step voltage protocol. The membrane currents elicited by depolarization steps from a holding potential of -140 to +60 mV exhibited complex behavior. During the initial stimulation, a noninactivating outward current was observed (Fig. 1B). After 40 sec, the current amplitude was increased without any change in the kinetics (Fig. 1C). Eighty seconds later (Fig. 1D), the current kinetics changed gradually to an inactivating behavior (Fig. 1E-F, 120 and 160 sec after the first stimulation, respectively). As demonstrated later, this outward current displayed (i) a noninactivating component (I_{ni}) with a decay in amplitude over time, known as "rundown", and (ii) an inactivating component (I_i) .

CHARACTERIZATION OF THE NONINACTIVATING OUTWARD CURRENT

To study the noninactivating outward current, depolarization steps from -35 to +60 mV were applied to the oocytes. This protocol was used to isolate the noninactivating outward current as the inactivating outward current was never observed under these conditions. This protocol did not induce any current in noninjected oocytes (n = 32, N = 9; Fig. 2A). When the same protocol was used on oocytes injected with total RNA, a noninactivating outward current (I_{ni}) was observed, with rapid biexponential activation kinetics ($\tau_1 = 68.74 \pm 15.49$ msec; $\tau_2 = 467.20 \pm 65.29$ msec; n = 12, N = 2; Fig. 2B). The mean amplitude of I_{ni} at +60 mV was 2915 \pm 848 nA (n = 11, N = 2). This current declined nearly to the baseline in 153 \pm 64 sec (n = 13, N = 2; Fig. 2B-C).

We investigated the ionic nature of I_{ni} . As indicated in Fig. 3A, substitution of external chloride ions completely abolished I_{ni} (n = 5, N = 2). As Xenopus oocytes contain a large density of endogenous calciumactivated chloride channels (Barish, 1983; Miledi & Parker, 1984; Hartzell, 1996), calcium dependence of I_{ni} was then explored. The removal of external calcium had no effect on I_{ni} (n = 12, N = 3; Fig. 3B). The mean amplitude and run-down kinetics of I_{ni} recorded in Normal Ringer or Ca-free external solution were similar (2915 ± 848 nA, 153 ± 64 sec; n = 11, N = 2 for I_{ni} recorded in Normal Ringer and 3772 ± 1507 nA, 106 ± 18.8 sec; n = 12, N = 3 for I_{ni} recorded in Ca-free external solution). Perfusion of Ca-free external solution for 10 min had no effect on control oocytes depolarized



Fig. 2. Electrophysiological properties of the noninactivating component of the outward current. (A) Noninjected and (B and C) injected oocytes were depolarized from -35 to +60 mV for 1.2 sec (the time between each pulse was 40 sec). (A) Current trace recorded in a non-injected oocyte (n = 32, N = 9). (B) Typical traces showing the amplitude decrease of I_{ni} (n = 11, N = 2). (C) Time course of the decrease of I_{ni} .

from -35 to +60 mV. To assess the role of intracellular calcium in I_{ni} development, we injected K₄. BAPTA into the oocytes. We then compared the expression of I_{ni} in BAPTA-injected oocytes (n = 19, N = 4) and in oocytes from the same batches not injected with BAPTA (n = 28, N = 4). BAPTA injection reduced the number of oocytes expressing I_{ni} by 76% (Fig. 3C).

Thus, we suggest that I_{ni} is a chloride current highly dependent on intracellular calcium concentration.

CHARACTERIZATION OF THE INACTIVATING OUTWARD CURRENT

As already shown, in oocytes injected with total RNA, depolarization from a holding potential of -35 up to +60



Fig. 3. Pharmacology of the noninactivating outward current. I_{ni} was induced by depolarization from -35 to +60 mV for 1.2 sec. (A) Effect of the substitution of chloride ions by methane sulfonate on I_{ni} . Traces before (Normal Ringer) and after (0 Cl) perfusion of 0 Cl solution (n = 5, N = 2). (B) Effect of a Ca-free solution on I_{ni} . Note that the time course of the decrease of I_{ni} in Normal Ringer and in Ca-free solution was similar (n = 12, N = 3). (C) Intracellular injection of 40 nl of 25 mM K₄. BAPTA completely abolished I_{ni} .

mV induced a large noninactivating outward component displaying a rapid run-down (Fig. 2B). After total disappearance of I_{ni} , the same oocyte was depolarized from -140 to +60 mV. This protocol induced an inactivating outward current (I_i) which displayed monoexponential fast activation ($\tau = 47.61 \pm 13.59$ msec; n = 17, N =3) and biexponential inactivation ($\tau_1 = 218.95 \pm 38.6$ msec; $\tau_2 = 398.14 \pm 16.47$ msec; n = 6, N = 2; Fig. 4B). The mean amplitude of I_i was 4461 \pm 1605 nA at +60 mV (n = 13, N = 2). These currents were never observed in noninjected oocytes (Fig. 4A). Figure 4C illustrates a typical current-voltage relationship showing an activation threshold around -25 mV (-22.33 \pm 7.06 mV; n = 8, N = 2).



Fig. 4. Characteristics of the inactivating outward current. (A) Current trace recorded on a noninjected oocyte depolarized from -35 to -140 mV for 1 sec then to +60 mV for 1 sec (n = 32, N = 9). (B) Typical traces recorded at 0, +20 and +60 mV (n = 13, N = 2). (C) Current-voltage relationship of I_{i} .

To identify the reversal potential and therefore the ionic nature of the inactivating outward current, we studied tail currents following repolarization to different holding potentials. As shown in Fig. 4D, the tail current following a test pulse to +60 mV was clearly inward at -25 mV and outward at +5 mV. From the current-voltage relationship of the tail currents, the reversal potential of the outward current was estimated to be -13.54 ± 8.17 mV (n = 11, N = 3). The reversal potential was close to the chloride equilibrium potential in our ionic conditions, suggesting that I_i was predominantly carried by chloride ions. Moreover, the substitution of external chloride ions led to a total disappearance of the inactivating outward current (n = 7, N = 2; Fig. 5A).

In contrast to I_{ni} , which was activated by intracellular calcium, I_i was dependent on extracellular calcium. I_i was completely abolished by perfusing total RNAinjected oocytes with a Ca-free solution (n = 13, N = 2; Fig. 5B). Extracellular perfusion of Ca-free solution for 10 mn had no effect on control oocytes depolarized from -140 to +60 mV.

These results are consistent with the hypothesis that calcium influx is required for I_i activation. Our interpretation is that depletion of calcium stores activates $I_{n\nu}$ which, in turn, stimulates the capacitative calcium entry responsible for I_i activation. To test this hypothesis, we used capacitative calcium entry blockers. The inorganic calcium channel blocker La³⁺ was the most potent capacitative current blocker in *Xenopus* oocytes (Gillo,

Sealfon & Minke, 1996; Yao & Tsien, 1997). Addition of 100 μ M La³⁺ completely abolished I_i (n = 12, N = 3; Fig. 6A). Moreover, the amplitude of I_i increased when the driving force for calcium entry was higher (Fig. 6B). In this protocol, oocytes were first hyperpolarized to different potentials (between -35 and -135 mV) and then depolarized to +60 mV, which completely activated I_i . Like the capacitative calcium entry in *Xenopus* oocytes previously demonstrated by Hartzell (1996), the inactivating outward current was only activated at negative potentials greater than -50 mV. The current-voltage relationship recorded in injected oocytes shows that the inactivating outward current was activated only when the membrane was hyperpolarized to negative potentials greater than -50 mV (n = 7, N = 3; Fig. 6B).

Recently, two endogenous chloride currents were reported following IP₃ injection in *Xenopus* oocytes (Hartzell, 1996; Centinaio, Bossi & Peres, 1997). Currents recorded in oocytes injected with IP₃ and oocytes, from the same batches, injected with total RNA from *Cichorium* leaf tissues, shared the same characteristics (Fig. 7). Figure 7A and B illustrate currents recorded in oocytes following IP₃ injection (n = 27, N = 6). During the early phase following IP₃ injection (Fig. 7A), depolarization steps from -35 to +60 mV induced an outward current, I_{STORE} , with the same characteristics as I_{ni} (Fig. 7C). The mean amplitude of I_{STORE} was 6730 ± 1968 nA (n = 17, N = 3), declining nearly to the baseline in 113 ± 48 sec (n = 17, N = 3). Induction of



Fig. 5. Dependence of the inactivating outward current on the extracellular chloride and calcium ions. The oocyte was depolarized from -140 to +60 mV for 1 sec. (A) Current traces recorded before (Normal Ringer) and after (0 Cl) the perfusion of 0 Cl solution (n = 7, N = 2). (B) Currents recorded in Normal Ringer and when the oocyte was shifted into a Ca-free solution (0 Ca) (n = 13, N = 2).

 I_{STORE} was independent of extracellular calcium and was abolished by intracellular K₄. BAPTA injection (n = 5, N = 2; data not shown). This current (I_{STORE}) is a calcium-activated chloride current induced by calcium release from internal stores. After the development of I_{STORE} , a second current was recorded on the same oocyte under a depolarization from -140 to +60 mV (n =15, N = 3; Fig. 7B). This current (I_{CCE}) had the same characteristics as I_i (Fig. 7D). The mean amplitude of I_{CCE} was 5610 ± 2100.8 nA (n = 15, N = 3), it was highly dependent on extracellular calcium and was blocked by extracellular application of 100 μ M La³⁺ (n = 4, N = 2; data not shown). Like I_{i} , this current was significantly activated only at negative potentials greater than -50 mV (n = 6, N = 3; data not shown). This current (I_{CCE}) was the consequence of an extracellular calcium influx through store-operated channels after calcium-release from internal stores.



Fig. 6. Effect of extracellular La³⁺ on the inactivating outward current and activation curve of I_i . (A) Current traces recorded in Normal Ringer and when 100 μ M La³⁺ was added to the bath (n = 12, N = 3). (B) The I_i activation curve was determined by hyperpolarizing the membrane from a holding potential of -35 mV to different prepotentials between -35 and -135 mV for 1 sec and then depolarizing to a test potential of +60 mV for 1 sec. The current for each oocyte was normalized (n =7, N = 3).

Discussion

For the first time, we have characterized a mechanism responsible for intracellular calcium regulation in cells from chicory leaf tissues, by injecting total RNA into *Xenopus* oocytes. We reported that injection of total RNA led to two different outward calcium-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes.

 I_{ni} is a Ca-activated Chloride Current Induced by Calcium-Release from Intracellular Stores

We propose that I_{ni} is a chloride current activated by calcium released from intracellular stores for the following reasons: (i) I_{ni} is highly dependent on extracellular chloride ions (Fig. 3A). (ii) I_{ni} is independent of extra-

M. Debarbieux et al.: Heterologous Expression of Chicory RNA



Fig. 7. Comparison of currents recorded on oocytes injected with IP₃ and oocytes injected with total RNA from chicory leaf tissues. (A and B) Current traces obtained in oocytes following IP₃ injection. (C and D) Current traces obtained in oocytes injected with total RNA from chicory leaf tissues. (A) Typical traces recorded after 40 nl injection of 1 mM IP₃ solution in a Ca-free extracellular solution (n = 27, N = 6). (B) Typical traces recorded at 0, +20 and +60 after a prepulse at -140 mV from a holding potential of -35 mV in Normal Ringer (n = 15, N = 3). (C) Typical traces of I_{ni} in a Ca-free extracellular solution (n = 12, N = 3). (D) Typical traces of I_i in Normal Ringer (n = 13, N = 2).

cellular calcium. The current is activated by depolarization even when calcium is removed from the external medium (Fig. 3B). (iii) I_{ni} requires intracellular calcium for activation, as it was abolished by intracellular injection of K₄. BAPTA (Fig. 3C). (iv) The I_{ni} amplitude at +60 mV declines to the baseline in 153 ± 64 sec (Fig. 2B and C). These kinetics may reflect the time course of calcium store depletion.

I, is a Ca-activated Chloride Current Induced by Capacitative Calcium Influx

We propose that I_i is a chloride current stimulated by capacitative calcium influx for several reasons: (i) I_i is highly dependent on extracellular chloride ions (Fig. 5A). (ii) Contrary to I_{ni} , I_i is highly dependent on extracellular calcium (Fig. 5B). (iii) As demonstrated by Putney (1990), calcium-release from internal stores in *Xenopus* oocytes triggers extracellular calcium influx. In these studies, we have shown that I_i is activated after I_{ni} (Fig. 1B-F). Thus, I_i may be the consequence of CCE. (iv) I_i is activated at negative potentials greater than -50 mV, at which capacitative calcium entry was significantly activated in *Xenopus* oocytes (Hartzell, 1996). (v) The inorganic calcium channel blocker La³⁺, the most potent capacitative calcium entry blocker in *Xenopus* oocytes (Gillo et al., 1996; Yao & Tsien, 1997), completely abolished I_i (Fig. 6A).

These results are supported by studies of two different chloride currents in *Xenopus* oocytes activated by calcium release from internal stores and capacitative calcium influx induced after injection of IP₃ (Hartzell, 1996; Centinaio et al., 1997). The characteristics of currents recorded in oocytes injected with total RNA extracted from *Cichorium* leaf tissues are similar to those observed after IP₃ injection (Fig. 7).

In summary, we suggest that injection of total RNA from *Cichorium* leaves induces the activation of two outward chloride currents which are the consequence of (i) calcium-release from internal stores and (ii) capacitative calcium entry.

31

CALCIUM RELEASE IN HIGHER PLANTS

Several transport mechanisms capable of triggering calcium release from internal stores, mainly the vacuole, have been reported in plant cells. Schumaker & Sze (1986), first reported the existence of IP₃-gated calcium channels in the vacuolar membrane vesicles of oat roots. They suggest that IP₃ may operate as a second messenger in the mobilization of intracellular calcium in plant cells. Another calcium-release channel has been reported in beet vacuoles (Johannes et al., 1992). This channel is voltage-sensitive and channel opening is largely promoted by negative potentials (potential in the cytosol relative to the vacuole). Channel activities are neither affected by IP₃ nor by alteration of cytosolic free calcium concentrations. Only Zn^{2+} and the lanthanide (Gd³⁺) have been shown to be effective inhibitors. The following calcium transport system reported in the vacuole is another voltage-sensitive calcium-release channel which may be involved in the calcium-induced calcium-release mechanism (Ward & Schroeder, 1994; Ward et al., 1995). This channel is activated at positive potentials and is strictly dependent on cytosolic free calcium. The last calcium transport system was reported in individual plant vacuoles. A cyclic-adenosine 5'-diphosphoribose (cADPR), which interacts with a ryanodine receptor in certain animal cells (Clapper et al., 1987), was also shown to elicit calcium release at the vacuolar membrane of beet storage root and analysis by patch-clamping demonstrated that the cADPR-gated pathway is voltagedependent (Allen et al., 1995; Muir et al., 1997).

the All and the track

Which of these calcium transports could be expressed in our system? Since IP3-gated calcium channels has been reported in plant cells, we do not totally exclude the hypothesis of the expression of exogenous IP₃-gated calcium channels in the endoplasmic reticulum of Xenopus oocytes. Moreover, neo-expression of exogenous voltage-dependent calcium channels or cADPR-gated calcium channels in intracellular membranes is possible. This would imply a conformational coupling where a portion of the intracellular membrane must lie within 10 nm of the plasma membrane to allow a depolarizationinduced calcium release as described in skeletal muscle (Gilly, 1981). A similar close juxtaposition of the endoplasmic reticulum to the cell surface has been described in Xenopus oocytes (Gardiner & Grey, 1983; Berridge, 1997). Further experiments are needed to elucidate which of these Ca^{2+} channels are responsible for the calcium-release reported in our study.

In summary, this paper reports for the first time, a calcium homeostasis mechanism induced by heterologous expression of total RNA from chicory leaf tissues in *Xenopus* oocytes.

This research was supported by grants from le Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

M. Debarbieux et al.: Heterologous Expression of Chicory RNA

We would like to thank B. RANDOUX (PhD student) for improvements in the total RNA extraction protocol.

References

- Alexander, J., Lassalles, J.P., Kado, R.T. 1990. Opening of calcium channels in isolated red beet vacuole membrane by inositol 1,4,5triphosphate. *Nature* 343:567-570
- Allen, G.J., Muir, S.R., Sanders, D. 1995. Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* 268:735-737
- Allen, G.J., Sanders, D. 1994. Two voltage-gated, calcium release channels coreside in the vacuolar membrane of broad bean guard cells. *Plant Cell* 6:685-694
- Barish, M.E. 1983. A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. J. Physiol. 342:309-325
- Berridge, M.J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. J. Physiol. 499.2:291–306
- Boorer, K.J., Forde, B.G., Leigh, R.A., Miller, A.J. 1992. Functional expression of a plant plasma membrane transporter in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 302:166–168
- Brosnan, J.M., Sanders, D. 1990. Inositol triphosphate-mediated Ca²⁺ release in beet microsomes is inhibited by heparin. *FEBS Lett.* 260:70-72
- Bush, D.S. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46:95-122
- Canut, H., Carrasco, A., Rossignol, M., Ranjeva, R. 1993. Is the vacuole the richest store of inositol triphosphate mobilisable calcium in plant cells? *Plant Sci.* **90**:135–143
- Cao, Y., Anderova, M., Crawford, N.M., Schroeder, J.I. 1992. Expression of an outward-rectifying potassium channel from maize mRNA and complementary RNA in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell* 4:961-969
- Centinaio, E., Bossi, E., Peres, A. 1997. Properties of the Ca²⁺activated Cl⁻ current of Xenopus oocytes. Cell Mol. Life Sci. 53:604-610
- Chirgwin, J.M., Przybgla, A.E., Mac Donald, R.J., Rutter, W.J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294
- Clapper, D.L., Walseth, T.F., Dargie, P.J., Lee, H.C. 1987. Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol triphosphate. J. Biol. Chem. 262:9561-9568
- Cosgrove, D.J., Hedrich, R. 1991. Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of Vicia faba L. Planta 186:143-153
- Dubois, T., Dubois, J., Guedira, M., Vasseur, J. 1988. Embryogenèse somatique directe sur les styles de Cichorium: effets de la température et origine des embryoïdes. C. R. Acad. Sci. Paris 307:669-675
- Dumont, J.M. 1972. Oogenesis in Xenopus laevis. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morphol. 136:153-179
- Fournier, F., Honoré, E., Brûlé, G., Mironneau, J., Guilbault, P. 1989. Expression of Ba currents in *Xenopus* oocyte injected with pregnant rat myometrium mRNA. *Pfluegers Arch.* **413:**682–684
- Gardiner, D.M., Grey, R.D. 1983. Membrane junctions in Xenopus eggs: their distribution suggests a role in calcium regulation. J. Cell. Biol. 96:1159-1163
- Gelli, A., Blumwald, E. 1993. Calcium retrieval from vacuolar pools. Plant Physiol. 102:1139-1146
- Gillo, B., Sealfon, S.C., Minke, B. 1996. Pharmacology of a capacitative Ca²⁺ entry in Xenopus oocytes. J. Phot. Chem. 35:77-82
- Gilly, W.F. 1981. Intramembrane charge movement and excitation-

M. Debarbieux et al.: Heterologous Expression of Chicory RNA

contraction couling. In: The Regulation of Muscle Contraction: Exitation-Contraction Coupling. D. Grinnell and M.A.B. Brazier, editors. pp. 3-21. Academic Press, New York

- Guedira, M., Dubois, J., Vasseur, J. 1990. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: is callose an early marker? *Ann. Bot.* 65:539-545
- Hartzell, H.C. 1996. Activation of different Cl currents in *Xenopus* oocytes by Ca-liberated from stores and by capacitative Ca influx. J. Gen. Physiol. 108:157-175
- Jansen, M.A.K., Booij, H., Schel, J.H.N., de Vries, S.C. 1990. Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 9:221-223
- Johannes, E., Brosnan, J.M., Sanders, D. 1992. Calcium channels in the vacuolar membrane of plants: multiple pathways for intracellular calcium mobilization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 338:105-112
- Kauss, H., Waldmann, T., Quader, H. 1990. Ca²⁺ as a signal in the induction of callose synthesis. *Nato. ASI.* H47:117-131
- Lurin, C., Geelen, D., Barbier-Brygoo, H., Guern, J., Maurel, C. 1996. Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel. *Plant Cell* 8:701-711
- Miledi, R., Parker, J. 1984. Chloride current induced by injection of calcium into Xenopus oocytes. J. Physiol. 357:173-183
- Muir, S.R., Bewell, M.A., Sanders, D., Allen, G.J. 1997. Ligand-gated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ signalling in higher plants. J. Exp. Bot. 48:589-597
- Muir, S.R., Sanders, D. 1997. Inositol 1,4,5 triphosphate-sensitive Ca²⁺ release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Phys*iol. 114:1511-1521
- Overvoorde, P.J., Grimes, H.D. 1994. The role of calcium and calmodulin in carrot somatic embryogenesis. *Plant Cell Physiol.* 35(2): 135-144
- Piñeros, M., Tester, M. 1995. Characterization of a voltage-dependent Ca²⁺-selective channel from wheat roots. *Planta* 195:478–488
- Piñeros, M., Tester, M. 1997. Characterization of the high-affinity verapamil binding site in a plant plasma membrane Ca²⁺-selective channel. J. Membrane Biol. 157:139-145
- Ping, Z., Yabe, I., Muto, S. 1992. Voltage-dependent Ca²⁺ channels in the plasma membrane and the vacuolar membrane of Arabidopsis thaliana. Biochimica Biophysica Acta 1112:287-290
- Putney, J.W. 1990. Capacitative calcium entry revisited. Cell Calcium 11:611-624
- Ranjeva, R., Carrasco, A., Boudet, A.M. 1988. Inositol triphosphate stimulates the release of calcium from intact vacuoles isolated from *Acer* cells. *FEBS Lett.* 230:137–141
- Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J., Anderson, J.A., Gaber, R.F. 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT₁ cDNA. Science 258:1654–1658

Schroeder, J.I. 1994. Heterologous expression and functional analysis

of higher plant transport proteins in Xenopus oocytes. A Companion to Methods in Enzymology 6:70-81

- Schumaker, K.S., Sze, H. 1987. Inositol 1.4,5-triphosphate releases Ca²⁺ from vacuolar membrane vesicles of oat roots. J. Biol. Chem. 262:3944–3946
- Thuleau, P., Moreau, M., Schroeder, J.I., Ranjeva, R. 1994b. Recruitment of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels in carrot cells. *EMBO J.* 13:5843–5847
- Thuleau, P., Ward, J.M., Ranjeva, R., Schroeder, J.I. 1994a. Voltagedependent calcium-permeable channels in the plasma membrane of a higher plant cell. *EMBO J.* 13:2970–2975
- Timmers, A.C.J., de Vries, S.C., Schel, J.H.N. 1989. Distribution of membrane-bound calcium and activated calmodulin during embryogenesis of carrot (*Daucus carota L.*). Protoplasma 153:24–29
- Timmers, A.C.J., Reiss, H.D., Bohsung, J., Traxel, K., Schel, J.H.N. 1996. Localization of calcium during somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota L.*). Protoplasma 190:107-118
- Tomaselli, G.F., Feldman, A.M., Yellen, G., Marban, E. 1990. Human cardiac sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. Am J Physiol. 258:H903-H906
- Tosco, M., Orsenigo, M.N., Gastaldi, G., Faelli, A. 1998. Functional expression of basolateral Cl⁻/HCO3-exchange from rat jejunum in *Xenopus laevis* oocytes. *Cell Biochem Funct.* **16**(1):35-42
- Tsay, Y-F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., Crawford, N.M. 1993. The herbicide sensitivity gene CHL 1 of Arabidopsis encodes a nitrateinductible nitrate transporter. *Cell* 72:705-713
- Verdus, M-C., Dubois, T., Dubois, J., Vasseur, J. 1993. Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. *Ann. Bot.* 72:375-383
- Ward, J.M., Pei, Z-M., Schroeder, J.I. 1995. Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* 7:833– 844
- Ward, J.M., Schroeder, J.I. 1994. Calcium-activated K⁺ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* 6:669–683
- Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Taylor, J.E., Hetherington, A.M. 1996. Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. Advances in Botanical Research 22:45–96
- White, P.J. 1993. Characterization of a high-conductance, voltagedependent cation channel from the plasma membrane of rye roots in planar lipid bilayers. *Planta* 191:541-551
- White, P.J. 1994. Characterization of a voltage-dependent cation channel from the plasma membrane of rye (*Secale cereale* L.) roots in planar lipid bilayers. *Planta* 193:186-193
- Yao, Y., Tsien, R.Y. 1997. Calcium Current activated by depletion of calcium stores in *Xenopus* oocytes. J. Gen. Physiol. 109:703-715

ANNEXE 2

"INSP3 MEDIATED CALCIUM RELEASE INDUCED BY HETEROLOGOUS EXPRESSION OF TOTAL CHICORY LEAF RNA"

M. DEBARBIEUX-DELEPORTE, B. DELBREIL, T. COLLIN, P. DELCOURT, J. VASSEUR, N. PREVARSKAYA, AND H.

OUADID-AHIDOUCH

ARTICLE SOUMIS

INSP₃-MEDIATED CALCIUM RELEASE INDUCED BY HETEROLOGOUS EXPRESSION OF TOTAL CHICORY LEAF RNA

M. Debarbieux-Deleporte^{1,2,*}, B. Delbreil², T. Collin³, P. Delcourt¹, J. Vasseur², N. Prevarskaya¹, and H. Ouadid-Ahidouch¹

¹ Laboratoire de Physiologie Cellulaire, SN₃, INSERM E9938, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

² Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogenèse Végétale, SN₂, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

³ Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, Université de Picardie Jules Verne, Faculté des Sciences, 33, rue Saint-Leu, 80039 Amiens Cedex 1, France.

(*) To whom all correspondence should be addressed

Fax : 33-3-20-43-40-66 Phone : 33-3-20-43-40-77 e-mail address : Marie.Debarbieux@univ-lille1.fr

Running title : InsP₃ Pathway and Chicory RNA Expression.
Abstract

A calcium dependent-chloride current (I_{ni}) has been recorded in *Xenopus* oocytes injected with total RNA from chicory leaf tissues, after a depolarization from -35 to +60 mV. Development of I_{ni} can be mimicked by InsP₃ injection in control oocytes. Injection of InsP₃ after the run-down of I_{ni} was ineffective, as was the second InsP₃ injection on control oocytes. Extracellular application of 5 mM caffeine, a specific inhibitor of the InsP₃ pathway, reduced the number of oocytes displaying I_{ni} by 85%. Measurements of InsP₃ production in depolarized oocytes injected with chicory RNA showed a net increase in the InsP₃ level (254 ± 14%) compared with control oocytes (100 ± 5%). Extracellular application of 10 μ M U73122, a selective inhibitor of Phospholipase C (PLC), reduced the number of oocytes

Thus, we demonstrated that the calcium homeostasis mechanism, induced by heterologous expression of total RNA from chicory, implied the $InsP_3$ signalling pathway. Our interpretation is that the oocyte membrane depolarization generates $InsP_3$ production *via* the activation of PLC or the availability of PiP₂.

KeyWords: Cichorium - Calcium regulation - InsP₃ - PLC activation - Xenopus oocytes.

1. Introduction

Calcium has many important structural and physiological roles in plants. It plays an essential role in cellular homeostasis and plant development, most notably as an intracellular second messenger (Sanders, Brownlee & Harper, 1999). Changes in cytosolic calcium concentrations have been reported in plant cells in response to a variety of external stimuli (for reviews, see Bush, 1995; Webb et al., 1996). Calcium may enter the cytosol either from the extracellular space via an influx across the plasma membrane or release from intracellular compartments (Piñeros & Tester, 1997).

Our previous study suggested, for the first time, that expression of total RNA from chicory leaf tissues in *Xenopus* oocytes allows the development of a calcium homeostasis mechanism. The present mechanism was revealed by the appearance of two distinct calcium dependent chloride currents namely I_{ni} and I_i that reflect respectively emptying of internal calcium stores and the consecutive calcium entry (Debarbieux et al., 1999). Nevertheless, the nature of the transport mechanism capable of triggering calcium release from oocyte's internal stores remained to be elucidated.

The best characterized calcium release mechanism in plants is by for the phosphoinositide system in the heart of which InsP₃ operates as a second messenger in the mobilization of intracellular calcium (Sanders et al., 1999; Leckie et al., 1998; Muir et al., 1997).

The present report proposes that membrane depolarization can induce $InsP_3$ formation in chicory leaf RNA-injected oocytes. We thereby pharmacologically demonstrate that the non-inactivating calcium dependent chloride current (I_{ni}) elicited by depolarization is supported by an $InsP_3$ -mediated calcium release.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material and culture conditions

The chicory hybrid clone "474" (*Cichorium intybus* L. x *Cichorium endivia* L.) was propagated *in vitro* from styles by somatic embryogenesis as previously described by Dubois et al., 1988. Plantlets were grown on Heller medium containing 15 mM sucrose, in a growth chamber with a 12 h light / 12 h dark regime. The temperature was 22° C / 24°C with a cool-white fluorescent light (50 μ M. m⁻². s⁻¹). Leaves were delicately cut off four to six week-old plantlets and put into liquid nitrogen for RNA extraction.

2.2 Extraction and purification of total RNA

The total RNA extraction method was derived from Chirgwin et al., 1979 (Chirgwin et al., 1979). Leaves stored at -70°C were ground in liquid nitrogen to a powder using a mortar and pestle, then solubilized in GIT buffer (isothiocyanate guanidium 4 M; β -mercapto-ethanol 0.1 M; sodium acetate 25 mM, pH 6). After centrifugation (15 000 g, 10 min, 4°C), the supernatant was settled in a cesium chloride solution (5.7 M) with potassium acetate (25 mM), pH 6. After ultracentrifugation (125 000 g, 21 h, 20°C), the RNA pellet was solubilized in sodium acetate solution (0.3 M) and precipitated by adding ethanol (v/v 0.3 : 0.7) for 18 h at -20°C. The pellet was drained after centrifugation (10 000 g, 5 min, 4°C) and, finally, suspended in sterile water. All solutions, except the final sterile water, were treated with DMPC (dimethyl pyrocarbonate v/v 1 : 100).

2.3 Oocyte preparation

Ovaries were dissected from tricaine methane sulphonate-anesthetized female *Xenopus laevis* (CRBM Montpellier, France). Ovarian follicles were removed and oocytes were isolated in normal Ringer (ND96), without calcium, containing 2 mg/ml collagenase A (Boehringer, France). Stage V and VI oocytes (Dumont, 1972) were selected for electrophysiological measurements. Oocytes were injected with 60 nl of a 5 mg/ml solution of total RNA from *Cichorium* leaves. Non-injected oocytes were used as negative control ; oocytes injected with sterile water had a behaviour similar to that of non-injected oocytes (Fournier et al., 1989 ; Tomaselli et al., 1990 ; Schroeder, 1994 ; Tosco et al., 1998). Oocytes could be maintained for 2-6 days at 19°C in a ND96 medium containing (in mM): NaCl, 96 ; KCl, 2 ; CaCl₂, 1.8 ; MgCl₂, 2 ; HEPES, 5 ; pH 7.45 with NaOH ; and supplemented with 50 μg/ml gentamicin.

2.4 Electrophysiological measurements

Electrophysiological measurements were performed from day three to day five after injection, using the standard two-microelectrode voltage-clamp technique with a TEV-200 amplifier (Dagan Instruments, Minneapolis, MN). Oocytes were placed in a recording chamber (300 μ l) and impaled with 3 M KCl-filled electrodes (0.5-1.5 M Ω resistance). In all experiments, oocytes were depolarized every 15 s from -35 mV to +60 mV for 1.2 s. Stimulation of the preparation, data acquisition, and analysis were performed using pCLAMP software (ver. 5.5, Axon Instruments, Burlingame, CA).

2.5 Solutions

Solutions were applied externally by addition to superfusate (gravity driven superfusion).

We used: (i) ND96 medium supplemented with 5 mM caffeine, pH 7.45 with NaOH; (ii) ND96 medium supplemented with U73122 or its inactive analogue U73343. U73122 or 1-(6{[17β-3 methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl] amino}hexil)-1H-pyrrole-2,5-dione, (10 μ M) and U73343 or 1-(6{[17β-3 methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl] amino}hexil-2,5-pyrrolidinedione, (10 μ M) were dissolved in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (final concentration 1/1000), pH 7.45 with NaOH.

Oocytes were incubated for 20 to 60 min in medium containing chemicals before being impaled. Appropriate controls (DMSO 1/1000) were performed for each experiment.

2.6 Internal perfusion

Oocytes were impaled with a third additional micropipette (Nichiryo digital micropipette CO., LTD). We injected 40 nl of a 1 mM IP₃ solution, dissolved in HEPES KOH (pH 7.2), to give a final calculated concentration in the oocyte of 50 μ M.

2.7 Analysis

Current amplitude was expressed as mean \pm standard error, *n* indicating the number of oocytes tested and N the number of frog donors.

The presence of I_{ni} as well as its modulation by the pharmacological agents was express as the percentage comparison validated by a χ^2 analysis. Significance was assumed with P ≤ 0.05 .

2.8 Procedure for measurements of InsP₃ production in control oocytes and in oocytes injected with chicory RNA.

For the measurements of InsP₃ production, the cells were microinjected with 40 nl of a solution containing 1250 μ Ci/ μ l of myo-(2-3H)inositol (Amersham pharmacia). Oocytes were depolarized once time from -35 to +60 mV for 1.2 s. InsP₃ metabolism was then arrested by crushing the oocyte in 1ml of ice cold buffer containing 0.1 M formic acid/ 0.4 M ammonium formate. The soluble fraction obtained by centrifugation at 35000 x g for 10 min was loaded on to a 0.6 ml Dowex 1x8 (formate form ; Bio-Rad) column. The column was washed with 20 ml of 0.1 M formic acid/ 0.7 M ammonium formate. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting.

3. Results

3.1 Development of I_{ni} can be mimicked by InsP₃ injection in control oocytes.

Figure 1A shows typical current traces induced by depolarization from -35 to +60 mV and the decrease in I_{ni} in injected oocytes. Control oocytes without InsP₃ injection displayed any outward current (Fig. 1B). Development of I_{ni} can be mimicked by InsP₃ injection in control oocytes (mean current amplitude was 7220 ± 1660 nA; n=20, N=2; Fig. 1C). This current, named I_{STORE} , declined nearly to the baseline in about 60 s as did I_{ni} .

InsP₃ was injected in control oocytes again after the rundown of I_{STORE} and any outward current was recorded (n=12, N=2; Fig. 2A). We investigated the effect of InsP₃ injection on injected oocytes after the total rundown of I_{ni} . The InsP₃ injection induced only a small outward current (mean current amplitude was 1650 ± 1781; n=18, N=2; Fig. 2B).

Taken together, these results are consistent with the hypothesis that the calcium release required for I_{ni} activation implies elements of an InsP₃-mediated signalling pathway. Indeed, InsP₃ injection after the rundown of I_{ni} was ineffective, as was the second InsP₃ injection on control oocytes.

3.2 Effect of extracellular caffeine application on I_{ni} and measurements of InsP₃ levels.

Caffeine is known to be an $InsP_3$ receptor inhibitor in *Xenopus* oocytes (Parker & Ivorra, 1991; Hague et al., 2000). Fig. 3A shows typical current traces showing the decrease in amplitude of I_{ni} . Extracellular incubation with caffeine 5 mM for 20 min reduced significantly the number of oocytes displaying I_{ni} by 85% (n=39, N=4; P< 0.001; Fig. 3B).

Several studies had suggested that the production of $InsP_3$ in animal cells was dependent on membrane potential (Charpentier, Béhue & Fournier, 1995; Ganitkevich & Isenberg, 1996; Gromada & Dissing, 1996). We investigated whether the depolarization from -35 to +60 mV could induce the $InsP_3$ formation stimulation. After a depolarization from -35 to +60 mV during 1.2 s, the InsP₃ metabolism from control or injected oocytes was arrested and measurement of InsP₃ level was performed as previously described. Measurement in injected oocytes showed a net increase in the InsP₃ level (245 \pm 14%; n=21, N=2; Fig.4) compared with control oocytes (100 \pm 5%; n=9, N=2; Fig. 4).

To elucidate how the depolarization induces the $InsP_3$ pathway stimulation, we used a specific PLC inhibitor. In fact, several study previously reported led us to think that the oocyte membrane depolarization generated $InsP_3$ production *via* the activation of PLC or the availability of PiP₂.

3.3 Effect of extracellular application of a specific PLC inhibitor (U73122) and its inactive analogue (U73343).

As shown in Fig. 5A, incubation with extracellular U73122 (10 μ M in DMSO 1/1000) for 30 min reduced significantly the number of oocytes presenting I_{ni} by 52% (n=47, N=4; P< 0.001). To verify that the action of U73122 was specifically mediated through PLC inhibition, a close structural analogue of U73122 (U73343), which is inefficient at inhibiting PLC, was tested. Extracellular incubation with U73343 (10 μ M in DMSO 1/1000) for 30 min had no effect on the number of oocytes displaying I_{ni} (n=38, N=4; Fig. 5B). Appropriate controls were performed using oocytes incubated in DMSO 1/1000 for 30 min (n=33, N=4; Fig. 5C).

4. Discussion

In this paper, we show that the development of I_{ni} can be mimicked by InsP₃ injection in control oocytes (Fig. 1). We demonstrated that InsP₃ injection after the run-down of I_{ni} was ineffective, as was the second InsP₃ injection on control oocytes (Fig. 2). These results could be explained by the following reasons : (i) internal stores could be empty after the first InsP₃ injection on control oocytes, or (ii) some elements of the InsP₃ signalling pathway could be inactivated. We then proposed that the calcium release reported in our study implied InsP₃ signalling. To confirm this hypothesis, we used caffeine, which is known to reduce or abolish the current evoked by microinjection of InsP₃ on *Xenopus* oocytes (Parker & Ivorra ; 1991). As shown in Fig. 3, extracellular application of caffeine 5 mM significantly reduced the number of oocytes displaying I_{ni} (P< 0.001). Moreover, measurements of InsP₃ production in depolarized oocytes injected with chicory RNA showed a net increase in the InsP₃ level compared with control oocytes (Fig. 4).

To elucidate how the membrane depolarization induces $InsP_3$ pathway stimulation, we used a selective PLC inhibitor (U73122). In fact, several studies have suggested that the production of $InsP_3$ in animal cells is dependent on membrane depolarization and that this depolarization generates $InsP_3$ production *via* the activation of PLC (Ganitkevich & Isenberg, 1996; Gromada & Dissing, 1996; Audigier, Wang & Greengard, 1998; Nilsson, 1998). In our experiments, U73122 (10 μ M) significantly reduced the number of oocytes presenting I_{ni} . In contrast, the inactive analogue, U73343 (10 μ M), had no such effect (Fig. 5).

These data led us to think that the oocyte membrane depolarization generated $InsP_3$ production *via* the activation of PLC or the availability of PiP₂. There may be several explanations for this phenomenon: (i) Charpentier et al. (1995) proposed that sustained depolarization of the oocyte membrane results in the activation of endogenous PLC which catalyses PiP₂ hydrolysis and promotes the generation of DAG and InsP₃. In our study, a single depolarization from -35 to +60 mV induced no outward current on control oocytes. However, in injected oocytes, the same protocol induced I_{ni}. One possible explanation is that heterologous expression of chicory RNA led to modifications in *Xenopus* oocyte PLC (such as conformational changes or post-translational modifications) resulting in an increased voltage-sensitivity. (ii) Another explanation is that injection of chicory RNA led to the expression of a chicory PLC in *Xenopus* oocytes. Most components in the PLC-signalling pathway, such as G-protein or PiP₂, have structural or functional equivalents in plants and it remains clear that plant tissues are capable of both degrading and elaborating inositol phosphates produced by the action of PLC (Coté & Crain, 1993). This signalling pathway has been implicated in a variety of plant physiological processes such as osmotic regulation or responses to pathogens and stress (Coté & Crain, 1993; Munnik, Irvine & Musgrave, 1998).

In summary, this study reports a calcium homeostasis mechanism, implying the $InsP_3$ signalling pathway and especially the PLC enzyme, induced by heterologous expression of total RNA from chicory leaf tissues in *Xenopus* oocytes. This signalling pathway may be implicated in a number of chicory physiological processes such as osmotic stress or defence responses.

Acknowledgements

This work was supported by grants from le Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

We would like to thank F. Hague (PhD student) for improvements in the measurements of InsP₃ protocol.

.

Legends to Figures

Fig. 1 : Development of I_{ni} can be mimicked by InsP₃ injection in control oocytes.

Oocytes were depolarized from -35 to +60 mV for 1.2 sec every 15 sec.

A- Typical traces showing the decrease in amplitude of Ini on total RNA-injected oocyte.

a-First step

b- Total Rundown of Ini

B- Current trace recorded on control oocyte before InsP₃ injection.

C- Current traces recorded on control oocyte after InsP₃ injection.

a- I_{store} recorded after InsP₃ injection. The current amplitude was 7220 ± 1600 nA

(n=20 ; N=2).

b- Total rundown of Istore

Fig. 2 : Effect of InsP₃ injection on injected and control oocyte.

Oocytes were depolarized from -35 to +60 mV for 1.2 sec every 15 sec.

A- Current trace recorded on control oocyte after a second InsP₃ injection (n=12; N=2).

B- Current traces recorded on injected oocyte, after the rundown of Ini and InsP₃ injection.

a- Total rundown of Ini

b- Current recorded after InsP₃ injection. The amplitude was 1650 ± 1781 nA (n=18;

N=2).

Fig. 3 : Effect of extracellular caffeine application on Ini-

Injected oocytes were depolarized from -35 to +60 mV for 1.2 sec every 15 sec.

A- Current traces recorded in Normal Ringer. The mean current amplitude was 6650 ± 2290 nA (n=32; N=4).

a-First step

b- Total rundown of Ini

B- Current recorded after incubation in caffeine 5 mM for 20 min (n=39; N=4).

Fig. 4 : Measurements of InsP₃ levels.

Measurements in injected oocytes showed a net increase in the InsP₃ level ($245 \pm 14\%$; n=21, N=2) compared with control oocytes ($100 \pm 5\%$; n=9, N=2).

Fig. 5 : Effect of extracellular application of U73122 and its inactive analogue U73343 on injected oocytes.

Oocytes were depolarized from -35 to +60 mV for 1.2 sec every 15 sec.

A- Current trace recorded on injected oocyte after incubation in U73122 (10 μ M) for 30 min (n=47; N=4).

B- Current traces recorded on injected oocyte after incubation in U73343 (10 μ M) for 30 min. The mean current amplitude was 7640 ± 1950 nA (n=38; N=4).

a- First step

b- Total rundown of Ini

C- Current traces recorded on injected oocyte after incubation in DMSO 1/1000 for 30 min. The mean current amplitude was 8340 ± 2160 nA (n=33; N=4).

a-First step

b- Total rundown of Ini

References

Audigier, S.M.P., Wang, J.K.T., Greengard, P. 1998. Membrane depolarization and carbamoylcholine stimulate phosphatidylinositol turnover in intact nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 2859-2863.

Bush, D.S. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 95-122.

Charpentier, G., Béhue, N., Fournier, F. 1995. Phospholipase C activates protein kinase C during induction of slow Na current in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch.* **429** : 825-831.

Chirgwin, J.M., Przybgla, A.E., Mac Donald, R.J., Rutter, W.J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294.

Coté, G.G., Crain, R.C. 1993. Biochemistry of phosphoinositides. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44: 333-356.

Debarbieux, M., Ouadid-Ahidouch, H., Delpierre, N., Vasseur, J., Prevarskaya, N. 1999. A calcium homeostasis mechanism induced by heterologous expression of total RNA from chicory leaves in *Xenopus* oocytes. *J. Membrane Biol.* **167** : 25-33.

Dubois, T., Dubois, J., Guedira, M., Vasseur, J. 1988. Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium* : effets de la température et origine des embryoïdes. *C. R. Acad. Sci. Paris* 307 : 669-675.

Dumont, J.M. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis*. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136** : 153-179.

Fournier, F., Honoré, E., Brûlé, G., Mironneau, J., Guilbault, P. 1989. Expression of Ba current in *Xenopus* oocytes injected with pregnant rat myometrium mRNA. *Pflüegers Arch.* **413**: 682-684.

Ganitkevich, V.Y., Isenberg, G. 1996. Effect of membrane potential on the initiation of acetylcholine-induced calcium transients in isolated guinea pig coronary myocytes. *American Heart Association* **78** (4): 717-723.

Gromada, J., Dissing, S. 1996. Membrane potential and cytosolic free calcium levels modulate acetylcholine-induced inositol phosphate production in insulin-secreting BTC3 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1310**: 145-148.

Hague, F., Matifat, F., Brûlé G., Collin, T. 2000. Cell Signal. 12(1): 31-35.

Leckie, C.P., McAinsh, M.R., Montgomery, L., Priestley, A.J., Staxen, I., Webb, A.A.R., Hetherington, A.M. 1998. Second messengers in guard cells. J. Exp. Bot. 49: 339-349.

Muir, S.R., Bewell, M.A., Sanders, D., Allen, G.J. 1997. Ligand-gated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ signalling in higher plants. *J. Exp. Bot.* **48 :** 589-597.

Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. 1998. Phospholipid signalling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1389 : 222-272.

Nilsson, H. 1998. Interactions between membrane potential and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Acta Physiol. Scand.* **164**: 559-566.

Parker, I., Ivorra, I. 1991. Caffeine inhibits inositol triphosphate-mediated liberation of intracellular calcium in *Xenopus* oocytes. J. Physiol. 433: 229-240.

Piñeros, M., Tester, M. 1997. Calcium channels in higher plant cells : selectivity, regulation and pharmacology. J. Exp. Bot. 48: 551-577.

Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F. 1999. Communicating with calcium. *The Plant Cell* 11:691-706.

Schroeder, J.I. 1994. Heterologous expression and functionnal analysis of higher plant transport proteins in *Xenopus* oocytes. *A Companion to Methods in Enzymology* **6**: 70-81.

Tomaselli, G.F., Feldman, A.M., Yellen, G., Marban, E. 1990. Human cardiac sodium channels expressed in Xenopus oocytes. *Am. J. Physiol.* **258** : H903-H906.

Tosco, M., Orsenigo, M.N., Gastaldi, G., Faelli, A. 1998. Functional expression of basolateral Cl-/ HCO3- exchange from rat jejunum in Xenopus laevis oocytes. *Cell Biochem. Funct.* **16(1):** 35-42.

Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Taylor, J.E., Hetherington, A.M. 1996. Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Advances in Botanical Research* 22: 45-96.











Les ions Ca²⁺ jouent un rôle primordial dans les signaux de transduction au cours de divers processus physiologiques chez les plantes.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au phénomène d'embryogenèse somatique chez la chicorée hybride "474". L'embryogenèse somatique concerne le développement d'embryons asexués à partir de cellules somatiques. Certains mécanismes ioniques, et en particulier calciques, interviennent au cours de ce phénomène. Cependant à ce jour, aucune donnée n'existe concernant la caractérisation précise des mécanismes contrôlant l'homéostasie calcique des cellules de chicorée ainsi que l'implication des conductances ioniques au cours du processus embryogène.

L'objectif de notre travail consiste en la caractérisation des mécanismes ioniques, principalement liés aux ions Ca²⁺ de la chicorée hybride "474" en utilisant l'ovocyte de Xénope comme système d'expression fonctionnelle.

Deux types de courants chlorures sont nouvellement enregistrés dans les ovocytes préalablement injectés avec les ARN totaux par rapport aux ovocytes contrôles. Le premier courant est activé par le Ca^{2+} libéré des réserves intracellulaires et le second courant est activé par l'influx de Ca^{2+} via les canaux CRAC. Nous montrons que le relargage de Ca^{2+} est induit par l'InsP₃ et que la PLC est impliquée dans l'initiation de la cascade de transduction. En effet, la dépolarisation membranaire engendre une augmentation du taux d'InsP₃ via l'activation d'une PLC. Nous avançons donc l'hypothèse d'une PLC d'origine végétale qui montre une sensibilité aux variations de potentiel membranaire.

Cette approche dynamique des processus physiologiques des cellules végétales ouvre de larges perspectives quant à une meilleure compréhension des signaux de transduction chez les plantes.

MOTS CLES : Chicorée hybride "474", Expression hétérologue, Homéostasie calcique, Ovocyte de Xénope, Signaux de transduction.

ABSTRACT

Transduction signals of various plant physiological processes involve calcium as a second messager. Numerous studies have reported especially that calcium may be involved in higher plant somatic embryogenesis which has been defined as a process producing an embryo from a somatic cell. The chicory hybrid "474" is our experimental model for the study of somatic embryogenesis. However, no electrophysiological data about calcium homeostasis in *Cichorium*, particularly during somatic embryogenesis, have been published so far.

The aim of our study was to characterize ionic transport, and specifically calcium transport, in *Xenopus* oocytes injected with total RNA from chicory leaf tissues.

Two different chloride currents were observed in injected oocytes after membrane depolarization. The first current was activated by calcium released from intracellular stores and the second was stimulated by capacitative calcium influx. We demonstated that the calcium release was induced by InsP₃ and that the phospholipase C enzyme was involved in the signalling pathway. We conclude that the oocyte membrane depolarization generates InsP₃ production *via* the activation of PLC. We thus propose that injection of chicory RNA leads to the expression of a voltage-sensitive chicory PLC in *Xenopus* oocytes.

The dynamic approach of physiological processes in plant cells that we have developped in this work allowed us to gain more insight in plant signal transduction.

KEY WORDS : Calcium homeostasis, Chicory hybrid "474", Heterologous expression, Signal transduction, *Xenopus* oocytes

