

Flux de calcium et contrôle de la glycogénolyse hépatique

Dans une cellule non stimulée, la concentration cytosolique de calcium est faible alors qu'elle est 10 000 fois plus élevée dans le milieu extracellulaire et que ce cation est stocké dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Certaines hormones mobilisent très rapidement le calcium des réserves du réticulum endoplasmique, via la production d'inositol triphosphate ; la persistance d'une concentration élevée de calcium dans le cytosol exige un influx augmenté à partir du milieu extracellulaire. Le calcium se comporte dans la cellule comme un messager de l'action hormonale, modifiant l'activité de divers systèmes enzymatiques.

Jean-Pierre Mauger

Chargé de recherche à l'Inserm

Michel Claret

Directeur de recherche au Cnrs

Le métabolisme des glucides dans le foie et dans les muscles est contrôlé par des hormones circulantes et par des neuro-médiateurs. Le signal, reconnu au niveau de la membrane plasmique par des récepteurs spécifiques, est transmis à l'intérieur de la cellule cible par des messagers intracellulaires. L'AMP cyclique découvert en 1958 par Sutherland [1] est le messager intracellulaire actuellement le mieux connu. L'AMP cyclique active une protéine kinase qui entraîne la phosphorylation de certaines protéines dans la cellule. Le transfert d'un groupe phosphate sur une protéine induit un changement de conformation et permet de modifier ses propriétés [2]. Ainsi, par exemple, la phosphorylase b-kinase, qui est l'enzyme clé contrôlant la dégradation du glycogène est activée par phosphorylation lorsque la concentration d'AMP cyclique augmente. Cette voie utilisant l'AMP cyclique comme second messager est mise

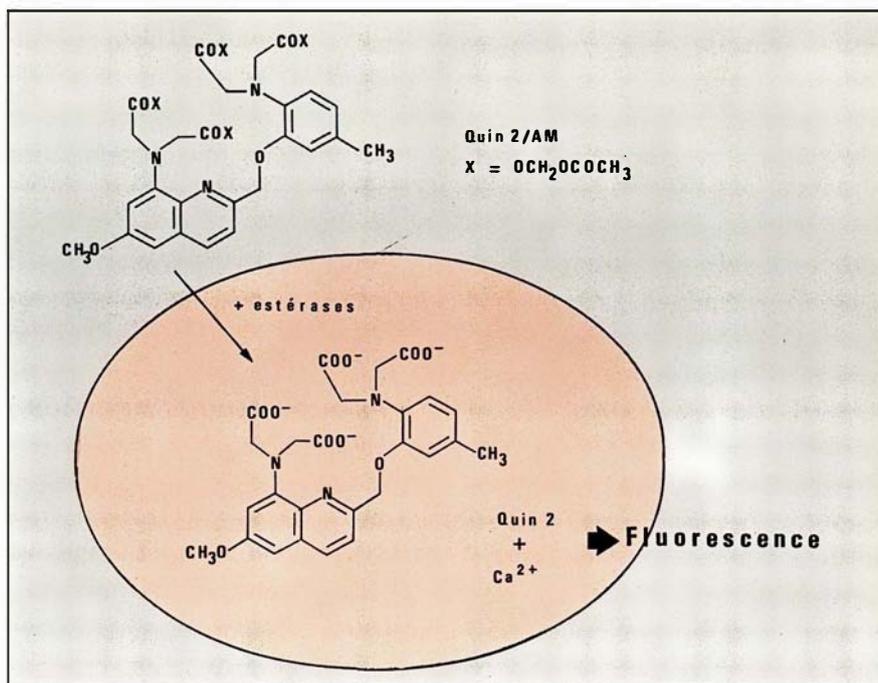
en jeu, dans le foie, par plusieurs hormones comme le glucagon ou l'adrénaline lorsque cette dernière interagit avec des récepteurs β -adrénergiques.

Cependant, l'AMP cyclique n'est pas le seul messager intracellulaire impliqué dans la régulation du métabolisme cellulaire. Un certain nombre d'hormones ou de neuro-médiateurs produisent leurs effets sur les cellules cibles sans modifier le contenu cellulaire en AMP cyclique. Ainsi, les catécholamines, en stimulant les récepteurs α_1 -adrénergiques, ou des hormones vaso-actives comme l'angiotensine ou la vasopressine, augmentent la concentration de Ca^{2+} ionisé dans les hépatocytes. De plus, il a été montré que les ionophores à Ca^{2+} , qui accélèrent les échanges de Ca^{2+} à travers les membranes cellulaires, reproduisent l'effet stimulateur des hormones sur la glycogénolyse. Inversement, si des hépatocytes ont été « déplétés » de leur calcium, les hormones indépendantes de l'AMP cyclique n'activent

ADRESSE

J.-P. Mauger, M. Claret : unité de recherches de physiologie et pharmacologie cellulaire, Inserm U. 274, bâtiment 443, université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.

Figure 1. **Mesure du Ca^{2+} cytosolique par le quin 2.** Le quin 2 acétoxyéthylester (quin 2/AM) diffuse librement à travers la membrane plasmique. Les estérases présentes dans le cytosol des cellules hydrolysent les liaisons esters (COX) et rendent le quin 2 libre (COO^-) apte à fixer le Ca^{2+} . Le complexe quin 2- Ca^{2+} entraîne une émission de fluorescence.



plus la glycogénolyse. Ainsi, il apparaît que le Ca^{2+} joue un rôle essentiel dans l'activation d'enzymes intracellulaires sous l'action de certaines hormones.

Homéostasie du calcium intracellulaire

La quantité de calcium total mesurée dans le foie ou dans d'autres tissus de mammifères est de 1 à 2 μmoles par gramme de tissu. Cependant, la plus grande partie de ce calcium est liée à des sites anioniques portés par les glycoprotéines, les protéines ou les phospholipides, ou encore est accumulée dans des compartiments intracellulaires comme le réticulum endoplasmique ou les mitochondries. En fait le calcium ne peut jouer un rôle de signal intracellulaire que sous la forme ionisée libre dans le cytosol. Nous savons depuis longtemps que la concentration de Ca^{2+} cytosolique est très faible en comparaison du calcium total contenu dans la cellule. Mais ce n'est que récemment qu'il a été possible de mesurer précisément la concentration de Ca^{2+} dans les cellules de petite taille comme le sont les

hépatocytes. Cette mesure est réalisée grâce à l'utilisation d'indicateurs photochimiques qui lient spécifiquement le Ca^{2+} . Ces molécules sont par exemple l'aequorine qui est une protéine bioluminescente isolée à partir de la méduse *Aequorea aequorea* et qui émet une lumière bleue après liaison du Ca^{2+} . D'autres molécules comme l'arsenazo III doivent être excitées et absorbent la lumière dans certaines longueurs d'onde spécifiques lorsqu'elles sont complexées avec le Ca^{2+} . Les indicateurs fluorescents synthétisés par R. Tsien [3] comme le quin 2 puis le fura 2 et l'indo 1, ont acquis une grande popularité au cours de ces dernières années. Ces indicateurs lient le Ca^{2+} avec une grande affinité comparative-ment à d'autres ions comme Na^+ , Mg^{2+} ou H^+ qui existent en quantité importante dans les cellules. Les complexes indicateurs- Ca , dont la constante de dissociation est comprise entre 100 et 300 nM, deviennent fluorescents lorsqu'ils sont excités à une ou deux longueurs d'onde données. L'émission de fluorescence du complexe est une fonction saturable dépendant du Ca^{2+} . On

comprend alors que si une molécule comme le quin 2, le fura 2 ou l'indo 1 est introduite dans des cellules, la concentration de Ca^{2+} libre du cytosol pourra être facilement quantifiée en mesurant la fluorescence émise. Ces indicateurs ne traversent pas la membrane plasmique et doivent être introduits dans les cellules sous forme estérifiée, diffusant à travers la membrane. Dans le cytosol, les liaisons esters sont hydrolysées par les estérases présentes naturellement dans la cellule, et les molécules recouvrent leur affinité de liaison pour le Ca^{2+} . Un exemple est montré pour le quin 2 dans la figure 1. La concentration de Ca^{2+} déterminée au moyen de marqueurs photochimiques varie de 50 à 200 nM selon les types cellulaires. Dans le cas particulier des hépatocytes la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol est de 100 à 200 nM [4]. Puisque la concentration de Ca^{2+} dans le sang ou le fluide interstitiel est de l'ordre de quelques millimoles/l, il existe un important gradient de concentration de Ca^{2+} (environ 10^4) entre les deux faces de la membrane plasmique. C'est l'existence même de ce gradient qui

fait du Ca^{2+} un excellent candidat pour jouer le rôle de signal amplificateur intracellulaire. En effet, une faible augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique pour le Ca^{2+} entraînera une augmentation importante de la concentration de Ca^{2+} ionisé dans le cytosol. Mais comment un gradient de concentration aussi important peut-il être maintenu par les cellules ?

Flux transmembranaires de Ca^{2+}

Le Ca^{2+} extracellulaire diffuse passivement dans le cytosol à travers la membrane plasmique en suivant son gradient de concentration (figure 2). Ce mouvement est facilité par la différence de potentiel existant entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Cet influx dépend : (a) de la concentration de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire ; (b) du potentiel transmembranaire ; (c) de la perméabilité de la membrane plasmique pour le Ca^{2+} . L'efflux de Ca^{2+} depuis le milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire qui se fait contre le gradient de concentration de Ca^{2+} nécessite un apport d'énergie. Celle-ci provient de l'hydrolyse de l'ATP en ADP par une ATPase (ou pompe à Ca^{2+}) activée par le Ca^{2+} du cytosol [5]. L'activité de la pompe à Ca^{2+} peut être dépendante de facteurs cytosoliques comme la calmoduline [6] ou, dans les hépatocytes, d'un facteur encore non identifié [7]. Des constituants de la membrane plasmique comme le phosphatidylinositol diphosphate (PIP_2), peuvent activer la pompe à Ca^{2+} [6]. Cette observation est importante parce qu'il a été montré que les hormones mobilisant le Ca^{2+} diminuent la concentration de PIP_2 dans la membrane. Ainsi, la pompe à Ca^{2+} pourrait jouer un rôle dans la variation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique observée en présence de certaines hormones ou de certains neuromédiateurs. Un autre système participe à la sortie de Ca^{2+} de la cellule, il s'agit de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [8]. Ce

transporteur utilise le gradient électrochimique des ions Na^+ pour évacuer les ions Ca^{2+} . Le gradient de concentration en Na^+ résulte lui-même de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase qui rejette le Na^+ de la cellule en échange avec le K^+ . L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est abondant dans les cellules excitables et possède une capacité importante d'évacuation du Ca^{2+} . Cependant, son rôle éventuel dans le foie n'est pas encore clairement établi.

Ainsi, l'efflux de Ca^{2+} de la cellule dépend du niveau de régulation de la pompe à Ca^{2+} et de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ qui eux-mêmes dépendent de l'état physiologique de la cellule, et de la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol. Dans une cellule au repos les flux transmembranaires de Ca^{2+} , c'est-à-dire l'influx et l'efflux, sont identiques. L'équilibre entre ces flux détermine la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol.

Nous avons vu que la concentration de Ca^{2+} ionisé est faible par rapport au Ca^{2+} total contenu dans la cellule. Ceci est dû au fait qu'une partie du Ca^{2+} est liée à des protéines solubles ou aux membranes intracellulaires. D'autre part, certains compartiments intracellulaires clos comme le réticulum endoplasmique ou les mitochondries peuvent accumuler du Ca^{2+} .

Le réticulum endoplasmique, appelé réticulum sarcoplasmique dans les muscles, représente environ 10 % du volume cellulaire et 50 % des membranes cellulaires. Le Ca^{2+} est accumulé dans le réticulum endoplasmique par une pompe à Ca^{2+} qui, comme la pompe à Ca^{2+} de la membrane plasmique, est une ATPase. La concentration de Ca^{2+} qui entraîne une activation de 50 % de l'activité maximale de la pompe est d'environ $0,3 \mu\text{M}$ [9, 10]. Cette concentration est proche de la concentration de Ca^{2+} cytosolique, ce qui signifie que le réticulum endoplasmique accumule du Ca^{2+} dans une cellule au repos. Le mécanisme permettant la sortie de Ca^{2+} de ce compartiment n'est pas encore élucidé, mais il

RÉFÉRENCES

1. Rall TW, Sutherland EW. Formation of a cyclic adenosine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* 1958 ; 232 : 1065-76.
2. Munnich A, Vaulont A, Marie J. De nouvelles fonctions pour l'AMP cyclique. *médecine/sciences* 1985 ; 1 : 192-7.
3. Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. Calcium homeostasis in intact lymphocytes. Cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 1982 ; 94 : 325-34.
4. Berthon B, Binet A, Mauger JP, Claret M. Cytosolic free Ca^{2+} in isolated rat hepatocytes as measured by quin 2 : effects of noradrenaline and vasopressin. *FEBS Lett* 1984 ; 167 : 19-23.
5. Carafoli E, Penniston JT. Le signal calcium. *Pour la Science* 1986 ; 99 : 78-88.
6. Penniston JT. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase as active Ca^{2+} pumps. In : Cheung WY, ed. *Calcium and Cell Function*. New York, Academic Press, 1983 : 100-49.
7. Lotersztajn S, Hanoune J, Pecker F. A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent ATPase in rat liver plasma membrane : Dependence on an endogenous protein activator distinct from calmodulin. *J Biol Chem* 1981 ; 256 : 11209-15.
8. Philipson KD. Sodium-calcium exchange in plasma membrane vesicles. *Ann Rev Physiol* 1985 ; 47 : 561-71.
9. Burgess GM, McKinney JS, Fabiato A, Leslie BA, Putney JW. Calcium pools in saponin-permeabilized guinea pig hepatocytes. *J Biol Chem* 1983 ; 258 : 15336-45.
10. Becker GL, Fiskum G, Lehninger AL. Regulation of free Ca^{2+} by liver, mitochondria and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1980 ; 255 : 9009-12.

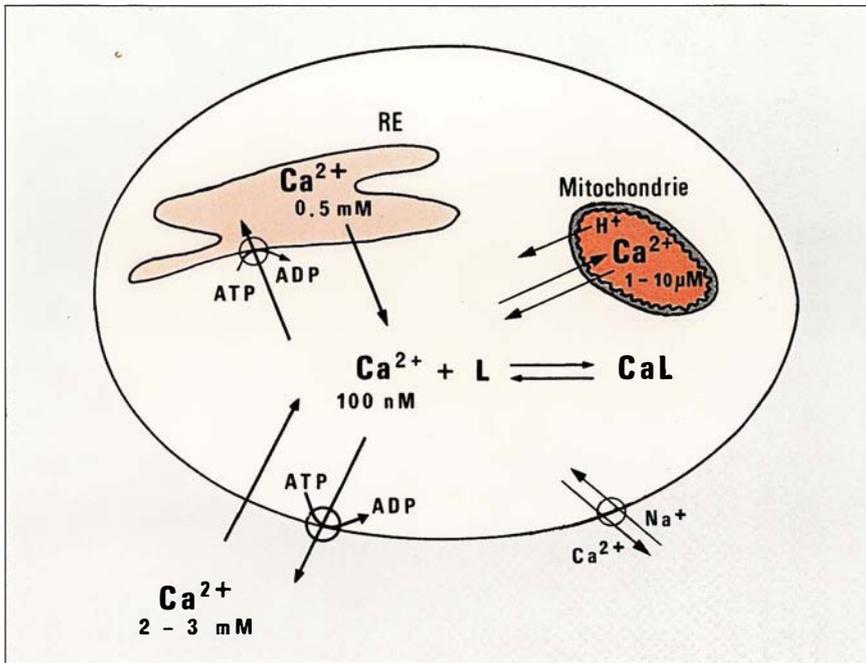


Figure 2. **Homéostasie du Ca^{2+} cellulaire.** Le Ca^{2+} extracellulaire traverse la membrane plasmique en suivant son gradient de concentration. Des pompes à Ca^{2+} rejettent le Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire ou l'accumulent dans le réticulum endoplasmique (RE). Les mitochondries accumulent aussi du Ca^{2+} en utilisant le gradient de H^+ provenant du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Le Ca^{2+} cytosolique peut également se fixer sur des sites anioniques intracellulaires (L). Enfin, un échangeur Na^+/Ca^{2+} participe dans certaines cellules à la sortie du Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire.

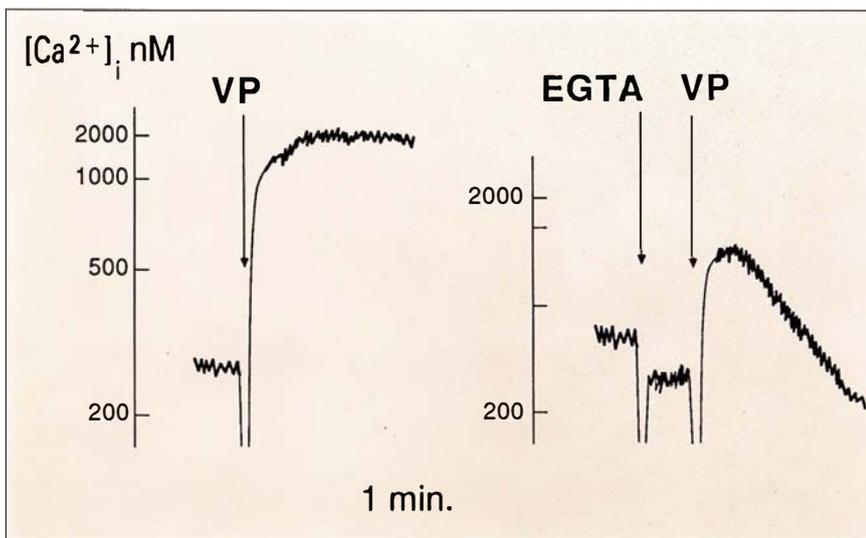


Figure 3. **Enregistrement de l'effet de la vasopressine (10 nM) dans les hépatocytes de rat isolés et chargés avec le marqueur quin 2.** La fluorescence de l'indicateur est calibrée en terme de $[Ca^{2+}]_i$ (nM). En présence d'une concentration normale de Ca^{2+} externe (1,8 mM), le signal indique que l'hormone augmente $[Ca^{2+}]_i$ de 250 à 2 000 nM. La réponse est soutenue. En absence de Ca^{2+} libre externe, condition obtenue en ajoutant du chélateur calcique EGTA (2,4 mM), l'hormone provoque une augmentation transitoire du signal.

m/s n° 10 vol. 3, décembre 87

est probable que le Ca^{2+} diffuse par des canaux spécifiques en suivant son gradient de concentration.

Les mitochondries sont des organites où s'effectue la « respiration cellulaire » permettant la transformation des substances nutritives en énergie. La chaîne respiratoire de la membrane interne des mitochondries entraîne une sortie de protons. Le gradient de protons qui en résulte fournit l'énergie nécessaire à l'accumulation de Ca^{2+} dans les mitochondries. Des études effectuées sur des cellules dont la membrane plasmique a été spécifiquement perméabilisée avec de la saponine, de façon à contrôler le milieu environnant les mitochondries, ont permis de constater que ces organites accumulent le Ca^{2+} avec une grande capacité et une faible affinité [9, 10]. Des conclusions identiques ont été obtenues à partir d'expériences effectuées sur des mitochondries isolées [10]. La concentration de Ca^{2+} qui entraîne une accumulation de 50 % de la capacité maximale est de 10 à 20 μM . Cette concentration est 100 fois supérieure à la concentration de Ca^{2+} cytosolique d'une cellule au repos. Ceci explique le fait que les mitochondries accumulent peu de Ca^{2+} dans une cellule au repos. Cependant, la grande capacité d'accumulation du Ca^{2+} par ces organites leur permet de s'opposer aux variations importantes de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} .

Mobilisation du Ca^{2+} par les hormones

Il est possible de mesurer les variations de concentration de Ca^{2+} cytosolique produites par les hormones dans des cellules préalablement chargées avec du quin 2. Ainsi, dans les hépatocytes stimulés par les hormones vaso-actives comme la vasopressine ou l'angiotensine ou les agonistes α_1 -adrénergiques, la concentration de Ca^{2+} cytosolique augmente d'un niveau de base de 100 à 200 nM à plus de 1 μM en quelques secondes (figure 3) [4].

RÉFÉRENCES

11. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984 ; 312 : 315-21.
12. Le Peuch C. De nouveaux seconds messagers de l'action hormonale. *médecine/sciences* 1985 ; 1 : 255-60.
13. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca^{2+} from a non mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 1983 ; 306 : 67-9.
14. Burgess GM, Godfrey PP, McKinney JS, Berridge MJ, Irvine RF, Putney JW. The second messenger linking receptor activation to internal Ca^{2+} release in liver. *Nature* 1984 ; 309 : 63-6.
15. Spat A, Bradford PG, McKinney JS, Rubin RP, Putney JW. A saturable receptor for ^{32}P -inositol-1,4,5-trisphosphate in hepatocytes and neutrophils. *Nature* 1986 ; 319 : 514-6.
16. Dawson AP. GTP enhances inositol trisphosphate-stimulated Ca^{2+} release from rat liver microsomes. *FEBS Lett* 1985 ; 185 : 147-50.
17. Mauger JP, Poggioli J, Guesdon F, Claret M. Noradrenaline, vasopressin and angiotensin increase Ca^{2+} influx by opening a common pool of Ca^{2+} channels in isolated rat liver cells. *Biochem J* 1984 ; 221 : 121-7.
18. Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 1983 ; 301 : 569-74.
19. Kuno M, Gardner P. Ion channels activated by inositol-1,4,5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature* 1987 ; 326 : 301-4.
20. Irvine RF, Moor RM. Micro-injection of inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca^{2+} . *Biochem J* 1986 ; 240 : 917-20.
21. Von-Tscharner V, Prod'hom B, Baggioini M, Reuter H. Ion channels in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration. *Nature* 1986 ; 324 : 369-72.

Des expériences effectuées sur les hépatocytes isolés ont montré que la phase initiale de la réponse était due à la libération de Ca^{2+} d'un compartiment intracellulaire identifié comme étant le réticulum endoplasmique (figure 3). Cependant, cette réserve de Ca^{2+} étant de capacité limitée, elle ne permet pas de maintenir la concentration cytosolique de Ca^{2+} à un niveau élevé de façon soutenue. Le maintien de la réponse est dû à l'entrée de Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire.

Le fait que le signal hormonal soit reçu au niveau de la membrane plasmique par des récepteurs spécifiques et le Ca^{2+} libéré d'un réservoir intracellulaire, suggère l'existence d'un autre messager intracellulaire. La liaison de l'hormone sur son récepteur entraîne

l'activation d'une phospholipase C qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5 diphosphate (PIP_2) présent dans la membrane, en diacylglycérol et en inositol triphosphate (IP_3) [11, 12]. M. Berridge [11] a proposé que l' IP_3 pourrait être le messager intracellulaire responsable de la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire. Pour tester cette hypothèse, il faut pouvoir accéder au réticulum endoplasmique ; cette condition est obtenue en utilisant des cellules traitées avec de la saponine qui, en se fixant au cholestérol abondant dans la membrane plasmique, forme des pores qui laissent passer les ions et les molécules de taille moyenne. Ces cellules sont incubées dans un milieu dont la composition ionique ressemble à celle du milieu intracel-

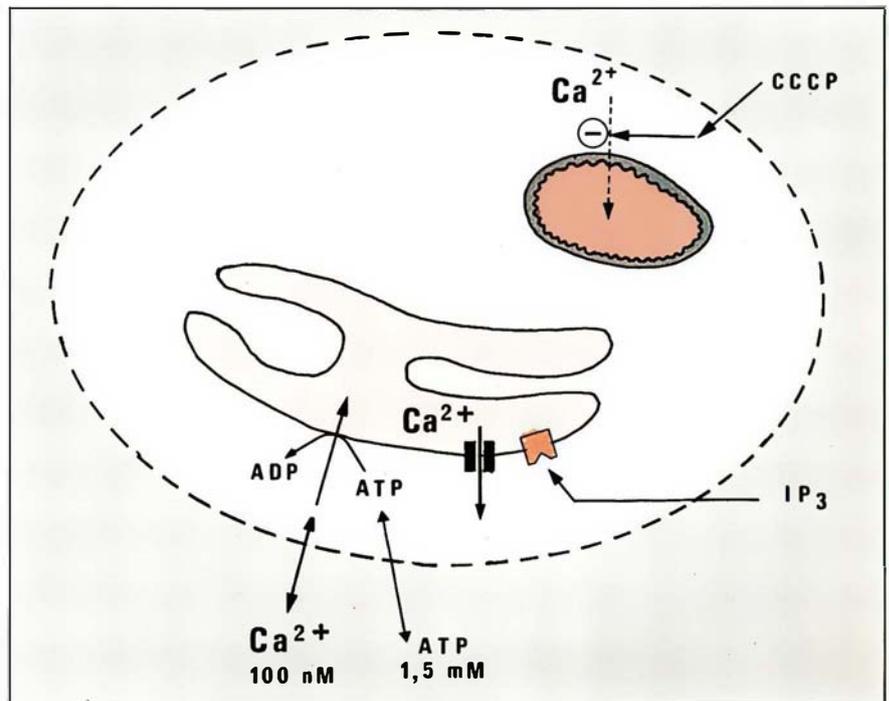


Figure 4. **Perméabilisation des cellules avec la saponine.** Des cellules traitées avec de la saponine sont perméables aux molécules de petite taille alors que les organites intracellulaires restent fonctionnels. Le milieu d'incubation reproduit la composition ionique du milieu intracellulaire. L'addition d'ATP dans le milieu permet l'accumulation de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique. La perméabilisation permet à l' IP_3 d'accéder à son récepteur localisé sur le réticulum endoplasmique. L'entrée de Ca^{2+} dans les mitochondries est inhibée par des inhibiteurs mitochondriaux comme le carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone (CCCP).

lulaire et l'addition d'ATP entraîne l'accumulation de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique (figure 4). L'addition d' IP_3 provoque une perte rapide du Ca^{2+} contenu dans le réticulum endoplasmique (figure 5) [13, 14]. Cet effet est indépendant de la température ce qui suggère que l' IP_3 ouvre des canaux calciques et n'affecte pas les propriétés de la pompe à Ca^{2+} . Des expériences effectuées avec du $^{32}\text{P}\text{IP}_3$ indiquent que ce ligand se fixe sur des récepteurs spécifiques avec une constante de dissociation (K_D) de 10^{-8} à 10^{-7}M [15]. Cependant, les mécanismes conduisant de la liaison de l' IP_3 sur son récepteur à l'ouverture des canaux Ca^{2+} ne sont pas encore connus. Des travaux récents indiquent que le GTP pourrait être impliqué dans ce processus [16]. D'autre part, nous savons que les hormones mobilisant le Ca^{2+} stimulent l'influx de Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire [17]. Ainsi, dans une cellule stimulée par une hormone, deux flux de Ca^{2+} d'origine différente convergent vers le cytosol pour augmenter de façon considérable et soutenue la concentration de Ca^{2+} dans ce compartiment. Cependant, les étapes impliquées dans la stimulation de l'influx de Ca^{2+} par les hormones ne sont pas connues. Il semble raisonnable de supposer que la cascade d'événements dépendant de l'hydrolyse du PIP_2 est impliquée, bien que la relation directe avec l'influx de Ca^{2+} n'ait pas encore été établie. Dans les cellules excitables, le Ca^{2+} entre dans la cellule par des canaux spécifiques qui s'ouvrent lorsque le potentiel transmembranaire, qui est de -80 à -60 millivolts, diminue ou s'inverse, c'est-à-dire lorsque la membrane se dépolarise. Une telle dépolarisation se produit sous l'action de certains neuromédiateurs. Nous savons aussi que l'AMP cyclique augmente la fréquence d'ouverture des canaux Ca^{2+} [18]. Dans les cellules non excitables, il existe deux types différents de canaux Ca^{2+} . Une forme présente les mêmes caractéristiques que les canaux calciques des cellules excitables, c'est-à-dire qu'ils s'ouvrent lorsque la membrane plasmique est dépolarisée. Ils sont en outre inhibés par les antagonistes calciques. L'autre type de canal Ca^{2+} trouvé dans les cellules non excitables est insensible aux inhibiteurs calciques et est activé par la liaison des hormones sur leurs récepteurs. Ces canaux appelés « receptor operated calcium channel » sont pré-

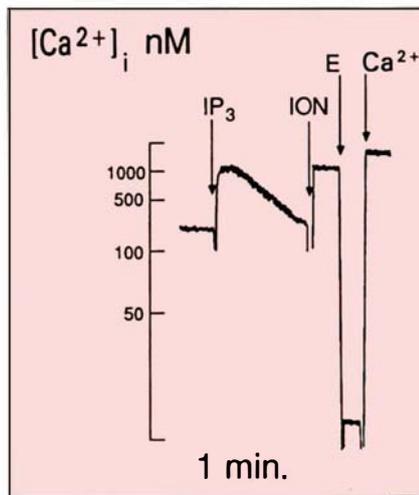


Figure 5. **Enregistrement de l'effet de l' IP_3 ($1\ \mu\text{M}$) dans les cellules hépatiques perméabilisées par la saponine ($50\ \mu\text{g/ml}$) et incubées dans un milieu dont la composition ionique reproduit celle du cytosol de la cellule (voir texte).** L' IP_3 provoque une perte rapide ($\leq 1\ \text{s}$) du Ca^{2+} séquestré dans le réticulum endoplasmique. L'effet est transitoire car l' IP_3 est rapidement dégradé par les phosphatases du cytosol, ce qui permet au réticulum endoplasmique de réaccumuler le Ca^{2+} perdu pendant la phase de perméabilisation. Ceci est illustré par le fait que la ionomycine (ION, $5\ \mu\text{M}$) qui est un ionophore à Ca^{2+} et accélère les échanges de Ca^{2+} à travers les membranes biologiques, libère de nouveau le Ca^{2+} accumulé. Expérience réalisée en présence de quin 2 ($10\ \mu\text{M}$) étaloné en fin d'expérience par l'addition d'EGTA ($200\ \mu\text{M}$) pour obtenir la fluorescence minimale et de Ca^{2+} ($300\ \mu\text{M}$) pour obtenir la fluorescence maximale (E = EGTA).

téristiques que les canaux calciques des cellules excitables, c'est-à-dire qu'ils s'ouvrent lorsque la membrane plasmique est dépolarisée. Ils sont en outre inhibés par les antagonistes calciques. L'autre type de canal Ca^{2+} trouvé dans les cellules non excitables est insensible aux inhibiteurs calciques et est activé par la liaison des hormones sur leurs récepteurs. Ces canaux appelés « receptor operated calcium channel » sont pré-

sents par exemple dans les hépatocytes.

Différents mécanismes ont été proposés récemment pour expliquer l'augmentation de l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique. Ainsi, par exemple, l' $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ active, dans les lymphocytes T, des canaux perméables au Ca^{2+} [19]. L' $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, qui provient de la phosphorylation de l' IP_3 , pourrait aussi servir de messager intracellulaire permettant l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique, comme le suggèrent des expériences effectuées sur les œufs d'oursin [20]. Enfin, dans les neutrophiles, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique entraîne l'ouverture de canaux non spécifiques permettant l'entrée de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique [21]. Ces données, pour l'instant préliminaires, conduisent à supposer que les inositols phosphates peuvent être aussi impliqués dans la mobilisation du Ca^{2+} extracellulaire. Cependant, il faut attendre de disposer d'autres résultats expérimentaux avant de pouvoir généraliser ces mécanismes de stimulation de l'influx calcique.

Lorsque le signal hormonal cesse, l' IP_3 n'est plus produit par la phospholipase C et il est rapidement dégradé en inositol qui redevient disponible pour la synthèse du phosphatidylinositol. Ce processus de dégradation fait intervenir plusieurs réactions enzymatiques qui commencent par l'action d'une IP_3 kinase et produit l' $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ qui, par l'action de différentes phosphomonoestérases, sera transformé en $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$, puis en IP_2 , IP et inositol [22]. Il apparaît ainsi plusieurs inositols polyphosphates au sein de la cellule et leurs rôles respectifs n'ont pas encore été élucidés. La concentration d' IP_3 dans la cellule étant revenue à son niveau de base, l'efflux de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique revient à son niveau de repos. De même, l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique diminue. Les pompes à Ca^{2+} de la membrane plasmique et du réticulum

RÉFÉRENCES

22. Irvine RF, Letcher AJ, Heslop JP, Bertridg MJ. The inositol tris/tetrakisphosphate pathway-demonstration of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -kinase activity in animal tissues. *Nature* 1986 ; 320 : 631-4.
23. Charest R, Blackmore PF, Berthon B, Exton JH. Changes in free cytosolic Ca^{2+} in hepatocytes following α_1 -adrenergic stimulation. Studies on quin 2-loaded hepatocytes. *J Biol Chem* 1983 ; 258 : 8769-73.
24. Mauger JP, Claret M. Mobilization of intracellular calcium by glucagon and cyclic AMP analogues in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 1986 ; 195 : 106-10.
25. Mauger JP, Poggioli J, Claret M. Synergistic stimulation of the Ca^{2+} influx in rat hepatocytes by glucagon and the Ca^{2+} -linked hormones vasopressin and angiotensin II. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 11635-42.
26. Wakelam MJO, Murphy GJ, Hrubby VJ, Houslay MD. Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature* 1986 ; 323 : 68-71.
27. Blackmore PF, Exton JH. Studies of the hepatic calcium-mobilizing activity of aluminium fluoride and glucagon. Modulation by cAMP and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 11056-63.
28. Burgess GM, Dooley RK, McKinney J, Nanberg E, Putney JW. Further studies on the interactions between the calcium mobilization and cyclic AMP pathways in guinea pig hepatocytes. *Mol Pharmacol* 1986 ; 30 : 315-20.
29. Poggioli J, Mauger JP, Claret M. Effect of cyclic AMP-dependent hormones and Ca^{2+} -mobilizing hormones on the Ca^{2+} influx and polyphosphoinositide metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1986 ; 235 : 663-9.
30. Rasmussen H, Barrett P. Calcium messenger system : an integrated view. *Physiol Rev* 1984 ; 64 : 938-84.
31. Claret M, Binet A. Mécanisme d'action des hormones mobilisant le calcium dans les hépatocytes de mammifères. *J Physiol (Paris)* 1984 ; 79 : 120-8.
- endoplasmique étant activées, elles ramènent rapidement la concentration du Ca^{2+} cytosolique à son niveau de repos 100 à 200 nM. Des études menées récemment sur le foie ou les hépatocytes remettent en question plusieurs certitudes sur le mode d'action des hormones qui utilisent l'AMP cyclique comme second messenger. Ainsi, par exemple, le glucagon modifie la distribution du Ca^{2+} dans les hépatocytes, de façon semblable à celle observée en présence d'hormones connues pour utiliser l' IP_3 comme messenger intracellulaire. Des études effectuées sur des hépatocytes chargés avec le quin 2 indiquent que le glucagon augmente la concentration de Ca^{2+} cytosolique [23]. Cette réponse est due en partie à la libération de Ca^{2+} depuis un réservoir intracellulaire identique à celui qui est sensible aux hormones mobilisant le Ca^{2+} [24]. De plus, il a été montré que le glucagon augmente l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique des hépatocytes et potentialise la réponse induite par les hormones mobilisant le Ca^{2+} [25]. Ces effets du glucagon sur la mobilisation du Ca^{2+} contenu dans le réticulum endoplasmique et la stimulation de l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique, sont également observés lorsque les hépatocytes sont stimulés par un agoniste β -adrénergique comme l'isoproterenol, ou par la forskoline qui stimule directement l'adénylcyclase. De même, l'incubation d'hépatocytes en présence d'analogues de l'AMP cyclique comme le dibutyryl AMP cyclique entraîne les mêmes effets que le glucagon sur les mouvements de Ca^{2+} . Il apparaît ainsi que l'augmentation du contenu cellulaire en AMP cyclique provoque une libération du Ca^{2+} contenu dans le réticulum endoplasmique et une stimulation de l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique. Un article récent [26] montre que le glucagon peut interagir avec deux types de récepteurs différents l'un étant couplé à l'adénylcyclase, l'autre entraînant l'activation de la phospholipase C qui hydrolyse le PIP_2 en IP_3 et en diacylglycérol. La stimulation de ce deuxième type de récepteur peut rendre compte en partie des effets du glucagon sur la distribution et les flux de Ca^{2+} . Cependant, il est clair que l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMP cyclique provoquée par l'hormone est également impliquée dans la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire et l'augmentation de l'influx de Ca^{2+} . Le mode d'action de l'AMP cyclique reste à ce jour l'objet de controverses. Il pourrait lui aussi provoquer l'hydrolyse du PIP_2 en IP_3 et en DAG [27] ce qui expliquerait que l'AMP cyclique produise les mêmes effets que les hormones mobilisant le Ca^{2+} . Mais certains laboratoires n'ont pu mettre en évidence d'accumulation d' IP_3 dans des hépatocytes stimulés par le glucagon ou incubés en présence d'analogues de l'AMP cyclique [28, 29]. Dans les cellules de foie, l'AMP cyclique et le Ca^{2+} contrôlent les mêmes fonctions métaboliques ; il est donc permis de penser que l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique provoquée par les hormones participe au développement complet de la réponse physiologique.

Protéines de liaison du Ca^{2+}

L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol entraîne la modification de nombreuses fonctions cellulaires qui vont de la contraction musculaire à la sécrétion ou la régulation d'enzymes impliquées dans le métabolisme. C'est en se fixant sur des protéines spécifiques que le Ca^{2+} remplit son rôle de signal intracellulaire. Les protéines récepteurs des ions Ca^{2+} lient le Ca^{2+} avec une haute affinité ($K_D = 10^{-8}$ à 10^{-6} M) et cette liaison produit des changements de conformation. Il en résulte une modification de leurs fonctions, ou de leur capacité à interagir avec d'autres protéines pour modifier leur fonction.

m/s n° 10 vol. 3, décembre 87

Parmi les enzymes qui voient leur activité directement modifiée par le Ca^{2+} , on peut noter la protéine kinase C ou des enzymes mitochondriales comme la pyruvate déshydrogénase ou l' α -cétoglutarate déshydrogénase [30]. D'autres protéines n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque. Cependant, lorsqu'elles lient le Ca^{2+} , elles subissent un changement de conformation leur permettant d'interagir avec d'autres protéines et aussi de modifier certaines fonctions de la cellule. Parmi ces protéines, on notera la troponine C qui joue un rôle important dans la contraction musculaire, la parvalbumine qu'on trouve dans le muscle squelettique, la chaîne légère de la myosine et enfin la calmoduline. Cette dernière, présente dans tous les types cellulaires, est capable d'agir sur un grand nombre d'enzymes dans la cellule. La calmoduline peut modifier le métabolisme des nucléotides cycliques en agissant sur l'adénylate-cyclase, la guanylate-cyclase ou la phosphodiesterase qui dégrade l'AMP cyclique. Elle stimule aussi la Ca^{2+} ATPase de la membrane plasmique dans plusieurs types cellulaires, et active différentes protéines kinases.

La calmoduline est une simple chaîne polypeptidique composée de 48 acides aminés qui peut fixer quatre ions Ca^{2+} . Cependant, les quatre sites de liaison du Ca^{2+} ne sont pas tous équivalents et il est probable que l'occupation des premiers sites modifie l'affinité des autres sites de liaison du Ca^{2+} . Cette plasticité de la sensibilité de la calmoduline pour le Ca^{2+} lui permet d'agir sur différentes fonctions cellulaires. Ainsi selon la concentration du Ca^{2+} cytosolique, la calmoduline interagit avec des protéines différentes. La calmoduline peut se trouver sous forme soluble dans le cytosol d'une cellule au repos ou bien faire partie intégrante d'un complexe enzymatique comme c'est le cas pour la phosphorylase kinase. Cette enzyme est constituée de quatre sous-unités appelées α , β ,

γ et δ . La sous-unité γ est l'unité catalytique et la sous-unité δ est identique à la calmoduline et rend l'enzyme sensible au Ca^{2+} . La phosphorylase kinase existe sous deux formes stables, phosphorylée ou non phosphorylée. L'enzyme phosphorylée par la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique a une constante de demi-activation pour le Ca^{2+} de $0,5 \mu\text{M}$ alors que l'enzyme non phosphorylée a une constante de $30 \mu\text{M}$. La phosphorylase kinase activée entraîne la phosphorylation de la glycogène phosphorylase b inactive pour la transformer en forme a active [31]. Parallèlement à l'activation de la phosphorylase kinase, le complexe calmoduline-Ca provoque une inhibition de la glycogène synthase par l'intermédiaire de la glycogène synthase kinase. Cette séquence d'événements permet au muscle de disposer du glucose nécessaire pour lui fournir de l'énergie et au foie de libérer le glucose dans le flux sanguin.

L'utilisation du Ca^{2+} comme signal intracellulaire ne se limite pas à la régulation de fonctions telles que le métabolisme du glucose, la sécrétion ou la division cellulaire mais permet aussi le développement de processus très rapides tels que la libération de neurotransmetteurs ou la contraction musculaire. Un tel rôle du Ca^{2+} n'est possible que parce que la concentration du Ca^{2+} cytosolique est très faible par rapport aux concentrations de Ca^{2+} dans les différents organites intracellulaires ou le milieu extracellulaire. Ainsi de faibles variations des flux de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique ou la membrane du réticulum endoplasmique entraînent des variations rapides et importantes de la concentration de Ca^{2+} cytosolique. Cependant, les mécanismes mis en jeu au cours d'une réponse hormonale qui permettent l'augmentation de l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique ou de l'efflux de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique stimulé par l' IP_3 , ne sont pas encore parfaitement élucidés ■

Summary

Several hormones or neurotransmitters use Ca^{2+} as intracellular signal to regulate metabolic pathways like glycolysis. The cytosolic Ca^{2+} concentration is maintained at low level (100-200) nM by means of a Ca^{2+} ATPase located in the plasma membrane, which actively pumps Ca^{2+} out of the cell. Two major intracellular organelles, the endoplasmic reticulum and, to a lesser extent, the mitochondria also actively accumulate Ca^{2+} . The Ca^{2+} mobilizing hormones induce the release of the Ca^{2+} contained in the endoplasmic reticulum by formation of the recently discovered second messenger Ins(1,4,5)-trisphosphate. These hormones also stimulate the Ca^{2+} influx of extracellular Ca^{2+} . The Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum and cell Ca^{2+} influx contribute to increase the Ca^{2+} concentration in the cytosol. The resulting activation of cell Ca^{2+} binding proteins like calmodulin induce the physiological response.

TIRÉS À PART

M. Claret : unité de recherches de physiologie et pharmacologie cellulaire, Inserm U 274, bâtiment 443, université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.