



**HAL**  
open science

# Canaux calciques des spermatozoïde de Mammifères Caractérisation des interactions fonctionnelles et moléculaires au cours de la réaction acrosomique

Severine Stamboulian

► **To cite this version:**

Severine Stamboulian. Canaux calciques des spermatozoïde de Mammifères Caractérisation des interactions fonctionnelles et moléculaires au cours de la réaction acrosomique. Biologie de la reproduction. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011465

**HAL Id: tel-00011465**

**<https://theses.hal.science/tel-00011465>**

Submitted on 25 Jan 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1  
SCIENCES, TECHNOLOGIE ET MEDECINE



*Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant*

## THESE

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**  
Discipline : **Biologie**

# Canaux calciques des spermatozoïdes de Mammifères

**Caractérisation des interactions fonctionnelles et  
moléculaires au cours de la réaction acrosomique.**

Dirigée par **Christophe Arnoult**

Présentée et soutenue publiquement par

**Séverine Stamboulian**

le 14 octobre 2005  
devant le jury composé de :

<b>Président :</b>	<b>Pr. Gilles Faury</b>
<b>Rapporteurs :</b>	<b>Dr Mohamed Benahmed</b> <b>Dr Joel Nargeot</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>Dr Sophie Pison-Rousseaux</b> <b>Dr Christophe Arnoult</b>

Thèse réalisée au sein du laboratoire *Canaux Calciques Fonctions et Pathologies*  
INSERM U 607 – DRDC / CEA – Grenoble



## Remerciements

*La thèse, quelle étape dans une vie, ou tout du moins dans ma vie...*

*Ces quatre années furent si riches en émotions et évènements qu'il va être difficile maintenant de faire une synthèse.*

Le fil conducteur de ces 4 années fut bien sûr Christophe. Que de qualités dans mon encadrement, je tiens à le remercier pour son investissement tout au long de ces années. Il a réussi à me communiquer son enthousiasme pour la recherche. J'ai énormément appris à ses côtés et je pense maintenant grâce à lui bénéficier d'un excellent bagage pour pouvoir continuer dans cette voie.

Je remercie les membres du jury : Joel Nargeot et Mohamed Benahmed pour avoir méticuleusement évalué mon travail de recherche; Sophie Rousseau qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury, Gilles Faury pour l'avoir présidé très efficacement.

J'adresse des remerciements particuliers à Michel Villaz qui m'a permis de débiter dans son laboratoire, ainsi qu'à Michel De Waard, qui a pris la suite, pour toute l'aide et l'attention qu'il m'a apporté au cours de ces 4 années.

Merci à nos collaborateurs Susan Treves et Francesco Zorzato pour leur contribution.  
Merci à Harvey Florman pour les nombreux conseils qu'il nous a fourni.

Merci à Marie Jo, Nathalie et Michel Ronjat pour leur implication tout au long du projet  
Merci à Isabelle pour ses nombreux conseils et sa disponibilité.  
Merci à tous les membres du laboratoire CIS/CCFP avec qui j'ai partagé des moments exceptionnels.

Je veux remercier particulièrement Julie qui m'a apportée sa fraîcheur et son amitié au quotidien ; Jean Claude qui a été pour moi un soutien essentiel.  
Merci à Stéphane pour sa bonne humeur.  
Merci à Christine et Fabien pour leur affectueuse amitié.

J'adresse mes sentiments les plus forts à Enguerrand pour m'avoir toujours si tendrement soutenu ; ainsi qu'à l'ensemble de la famille Billères, pour tout le réconfort qu'ils m'ont procuré.

Et le meilleur pour la fin, je remercie ma famille pour avoir toujours cru en moi.

Enfin, je remercie toutes les personnes que je n'ai pas citées mais qui ont été très importantes au cours de ces 4 années décisives dans ma vie.



# TABLE DES MATIERES.

<b>INTRODUCTION</b>	<i>1</i>
<b>Préambule</b>	<i>1</i>
<b>Chapitre 1 : Les canaux calciques</b>	<i>3</i>
1. Généralités sur les canaux	<i>3</i>
2. Diversité des canaux calciques	<i>3</i>
2.1. Les canaux calciques activés par le voltage (Voltage Operated Calcium Channels)	<i>5</i>
2.1.1. Introduction	<i>5</i>
2.1.2. Structure moléculaire et classification	<i>6</i>
2.1.2.1. Les 7 sous-unités $\alpha_{1S,C,D,F,A,B,E}$ ont été regroupées dans la famille des canaux HVA pour « High Voltage Activated »	<i>8</i>
2.1.2.2. Les 3 sous-unités $\alpha_{1G, H, I}$ appartiennent à la famille des canaux LVA pour « Low Voltage Activated »	<i>9</i>
2.1.3. Régulation des canaux T	<i>11</i>
2.1.3.1. La facilitation	<i>11</i>
2.1.3.2. Effets des hormones	<i>12</i>
2.1.3.3. Effet des modifications covalentes	<i>13</i>
2.1.3.4. Dans les cellules spermatogéniques	<i>13</i>
2.2. Les canaux récepteurs activés par la liaison d'un agoniste (Receptor Activated Channels)	<i>13</i>
2.3. Les canaux sensibles au relâchement de calcium des stocks intracellulaires (Store-Operated Channel)	<i>14</i>
2.3.1. Les canaux TRPCs	<i>17</i>
2.3.2. TRPC2.	<i>19</i>
2.3.3. Les différents partenaires connus des TRPCs	<i>21</i>
2.3.3.1. Le récepteur à l'IP3	<i>21</i>
2.3.3.2. Homer	<i>21</i>
2.3.3.3. La junctate	<i>22</i>
2.3.2.4. L'enkurin	<i>23</i>

2.4. Les canaux des stocks calciques	23
2.4.1. Le Récepteur à l'Inositol Triphosphate	23
2.4.1.1. Régulation par le calcium	25
2.4.1.2. Régulation par des phosphorylations	25
2.4.1.3. Régulation par les nucléotides	26
2.4.1.4. Régulation par des interactions protéines-protéines	26
2.4.2. Le Récepteur de la Ryanodine (RyR)	26
3. Les protéines de liaison du calcium	27
4. Les chélateurs de calcium	28
5. Maintien de l'homéostasie calcique †	28
5.1. Les pompes calciques	28
5.2. Rôle des mitochondries	29
6. Méthodes d'études des canaux	30
6.1 Electrophysiologie	30
6.2. Imagerie	32
6.3. La technique du « planar bilayer » ou des membranes artificielles	32
6.4. La biochimie et la biologie moléculaire	32
<b>Chapitre 2. Signalisation calcique dans le spermatozoïde de Mammifère</b>	<b>33</b>
1. Le spermatozoïde et la réaction acrosomique : contexte physiologique	33
1.1. Le spermatozoïde	33
1.1.1 Morphologie	33
1.1.2 Maturation	34
1.1.2.1. La capacitation	34
1.1.2.2. L'hyperactivation	35
1.2. La réaction acrosomique	35
1.2.1. La zone pellucide	35

1.2.2. Mécanisme de la réaction acrosomique	37
2. La réaction acrosomique : une signalisation calcique particulière	38
2.1. Les canaux calciques dépendants du voltage de type T	39
2.1.1. Méthodologie	39
2.1.2. Historique concernant la mise en évidence d'un canal dépendant du voltage dans la RA	41
2.2. Le récepteur à l'IP <sub>3</sub>	43
2.2.1. Dans les cellules spermatogéniques	43
2.2.2. Dans le spermatozoïde mature	44
2.3. Les canaux TRPCs	45
2.3.1. TRPC2	46
2.3.2. Les autres TRPCs	47
<b>PROBLEMATIQUE</b>	48
<b>RESULTATS</b>	
Article 1 : Interaction fonctionnelle entre les canaux LVA des cellules spermatogéniques et les canaux calciques modulés par la Thapsigargine	51
Introduction	52
Conclusion	53
Article 2 : Caractérisation biophysique et pharmacologique des courants calciques de type T dans les souris KO pour le canal calcique Cav3.1 ( $\alpha_{1G}$ ) : Cav3.2 ( $\alpha_{1H}$ ) est le canal calcique principal dans les cellules spermatogéniques sauvages.	56
Introduction	57
Conclusion	58
Article en préparation : Les canaux calciques LVA du spermatozoïde : étude chez les souris déficientes en $\alpha_{1H}$ .	60
Introduction	61
Résultats	61



Conclusion	64
Article 3 : La junctate, une protéine associée à l'IP3R, est présente dans les spermatozoïdes de souris et interagit avec les canaux TRPC2 et TRPC5 mais pas avec TRPC1	65
Introduction	66
Conclusion	67
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	70
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	78

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.

### Figures.

- Figure 1 :** Schéma des principaux mécanismes de contrôle de l'homéostasie calcique intracellulaire dans les cellules eucaryotes. 4
- Figure 2 :** Représentation schématique des différents états des canaux calciques activés par le voltage. 5
- Figure 3 :** Représentation schématique de la structure des canaux calciques. 6
- Figure 4 :** Phylogénie des canaux calciques dépendants du voltage. 7
- Figure 5 :** Facilitation du canal calcique dépendant du voltage : exemple du canal T des cellules spermatogéniques. 12
- Figure 6 :** Différentes hypothèses d'activation des SOCs. 15
- Figure 7 :** Mode d'action de la thapsigargine. 16
- Figure 8 :** Homologie entre les différents TRPCs. 17
- Figure 9 :** Organisation structurale des TRPCs. 18
- Figure 10 :** TRPC2 est codé par quatre différents isoformes. 20
- Figure 11 :** Représentation schématique des protéines junctine, junctate et Aspartate  $\beta$  Hydroxylase. 22
- Figure 12 :** Structure de l'IP3R de type I. 24
- Figure 13 :** Les systèmes de transport impliqués dans les mouvements calciques entre le cytosol et la matrice mitochondriale. 30
- Figure 14 :** Les différentes configurations du patch-clamp. 31
- Figure 15 :** Le spermatozoïde de Mammifère. 33
- Figure 16 :** La zone pellucide de l'œuf. 36
- Figure 17 :** La réaction acrosomique. 37
- Figure 18 :** Représentation schématique de la signalisation calcique biphasique au cours de la réaction acrosomique. 39
- Figure 19 :** Différents stades de la spermatogenèse. 40

<b>Figure 20 :</b> Enregistrement du courant transitoire calcique suivant l'addition de ZP3 sur des spermatozoïdes chargés en Mag Fura.	41
<b>Figure 21 :</b> Marquage immunofluorescent sur Spermatozoïde de rat avec un AC anti IP3R.	44
<b>Figure 22 :</b> La thapsigargine active un influx de calcium dans des spermatozoïdes chargés en Fura 2.	45
<b>Figure 23 :</b> Les anticorps anti TRPC2.	46
<b>Figure 24 :</b> Localisation des TRPCs dans le spermatozoïde mature.	47
<b>Figure 25 :</b> Scénario proposé pour la signalisation calcique de la RA	48
<b>Figure 26 :</b> Modèle spéculatif d'organisation des flux calciques au cours de la signalisation calcique de la RA.	
<b>Figure 27:</b> Exemple de traces obtenues après mesure de courants calciques dans les cellules spermatogéniques des souris déficiente pour $\alpha 1_G$ et dans les cellules spermatogéniques des souris déficientes pour $\alpha 1_H$ .	61
<b>Figure 28 :</b> WB anti- $\alpha 1_H$ sur extrait de protéines acrosomales.	62
<b>Figure 29 :</b> Immunolocalisation de $\alpha 1_H$ chez le spermatozoïde mature de souris OF1 et de souris déficiente pour $\alpha 1_H$ .	62
<b>Figure 30 :</b> Immunolocalisation d' $\alpha 1_H$ au niveau de spermatozoïdes contrôle et de spermatozoïdes ayant accompli leur RA.	63
<b>Figure 31 :</b> Comparaison de la mobilité des spermatozoïdes des souris déficientes pour $\alpha 1_G$ et $\alpha 1_H$ par rapport à des souris contrôles.	64
<b>Figure 32 :</b> Organisation spéculative.	69
<b>Tableaux.</b>	
<b>Tableau 1:</b> Propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux calciques dépendant du voltage.	9
<b>Tableau 2:</b> Comparaison des trois types de canaux de type T clonés.	10
<b>Tableau 3:</b> Comparaison des caractéristiques biophysiques et pharmacologiques des courants calciques T des cellules spermatogéniques par rapport à la réaction acrosomique.	42
<b>Tableau 4:</b> Nomenclature, composition, expression des canaux calciques voltage dépendant HVA dans le spermatozoïde.	73

## LISTE DES ABREVIATIONS.

<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AID</b>	<i>Alpha Interaction Domain</i>
<b>AMPA</b>	Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-methyl-isaxazole-4-propionic acid
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>Ba<sup>2+</sup></b>	Baryum
<b>BID</b>	<i>Beta Interaction Domain</i>
<b>BSA</b>	Serum Albumine Bovine
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CaM</b>	Calmoduline
<b>CAMKII</b>	Ca <sup>2+</sup> Calmoduline Kinase II
<b>CCVD</b>	Canal calcique dépendant du voltage
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	Ion cadmium.
<b>CHO</b>	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
<b>CHO-NTR</b>	Cellules CHO qui surexpriment le récepteur de la Neurotensine
<b>CIF</b>	Facteur diffusible calcique intracellulaire
<b>CIRB</b>	<i>CaM /IP3R Binding Domain</i>
<b>COS</b>	Cellules Fibroblastiques de Singe
<b>Cter</b>	extrémité terminale COOH
<b>Cyt C</b>	Cytochrome C
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>ΔV</b>	Dépolarisation de la membrane
<b>DHP</b>	Dihydropyridines
<b>DHPR</b>	Récepteur aux DHP
<b>Epo</b>	Erythropoïétine
<b>FKBP12</b>	<i>FKBinding Protein12</i>
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescence Protein</i>
<b>GMPc</b>	Guanosine Monophosphate Cyclique
<b>GST</b>	Glutathion S-tranferase.
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HEK</b>	<i>Human Embryonic Kydney</i>
<b>HVA</b>	<i>High Voltage Activated</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	Valeur de concentration de demi inhibition
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1, 4,5- triphosphate
<b>IP3R</b>	Récepteur à l' IP <sub>3</sub>
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion potassium
<b>KDa</b>	KiloDalton
<b>KO</b>	<i>Knock Out</i>
<b>LVA</b>	Low Voltage Activated
<b>mGluR</b>	Récepteur métabotropique au glutamate.
<b>μM</b>	Micromolaire
<b>ms</b>	Milliseconde
<b>mV</b>	MilliVolt
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ion Sodium

<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
<b>NCE</b>	<i>Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger</i>
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	Ion nickel
<b>nM</b>	Nanomolaire
<b>NMDA</b>	N-méthyl D aspartate
<b>Nter</b>	Extrémité terminale NH <sub>2</sub>
<b>OAG</b>	1-oleoyl-2 Acetylglycérol
<b>pA</b>	PicoAmpère
<b>PIP2</b>	Phosphatidyl inositol diphosphate
<b>PKA</b>	Protéine Kinase A
<b>PKC</b>	Protéine Kinase C
<b>PKG</b>	Protéine Kinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PMCA</b>	Ca <sup>2+</sup> ATPase de la membrane plasmique
<b>pS</b>	PicoSiemens
<b>PTP</b>	<i>Permeability Transitory Pore</i>
<b>RA</b>	Réaction Acrosomique
<b>RyR</b>	Récepteur de la Ryanodine
<b>ROC</b>	<i>Receptor Operated Channel</i>
<b>RAC</b>	<i>Receptor Activated Channel</i>
<b>SERCA</b>	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
<b>SOC</b>	<i>Store Operated Channel</i>
<b>SH3</b>	Src Homology
<b>SNARE</b>	Récepteur aux protéines associées aux Synaptosomes
<b>TRPC</b>	<i>Canonical Transient Receptor Protein</i>
<b>Vm</b>	Potentiel de membrane
<b>VNO</b>	Organe voméronasal
<b>VOCC</b>	<i>Voltage Operated Calcium Channel</i>
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>ZP</b>	Zone pellucide

### **Préambule.**

Le calcium est un messager secondaire ubiquitaire impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. Contrairement aux autres messagers secondaires, il n'est pas métabolisé par la cellule au repos. La concentration cytoplasmique de calcium libre est faible, de l'ordre de 100 nM. Dans la cellule, le  $\text{Ca}^{2+}$  provient de deux sources, soit du milieu extracellulaire où sa concentration plus élevée atteint 2 mM, soit des stocks intracellulaires comme le réticulum. Sa concentration doit être finement régulée par la cellule. Cette régulation s'effectue par le biais de protéines membranaires appelées canaux calciques permettant le passage du calcium vers l'intérieur de la cellule.

Le calcium est essentiel au cours de la fécondation. Au laboratoire, nous nous intéressons au rôle du calcium au cours de la réaction acrosomique (RA) du spermatozoïde de Mammifères. Il s'agit d'une exocytose tout à fait particulière permettant la libération des enzymes contenues au niveau de l'acrosome. Celle-ci est initiée par la liaison à la zone pellucide de l'ovocyte qui déclenche une augmentation transitoire en calcium, suivie d'une augmentation soutenue. Cette signalisation implique l'activation et la régulation de canaux calciques. Ces canaux ont été identifiés :

Un canal dépendant des variations de potentiel de type T.

Un canal Récepteur à l'inositol 1, 4, 5- triphosphate (IP3R).

Un canal « Store Operated Channels » (SOC), TRPC2 activé par la vidange des stocks calciques intracellulaires.

Il est clairement établi que ces trois types de canaux s'activent successivement au cours de la signalisation calcique de la réaction acrosomique. Cependant, le rôle physiologique respectif des flux calciques de chacun de ses trois canaux reste encore largement incompris. L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre les modes d'activation et la régulation des différents canaux calciques impliqués dans la réaction acrosomique du spermatozoïde de Mammifère. La compréhension de ces mécanismes physiologiques nécessite la caractérisation moléculaire des canaux impliqués. Celle-ci a été effectuée pour l'IP3R chez l'homme (Kuroda et al., 1999), qui est l'IP3R de type I et pour le canal SOC, qui a été montré comme étant TRPC2 chez la souris (Jungnickel et al., 2001). En ce qui concerne le canal voltage dépendant, la caractérisation moléculaire n'a pas encore été effectuée. Nous avons focalisé nos recherches sur ce canal, dont l'inhibition au cours de la RA, inhibe toute signalisation calcique ultérieure. Nous avons pu caractériser la nature moléculaire de ce canal par l'utilisation de souris déficientes pour certains types de canaux

calciques. Au cours d'un premier article, nous avons mis en évidence une interaction fonctionnelle entre les trois canaux calciques impliqués dans la RA. Nous avons ensuite voulu caractériser le mode d'activation des canaux SOC dans le spermatozoïde en recherchant des partenaires putatifs pour TRPC2 qui pourrait faire le lien entre les trois protagonistes de la signalisation calcique qui gouverne la RA du spermatozoïde.

## Chapitre 1 : Les canaux calciques.

### 1. Généralités sur les canaux.

Les canaux sont des protéines enchâssées dans la membrane permettant le passage d'ions à travers cette membrane suivant le gradient électrochimique. Le passage de ces ions peut s'effectuer de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur de la cellule et inversement.

Les canaux sont caractérisés par leur sélectivité ionique. Cette sélection s'effectue par le biais de contacts étroits entre le pore et les ions. Le pore doit permettre le passage spécifique d'ions selon leur taille et leur charge. De plus, ces ions ne doivent pas lier de molécules d'eau. Leur déshydratation est importante pour le passage à travers le pore.

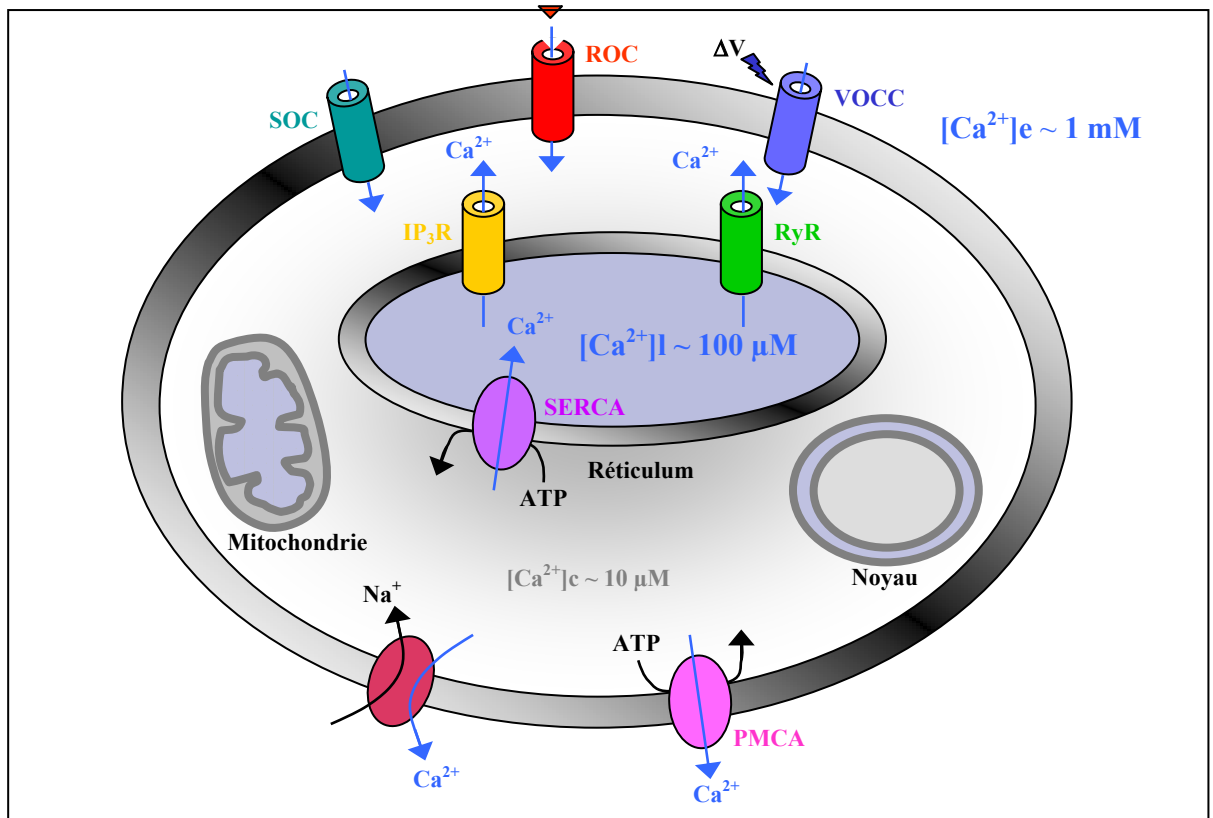
Les canaux constituent des portes à travers la membrane. Ils doivent permettre un contrôle des flux ioniques. Les canaux oscillent entre l'état ouvert et fermé. L'ouverture nécessite un stimulus. Le canal peut s'ouvrir :

- suite à la modification du potentiel de repos de la membrane,
- suite à la liaison d'un ligand,
- suite à une stimulation mécanique,

### 2. Diversité des canaux calciques.

La signalisation calcique s'effectue via des augmentations de concentration et nécessite le transfert du calcium des espaces intra et extracellulaires de stockage vers le cytoplasme, par l'intermédiaire de *canaux calciques*. Il existe différents types de canaux qui se différencient par leur stimulus d'activation et leur localisation cellulaire (Figure 1).





**Figure 1: Schéma des principaux mécanismes de contrôle de l'homéostasie calcique intracellulaire dans les cellules eucaryotes.**

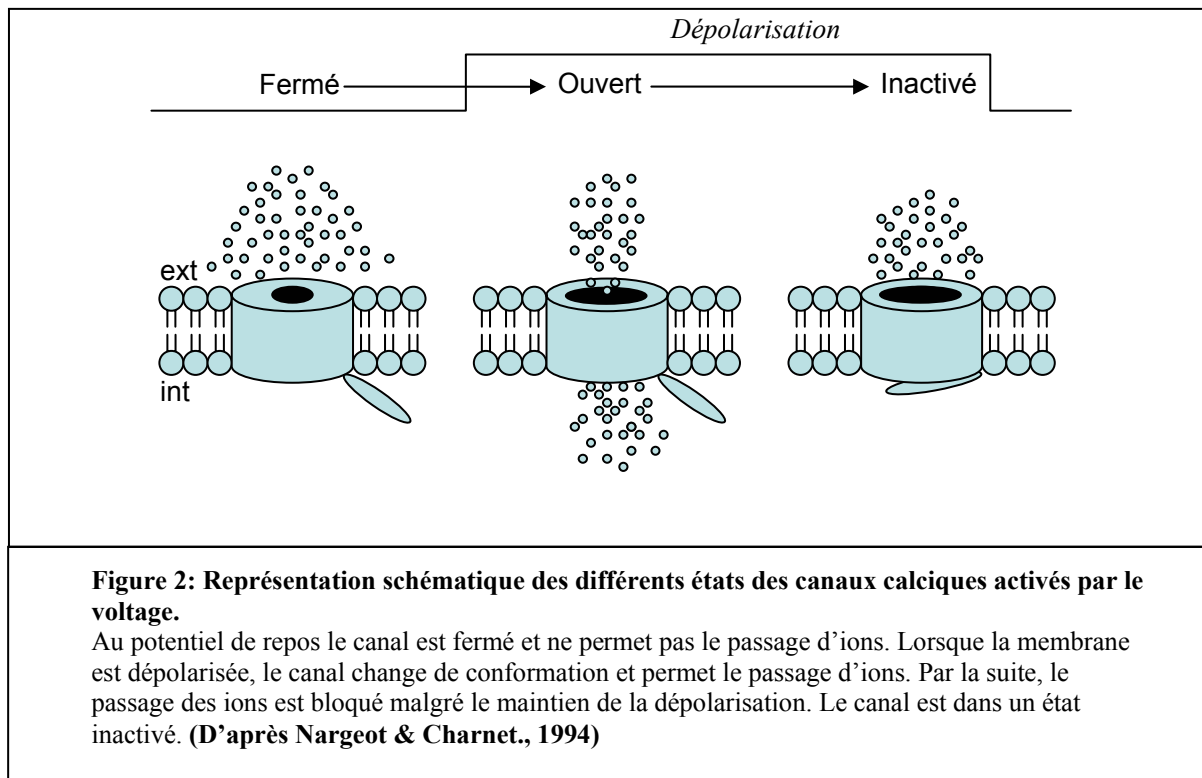
L'influx d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le cytosol est assuré par différents types de canaux calciques de la membrane plasmique: les SOC (pour *Store Operated Channels*), les ROC (pour *Receptor Operated Channel*) et les VOCC (pour *Voltage Operated Calcium Channels*). La libération d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des stocks calciques internes (réticulum endoplasmique essentiellement) est déclenchée par l'ouverture de canaux calciques intracellulaires: le récepteur à la ryanodine (RyR) et le récepteur à l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>R). Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  cytosoliques sont séquestrés dans le réticulum grâce aux pompes de type SERCA (pour *Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) et extrudés grâce à l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et à la pompe PMCA (pour *Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase*). D'autres organites intracellulaires interviennent dans la régulation de l'homéostasie calcique, notamment les mitochondries et le noyau.

## 2.1. Les canaux calciques activés par le voltage (Voltage Operated Calcium Channels).

### 2.1.1. Introduction.

Il s'agit de protéines transmembranaires qui laissent entrer le calcium dans la cellule en réponse à une dépolarisation de la membrane.

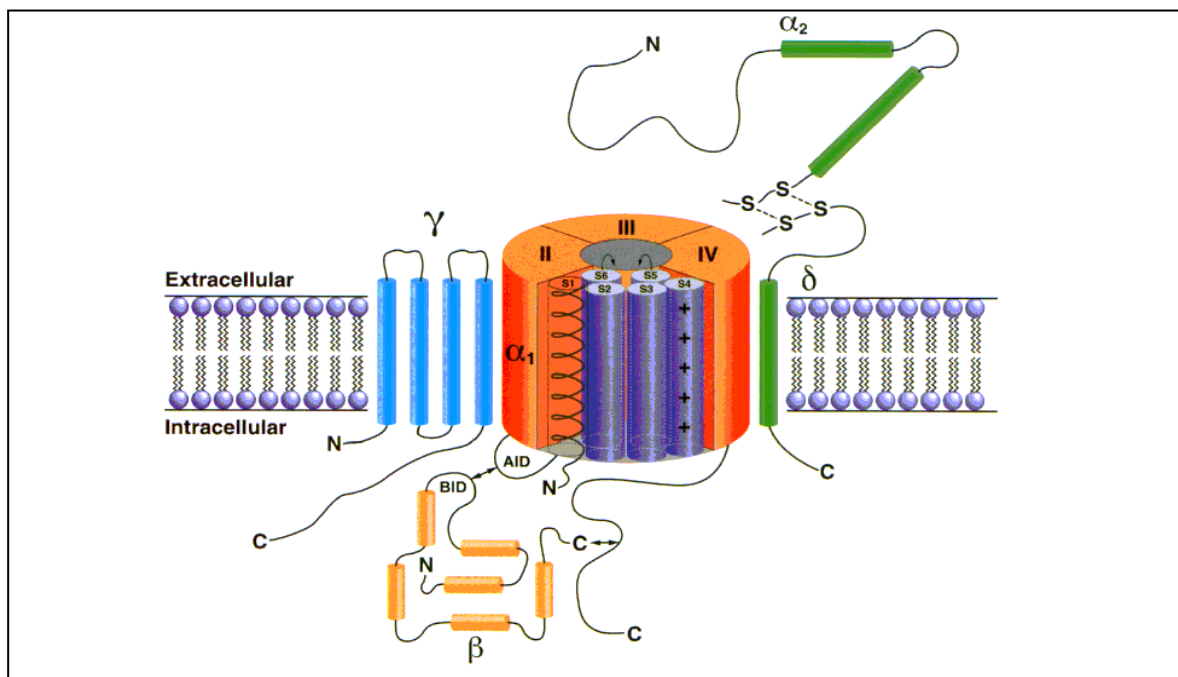
Dans la majorité des cellules, le potentiel de repos de la membrane est déterminé par l'équilibre des ions  $K^+$ . Ainsi une augmentation de la concentration extracellulaire des ions  $K^+$  et le déplacement du potentiel qui suit peuvent être utilisés pour activer les canaux calciques dépendant du voltage. Pour les canaux calciques sensibles à la dépolarisation, le passage du potentiel de repos à un potentiel plus positif permet l'ouverture transitoire du canal et l'entrée de calcium dans la cellule, le canal est alors activé. Le canal passe progressivement dans un état inactivé où l'entrée de calcium est bloquée par un changement de conformation de la protéine. Le canal est dans un état réfractaire et ne peut plus être activé (Figure 2).



### 2.1.2. Structure moléculaire et classification.

Les VOCCs sont des protéines hétéro-oligomériques. Ils possèdent une structure commune la sous-unité  $\alpha_1$  qui forme le pore du canal. Cette protéine contient le filtre sélectif ionique, le senseur du voltage et les sites de fixation des drogues. Elle est constituée de quatre domaines homologues (I-IV). Chaque domaine comprend six domaines transmembranaires (S1-S6) séparés par des boucles intra et extracellulaires. Les S5, S6 ainsi que les boucles liants les domaines 5 et 6 de chaque motif constituent le pore (McClesky, 1994). Les hélices IIIS5, IIIS6 et IVS6 forment le domaine de liaison des dihydropyridines (DHP) pour les canaux de type L.

Cette sous-unité  $\alpha_1$  peut fonctionner comme un canal fonctionnel lors d'expression dans des systèmes hétérologues mais, elle est généralement associée à des protéines auxiliaires :  $\alpha_2$  lié à  $\delta_2$  par un pont disulfure,  $\beta$  et  $\gamma$  (Figure 3). Les sous-unités auxiliaires régulent l'expression et les caractéristiques biophysiques de la sous-unité  $\alpha_1$  avec laquelle elles s'associent. Il a été montré que la sous-unité  $\beta$  est capable d'augmenter l'amplitude du courant L (Lacerda et al., 1991).

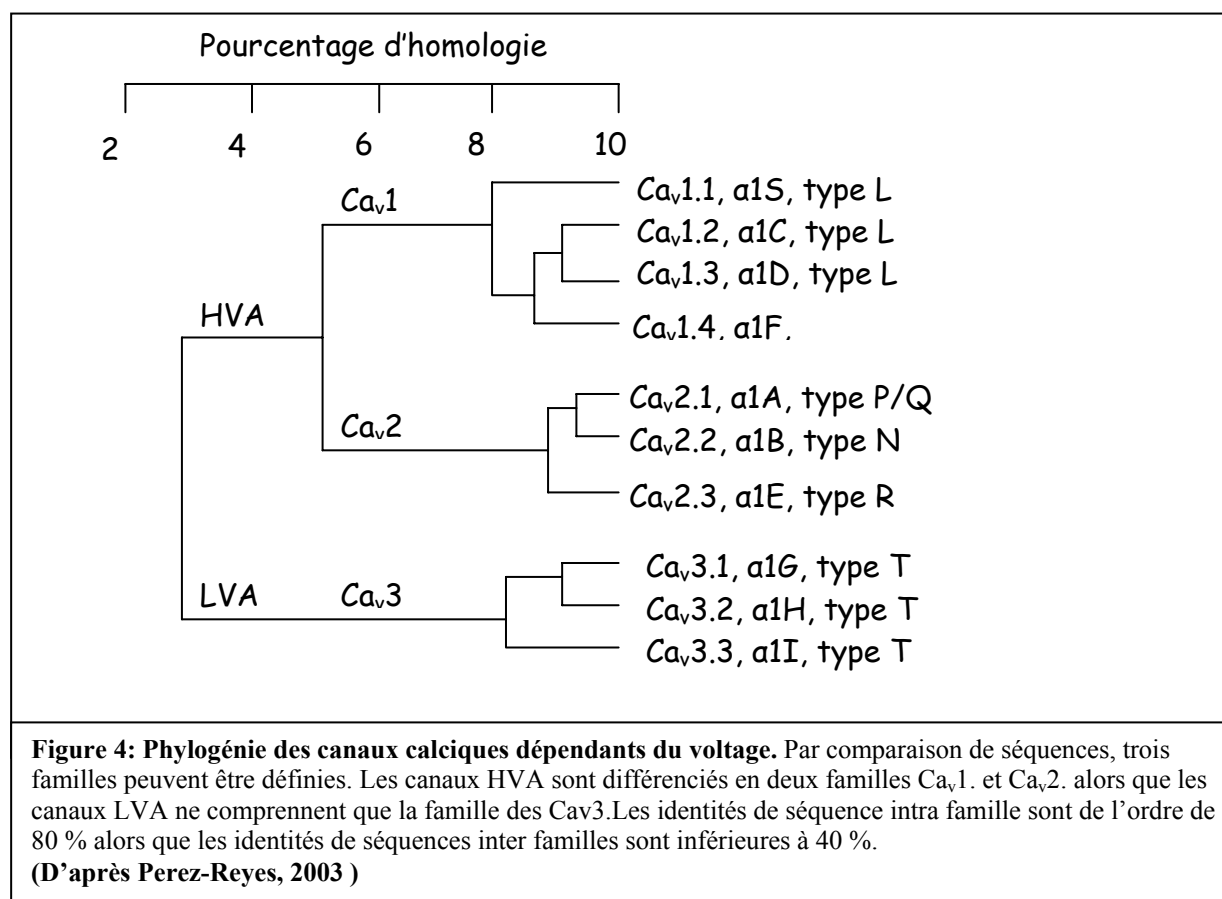


**Figure 3: Représentation schématique de la structure des canaux calciques.**

Les canaux calciques sont constitués d'une sous-unité principale  $\alpha_1$  qui constitue notamment le pore du canal. Elle comprend 4 domaines membranaires (I-IV) qui possèdent chacun 6 hélices transmembranaires (S1-S6) relié par des boucles intra et extracellulaires. Des sous unités auxiliaires peuvent être présentes. La sous-unité  $\beta$  est essentiellement cytosolique et s'associe à la sous-unité  $\alpha_1$  au niveau d'une séquence appelé AID (« Alpha Interaction Domain ») par le biais de sa séquence BID (« Beta Interaction Domain »). La sous-unité  $\gamma$  est membranaire. La sous-unité  $\alpha_2\delta$  a une partie membranaire et une partie extracellulaire.

Après le clonage de son ADNc, la séquence primaire de la sous-unité  $\alpha 1$  a montré des homologies avec la sous-unité qui forme le pore des canaux sodiques dépendants du voltage. En effet, la sous-unité  $\alpha 1$  comprend le senseur du voltage et constitue le pore permettant le passage du calcium vers l'intérieur de la cellule.

Dix gènes homologues ont été clonés pour la sous-unité  $\alpha 1$  et classés en fonction de leur degré d'homologie pour les régions putatives transmembranaires et du pore (Figure 4). Les séquences en acides aminés de ces sous-unités  $\alpha 1$  présentent 80 % d'homologie au sein d'une même famille, mais moins de 40 % d'homologie entre les différentes familles (Ertel et al., 2000). Un grand nombre de variants d'épissages ont été décrits pour ces sous-unités  $\alpha 1$  (Bourinet et al., 1999). La diversité de cette molécule explique les différents courants calciques observés.



Il existe deux classes de canaux calciques activés par le voltage. La classification de ces canaux a tous d'abord été fondée sur des critères électrophysiologiques (Tsien et al., 1991) puis des critères pharmacologiques se sont rajoutés avec la découverte de toxines spécifiques. Sur l'ensemble de ces critères, six classes de canaux ont été clairement identifiés et regroupés en deux grandes familles en fonction du seuil d'activation (Nargeot and Charnet, 1994).

2.1.2.1. Les 7 sous-unités  $\alpha_{1S,C,D,F,A,B,E}$  ont été regroupées dans la famille des canaux HVA pour « High Voltage Activated » (tableau 1).

Ces canaux sont activés par de fortes dépolarisations. Ils nécessitent une dépolarisation de la membrane supérieur à  $-30$  mV pour être activé. Ils ont une conductance élémentaire entre 11 et 25 pS. Une perméabilité aux ions baryum supérieur aux ions calcium.

Ils sont séparés en plusieurs familles :

- L pour « Long Lasting » : la caractéristique principale de ces canaux est leur sensibilité aux dihydropyridines qui sont des antagonistes des canaux calciques. Ces canaux sont impliqués, entre autre, dans le couplage excitation-contraction des muscles squelettiques, lisses et cardiaques où ils permettent la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique via les récepteurs de la ryanodine.

- N pour « Neuronal » : ces canaux présentent une inactivation importante et s'activent pour de fortes dépolarisations. Au niveau pharmacologique, ces canaux N sont bloqués par l'application de  $\omega$ -conotoxine GVIA spécifiquement. Ces canaux sont essentiellement neuronaux et se localisent au niveau synaptique où ils sont impliqués dans la libération des neurotransmetteurs.

- P/Q : Les canaux P sont exprimés, en majorité, dans les cellules de Purkinje du cervelet alors que les canaux Q ont été localisés dans les cellules granulaires du cervelet. La distinction fonctionnelle entre ces deux types de canaux n'est pas claire. Ils appartiennent donc à une famille unique appelé P/Q. Ils sont codés par la même sous-unité  $\alpha_{1A}$  qui est la sous unité majoritaire dans le cerveau. La souris KO pour la sous-unité  $\alpha_{1A}$  présente une ataxie progressive et une transmission synaptique altérée. L'étude du phénotype associé à l'absence de sous-unité  $\alpha_{1A}$  est compliquée car les autres canaux calciques sont surexprimés chez cette souris (Toru et al., 2000).

- R : ce sont les canaux les moins caractérisés parmi les canaux HVA. Ces courants ont été enregistrés dans les neurones granulaires du cervelet chez le rat. Ils sont classifiés comme haut seuil alors que leur cinétique diffère des autres HVA et se rapproche des LVA. La sous-unité  $\alpha_{1E}$  a été identifiée pour induire les courants R (Piedras-Renteria and Tsien, 1998). Une toxine issue de la tarentule, la SNX-482 bloque sélectivement ces courants (Newcomb et al., 1998).

Type	Activation	Inactivation	Conductance	Ba <sup>++</sup> /Ca <sup>++</sup>	DHP	Autres	Toxines	Ions divalents
L	Haut seuil	Lente	20-25 pS	Ba <sup>++</sup> >Ca <sup>++</sup>	+++	Diltiazem Vérapamil	-	Cd <sup>++</sup> >Ni <sup>++</sup>
T	Bas seuil	Rapide	8 pS	Ca <sup>++</sup> >Ba <sup>++</sup>	+/-	Amiloride < 500µM Pimozide < 0.5 µM mibefradil	-	Ni <sup>++</sup> > Cd <sup>++</sup>
N	Haut seuil	Lente	10-12 pS	Ba <sup>++</sup> >Ca <sup>++</sup>	-		ω - CgT-GVIA ω - CmT MVIIA +++	Cd <sup>++</sup> >Ni <sup>++</sup>
P	Haut seuil	Intermédiaire	?	Ba <sup>++</sup> >Ca <sup>++</sup>	-		ω - Aga-IVA +++	?
Q	Haut seuil	Intermédiaire	10-20 pS	Ba <sup>++</sup> >Ca <sup>++</sup>	-		ω - CmT MVIIC +++	?
R	Intermédiaire	Rapide	-	Ca <sup>++</sup> >Ba <sup>++</sup>	-	-	SNX-482	Ni < 1µM

Tableau 1: Propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux calciques dépendant du voltage (modifié de Nargeot and Charnet, 1994).

2.1.2.2. Les 3 sous-unités  $\alpha_{1G, H, I}$  appartiennent à la famille des canaux LVA pour « Low Voltage Activated ».

Ces canaux sont également appelés canaux calciques de type T pour « Transient ». Ils s'ouvrent pour des potentiels de membranes significativement plus négatifs et proches du potentiel de repos ( $> -70$  mV) (tableau 1).

Les canaux T sont constitués uniquement par une sous-unité  $\alpha_1$  et ne possèdent pas de sous-unités auxiliaires. Les trois isoformes,  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$  appartiennent à une nouvelle famille de canaux calciques. L'équipe de Perez-Reyes est responsable en grande majorité du clonage de ces trois isoformes. Alors que les premières sous-unités  $\alpha_1$  avaient été clonées à partir du muscle squelettique puis à partir de cerveau, le clonage de ses trois sous-unités s'est effectué d'une manière beaucoup plus moderne : le clonage *in silico*. Cette méthode consiste à cribler des banques de données avec une séquence spécifique, par exemple, la séquence putative du pore des sous-unités  $\alpha_1$ . Les séquences d'intérêts sont ensuite isolées par RT-PCR, puis utilisées comme sonde pour le clonage des sous-unités  $\alpha_1$ . Le premier membre des canaux calciques de type T,  $\alpha_{1G}$ , a été cloné chez le rat (Perez-Reyes, 1998), la souris

(Klugbauer et al., 1999) et à partir de tissus neuronaux chez l'homme (Monteil et al., 2000a). Des expressions hétérologues dans l'ovocyte de Xénopes ont montré que  $\alpha 1_G$  correspond aux courants T. En effet, cette étude fonctionnelle montre une adéquation entre les potentiels d'activation, l'inactivation rapide, la désactivation lente et la faible conductance d'environ 7,5 pS.

Le gène codant pour la sous-unité  $\alpha 1_H$  a ensuite été cloné à partir de tissu cardiaque humain (Cribbs et al., 1998). La séquence de l'ADNc correspond à la structure générale des canaux calciques dépendant du voltage et montre beaucoup d'homologies avec la sous-unité  $\alpha 1_G$ . Les deux protéines possèdent environ 70% d'homologie.

La sous-unité  $\alpha 1_I$  a ensuite été identifiée chez le rat (Lee et al., 1999a) et chez l'homme (Monteil et al., 2000b).

Ces trois canaux T possèdent des caractéristiques proches mais des différences marquées qui permettent de les caractériser spécifiquement (tableau 2).

	Ca <sub>v</sub> 3.1	Ca <sub>v</sub> 3.2	Ca <sub>v</sub> 3.3
	$\alpha 1_G$	$\alpha 1_H$	$\alpha 1_I$
<i>Electrophysiologie :</i>			
Seuil d'activation	-70 mV	-70 mV	-70 mV
Pic de la courbe courant tension	-30 mV	-30 mV	-30 mV
Cinétique d'activation	1 ms	2 ms	7 ms
Cinétique d'inactivation	11 ms	16 ms	69 ms
Recouvrement de l'inactivation	117 ms	395 ms	352 ms
<i>Pharmacologie :</i>			
Nickel (IC <sub>50</sub> )	250 $\mu$ M	12 $\mu$ M	216 $\mu$ M
Mibefradil (IC <sub>50</sub> en 10 mM Baryum)	1,2	1,1	1,5

**Tableau 2: Comparaison des trois types de canaux de type T clonés (d'après Perez-Reyes, 2003).**

$\alpha 1_I$  s'active et s'inactive plus lentement que  $\alpha 1_G$  et  $\alpha 1_H$ . Ils ont une distribution spécifique dans le cerveau.

Dans le cœur, les canaux calciques de type T sont fortement exprimés dans le sinus atrial, dans le tissu nodal atrio ventriculaire et dans les cellules de Purkinje (Shorofsky and Balke, 2001). En revanche, ils sont presque absents dans les cellules atriales et ventriculaires. Cette distribution est en adéquation avec leur rôle putatif de promoteur de l'influx pacemaker. Ils auraient un rôle dans la génération du potentiel d'action dans les cellules qui ont peu de canaux sodiques comme le muscle squelettique vasculaire.

La pharmacologie des canaux de type T est peu développée. Certaines drogues et des composés inorganiques affectent ces canaux : l'amiloride et son dérivé le 3,4-

dichlorobenzamil, le vérapamil, le diltiazem, le flunarizine, la tétradine, le pimozide. Le nickel et le cadmium bloquent également les canaux T. Cependant, tous ces agents bloquent également les canaux de type L et ne permettent pas de caractériser spécifiquement les canaux T. Récemment, un nouvel antagoniste des canaux calciques a été découvert : le mibefradil. Celui-ci montre une sélectivité plus marquée pour les canaux T par rapport aux canaux L. Le mibefradil est l'une des premières molécules qui affecte ces canaux à des concentrations inférieures à 1  $\mu\text{M}$  (Clozel et al., 1997). Les trois différents isoformes des canaux T peuvent être différenciés par leur sensibilité au nickel : l'ion nickel bloque  $\alpha_{1H}$  avec une  $IC_{50}$  d'environ 5  $\mu\text{M}$  et  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1I}$  avec  $IC_{50}$  d'environ 150  $\mu\text{M}$  (Monteil et al., 2000b; Lee et al., 1999b).

Après le clonage de trois sous-types de canaux T, des régulations de ces courants ont été caractérisées dans les systèmes d'expression hétérologue. Les courants calciques des cellules qui expriment  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$  sont inhibés par l'hypoxie (Fearon et al., 2000). Les courants calciques à travers  $\alpha_{1H}$  sont augmentés par le glutathion réduit (GSH, 2mM) et inhibé par le glutathion oxydé (GSSG, 2mM). L'application externe de 10  $\mu\text{M}$  d'acide arachidonique entraîne une atténuation lente et dépendante du temps des courants  $\alpha_{1H}$  (Zhang et al., 2000a). De la même manière que pour l'acide arachidonique, l'anadamide bloque les trois types de canaux T à des concentrations submicromolaires (Chemin et al., 2001). L'anadamide est un ligand endogène des récepteurs cannabinoïdes qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G.

### 2.1.3. Régulation des canaux T.

Les canaux calciques sensibles au potentiel sont des sites de convergence de nombreuses voies de régulation. Ces régulations s'effectuent par plusieurs types de mécanismes. Cela peut être des modifications covalentes des canaux comme des phosphorylations ou encore des interactions protéines-protéines.

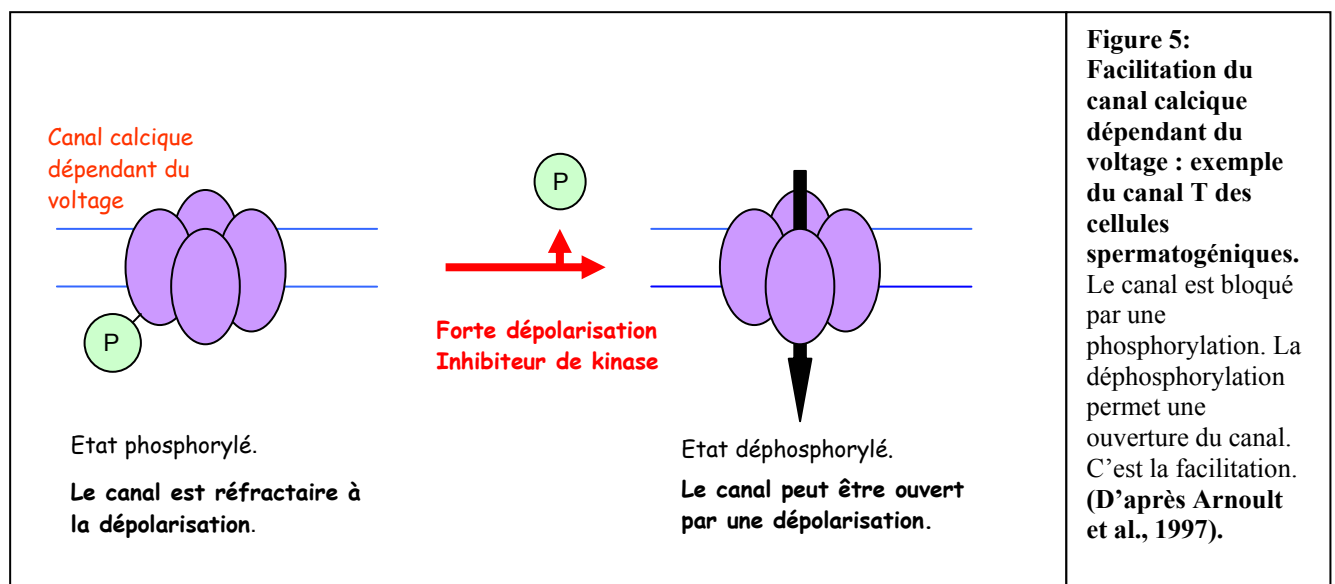
#### 2.1.3.1. La facilitation.

Les courants ioniques à travers ces canaux sont principalement régulés par *le potentiel de membrane*. Cependant les canaux sont les cibles de différentes voies de régulation qui permettent à la cellule de contrôler ses flux de calcium, soit en les augmentant, soit en les diminuant. Les processus permettant le passage d'un influx plus important sont appelés « facilitation ». Parmi ces facilitations, certaines sont activées par des processus dépendants



du voltage (Artalejo et al., 1991), comme une augmentation de la fréquence de dépolarisation ou par le biais d'une forte dépolarisation. Ces facilitations qui dépendent du potentiel, peuvent être attribuées à l'état de phosphorylation du canal (Sculptoreanu et al., 1993) ou à l'interaction directe de protéine G avec des sous-unités du canal (Bean, 1989; Hille, 1994).

Une facilitation a été mise en évidence dans les cellules spermatogéniques (Arnoult et al., 1997). Le courant T est facilité après de fortes dépolarisations qui permettent une augmentation d'environ 50% de celui-ci. Cette même facilitation est produite par des antagonistes des tyrosines kinases. En revanche, des antagonistes de tyrosines phosphatases bloquent la facilitation. Ainsi, les canaux de type T semblent être bloqués par une phosphorylation sur des résidus tyrosines, la déphosphorylation par une phosphatase inversant le processus (Figure 5).



### 2.1.3.2. Effets des hormones.

Certaines hormones et neurotransmetteurs sont capables d'inhiber les courants T alors que d'autres peuvent les stimuler (pour revue Perez-Reyes, 2003):

-Les hormones inhibitrices : **La Dopamine** : provoque une réduction de la probabilité d'ouverture sans affecter la cinétique des courants. **La Somatostatine** : entraîne une baisse plus rapide du courant pendant un pulse prolongé.

-Les hormones stimulatrices : Sérotonine, l'Acétylcholine, l'Endothéline, Angiotensine II.

La régulation par les hormones passe par l'intermédiaire de canaux récepteurs le plus souvent couplés à des protéines G. Les courants T sont régulés par les récepteurs couplés aux protéines G (Wolfe et al., 2003). Cette régulation nécessite la présence de GTP et peut être modifié par des activateurs (GTP $\gamma$ S) ou des inhibiteurs (GTP $\beta$ S) des protéines G. Cette inhibition disparaît lorsqu'on enregistre les courants T en configuration « cellule-attachée ». Ceci indique que cet effet est limité à la membrane. Dans les neurones,  $\alpha_{1H}$  est inhibé par les sous-unités  $\beta_2$  et  $\gamma_2$  des protéines G.

#### *2.1.3.3. Effet des modifications covalentes.*

L'étude de la structure des canaux T suggère que ces protéines sont glycosylées et que cette glycosylation pourrait moduler leur fonction (Yee et al., 1989). La neuraminidase est une protéine de l'enveloppe virale qui hydrolyse la liaison de l'acide sialique avec les glycoconjugués. L'application de neuraminidase augmente les courants T.

Les courants T sont inhibés par une phosphorylation par la PKC et stimulés lors de phosphorylation par la CAMKII ou les tyrosines kinases (Wolfe et al., 2002, Welsby et al., 2003). L'effet de la PKC peut être évalué par l'activation directe de la kinase par l'OAG (1-oleoyl-2 Acetyl-glycérol) ou par divers ester de phorbol. Les courants  $\alpha_{1G}$  sont potentialisés par l'ATP et ce phénomène passe par le biais d'une phosphorylation (Leresche et al., 2004).

#### *2.1.3.4. Dans les cellules spermatogéniques.*

Des antagonistes de la calmoduline entraînent une baisse d'activation et d'inactivation des canaux T (Lopez-Gonzalez et al., 2001). Des expériences de patch-clamp sur les cellules spermatogéniques ont montré que la sérumalbumine de bœuf (BSA) induisait une augmentation de la densité des courants calciques de type T d'une façon dépendante du calcium (Espinosa et al., 2000). L'oestradiol inhibe l'activité de ces canaux de manière calcium dépendante et voltage indépendante.

## **2.2. Les canaux récepteurs activés par la liaison d'un agoniste (Receptor Activated Channels).**

Ces protéines transmembranaires permettent l'entrée d'ion calcium suite à la liaison d'un ligand au niveau de leur extrémité extracellulaire. C'est le cas des récepteurs au Glutamate (NMDA, AMPA et kaïnate), à l'Acétylcholine et à la Sérotonine.

Ces canaux sont présents dans le spermatozoïde. Différents canaux récepteurs activés par des neurotransmetteurs sont activés au cours de la RA initiée par des zones pellucides solubilisées (Meizel, 1997; Bray et al., 2002) :

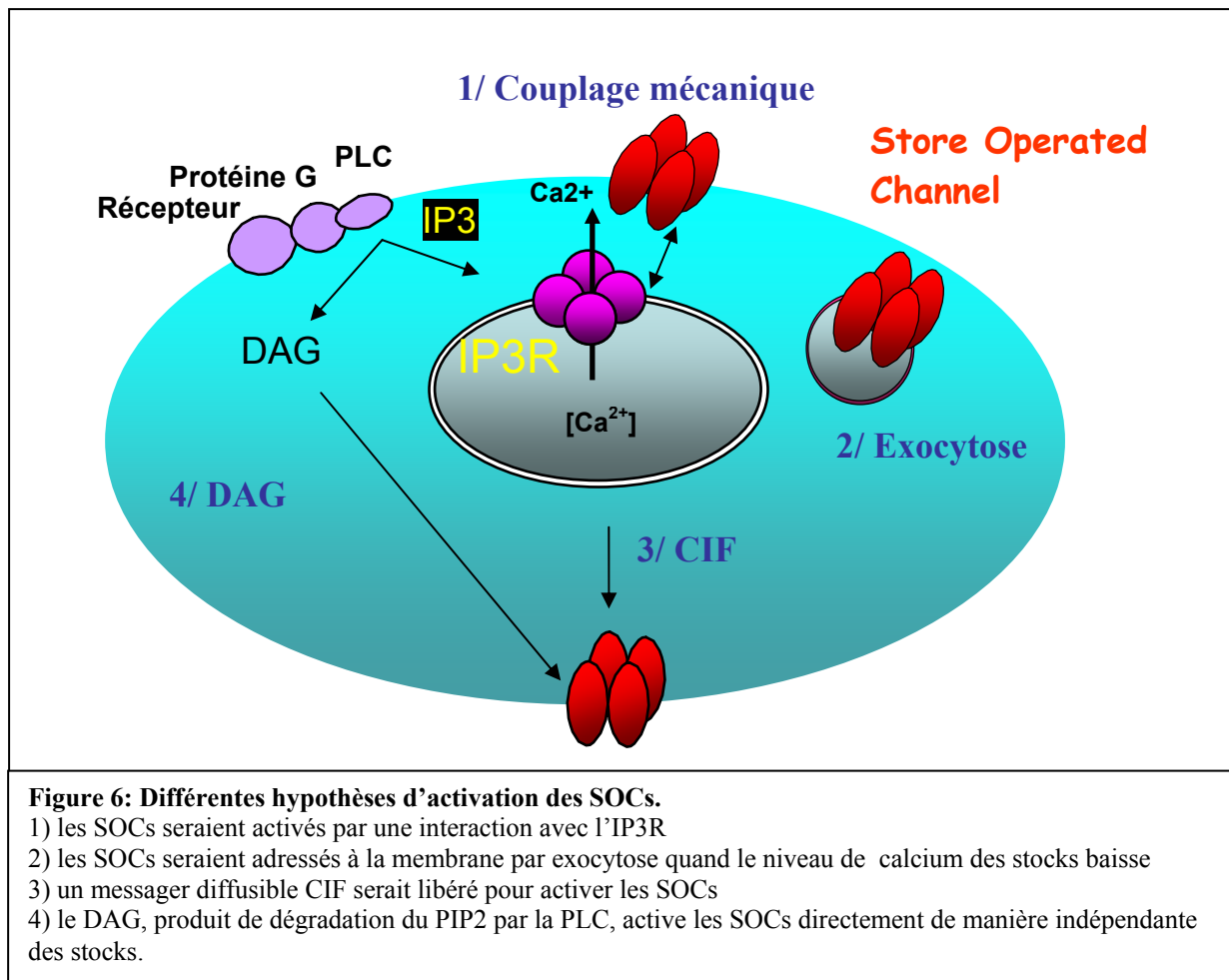
- un récepteur à la glycine (GlyR1).
- un récepteur à l'Acétylcholine (CHRNA7).

### **2.3. Les canaux sensibles au relâchement de calcium des stocks intracellulaires (Store-Operated Channel).**

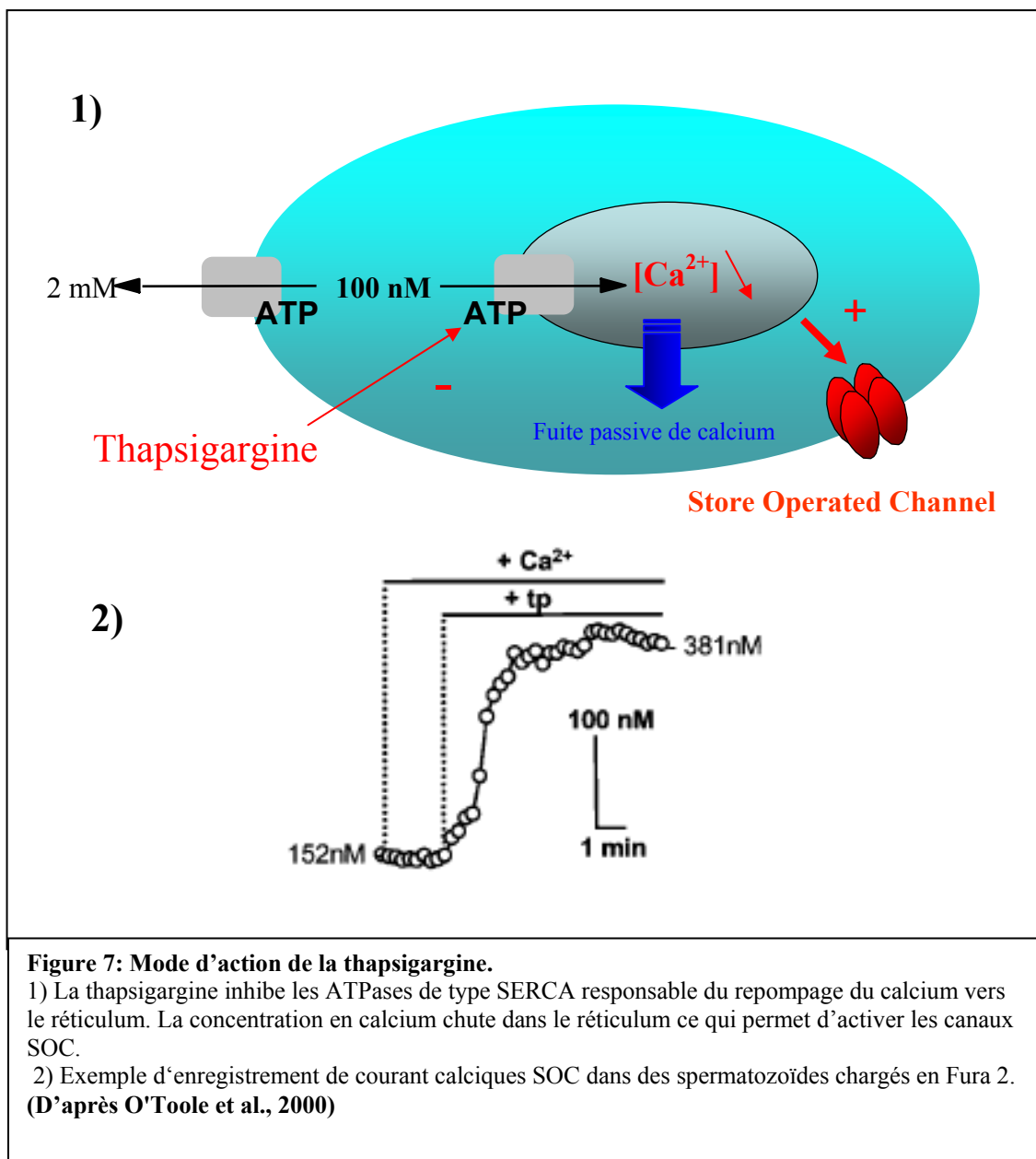
La signalisation calcique stimulée par la liaison d'un agoniste dans les cellules non excitables se divise en 2 phases : la première correspond à l'activation d'un canal récepteur situé au niveau des stocks calciques intracellulaires et qui entraîne la vidange de ces stocks vers l'intérieur de la cellule. Cette première réponse est relativement transitoire et déclenche l'ouverture de canaux situés au niveau de la membrane plasmique qui sont sensible à l'état de remplissage des stocks calciques intracellulaires. Il s'agit de la seconde phase. Celle-ci permet une élévation plus soutenue de la quantité de calcium interne et est appelée « Entrée Capacitive ». Les canaux responsables de cette entrée capacitive sont appelés « Store Operated Channel » (Putney, 1986). Leur activation est contrôlée uniquement par le niveau de remplissage du stock, indépendamment des cinétiques de relâchement du calcium luminal ou des variations du calcium cytoplasmique. Ils permettent une entrée importante de calcium lorsque des signalisations calciques soutenues sont nécessaires et fournissent le calcium pour remplir à nouveau les stocks calciques intracellulaires. L'activation des SOCs qui fait suite à la vidange des stocks est un mécanisme encore mal connu.

Quatre modes d'activations sont envisagés (Figure 6):

- 1) un couplage conformationnel avec les canaux calciques des stocks intracellulaires IP3R ou RyR (Berridge, 1995, Kiselyov et al., 1998).
- 2) un recrutement de canaux vers la membrane plasmique par exocytose (Yao et al., 1999).
- 3) la vidange des stocks pourrait permettre le relâchement d'un facteur diffusant jusqu'à la membrane plasmique (Randriamampita and Tsien, 1993).
- 4) une activation par la voie de la PLC, indépendante de la vidange des stocks. Le diacylglycérol (DAG) produit à partir du PIP2 permet l'activation des SOCs (Vazquez et al., 2004).



Il est possible d'activer ces canaux de manière pharmacologique en jouant sur le stock calcique. Il existe une fuite passive de calcium à partir du réticulum ; ce calcium est récupéré par l'intermédiaire des pompes  $Ca^{2+}$ -ATPases de type SERCA. La thapsigargine, un alcaloïde de plante, est un inhibiteur de ces pompes. Le blocage des pompes provoque une vidange rapide des stocks calciques, l'activation des canaux SOCs et finalement un influx de calcium. La mesure de l'influx de calcium s'effectue classiquement par imagerie calcique et en absence de calcium externe pour que cette mesure ne soit pas polluée par l'augmentation de calcium cytoplasmique induite par la vidange du stock. Lorsque la vidange est terminée et que le calcium est retourné à son niveau basal, le calcium est réintroduit dans le milieu externe. Le signal d'ouverture des canaux étant toujours présent (stocks calciques vides), un influx de calcium est enregistré (Figure 7).



Les protéines codées par les gènes *trp* (*transient receptor potential*) exprimés au niveau des photorécepteurs chez la *Drosophile*, ont été montrées être activées par la voie de la PLC (Montell, 2001 ; Venkatachalam et al., 2002).

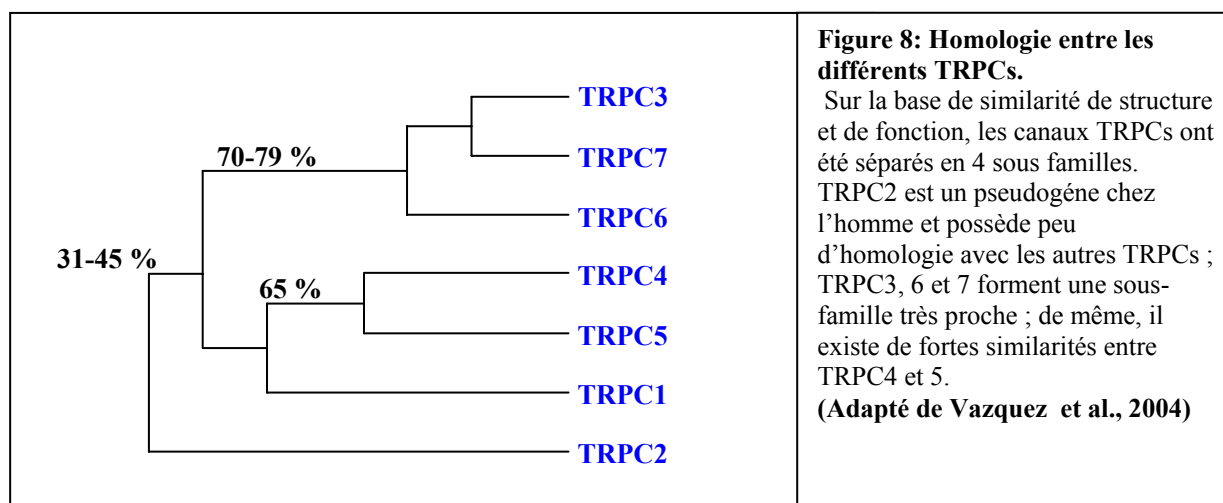
(Pour revue Minke and Cook, 2002 et Montell, 2005)

La superfamille des protéines TRPs est composée de 6 sous-familles : TRPC pour « Canonical », TRPV pour « Vanilloïde », TRPM pour « Melastatin », TRPML pour « MucLopins », TRPP pour « Polycystin » et TRPA pour « ANKTM1 ». Ces canaux possèdent des mécanismes d'activation distincts. Les Mammifères possèdent au moins 22 gènes différents codant pour ces canaux ioniques (Moran et al., 2004). Nous nous intéressons à la famille des TRPCs.

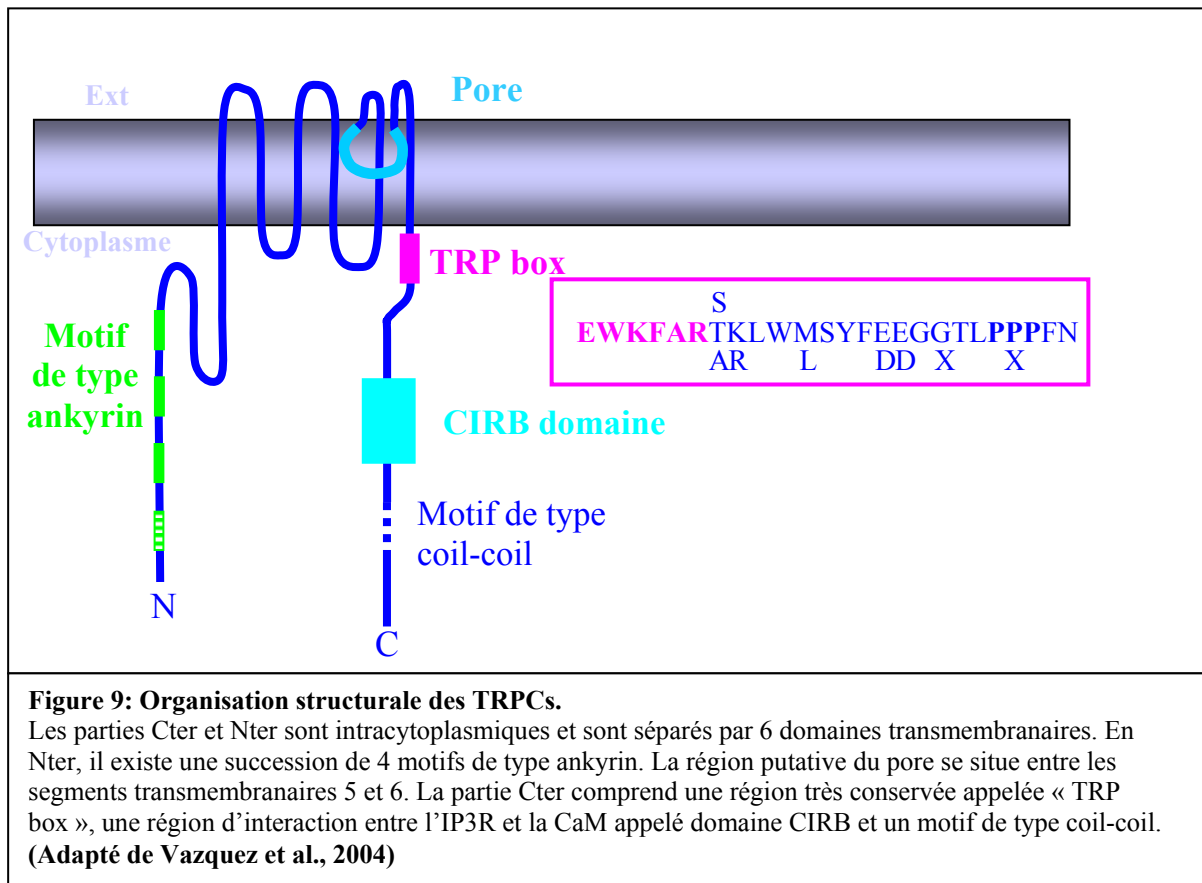
### 2.3.1. Les canaux TRPCs.

Il existe 7 gènes codant pour les canaux TRPC appelés TRPC1 à 7 chez les Mammifères. Ils ont été séparés en quatre sous-familles sur la base de leur séquence primaire et diffèrent principalement au niveau de leur séquence Cter (Figure 8):

- 1) TRPC1
- 2) TRPC2
- 3) TRPC 3, 6 et 7
- 4) TRPC4 et 5



Du point de vue structural, le canal contient des motifs de type ankyrin en Nter suivies de six domaines transmembranaires et d'un domaine hydrophobe compris entre les segments 5 et 6 qui constituent le pore du canal. Il possède des motifs de type coil-coil en Cter. La topologie du pore correspond à celle des canaux  $Ca_v$  avec la partie senseur du voltage en moins. Les canaux TRPC, TRPM et TRPN ont en commun une séquence invariable en acides aminés au niveau de leur C terminal qui est appelé « TRP box. » Cette séquence est extrêmement conservée mais sa fonction reste inconnue. En Cter, il a été montré que les 7 TRPCs interagissaient avec l'IP3R et la CaM (Figure 9). Ils peuvent être activés par le DAG qui provient de la dégradation du PIP2 par la PLC ou par des acides gras polyinsaturés (Montell et al., 2002). La majorité nécessite le relâchement de calcium des stocks intracellulaires.



Les motifs de type ankyrin sont supposés avoir un rôle dans l'adressage du canal. Des mutants de TRPC3 dans la région des motifs ankyrin restent accumulés dans les compartiments intracellulaires (Wedel et al., 2003). Le motif de type coil-coil est un motif protéique ubiquitaire utilisé pour contrôler l'oligomérisation. Il est concevable que ce domaine contribue à l'homo- ou hétéromérisation des TRPCs pour former des tétramères ou pour lier les TRPCs avec des protéines possédant également le domaine coil. Une étude récente montre que TRPC1 est capable de former des homodimères au niveau de son domaine coil-coil (Engelke et al., 2002). TRPC1 et TRPC5 s'associent pour former un canal hétéromultimérique dans le cerveau de Mammifères (Strubing et al., 2001). TRPC4, TRPC5 et polycystin-2 forment des hétéromultimères (Venkatachalam et al., 2002). Les TRPCs peuvent être activés ou modulés par des agonistes ou des récepteurs qui stimulent la PLC. Cependant, l'expression des TRPCs dans des systèmes d'expression hétérologues montre des résultats contradictoires. L'étude des canaux TRPCs se révèle difficile d'autant plus que leur mode d'activation varie en fonction du niveau d'expression. Dans la lignée cellulaire DT 40 B, TRPC3 forme, soit des canaux SOCs, soit est activé d'une façon dépendante de la PLC (probablement par le DAG) selon son niveau d'expression (pour revue Putney, 2004). La caractérisation de ces canaux reste difficile en absence de drogues spécifiques qui pourraient

les bloquer. Trois souris KO ont été mises au point permettant de visualiser l'impact *in vivo* de la perte de ces canaux. Ainsi les souris KO pour TRPC2, TRPC4 et TRPC6 ont été générées (pour revue Freichel et al., 2004). Les souris KO pour TRPC4 sont viables mais sont atteintes d'un déficit de la vasorelaxation au niveau des crosses aortiques (Freichel et al., 2001) ; les souris KO pour TRPC6 présentent un tonus des cellules musculaires lisses plus élevé et une pression sanguine plus élevée (Dietrich et al., 2005). Le phénotype des souris KO pour TRPC2 est expliqué plus loin.

### 2.3.2. TRPC2.

Chez l'homme, le gène codant pour TRPC2 est un pseudogène. Les ESTs montrent six mutations délétères qui génèrent des codons stops prématurément (Vannier et al., 1999), (Liman and Innan, 2003). TRPC2 a été localisé en majorité dans l'organe voméronasal (VNO), dans le spermatozoïde et dans les cellules hématopoïétiques. Une combinaison de RT-PCR et de RACE PCR montrent que TRPC2 est fortement exprimé dans les testicules de souris (Vannier et al., 1999). L'étude des transcrits montre deux variants d'épissage qui codent pour deux protéines qui varient uniquement au niveau de leur séquence Nter. Ces clones sont appelés clone 14 et 17. Le clone 17 a perdu les 11 premiers codons du clone 14. Ils montrent également qu'il existe un site de glycosylation au niveau de la région putative du pore. Ils ont réalisé une analyse fonctionnelle de TRPC2 en cotransfectant dans des cellules COS les ADNc de TRPC2 et d'un récepteur muscarinique. TRPC2 est activé par le biais d'un récepteur et de la vidange des stocks. TRPC2 agirait comme un SOC. Deux nouveaux variants d'épissages sont découverts (Hofmann et al., 2000) :  $\alpha$  et  $\beta$ . Il semble que l'isoforme  $\beta$  soit localisée uniquement dans le VNO (Figure 10).

Un homologue de TRPC2 (rTrp2) a été identifié dans l'organe voméronasal du rat (Liman et al., 1999). Cet organe permet aux animaux de détecter les phéromones. Or, les transcrits pour rTrp2 sont situés uniquement dans cet organe impliquant rTrp2 dans la cascade de signalisation des phéromones. Ils réalisent des immunomarquages sur des neurones dissociés de cet organe et localisent rTrp2 à l'extrémité sensorielle, colocalisant avec la protéine  $G_{\alpha 12}$ . Cette localisation, loin de tous stocks calciques, met en doute une activation dépendante des stocks.

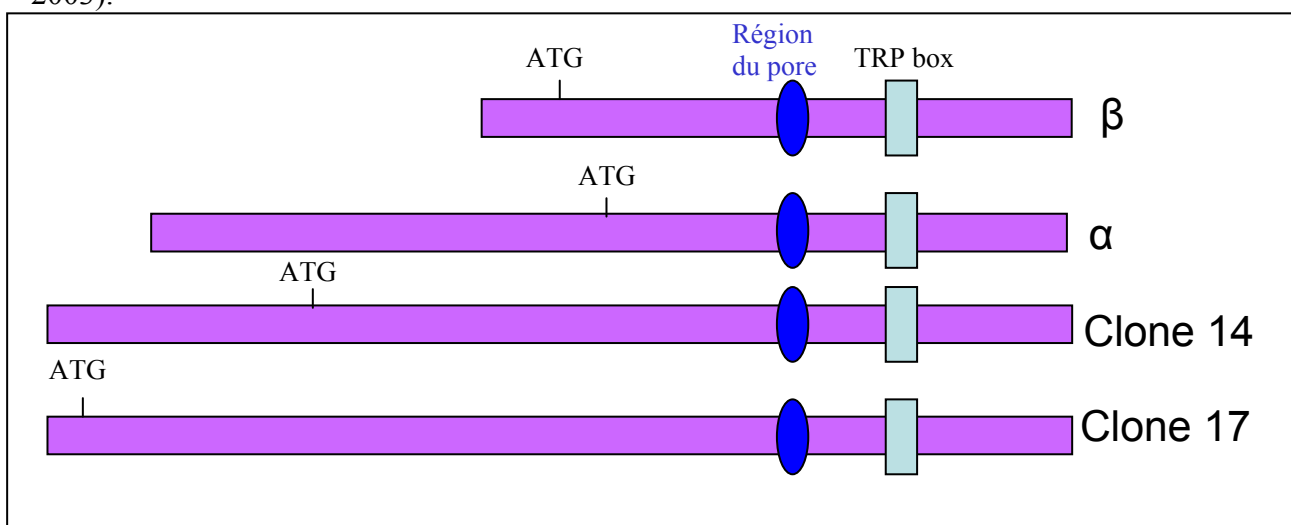
Récemment TRPC2 a été identifié dans les cellules hématopoïétiques où son activité est modulée par l'Erythropoïétine (Chu et al., 2002; Chu et al., 2004; Chu et al., 2005). Ils ont montré la présence des isoformes 14, 17 et  $\beta$  ainsi que d'un nouveau variant d'épissage appelé



smTRPC2 pour « similar to mouse TRPC2 ». Ce dernier correspond à la partie Nter du clone 17 mais ne possède pas la partie canal. TRPC6 est également présent dans ces cellules et coprécipite avec TRPC2. Lorsque TRPC2 est cotransfecté avec le récepteur de l'érythropoïétine (Epo) dans des cellules CHO, on observe une modification de la ligne de base en présence d'Epo. L'influx de calcium initié par l'Epo est inhibé par TRPC6 et smTRPC2. L'effet de l'Epo sur TRPC2 utilise la voie de la PLC et nécessite une interaction avec l'IP3R (Tong et al., 2004).

Les cellules CHO-NTR sont des fibroblastes qui surexpriment le récepteur de la neurotensine. TRPC2 est présent dans cette lignée de cellules (Gailly and Colson-Van Schoor, 2001). L'ajout de neurotensine et de thapsigargine permet l'activation d'un influx calcique. Cet influx est fortement diminué en présence d'ARN antisense contre TRPC2. Donc TRPC2 joue le rôle de SOC dans cette lignée de cellules. La même équipe suggère un rôle d'accélérateur d'apoptose pour TRPC2 dans cette lignée de cellules (Pigozzi et al., 2004). Les cellules transfectées avec un ARN antisense de TRPC2 entre en apoptose 12 heures plus tard.

Une souris KO pour TRPC2 a été réalisée (Stowers et al., 2002). Ces souris présentent une perte de discrimination du sexe et une perte d'agression contre des mâles intrus. Le comportement entre mâles et femelles n'est pas modifié. Ces résultats suggèrent que l'organe voméronasal est impliqué dans la discrimination du sexe et dans l'acquisition des comportements sociaux spécifiques de l'espèce. Cependant, cette souris ne présente aucun autre trouble physique ou comportemental. Dans le VNO, la signalisation des phéromones implique l'activité d'une PLC et d'un canal cationique activé par le DAG. L'activation de ce canal cationique activé par le DAG est déficiente dans la souris KO pour TRPC2 (Lucas et al., 2003).



**Figure 10: TRPC2 est codé par quatre différents isoformes.** Ces isoformes diffèrent par leur séquence Nter et par la position du codon d'initiation (ATG) (d'après Chu et al., 2002).

### 2.3.3. Les différents partenaires connus des TRPCs.

#### 2.3.3.1 Le récepteur à l'IP3.

L'activation des canaux SOC's suite à la vidange des stocks intracellulaires est une question importante : Comment les SOC's sentent le niveau de remplissage des stocks ? Une hypothèse repose sur une interaction directe avec l'IP3R. En effet, il existe une interaction fonctionnelle entre l'IP3R et TRPC3 (Kiselyov et al., 1998). L'entrée de calcium par les canaux TRPC3 surexprimés dans des cellules HEK peut être activée en patch-clamp en configuration « inside-out » par addition de microsomes de cervelet enrichis en IP3R. Ensuite une interaction directe a été montrée entre TRPC3 et TRPC6 et l'IP3R. En transfectant transitoirement TRPC3 et TRPC6 dans des cellules HEK, il est possible d'immunoprécipiter l'IP3R (Boulay et al., 1999). Par des techniques de GST pulldown, deux sites d'interaction pour TRPC3 ont été identifiés au niveau de l'IP3R dans sa partie Nter. Il n'existe qu'un site de liaison pour l'IP3R au niveau de TRPC3 et ce site chevauche celui de la calmoduline (Zhang et al., 2000b). De plus l'addition d'IP3R déplace la CaM de son site d'interaction et permet l'activation de TRPC3. Il semble que cette interaction soit mutuellement exclusive. La calmoduline inhibe la liaison de l'IP3R de façon calcium dépendante. Le domaine commun de liaison de la CaM et de l'IP3R est appelé CIRB domaine (**C**almodulin and **I**P3R **R**egulation **B**inding). Ce domaine est commun à tous les TRPCs (Tang et al., 2001). Par des techniques de « pulldown », ils ont montré que ce domaine est conservé chez tous les TRPCs. L'affinité pour la CaM diffère cependant entre les TRPCs mais ceci peut être expliqué par la présence d'un second site de liaison avec une affinité plus faible. La calmoduline est un élément de régulation des TRPCs. Elle est capable de moduler la période entre le relâchement de calcium du réticulum et l'activation de l'influx de calcium observé dans différentes cellules (Vaca and Sampieri, 2002). Récemment il a été montré que le CIRB permettait l'adressage de TRPC3 à la membrane par un mécanisme indépendant de la CaM et de l'IP3R (Wedel et al., 2003). TRPC2 est le seul TRPC pouvant lier la CaM en Nter (Yildirim et al., 2003).

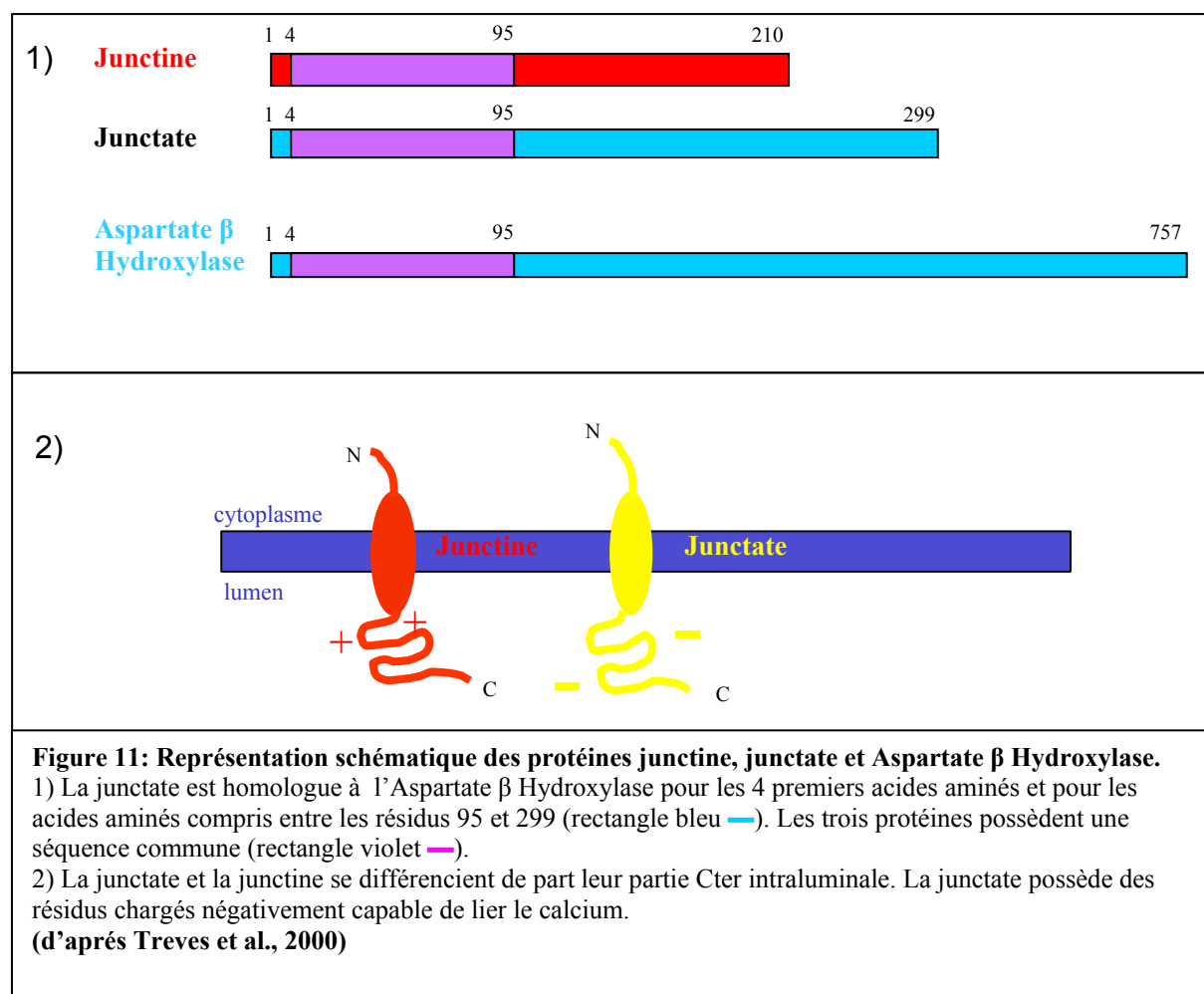
#### 2.3.3.2. Homer

Les protéines Homer ont été découvertes dans les neurones et se concentrent plus particulièrement au niveau des synapses excitatrices. Elles sont capables de lier les récepteurs métabotropiques au Glutamate de type 1 et de favoriser des complexes macromoléculaires par l'intermédiaire d'une séquence coil-coil (Tu et al., 1998 ; Xiao et al., 1998).

Homer 1 est une protéine adaptatrice qui facilite une association physique entre TRPC1 et l'IP3R (Yuan et al., 2003). Il existe une séquence consensus sur laquelle les protéines Homer peuvent se lier aux récepteurs métabotropique du glutamate. Or cette séquence est présente au niveau des TRPCs. Sur la base de cette homologie de séquence, cette étude a montré que les différents isoformes d'Homer pouvaient lier les TRPCs.

### 2.3.3.3. La junctate.

La junctate est une protéine de liaison du calcium identifiée chez l'homme (Treves et al., 2000) (Figure 11).



Il s'agit d'une protéine enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique ou du réticulum sarcoplasmique. Elle a une masse prédite de 33 KDa avec en N-terminale 78 acides aminées qui correspondent à la junctine alors que son domaine C-terminale est identique à l'aspartate β hydroxylase. Ces trois protéines proviennent du splicing alternatif du même gène (Dinchuk et al., 2000). Chez la souris, trois isoformes cardiaques ont été mis en évidence (Hong et al., 2001). Récemment, il a été montré que la junctate interagissait à la fois

avec l'IP<sub>3</sub>R et TRPC3 (Treves et al., 2004). L'utilisation d'un peptide contenant la séquence N-terminale de la junctate diminue le courant TRPC3.

#### 2.3.3.4. *L'enkurin.*

L'enkurin est une nouvelle protéine identifiée par des techniques de doubles hybrides comme interagissant avec certains TRPCs (TRPC1, 2 et 5). Elles s'expriment fortement dans le VNO et dans les testicules et colocalisent avec les TRPCs au niveau du spermatozoïde (Sutton et al., 2004). Sa liaison avec la calmoduline est dépendante du calcium. L'enkurin est capable d'interagir *in vitro* avec la sous-unité p85 de la kinase PI3 et avec d'autres domaines SH3. Ainsi, l'enkurin possède les caractéristiques d'une protéine d'échafaudage qui relie des protéines à domaine SH3 avec certains canaux TRPCs. Les auteurs suggèrent que cette protéine fonctionnerait comme un adaptateur sensible au calcium qui transduirait un signal jusqu'au canal calcique.

## 2.4. Les canaux des stocks calciques

Au niveau de la **membrane du réticulum endoplasmique et des autres stocks calciques qui sont la mitochondrie et l'espace intermembranaire du noyau**, on trouve principalement des *canaux récepteurs*. Seuls deux canaux ont été identifiés : Le récepteur à l'IP<sub>3</sub> et le récepteur à la ryanodine. Malgré des homologues de séquences, ces canaux possèdent des différences importantes de fonctionnement.

### 2.4.1. Le Récepteur à l'Inositol Triphosphate (IP<sub>3</sub>R) :

(Pour revue Patterson et al., 2004)

Ce canal récepteur est activé par la liaison de l'Inositol 1, 4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> est un messager secondaire. Il s'agit du produit de la dégradation du phosphatidylinositol biphosphate (PIP<sub>2</sub>) par la phospholipase C (PLC) en réponse à la stimulation d'un récepteur couplé aux protéines G ou d'un récepteur aux tyrosines kinases (Berridge et al., 2000). En se liant au canal récepteur à l'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R), l'IP<sub>3</sub> permet le relâchement de calcium contenu dans les stocks intracellulaires. Dans la majorité des cellules, l'IP<sub>3</sub>R est situé au niveau du réticulum endoplasmique.

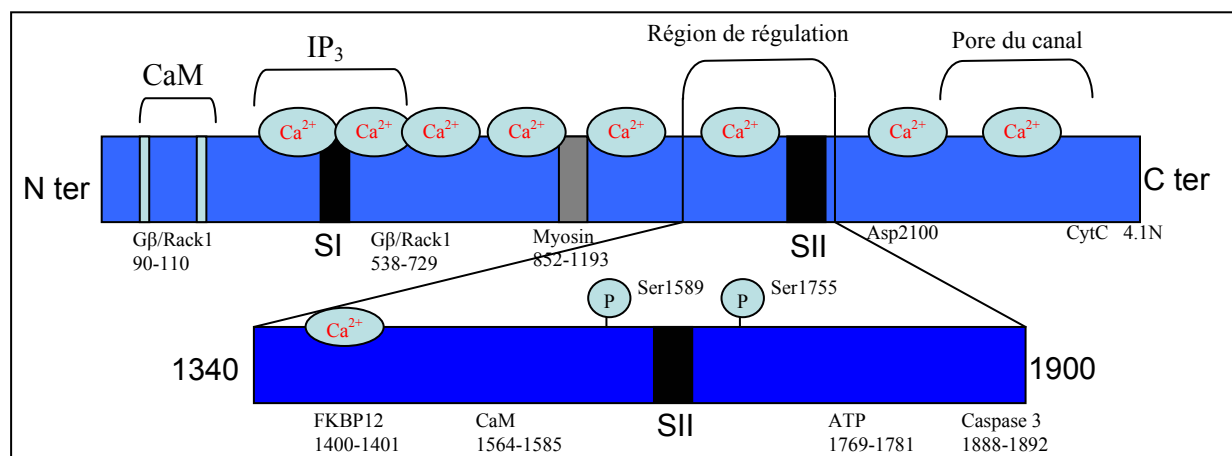
L'IP<sub>3</sub>R a été purifié à partir du cervelet. En effet, cet organe montre la plus forte capacité à lier l'IP<sub>3</sub>. Cette étape a permis la caractérisation fonctionnelle de la protéine (Worley et al., 1987; Ross et al., 1989; Supattapone et al., 1988).

Trois gènes codant pour le récepteur à l'IP<sub>3</sub> ont été clonés. Les différentes isoformes ont été appelées IP3R type 1, 2 et 3 (Nakagawa et al., 1991)

Ces trois gènes ont une expression différentielle bien qu'il n'existe pas de différences fonctionnelles entre ces trois isoformes. Des souris KO pour ces trois gènes ont été réalisées : les souris KO pour les IP3R type 2 et 3 ne présentent pas de phénotype majeur. En revanche, la souris KO pour l'IP3R de type 1 montre des affections neuronales sévères et des défauts physiologiques. Très peu de souris survivent à la naissance et elles présentent des déficits dans la dépression à long terme du cervelet (Matsumoto and Nagata, 1999).

Du point de vue de sa structure, il s'agit d'un tétramère (Jiang et al., 2002). La région du canal calcique possède des homologies avec le RyR et est localisée au niveau Cter de la protéine. Le filtre de sélectivité est codé par une séquence précise en acides aminés GVGD. La sélectivité au calcium est déterminée par un résidu Asp2550 (Boehning et al., 2001). La protéine comprend six domaines transmembranaires et sa partie Cter se projette dans le cytoplasme. Le site de liaison pour l'IP<sub>3</sub> se situe au niveau Nter de la protéine. L'IP3R est une très grosse protéine d'environ 1000 KDa. Cette protéine n'a pas qu'une fonction de canal calcique. En effet, de nombreuses protéines interagissent directement avec l'IP3R qui est impliqué dans de nombreuses voies de signalisations (Figure 12).

La régulation de cette protéine est assez complexe.



**Figure 12 : Structure de l'IP3R de type I.** Représentation de l'IP3R avec ces sites de liaisons du calcium, les régions d'épissages (SI, SII) et les sites de liaisons pour Gβ, Rack1, CaM, myosin, CARP, 4.1 N et Cyt C. La vue élargie du domaine de régulation montre les domaines de liaison pour la FKBP12, la CaM et l'ATP, les sites de phosphorylation pour la PKA et la PKG ainsi que le site de clivage pour la caspase 3. (Adapté de Patterson *et al.*, 2004).

#### 2.4.1.1. Régulation par le calcium :

Tous d'abord, l'IP3R est régulé par le calcium. En absence de calcium, l'IP3R ne peut s'ouvrir (Bezprozvanny et al., 1991). Le calcium contrôle l'IP3R de façon biphasique. Le calcium stimule la conductance au calcium de l'IP3R avec un effet « en cloche » maximal vers 100-300 nM de calcium et il existe une inhibition du calcium lorsque celui-ci est faiblement concentré. L'inhibition par le calcium est perdue sur la protéine purifiée ce qui signifie que la protéine responsable de l'inhibition a été perdue au cours de la purification. Cette inhibition serait médié par la calmoduline (Hirota et al., 1999). Plusieurs sites de fixation du calcium ont été identifiés. Le résidu Asp 2100 paraît crucial pour la réponse au calcium (Miyakawa et al., 2001). La mutation en glutamate abaisse la sensibilité au calcium de 10 fois. Le mécanisme de régulation par le calcium reste controversé, cependant il est généralement accepté que le calcium relâché initialement par l'IP3R rétroagisse pour augmenter le relâchement de calcium qui suit. Les hautes concentrations en calcium inhibent ensuite le canal.

#### 2.4.1.2. Régulation par des phosphorylations :

La régulation de l'IP3R peut s'effectuer par le biais de phosphorylations. L'IP3R peut être phosphorylé par plusieurs protéines kinases. Il a été montré deux sites de phosphorylations pour la PKA : Sérine 1589 et 1755 (Ferris et al., 1991a). Dans des cellules intactes ou perméabilisées, la forskolin ou le dibutyryl AMPc qui sont des activateurs de PKA stimulent le relâchement de calcium. La phosphorylation par la PKA est assez brève car celle-ci appartient à un complexe protéique qui possède des phosphatases (PP1 et PP2A). La PKG phosphoryle l'IP3R au niveau des mêmes sites que la PKA (Komalavilas and Lincoln, 1994). La PKC et la Ca<sup>2+</sup>/CaM dependent protein kinase III (CAMKII) phosphorylent l'IP3R sur des sites différents (Ferris et al., 1991b). La phosphorylation de la PKC a pour effet d'augmenter la sensibilité du relâchement de calcium médié par l'IP<sub>3</sub>. La phosphorylation de l'IP3R par la CAMKII serait impliquée dans le relâchement des neurotransmetteurs et au niveau de la jonction neuromusculaire permet un rétrocontrôle positif. La phosphorylation de l'IP3R modifie les caractéristiques spatiotemporelles du relâchement de calcium et permet de créer des microdomaines de signalisation calcique (Jayaraman et al., 1996).

#### 2.4.1.3. Régulation par les nucléotides :

Il existe des sites de liaison de l'ATP au niveau de l'IP3R. L'ATP augmente l'influx de calcium via l'IP3R quand sa concentration est de 100  $\mu\text{M}$ . En revanche, lorsque sa concentration est élevée, l'ATP inhibe le relâchement de calcium induit par l'IP3 (Ferris et al., 1990). Ainsi, l'activation de l'IP3R s'effectue lors de faibles concentrations en ATP.

La NADH régule également l'IP3R (Kaplin et al., 1996). Des concentrations physiologiques de NADH stimule le flux calciques médié par l'IP<sub>3</sub>.

#### 2.4.1.4. Régulation par des interactions protéine-protéines.

A l'heure actuelle, plus de 25 protéines ont été identifiées comme interagissant avec l'IP3R. Son interaction avec les *protéines d'échafaudage* permet de stabiliser l'IP3R dans la cellule. La liaison avec l'*ankyrin* entre en compétition avec l'IP<sub>3</sub> et donc bloque le relâchement de calcium. Une interaction directe entre *Homer* et le récepteur à l'IP<sub>3</sub> a été mise en évidence (Tu et al., 1998). Les protéines *Homer* sont des protéines adaptatrices avec des motifs qui permettent l'oligomérisation et qui interagissent avec les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRI) au niveau des synapses excitatrices. *Homer* interagit également avec les canaux TRPCs de la membrane et pourrait faire le lien entre l'IP3R et les canaux SOCs de la membrane (Yuan et al., 2003).

L'IP3R interagit avec de nombreuses autres protéines comme par exemple la myosine, des protéines de liaison du calcium et encore des protéines apoptotiques.

Identifié pour la première fois dans le réticulum endoplasmique, l'IP3R a été localisé également au niveau de membranes d'organelles capables de relâcher du calcium. L'IP3R est représenté dans tous les types cellulaires. Il est très fortement exprimé dans les cellules spermatogéniques et possède un rôle central dans la RA.

### 2.4.2. Le Récepteur de la Ryanodine (RyR).

Le RyR est un canal calcique fonctionnel constitué par l'association de 4 monomères identiques (PM>2000 KDa). La ryanodine est un alcaloïde neutre d'origine végétale, inhibiteur de ce canal. Ce canal permet également le relâchement de calcium du réticulum endoplasmique vers l'intérieur de la cellule. Il peut être activé directement par une interaction mécanique avec un canal sensible au DHP de la membrane plasmique (Marty et al., 1994), par

le calcium ou encore par la caféine. En revanche, il est inhibé par la ryanodine, le Magnésium et le rouge de ruthénium.

Trois différents isoformes du RyR ont été identifiés : RyR1, RyR2 et RyR3. Bien que ces différents isoformes soient préférentiellement exprimés dans les cellules excitables, RyR1 et RyR2 sont présents dans le muscle strié. Ils possèdent une répartition tissulaire spécifique :

RyR1 est majoritaire dans le muscle squelettique et présent dans les cellules de Purkinje du cervelet.

RyR2 est majoritaire dans le muscle cardiaque et présent dans le cerveau.

Les transcrits pour RyR3 ont été détectés dans une large variété de tissu mais le niveau d'expression de la protéine reste faible. RyR1 et RyR3 sont coexprimés dans le muscle squelettique.

Le RyR est présent dans les cellules spermatogéniques. Des études de protection à la RNase, d'hybridation in situ (Giannini et al., 1995) et d'immunocytochimie (Trevino et al., 1998) montrent que RyR1 et 3 sont présents dans les tubules séminifères au niveau des régions enrichies en spermatocytes et spermatides. RyR3 est le seul isoforme présent dans le spermatozoïde mature. Une étude récente (Chiarella et al., 2004) montre une expression différentielle de RyR1 au cours de la spermatogénèse. Le RyR est fonctionnel dans les cellules spermatogéniques et la mobilisation du calcium via le RyR participerait à la maturation de la lignée germinale.

### 3. Les protéines de liaison du calcium

La concentration de calcium libre dans le cytosol varie d'environ  $10^{-7}$ M dans la cellule au repos à environ  $100 \cdot 10^{-6}$ M, lorsque la cellule est activée. Il est d'usage de parler de concentration en calcium libre. Il existe dans la cellule des protéines de liaison du calcium. Lorsque le calcium est lié à ces protéines, il n'est plus mobilisable et ne participe donc plus à la signalisation calcique. Ces protéines de liaison du calcium sont des protéines cytosoliques appelés « Calcium Binding Proteins ». Ces protéines appartiennent à la famille des protéines à domaine EF-hand. Elles sont capables de moduler la concentration en calcium libre dans le cytoplasme ; elles sont également appelées tampons cytosoliques. Elles peuvent servir aussi de médiateur pour le calcium afin de réguler l'activité d'enzymes ou de canaux ioniques. La première protéine caractérisée fut la Troponine C des cellules du muscle squelettique. La Calmoduline a été identifiée dans toutes les cellules eucaryotes. Elle fonctionne comme un récepteur intracellulaire du calcium et joue un rôle dans la plupart des mécanismes contrôlés



par ces ions. Elle possède quatre sites de fixation du calcium et change de conformation quand elle le fixe. Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline n'a pas d'activité enzymatique mais agit en se liant à d'autres protéines. Parmi les protéines cibles, il existe de nombreuses enzymes et des protéines de transport membranaires. Ce complexe est capable de fixer et d'activer la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrane plasmique. Ainsi quand le calcium augmente dans la cellule, celui-ci fixe la Calmoduline. Le complexe active les pompes de la membrane qui régulent ainsi la concentration intracellulaire en calcium. Les synaptogamines (Sudhof, 2002) sont des protéines transmembranaires qui seraient les senseurs responsables du déclenchement de l'exocytose. En effet, le domaine de liaison du calcium des synaptogamines interagit avec des membres du complexe SNARE. Or les SNAREs sont des protéines clés impliquées dans le pontage de membranes qui doivent fusionner (Jahn and Sudhof, 1999).

#### 4. Les chélateurs de calcium.

La calséquestrine est une protéine spécifiquement localisée dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (Franzini-Armstrong et al., 1987) et joue un rôle majeur dans la liaison du calcium intraluminal (Ikemoto et al., 1989; Lytton and Nigam, 1992).

#### 5. Maintien de l'homéostasie calcique.

##### 5.1 Les pompes calciques.

Le maintien de la concentration au repos du calcium est assuré tout d'abord par des *pompes*. Il s'agit de protéines enchâssées au niveau de la membrane plasmique et du réticulum. Elles permettent soit l'évacuation du calcium vers le compartiment extracellulaire soit sa recapture vers les stocks calciques intracellulaires. Ces pompes permettent le transit du calcium contre le gradient électrochimique en utilisant l'hydrolyse de l'ATP.

Au niveau de la membrane, il existe deux types de pompes :

- **des  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases** qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour pomper les ions calcium hors de la cellule ou vers l'intérieur du réticulum. Les pompes situées au niveau du réticulum sont appelées ATPase de type SERCA (Sarco Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase). La thapsigargine est inhibiteur spécifique de ces pompes. La thapsigargine est utilisée pour l'étude des courants capacitifs ou SOCs. Ce mécanisme a

été décrit plus tôt. Ces pompes sont aussi présentes au niveau de la membrane plasmique où elles sont appelées PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase) mais ne sont pas sensibles à la thapsigargine.

- **des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  ATPases** sont plus particulièrement présentes dans les cellules musculaires et nerveuses qui utilisent de façon intensive le signal calcique. Cette pompe couple le flux sortant de calcium au flux entrant de sodium. Cette pompe possède une affinité plus faible pour le calcium que les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. Il s'agit d'une pompe de secours dans ces cellules qui peuvent être excitées plusieurs fois de suite et nécessite donc une plus grande capacité d'extrusion et de stockage de calcium.

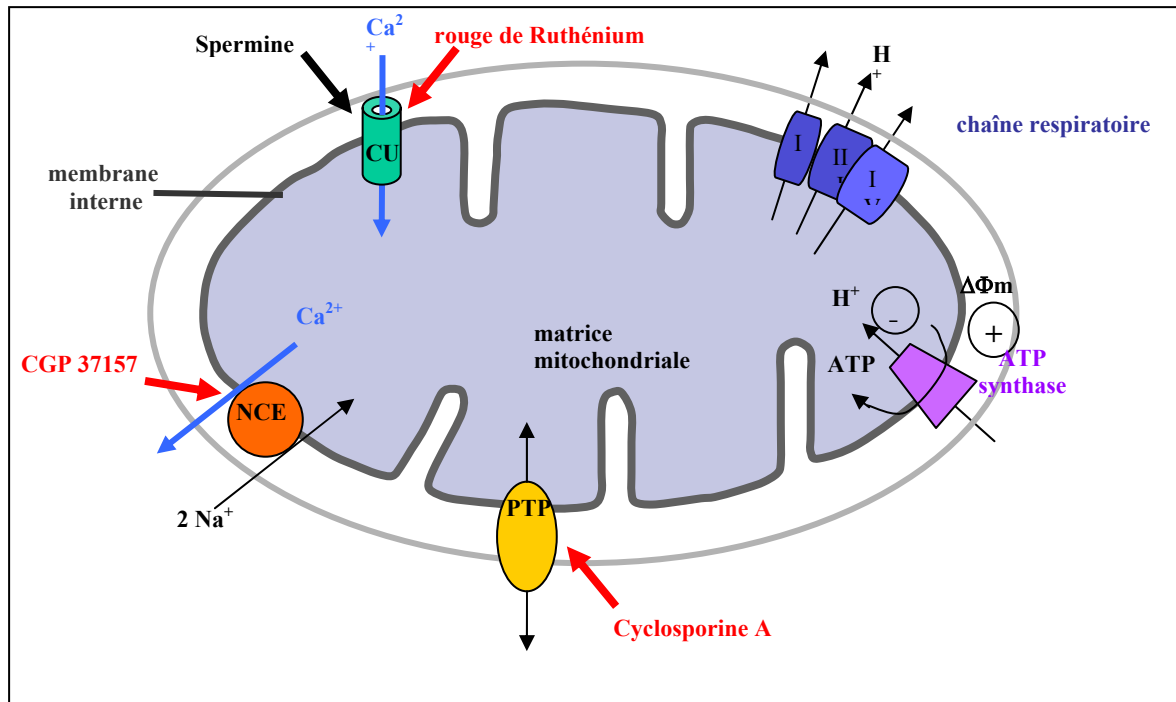
## **5.2 Rôle des mitochondries.**

Les mitochondries ont un rôle important dans la modulation des caractéristiques spatio-temporelles du signal calcique. Au niveau de la mitochondrie, les mouvements calciques sont assurés par deux protéines (Figure 13):

- un uniporteur  $\text{Ca}^{2+}$  qui permet l'entrée de calcium dans la matrice mitochondriale.
- un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  qui en assure la sortie (Babcock and Hille, 1998).

Grâce à ces deux transporteurs, les mitochondries peuvent stocker du calcium lors d'augmentations globales massives de la concentration calcique cytosolique (>500 nM), ou d'augmentations plus modestes localisées dans des microdomaines, et ensuite relâcher le calcium lentement dans le cytoplasme.

Il existe également un complexe multi protéique appelé pore de perméabilité transitoire (PTP). Celui-ci est composé d'un canal anionique dépendant du voltage de la membrane externe, d'un échangeur ADP/ATP de la membrane interne et d'une protéine matricielle (la cyclophiline D). Ce complexe permet une libération massive de calcium qui intervient notamment dans le processus de mort cellulaire (pour revue Crompton, 2000).



**Figure 13 : Les systèmes de transport impliqués dans les mouvements calciques entre le cytosol et la matrice mitochondriale.** Le gradient de proton entre matrice mitochondriale et cytosol est à l'origine d'un potentiel de membrane ( $\Delta\Phi_m$ ) qui est de l'ordre de 140 à 180 mV, la matrice étant plus électro négative. Les mitochondries peuvent stocker du calcium grâce à un uniporteur  $\text{Ca}^{2+}$  électrogénique (CU) localisé dans la membrane interne et le relâcher via un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCE) ou un complexe appelé pore de perméabilité transitoire (PTP). L'uniporteur  $\text{Ca}^{2+}$  est modulé par une grande variété d'effecteurs tels que les polyamines (notamment la spermine) qui l'activent et les polycations (dont le rouge de ruthénium) qui l'inhibent. Le relâchement de calcium via l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  est inhibé par le CGP 37157 tandis que le pore de perméabilité transitoire est inhibé par l'immunosuppresseur Cyclosporine A. (D'après Simpson and Russell 1998).

## 6. Méthodes d'études des canaux.

### 6.1 Electrophysiologie.

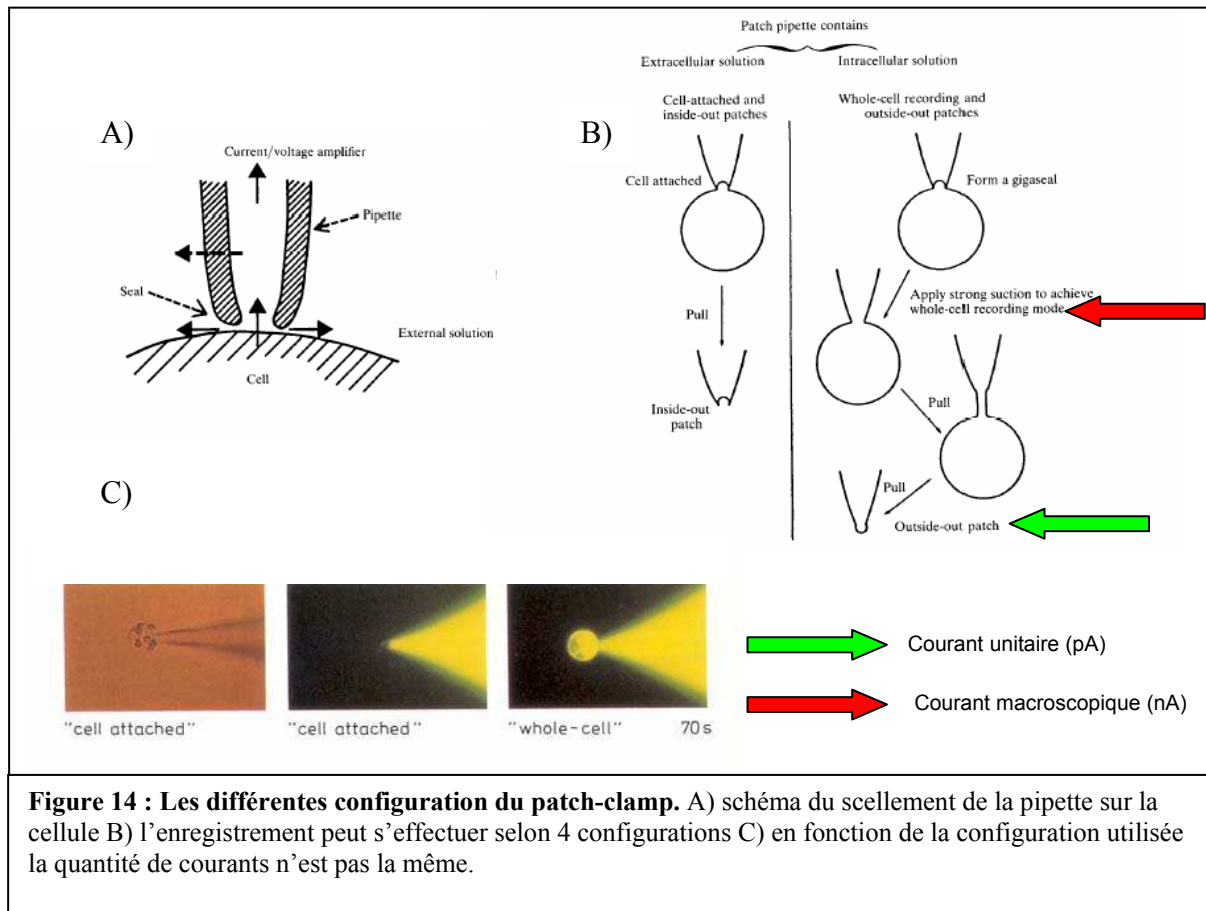
Le patch-clamp permet une étude fonctionnelle des canaux par la mesure des courants calciques qui les traversent. Cette technique a été mise au point par Sakmann et Neher, en 1984 et permet d'enregistrer l'activité électrique d'une cellule ou d'un canal. Elle consiste à apposer une pipette de verre munie d'une électrode à la surface de la cellule pour former un scellement de haute résistance afin de diminuer le rapport signal/bruit. Quatre configurations sont possibles (Figure 14):

- "Cellule attachée" qui permet d'enregistrer un petit nombre de canaux en conservant l'intégrité du milieu intracellulaire et la valeur du potentiel de membrane de la cellule.

- "Cellule entière" qui permet de mesurer les fluctuations du courant de l'ensemble des canaux de la cellule ou du potentiel membranaire tout en contrôlant la composition ionique du milieu intracellulaire.

- "Inside-out" qui permet d'enregistrer un petit nombre de canaux sur un morceau de membrane isolée, la face interne de la membrane est exposée au milieu extracellulaire qui peut être aisément manipulé.

- "Outside-out" qui permet d'enregistrer un petit nombre de canaux sur un morceau de membrane isolée, la face externe de la membrane étant orientée vers l'extérieur de la pipette. Cette configuration permet de manipuler l'environnement extérieur et notamment la concentration en neurotransmetteurs pour les récepteurs impliqués dans la neurotransmission.



La technique du patch clamp s'oppose à la méthode du voltage imposée à deux électrodes. La technique consiste à maintenir le potentiel de membrane ( $V_m$ ) à une valeur constante ( $V_i$ ). Pour ce faire, un amplificateur à contre-réaction délivre un contre-courant égal mais de sens opposé au courant ionique transmembranaire, ce qui tend à annuler la différence ( $V_i - V_m$ ). Le contre-courant, visualisé sur l'écran d'ordinateur, représente donc la mesure inverse des courants ioniques transitant à travers la membrane.

Cette technique est notamment utilisée pour mesurer les courants ioniques dans l'ovocyte de xénope.

## 6.2. Imagerie.

Des sondes fluorescentes sont utilisées pour mesurer *in vivo* la concentration intracellulaire en calcium, le pH intracellulaire et le potentiel de membrane.

Les ions sont des molécules chargées qui peuvent être chélater par d'autres molécules. Afin de visualiser les mouvements ioniques, des sondes fluorescentes ont été mises au point. La sonde spécifique de l'ion d'intérêt va émettre une fluorescence lorsqu'elle entre en contact avec celui-ci. La fluorescence émise est visualisée grâce à des microscopes à fluorescence. Cette technique permet de visualiser les compartiments de stockage de l'ion ainsi que ces mouvements après stimulation des canaux spécifiques de l'ion.

Des indicateurs de calcium ont été synthétisés. Ceux-ci en se fixant étroitement aux ions calcium voient leur longueur augmentée par rapport à leur forme libre. Ils fournissent une mesure précise de la concentration en calcium.

## 6.3. La technique du « planar bilayer » ou des membranes artificielles.

Cette technique consiste à exprimer un canal dans un système artificiel de membrane. Il s'agit d'une étude sur canal unitaire qui permet d'enregistrer les courants à travers une membrane artificielle en dehors des cellules et d'imposer les compositions des milieux externes et internes.

## 6.4. La biochimie et la biologie moléculaire.

Les premières méthodes que je viens de vous décrire permettent une analyse fonctionnelle des canaux. La biologie moléculaire et la biochimie sont essentielles pour l'analyse structurale des canaux. Il est d'usage de purifier le canal à partir du tissu où il est le plus exprimé puis, on effectue le clonage de celui-ci. Les étapes suivantes consistent à exprimer le canal ou des mutants du canal dans des systèmes d'expression hétérologues afin de caractériser les propriétés biophysiques et pharmacologiques. A l'heure actuelle, on privilégie le clonage plutôt *in silico*. Le canal putatif est identifié par homologie de séquences avec d'autres canaux connus. Puis, on crible différents organes afin d'identifier l'organe d'intérêt.

## Chapitre 2. Signalisation calcique dans le spermatozoïde de Mammifère.

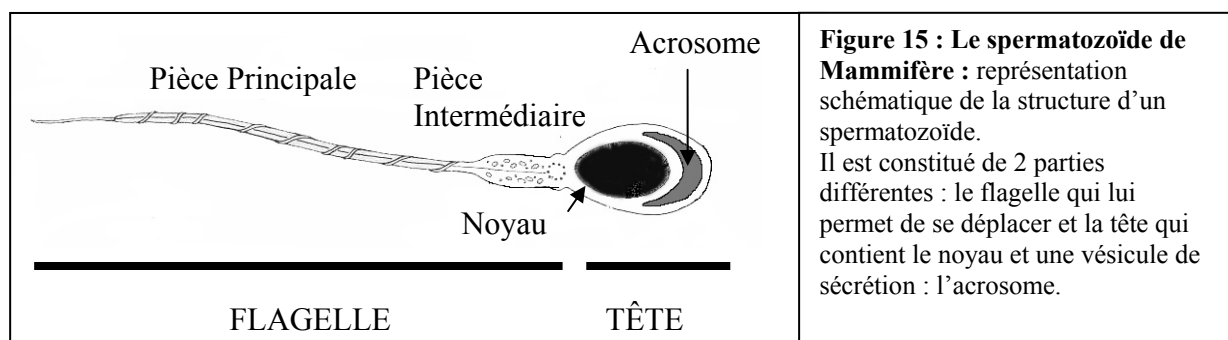
### 1. Le spermatozoïde et la réaction acrosomique : contexte physiologique

#### 1.1. Le spermatozoïde.

##### 1.1.1. Morphologie

La fécondation nécessite la rencontre et la fusion des gamètes mâle et femelle. Le spermatozoïde et l'œuf possèdent des morphologies très différentes. L'œuf est très volumineux et fournit tous les matériaux bruts pour la croissance et le développement. Le spermatozoïde est une petite cellule mobile conçue pour propager les gènes paternels. Le spermatozoïde est morphologiquement constitué de deux parties distinctes : la *tête* qui contient le noyau haploïde et la *queue* qui propulse le spermatozoïde jusqu'à l'ovule (Figure 15). Au niveau de la tête spermatique se trouve une vésicule sécrétrice appelée **acrosome**. Cette vésicule contient les enzymes capables de digérer des protéines et des saccharides complexes. Ces enzymes, mises en réserve, sont utilisées lors de la lyse des enveloppes externes de l'œuf. La libération de ces enzymes s'effectue au contact de l'œuf et s'appelle la réaction acrosomique. Cette réaction acrosomique sera décrite en détail au cours du prochain chapitre.

La queue mobile du spermatozoïde est un long flagelle. Il s'agit d'une structure complexe dont la partie principale est appelée **axonème**. Un axonème est formé de microtubules partant du centriole distal situé à la base du noyau spermatique. La force qui fait avancer le flagelle est fournie par la dynéine, une protéine attachée aux microtubules. La dynéine hydrolyse des molécules d'ATP et fournit l'énergie qui fait avancer le spermatozoïde (Ogawa et al., 1977). L'énergie nécessaire au mouvement flagellaire est fournie par l'hydrolyse de l'ATP synthétisé par des mitochondries situées au niveau de la *pièce intermédiaire*.



**Figure 15 : Le spermatozoïde de Mammifère** : représentation schématique de la structure d'un spermatozoïde. Il est constitué de 2 parties différentes : le flagelle qui lui permet de se déplacer et la tête qui contient le noyau et une vésicule de sécrétion : l'acrosome.

Afin de fusionner, le spermatozoïde doit être mature. Au cours de la maturation du spermatozoïde, le calcium joue un rôle central.

### **1.1.2. Maturation.**

Le spermatozoïde doit séjourner dans le tractus génital femelle avant de pouvoir déclencher la réaction acrosomique et féconder l'œuf.

#### *1.1.2.1. La capacitation.*

Au cours de la capacitation, le spermatozoïde va subir des changements moléculaires. La fluidité membranaire est modifiée par un changement dans sa composition lipidique. En effet, la concentration en cholestérol diminue au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde (Davis, 1981, Visconti et al., 1999). Ceci déclenche une entrée d'ions carbonates et de calcium (Visconti et al., 1995). La capacitation nécessite une concentration minimum en calcium externe de 90  $\mu\text{M}$ . Des protéines ou des hydrates de carbone particuliers de la surface du spermatozoïde sont perdus. Certaines protéines impliquées dans la fixation du spermatozoïde à la membrane pellucide de l'œuf et dans l'exocytose de la vésicule acrosomiale vont être phosphorylés au niveau de leurs résidus tyrosines.

Ces changements moléculaires s'accompagnent de modifications ioniques et métaboliques :

- Augmentation du pH interne (Parrish et al., 1989).
- Hyperpolarisation de la membrane plasmique spermatique (Zeng et al., 1995); (Arnoult et al., 1999).
- Augmentation de la concentration interne en calcium (Garcia and Meizel, 1999).

L'environnement ionique et les flux ioniques à travers la membrane plasmique du spermatozoïde sont très importants au cours de la capacitation et plus particulièrement l'augmentation de la concentration calcique interne. Les protéines permettant l'influx calcique ne sont encore caractérisées. Au début de la capacitation, les mouvements du flagelle sont lents. Dans le spermatozoïde de Mammifères, les canaux calciques dépendant du GMPc n'ont pas une localisation homogène au niveau du flagelle (Weyand et al., 1994; Wiesner et al., 1998) et pourrait être à l'origine du mouvement du flagelle par une augmentation dissymétrique du calcium.

### 1.1.2.2. L'hyperactivation.

Quand les spermatozoïdes passent de l'utérus à l'oviducte, ils sont hyperactivés, nagent à plus grande vitesse et adoptent un mouvement moins rectiligne. Cette hyperactivation va leur permettre de traverser la zone pellucide. Bien que le mécanisme qui déclenche la modification de motilité des spermatozoïdes est inconnu, il a été montré que la modification de la balance du calcium par différents mécanismes était très importante. Les canaux TRPC1, 3, 4 et 6 ont été détectés au niveau du flagelle du spermatozoïde humain (Castellano et al., 2003).

Les canaux calciques de la famille **Catsper** ont été identifiés dans le spermatozoïde de Mammifères. Bien que leur mode d'activation reste inconnu, ces canaux calciques sont impliqués dans l'hyperactivité du flagelle (Ren et al., 2001). Ils sont localisés au niveau de la pièce principale du spermatozoïde.

Ainsi le calcium et les canaux calciques jouent des rôles primordiaux dans les étapes de la maturation du spermatozoïde. La dernière étape nécessaire au spermatozoïde pour féconder l'œuf est la réaction acrosomique où l'influx de calcium est une absolue nécessité. Après avoir effectué sa réaction acrosomique, les membranes du spermatozoïde et de l'œuf fusionnent. L'entrée du spermatozoïde déclenche la réaction corticale de l'œuf. Ce phénomène dépendant du calcium permet d'empêcher l'entrée de tout autre spermatozoïde et donc de stopper la polyspermie. Le calcium joue également un rôle important lors de l'activation du développement. L'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte est suivie d'augmentation transitoire de la concentration calcique.

## 1.2. La réaction acrosomique

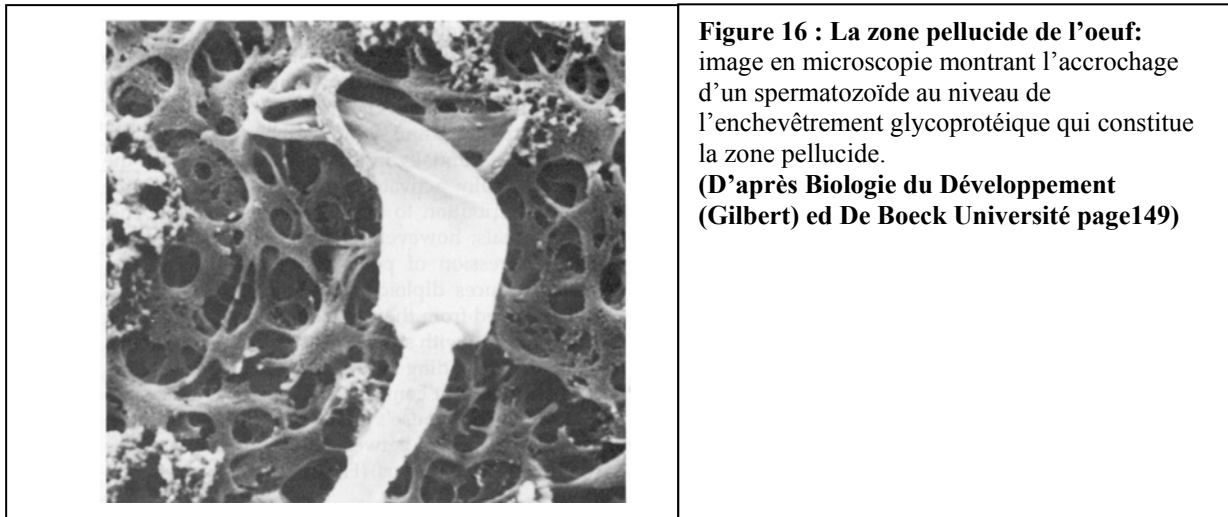
La réaction acrosomique est la première étape de la fécondation. Il s'agit d'une exocytose du contenu de la vésicule acrosomiale permettant au spermatozoïde de traverser la zone pellucide de l'œuf.

### 1.2.1 La zone pellucide.

Il a été montré que la RA est déclenchée par la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide de l'œuf (Yanagimachi, 1994). La zone pellucide constitue une matrice extracellulaire de l'œuf (Figure 16). Il s'agit d'une structure épaisse et complexe entourant



l'ovocyte. Son maillage est composé de 3 glycoprotéines ZP1, ZP2 et ZP3. ZP2 et ZP3 s'associent pour former des filaments réunis par des ponts de ZP1 (Greve and Wassarman, 1985; Wassarman and Mortillo, 1991). L'épaisseur de la zone pellucide est normalement de 12  $\mu\text{M}$ . Une épaisseur excessive est un obstacle à la fécondation. Pour traverser la zone pellucide, le spermatozoïde doit d'abord se fixer à la surface puis modifier la structure de sa tête (réaction acrosomique) et enfin franchir l'épaisseur de la paroi.



Ainsi, la zone pellucide joue deux rôles principaux pendant la fécondation : elle fixe le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique après la fixation du spermatozoïde. Il a été montré que ZP3 pouvait empêcher la fixation du spermatozoïde alors que ZP1 et ZP2 en sont incapables. ZP3 est la protéine spécifique de la zone pellucide qui permet la fixation du spermatozoïde (Bleil and Wassarman, 1980) et déclenche la réaction acrosomique.

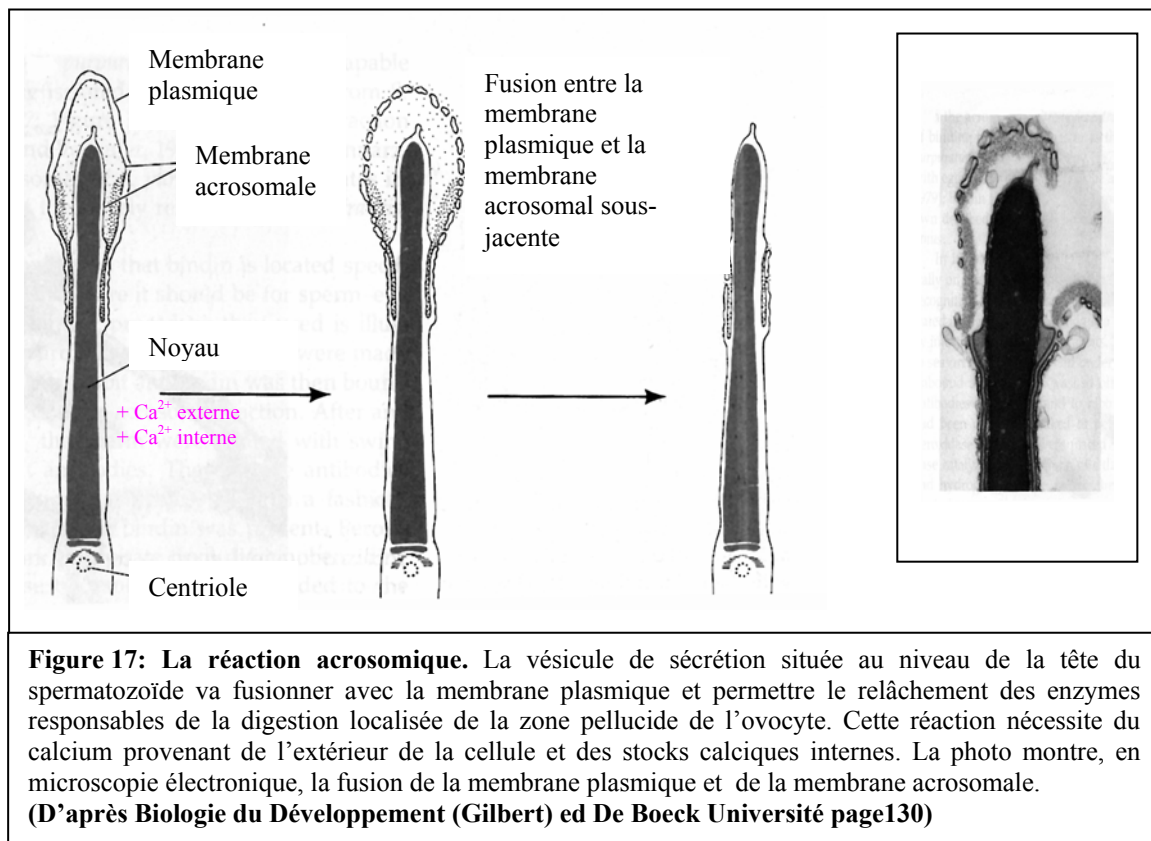
Ces glycoprotéines sont constituées d'une charpente polypeptidique et glycosylées de façon hétérogène au niveau de résidus Asparagine (N) et Sérine Thréonine (O). La charpente polypeptidique ne joue qu'un rôle mineur comme ligand du spermatozoïde. L'interaction spécifique d'espèces entre ZP3 et son récepteur spermatique et un évènement plutôt médié par des sucres et dépend de la nature des oligosaccharides de ZP3. Une inactivation enzymatique des oligosaccharides (Litscher et al., 1995) inhibe en effet la liaison des spermatozoïdes à la ZP chez la souris. Des oligosaccharides O-liés, isolés de ZP3 par hydrolyse alcaline douce ou en conditions réductrices, inhibent également *in vitro* la liaison des spermatozoïdes à la ZP (Florman and Wassarman, 1985).

La reconnaissance de ZP3 par un récepteur spécifique situé au niveau de la tête du spermatozoïde semble être l'élément déclencheur de la signalisation qui induit la réaction acrosomique.

### 1.2.2 Mécanisme de la réaction acrosomique.

L'acrosome, qui recouvre les deux tiers de la surface antérieure de la tête, est une vésicule de sécrétion géante qui va effectuer, au contact de la zone pellucide de l'ovocyte, une exocytose en libérant des enzymes : c'est la **réaction acrosomique** (Figure 17).

Celle-ci, après destruction de la membrane acrosomiale, permettra, premièrement la destruction localisée de la zone pellucide, et deuxièmement la mise à nu de structures sous membranaires du spermatozoïde jusqu'alors masquées. Ces structures, en entrant en contact avec des sites complémentaires de la membrane ovocytaire permettront la fixation du spermatozoïde et enfin sa fusion avec l'ovocyte.



Comme toutes les exocytoses, le phénomène est sous le contrôle d'une augmentation de la concentration cytosolique du calcium. Dans le spermatozoïde, le calcium nécessaire provient de deux sources, du stock calcique interne et de l'extérieur de la cellule. Ces transferts s'effectuent via les canaux calciques.

## 2. La réaction acrosomique : une signalisation calcique particulière.

La réaction acrosomique, première étape de la fécondation, est un événement d'exocytose permettant au spermatozoïde de traverser la zone pellucide de l'œuf et devenir compétent pour fusionner avec l'ovocyte. Il est clairement établi qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et du pH déclenchent la réaction acrosomique (Florman et al., 1992). La réaction acrosomique et l'élévation de calcium intracellulaire sont diminuées à la fois lorsque la concentration extracellulaire du calcium est abaissée et lors du blocage non spécifique des canaux calciques par des ions métalliques.

Cette étape est rythmée par l'ouverture successive de différents canaux calciques (Figure 18):

1) La fixation du spermatozoïde sur la zone pellucide provoque l'ouverture d'un canal cationique peu sélectif qui entraîne une dépolarisation de la membrane. Cette dépolarisation déclenche l'activation de canaux calciques dépendants du voltage (Arnoult et al., 1996a) situé au niveau de la membrane.

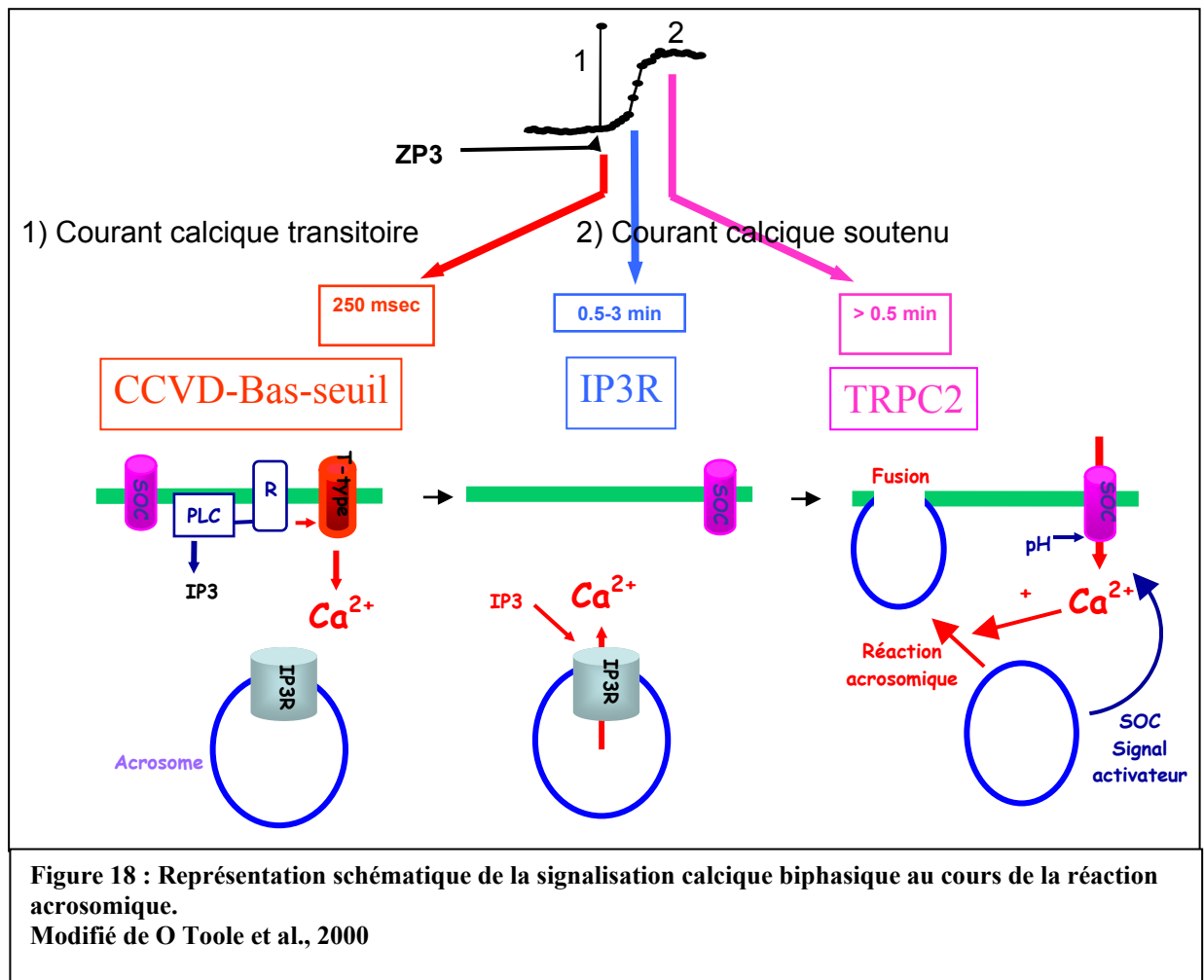
Le canal calcique de type T joue un rôle primordial dans la signalisation calcique du spermatozoïde car il est le premier canal à être activé, son inhibition éteint toute signalisation calcique ultérieure et bloque la réaction acrosomique. Les propriétés biophysiques et pharmacologiques de ces canaux se sont révélées différentes par rapport à celles des cellules somatiques suggérant une diversité moléculaire de ces canaux de type T (Arnoult et al., 1998).

2) Ensuite le récepteur à l' $IP_3$  s'active et permet une libération massive de calcium à partir de l'acrosome qui joue ici le rôle de stock calcique intracellulaire joué habituellement par le réticulum endoplasmique. Cette libération de calcium déclenche l'activation de canaux SOCs sensibles au niveau de remplissage des stocks calciques. Ces canaux sont situés au niveau de la membrane plasmique et permettent une entrée massive de calcium à partir de l'extérieur de la cellule.

3) La démonstration de l'implication du canal TRPC2 a été essentiellement faite par l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre TRPC2 qui bloquent les courants TRPC2, la signalisation calcique du spermatozoïde et la réaction acrosomique (Jungnickel et al., 2001)

La mesure de la concentration intracellulaire de calcium au cours de la réaction acrosomique permet d'observer un signal biphasique (Arnoult et al., 1999). La fixation de ZP3 provoque un influx transitoire qui correspond à l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage de type T. L'augmentation soutenue de la concentration calcique qui

suit correspond à l'ouverture du récepteur à l'IP<sub>3</sub> puis des canaux SOC. Si l'implication dans la réaction acrosomique de ces trois types de canaux est maintenant démontrée, leurs interactions respectives restent à élucider. De même, la caractérisation moléculaire du canal calcique de type T n'est pas encore déterminée.

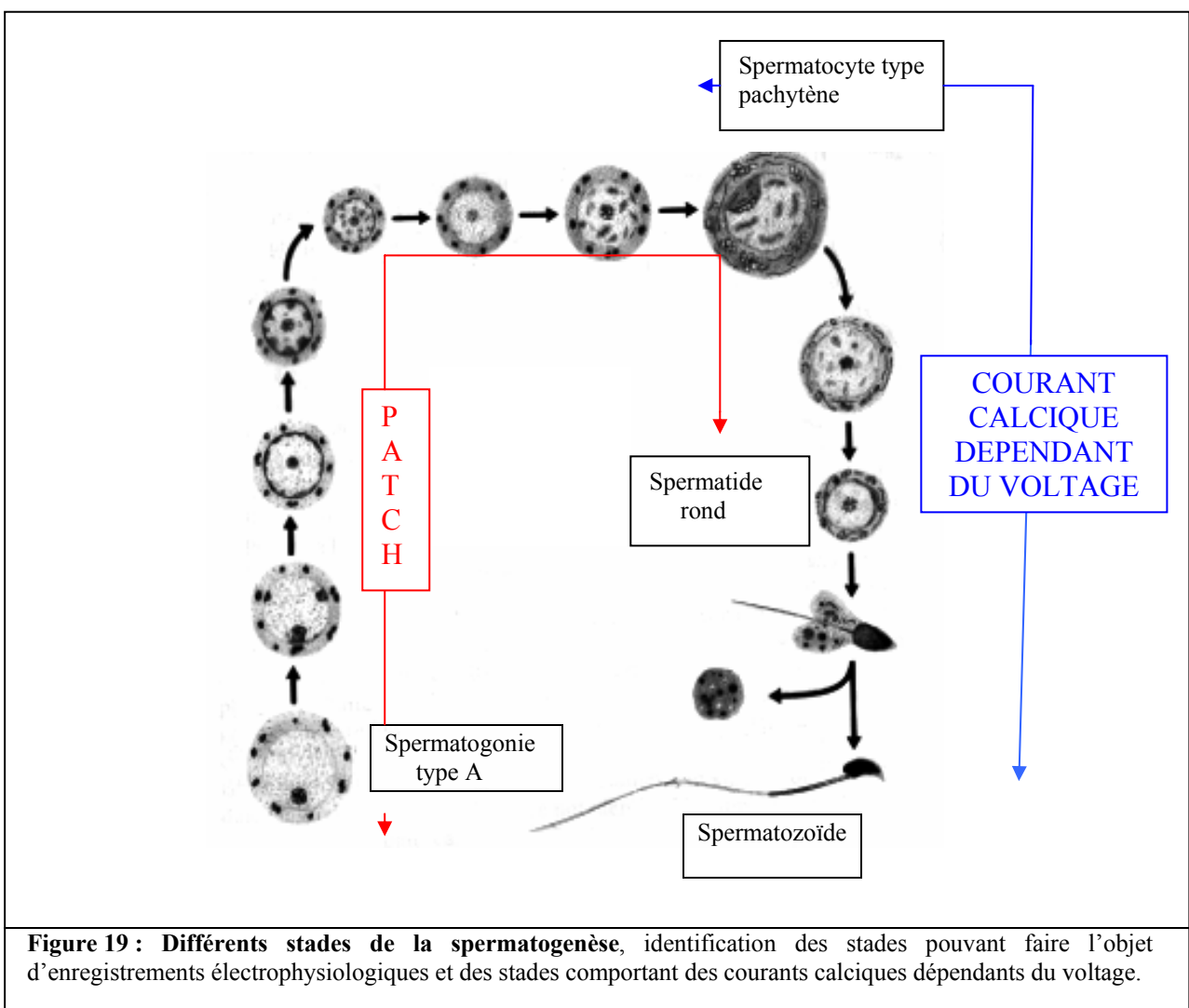


## 2.1. Les canaux calciques dépendants du voltage de type T (VOCCs).

### 2.1.1. Méthodologie.

Afin de caractériser des courants ioniques, le patch clamp est la méthode de référence. Cependant, cette technique s'est révélée impossible à pratiquer sur le spermatozoïde mature. En effet, la composition lipidique de sa membrane et le fait qu'il s'agisse de cellules très compactes ne permet pas d'enregistrer des courants. Une méthode alternative a été mise au point (Arnoult et al., 1996b). Les courants ioniques sont caractérisés dans les cellules

spermatogéniques qui sont les progéniteurs des spermatozoïdes dans les testicules (Figure 19). Les cellules des tubules séminifères se différencient de la spermatogonie en spermatozoïde de manière centripète. Le spermatozoïde est une cellule où il n'y a plus ni transcription ni traduction. Il apparaît que certaines protéines nécessaires au stade spermatozoïde mature soit déjà présentes au stade progéniteurs. Toutes les cellules spermatogéniques ne sont pas équivalentes. En effet, si toutes ces cellules se sont révélées « patchable », elles ne présentent pas toutes des courants calciques dépendants du voltage. Seules les spermatocytes de type pachytène et les spermatides ronds permettent la caractérisation des courants calciques dépendants du voltage par la technique du patch clamp.

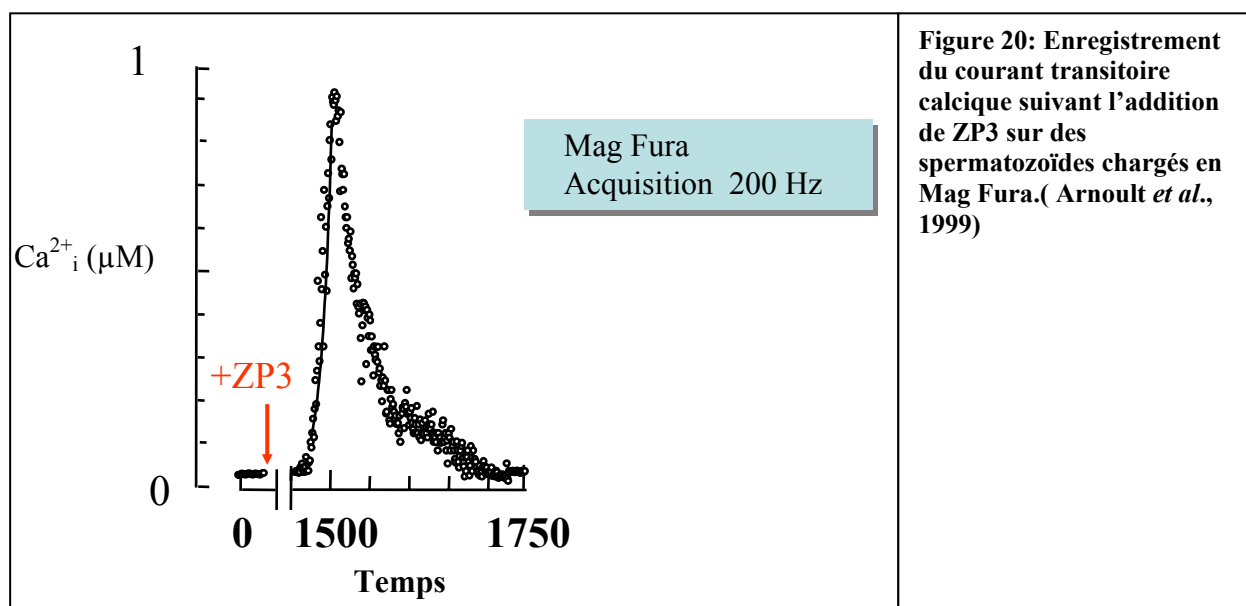


**Figure 19 :** Différents stades de la spermatogenèse, identification des stades pouvant faire l'objet d'enregistrements électrophysiologiques et des stades comportant des courants calciques dépendants du voltage.

### 2.1.2. Historique concernant la mise en évidence d'un canal dépendant du voltage dans la RA.

La liaison du spermatozoïde à ZP3 est responsable à la fois de l'activation d'un canal récepteur aux protéines G (Florman et al., 1989) et déclenche l'ouverture d'un canal cationique peu sélectif. L'ouverture de ce canal cationique entraîne une dépolarisation de la membrane. Cette dépolarisation est à l'origine de l'activation d'un courant calcique dépendant du voltage (Florman et al., 1992). L'activation de ces courants calciques dépendants du voltage est importante pour le déroulement de la RA. L'étude de la durée, de la sensibilité aux inhibiteurs des canaux calciques et de la sélectivité ionique a été effectuée par des techniques utilisant des indicateurs fluorescents de calcium. Ainsi, deux voies de régulation du calcium intracellulaire sont activées par l'agoniste ZP (Florman, 1994). La première voie caractérise un canal cationique peu sélectif et le second correspond à l'ouverture d'un canal sensible aux dihydropyridines. Les dihydropyridines inhibent la réaction acrosomique et l'augmentation de calcium intracellulaire induite par la liaison à la zone pellucide. Ce résultat suggérait que le canal calcique dépendant du voltage qui était activé par la liaison à la zone pellucide était un canal de type HVA.

Des études d'imageries calciques effectuées avec une résolution temporelle très élevée ont révélé la présence d'un courant transitoire qui suit la liaison à ZP3 (Figure 20).



Afin de caractériser les canaux calciques impliqués dans le RA, ceux-ci ont été caractérisés dans les cellules spermatogéniques (Arnoult et al., 1996b). Les enregistrements électrophysiologiques effectués ont montré la présence de courants calciques de type T mais aucun courant de type HVA. De plus, les propriétés pharmacologiques de ces courants sont très proches de celles qui caractérisent la RA (tableau 3). Ainsi, les courants calciques de type T enregistrés dans les cellules spermatogéniques semblent être responsable du courant transitoire qui initie la RA.

	Réaction Acrosomique	Canaux calciques de type T dans les cellules spermatogéniques.
<b>Inhibiteurs</b>	La réaction acrosomique est inhibée par PN200-110, $IC_{50} = 0.07 \mu M$ amiloride, $IC_{50} = 500 \mu M$ cadmium, $IC_{50} = 250-500 \mu M$ nickel, $IC_{50} = 50 \mu M$	Le courant calcique est inhibé par PN200-110, $IC_{50} = 0.039 \mu M$ amiloride, $IC_{50} = 245 \mu M$ cadmium, $IC_{50} = 34 \mu M$ nickel, $IC_{50} = 285 \mu M$
<b>Inhibition Pimozide</b>	La réaction acrosomique est inhibée par le pimozide à : 0.5 $\mu M$ si $V_m^* = -45 mV$ 24 $\mu M$ si $V_m = -80 mV$ * $V_m$ = potentiel de membrane	$IC_{50} = 0.5 \mu M$ si les canaux sont dans un état inactivé, i.e. $V_m > -60 mV$ $IC_{50} = 9 \mu M$ si le canal est fermé, i.e. $V_m < -80 mV$
<b>Potentiel de Membrane</b>	Pas de réaction acrosomique quand $V_m$ est autour de -45 mV	Le canal est inactivé pour $V_m > -60 mV$
<b>Cinétique</b>	Augmentation initiale intracellulaire en calcium, $\tau = 11.4 msec$	Activation du courant, $\tau = \sim 11 \text{ à } 15 msec$

**Tableau 3: Comparaison des caractéristiques biophysiques et pharmacologiques des courants calciques T des cellules spermatogéniques par rapport à la réaction acrosomique.**

De plus, au cours de la capacitation, le potentiel de membrane du spermatozoïde est hyperpolarisé hors les canaux T sont inactivés pour de telles valeurs de potentiel. Ceci suggère que ces canaux T ont un rôle primordial au cours de la réaction acrosomique (Arnoult et al., 1999), que le maintien de ces canaux dans un état inactivé permet de réguler la RA. Le pimozide est un inhibiteur des courants T. Son affinité pour les canaux T est plus élevée lorsque ceux-ci se trouvent dans un état inactivé. L'introduction de pimozide sur des

spermatozoïdes montre une inhibition de la RA avec des valeurs de demi inhibition ( $IC_{50}$ ) différentes si le pimozide est introduit en début ou en fin de capacitation. Ainsi, le maintien à l'état inactivé de ces canaux permet de contrôler leur ouverture finement. De plus, l'inhibition des canaux T éteint toute la signalisation calcique ultérieure et empêche la RA.

Des études ont révélé la présence de courants HVA au niveau de membranes isolées de spermatozoïdes de boeuf (Cox and Peterson, 1989). L'analyse des transcrits présents dans les cellules spermatogéniques révèle des transcrits pour  $\alpha 1C$ . La sous-unité  $\alpha 1C$  testiculaire serait tronquée dans sa partie C terminal (Benoff, 1998). D'autres études ont montré la présence de transcrits pour  $\alpha 1_A$  et  $\alpha 1_E$  (Lievano et al., 1996). Grâce à des techniques d'immunohistochimie, une très large variété de canaux calciques a été identifiée dans le spermatozoïde mature. (Westenbroek and Babcock, 1999) ont localisé les sous-unités  $\alpha 1_A$ ,  $\alpha 1_E$  et  $\alpha 1_C$  au niveau du spermatozoïde.

Le rôle respectif des canaux HVA par rapport aux canaux LVA est l'objet de nombreuses questions. Bien que la présence des canaux HVA ait été montré par immunohistochimie sur le spermatozoïde, seuls des courants de type T peuvent être enregistrés dans les cellules spermatogéniques. L'influx de calcium médié par les canaux T dans les cellules spermatogéniques pourrait représenter un signal pour la différenciation des cellules germinales mâles (Santi et al., 1996). En effet, les spermatocytes de type pachytènes ont un niveau très faible en calcium (environ 50 nM) par rapport aux autres cellules germinales et cette valeur de calcium basale augmente graduellement dans les cellules de stades de différenciation supérieure (Santi et al., 1998). Cependant, le potentiel de membrane étant de  $-15$  mV dans ces cellules, il est peu probable que cette hypothèse se vérifie.

En ce qui concerne les canaux calciques HVA, leur expression ou leur traduction doivent se réaliser dans les étapes ultimes de la spermatogenèse.

## **2.2. Le récepteur à l'IP<sub>3</sub>.**

### **2.2.1. Dans les cellules spermatogéniques.**

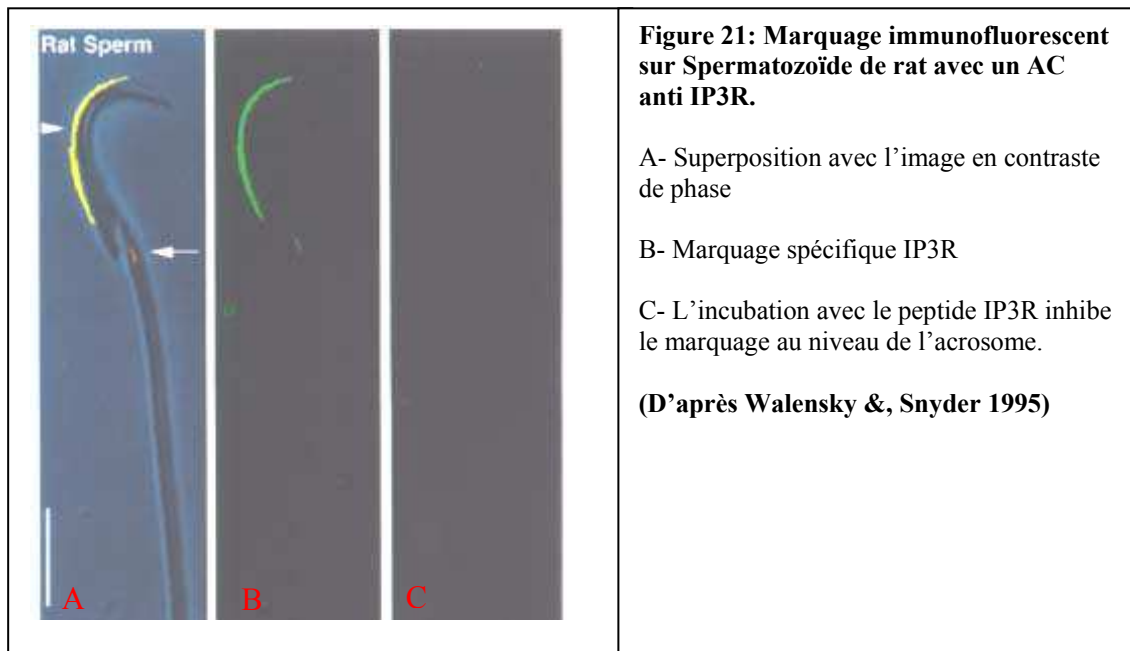
Des études de RT-PCR ont révélé la présence de tous les isoformes du RyR et de l'IP3R dans les cellules spermatogéniques (Trevino et al., 1998). L'utilisation d'anticorps spécifiques contre le RyR et l'IP3R a montré la présence de ces protéines à tous les stades de différenciation des cellules spermatogéniques y compris au niveau du spermatozoïde mature. Les cellules spermatogéniques expriment RyR1 et RyR3 mais pas RyR2. Ces protéines sont



distribuées de façon homogène dans le cytoplasme. En revanche l'IP<sub>3</sub>R possède un marquage plus précis en croissant au niveau de l'appareil de Golgi.

### 2.2.2. Dans le spermatozoïde mature.

Walensky et Snyder en 1995 ont réalisé une étude de référence sur la présence du récepteur à l'IP<sub>3</sub> dans le spermatozoïde mature. Ils ont montré que le spermatozoïde était une cellule très riche en IP<sub>3</sub>R, que l'IP<sub>3</sub>R colocalisait avec l'acrosome (Figure 21) et que le signal disparaissait sur des spermatozoïdes qui ont effectué leur RA.



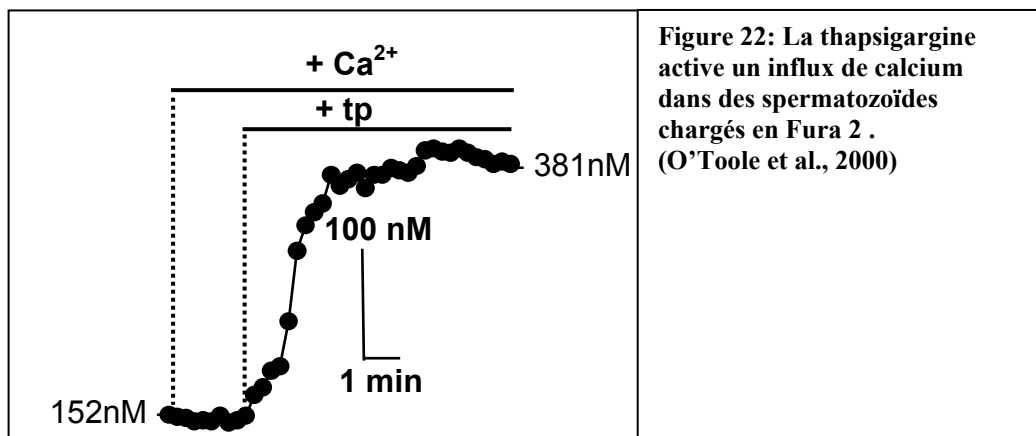
En utilisant la thapsigargine, ils ont provoqué une exocytose acrosomale. La vidange des stocks calciques joue un rôle important et place l'IP<sub>3</sub>R dans une position centrale. La localisation du récepteur à l'IP<sub>3</sub> au niveau de l'acrosome a suggéré que l'acrosome jouait également un rôle de stock calcique. Il a été confirmé récemment que l'acrosome correspondait à la condensation de deux organites en un seul (De Blas et al., 2002) L'utilisation de spermatozoïdes perméabilisés a montré que l'acrosome jouait à la fois le rôle de stock calciques interne et de vésicules de sécrétion. La vidange de ce stock est indispensable pour l'exocytose acrosomique. En effet, le calcium acrosomique aurait un rôle direct dans la fusion des membranes menant à l'exocytose du contenu enzymatique de l'acrosome. L'activation de Rab3A déclenche l'exocytose. Or, cette activation est sous le contrôle de l'ouverture de canaux sensible à l'IP<sub>3</sub>.

La signalisation calcique au cours de la RA est biphasique (Arnoult et al., 1999). Un courant transitoire est suivi d'un courant soutenu. Ce plateau calcique a été attribué à

l'activation des canaux SOCs de la membrane après la vidange des stocks calciques ici l'acrosome. L'activation des canaux SOCs permet l'entrée massive de calcium à partir de l'extérieur de la cellule. Néanmoins, la vidange de l'acrosome passe par l'activation du récepteur à l'IP<sub>3</sub>. En effet, l'utilisation d'un antagoniste de la phospholipase C (U73122) inhibe la production d'IP<sub>3</sub>, le plateau calcique et la RA induite par ZP3 montrant ainsi l'importance de l'IP<sub>3</sub>R dans le plateau calcique. Cependant, la vidange des stocks calciques de l'acrosome par un ionophore calcique en zéro calcium externe n'induit pas le plateau calcique donc l'activation de l'IP<sub>3</sub>R est nécessaire mais pas suffisante pour la réponse calcique soutenue.

### 2.3. Les canaux TRPCs.

L'influx de calcium déclenché par la thapsigargine (Figure 22), un activateur classique des canaux SOCs, avait les mêmes caractéristiques que l'influx de calcium enregistré au cours de la RA déclenchée par ZP3. Ce résultat suggère que les SOCs pourraient être responsable du plateau calcique.



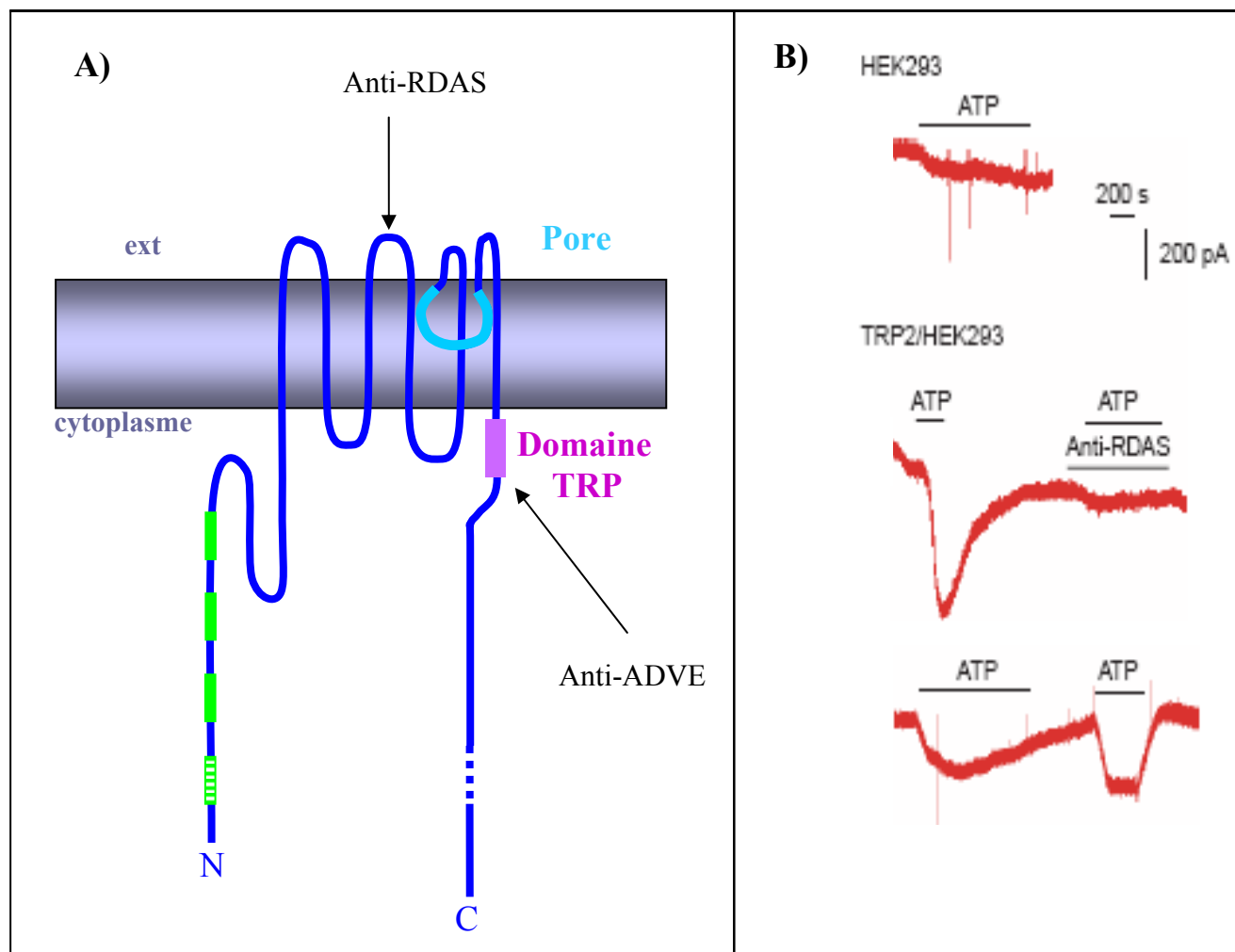
De plus, l'influx capacitif et l'influx dépendant de ZP3 partagent les mêmes inhibiteurs comme le Nickel ( $IC_{50} = 1 \text{ mM}$ ) ou l'AN1043 ( $IC_{50}=1\mu\text{M}$ ) (O'Toole et al., 2000).

L'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre TRPC2 (Jungnickel et al., 2001) révèle la présence de TRPC2 au niveau de la tête de spermatozoïde. L'utilisation d'un anticorps fonctionnel permet d'inhiber les courants calciques à travers celui-ci. Or cette inhibition empêche la RA. Ainsi, TRPC2 joue un rôle important dans la signalisation calcique soutenue déclenchée par la liaison à ZP3. Cependant, la souris KO TRPC2 reste fertile (Leypold et al., 2002). Ce qui suggère que d'autres TRPCs pourraient se substituer à TRPC2. D'ailleurs des études récentes ont montré la présence de TRPC1, 2, 3, 4, 5 et 6

(Trevino et al., 2001, Jungnickel et al., 2001, Castellano et al., 2003, Sutton et al., 2004) dans le spermatozoïde.

### 2.3.1. TRPC2.

La mise au point de deux anticorps contre TRPC2 a permis sa caractérisation fonctionnelle dans le spermatozoïde (Jungnickel et al., 2001). Le premier anticorps appelé RDAS est un anticorps fonctionnel, c'est-à-dire qu'il inhibe les courants TRPC2. Le second appelé ADVE est dirigé contre la partie Cter de la protéine (Figure 23). Ils expriment de façon transitoire le clone 17 dans des cellules HEK. Après activation des récepteurs purinergiques par l'ATP, ils obtiennent un courant qui est inhibé par l'anticorps RDAS. Ces anticorps utilisés directement sur des spermatozoïdes bloquent l'effet de la thapsigargine et la RA.



**Figure 23 : Les anticorps anti TRPC2.**

A) L'anticorps RDAS est dirigé contre la boucle 3-4 du canal. L'anticorps ADVE est dirigé contre la partie Cter de TRPC2 et comprend la séquence du domaine TRP

B) L'anticorps RDAS est un anticorps fonctionnel qui inhibe les courants TRPC2. Les courants TRPC2 sont obtenus après transfection transitoire du clone 14 et d'un ADNc codant pour un récepteur métabotrope. L'application d'ATP permet d'activer des courants calciques qui sont inhibés par l'anticorps RDAS.

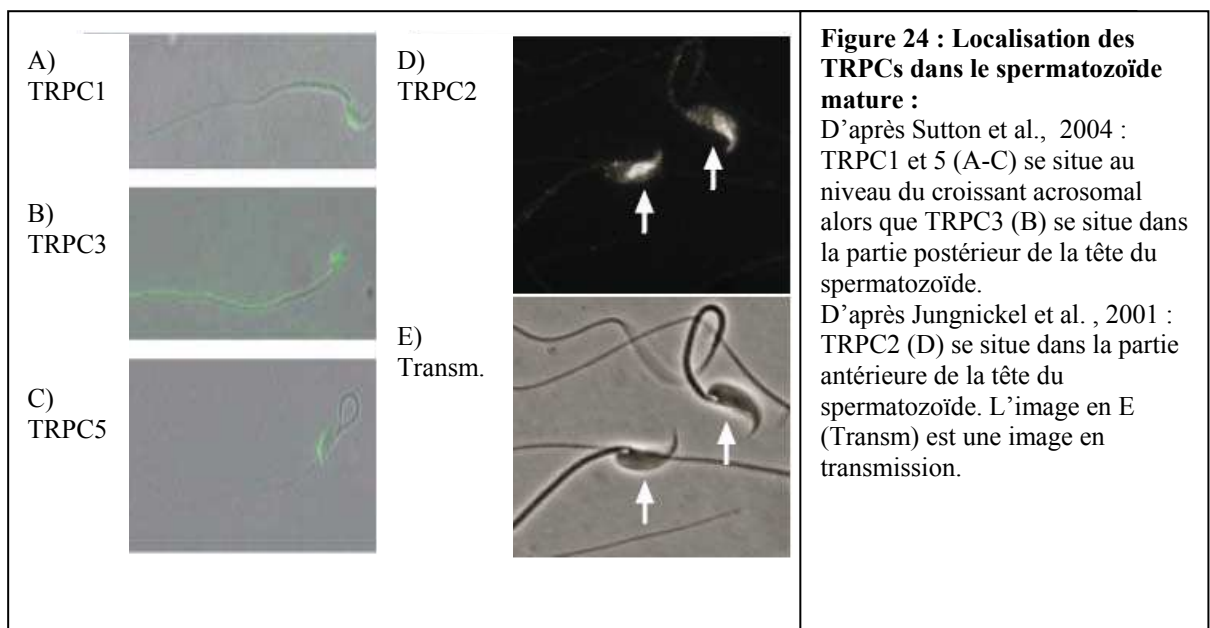
(D'après Jungnickel et al., 2001).

### 2.3.2. Les autres TRPCs.

Des gènes pour les autres membres des TRPC s'expriment au cours de la spermatogenèse (Castellano et al., 2003 ; Trevino et al., 2001). Ceux-ci pourraient conduire le courant calcique résiduel qui persiste après le blocage du courant TRPC2 (Jungnickel et al., 2001). La localisation de ces protéines montre (Figure 24):

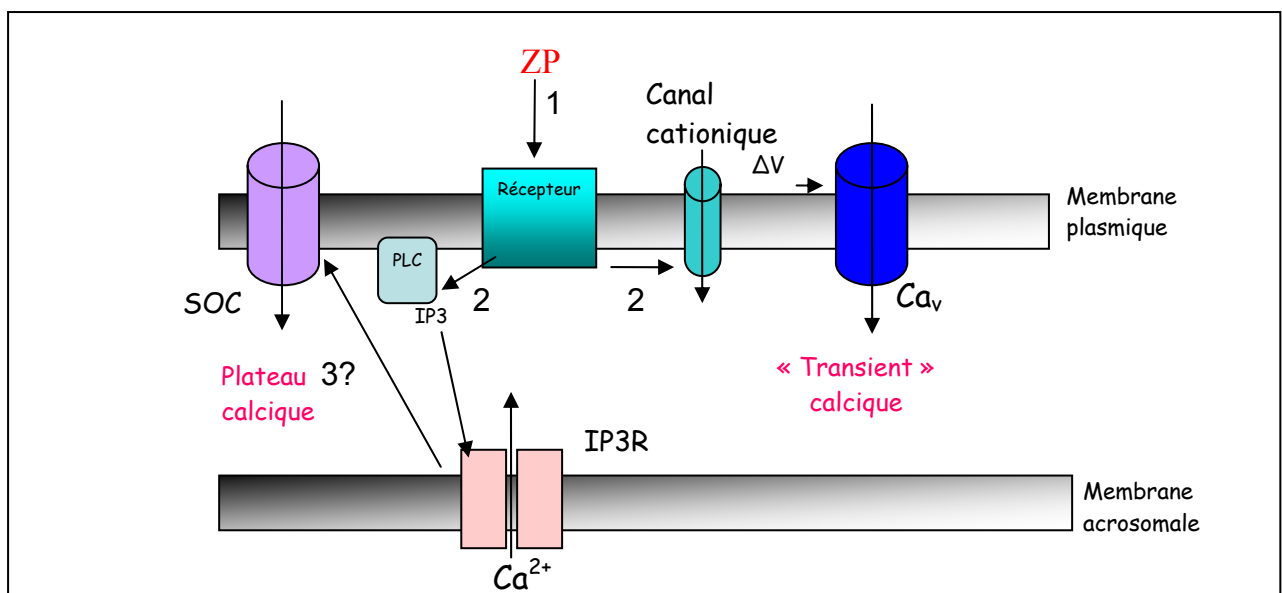
- TRPC2 est présent au niveau antérieur de la tête du spermatozoïde (Jungnickel et al., 2001).
- TRPC1 et 5 se situent au niveau du croissant acrosomal (Sutton et al., 2004)
- TRPC3 se situe dans la partie postérieure de la tête et dans la pièce principale du flagelle.

La souris KO pour TRPC2 est fertile (Stowers et al., 2002) ce qui suggère que d'autres TRPC peuvent se substituer à TRPC2 au cours de la RA.





De manière assez inhabituelle pour une exocytose, l'augmentation intracellulaire de calcium nécessaire à la réaction acrosomique fait intervenir plusieurs familles de canaux calciques. La signalisation calcique qui régule la RA du spermatozoïde de Mammifère est une signalisation calcique particulière qui nécessite l'activation de trois différents types de canaux calciques. Le premier à s'activer est le canal calcique dépendant du voltage de type T puis c'est le tour du récepteur à l'IP<sub>3</sub> et le dernier à s'ouvrir est le canal TRPC2. La visualisation de cette signalisation en imagerie calcique montre tout d'abord une augmentation transitoire de la concentration calcique interne qui correspond à l'ouverture du canal de type T puis une augmentation plus importante et plus longue appelée plateau calcique qui dure plusieurs minutes. Au bout du plateau calcique, la membrane de l'acrosome fusionne avec la membrane plasmique. La synthèse de l'ensemble des résultats obtenus par les techniques d'électrophysiologie, d'imagerie calcique et de biologie cellulaire nous permet de proposer le scénario suivant: La fixation de ZP3 active deux voies parallèles. Tout d'abord, la stimulation de la phospholipase C permet la synthèse d'IP<sub>3</sub> et de DAG. Ensuite, une conductance cationique, non caractérisée, est activée et entraîne une dépolarisation de la cellule. La synthèse d'IP<sub>3</sub> permet l'activation de récepteur à l'IP<sub>3</sub> tandis que la dépolarisation de la membrane permet l'activation d'un canal LVA. D'une manière encore inexpliquée, le canal TRPC2 est à son tour finalement activé (Figure 25).



**Figure 25 : Scénario proposé pour la signalisation calcique de la RA.**

- 1) La liaison à la zone pellucide (ZP) active un récepteur non caractérisé.
- 2) Celui-ci active à son tour un canal cationique et la PLC. La dépolarisation induite permet l'ouverture d'un canal calcique dépendant du voltage de type T qui est responsable du courant calcique transitoire.
- 3) Les canaux SOCs de la membrane plasmique sont activés suite à la vidange du stock calcique ici l'acrosome et sont responsable d'une entrée massive de calcium : c'est le plateau calcique. Mais l'activation des canaux SOCs de la membrane plasmique à la suite de l'activation de l'IP3R reste encore inexpliquée.

Malgré l'impressionnante quantité de données accumulées sur cette signalisation calcique particulière et supportant le scénario proposé, de nombreuses zones d'ombre persistent :

**- Caractérisation moléculaire des canaux LVA.**

D'un point de vue quantitatif, les canaux calciques dépendants du voltage ne contribuent que très minoritairement à la signalisation calcique. La quantité d'ions calcium rentrant dans la cellule pendant la centaine de millisecondes du transitoire est en effet négligeable par rapport à celle s'engouffrant dans la cellule pendant les minutes que dure l'activation des canaux SOC. Pour autant, les inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des canaux calciques dépendants du voltage, bloquent puissamment la réaction acrosomique, en ralentissant l'activation des SOC (Arnoult et al., 1996). Ce résultat semble indiquer que le flux calcique transitant par ces canaux est indispensable au bon déroulement des événements. Le canal LVA est ainsi le gardien de la signalisation calcique de la réaction acrosomique. En tant que tel, il est le siège de nombreuses régulations cellulaires soit positives, soit négatives (voir chapitre 1).

Afin de mieux appréhender ces régulations, la caractérisation moléculaire de ce courant calcique est une étape fondamentale. Celle-ci ouvrira la voie à d'autres études comme la caractérisation des sites de régulation ou la recherche de partenaires spécifiques spermatiques.

**- Rôle du flux calcique transitant par les LVA.**

Si le flux calcique transitant par les canaux LVA semble fondamental à la vue des expériences pharmacologiques, les cibles intracellulaires des ions calcium sont pour l'instant parfaitement inconnues. Une des cibles privilégiées pourrait être l'IP<sub>3</sub>R. En effet, le calcium est un puissant cofacteur de ce canal calcique et il pourrait ainsi faciliter l'ouverture des IP<sub>3</sub>R activés par l'augmentation d'IP<sub>3</sub> concomitante. D'une manière troublante, et en contradiction avec la conclusion précédente, l'absence transitoire de calcium externe pendant la phase d'activation des canaux dépendant du voltage, n'a pas d'effet sur l'activation des SOC (O'Toole et al., 2000). Le blocage des canaux par des inhibiteurs ne semble donc pas équivalent à l'absence de calcium externe pendant la fenêtre de temps d'activation. Si aujourd'hui nous sommes incapables de donner une explication cohérente à ces expériences contradictoires, ce désaccord permet d'imaginer de nouvelles hypothèses concernant le rôle

des canaux LVA dans l'activation de l'IP3R ou le SOC, indépendantes du flux calcique, à l'image de ce qui est décrit pour l'activation du RyR, via le DHPR dans la cellule musculaire squelettique. Pour appréhender ces nouvelles relations possibles entre les canaux LVA et les deux autres canaux calciques, il nous est paru opportun de regarder si les caractéristiques biophysiques d'un canal calcique pouvaient être modulées par l'activation des autres canaux.

**-Mécanismes d'activation des canaux TRPCs impliqués dans la réaction acrosomique.**

Les mécanismes d'activation des canaux TRPCs restent largement débattus. Le fait que l'ensemble des 7 canaux TRPCs possède un site de fixation pour l'IP3R sur la partie C-terminale (Tang et al., 2001) semble indiquer que ces canaux pourraient être activés par un couplage mécanique, via une modification de l'IP3R ou de ces protéines partenaires. En agrément avec cette hypothèse, il a été montré récemment que l'activation de TRPC3 était modulée par la junctate, une protéine située dans le réticulum et partenaire moléculaire de l'IP3R (Treves et al., 2004). Cependant d'autres hypothèses alternatives existent, comme une activation directe par le DAG ou d'autres phospholipides. Le débat se complique encore lorsque l'on sait qu'un même TRPC peut être activé par différentes voies en fonction de sa localisation tissulaire ou de son niveau d'expression (Vazquez et al., 2003). Ainsi les mécanismes d'activation de TRPC2 semblent dépendre de la localisation tissulaire. TRPC2 est un canal fonctionnel chez les rongeurs (Vannier et al., 1999), spécifiquement exprimé dans l'organe voméronasal, où il joue un rôle fondamental dans la détection des phéromones (Stowers et al., 2002), dans les spermatozoïdes où il est impliqué dans la RA (Jungnickel et al., 2001) et dans les érythroblastes, où il contrôle leur prolifération et leur différenciation (Chu et al., 2002). Dans les neurones de l'organe voméronasal, TRPC2 est clairement activé directement par le DAG, indépendamment de l'activation de l'IP3R (Lucas et al., 2003). Par contre dans les érythroblastes, l'activation de TRPC2 passe par un couplage direct entre l'IP3R et TRPC2 (Tong et al., 2004). Contrairement à ces deux types cellulaires, les mécanismes d'activation de TRPC2 dans le spermatozoïde sont moins compris.

Afin de préciser le mode d'activation de TRPC2 dans les spermatozoïdes, nous nous sommes attachés à montrer la présence dans le spermatozoïde de protéines décrites pour faire la liaison entre les TRPCs et l'IP3R comme la junctate, ainsi que de caractériser la fixation d'une telle protéine sur le canal TRPC2.





*Article 1.*

*Interaction fonctionnelle entre les canaux LVA des  
cellules spermatogéniques et les canaux calciques  
modulés par la Thapsigargine*



## **Introduction.**

Les canaux calciques de type T jouent un rôle crucial lors de la réaction acrosomique du spermatozoïde de Mammifères au cours de laquelle trois différents types de canaux ont été identifiés et s'activent successivement (Walensky and Snyder, 1995 ;O'Toole et al., 2000). Les canaux de type T sont les premiers à s'activer (Arnoult et al., 1996; Arnoult et al., 1999). L'influx de calcium passant par ces canaux est transitoire et leur inactivation par des inhibiteurs spécifiques bloquent l'activation du récepteur à l'IP<sub>3</sub> situé au niveau de l'acrosome et d'un canal de type SOC TRPC2 (Jungnickel et al., 2001). Ainsi, le fait que l'activation de ces canaux de type T constitue l'événement initial de la signalisation calcique lors de la réaction acrosomique rend l'étude de leur régulation très importante. Nous avons voulu comprendre le rôle des ions calcium transitant par le canal T dans la suite de la signalisation en regardant si les caractéristiques biophysiques de ce canal étaient modifiées après activation des autres canaux calciques impliqués dans la RA.

Pour cela, nous avons utilisé des outils pharmacologiques pour moduler le récepteur à l'IP<sub>3</sub> et les canaux calciques TRPCs et observer les conséquences sur les propriétés biophysiques du canal calcique de type T. Nous avons observé l'effet de la thapsigargine sur la facilitation dépendante du voltage des canaux T dans les cellules spermatogéniques. Certains canaux ne s'activent pas lors de dépolarisation de la membrane, ils sont dans un état réfractaire. Cependant de fortes dépolarisations sont capables de les activer, ce phénomène est appelé facilitation dépendante du voltage. La facilitation dépendante du voltage a été montrée dans les cellules spermatogéniques. Les courants T sont « facilités » grâce à une inhibition de la phosphorylation sur tyrosine (Arnoult et al., 1997). Nous avons mis en évidence une nouvelle facilitation dépendante du voltage dans les cellules spermatogéniques. Nous avons étudié le rôle du calcium cytosolique sur la facilitation des courants LVA. Nous avons modifié la concentration intracellulaire en calcium en introduisant des chélateurs du calcium dans le milieu de la pipette d'enregistrement et par l'addition de modulateurs calciques comme la thapsigargine et l'ionophore calcique A23187. La diminution de la concentration intracellulaire en calcium permet de mettre en évidence une facilitation dépendante du voltage et du calcium.



# Functional Interaction between Mouse Spermatogenic LVA and Thapsigargin-Modulated Calcium Channels

S everine Stambouliau, Michel De Waard, Michel Villaz, and Christophe Arnoult<sup>1</sup>

CEA/Grenoble, Laboratoire INSERM E9931 "Canaux Ioniques et Signalisation", 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France

The acrosome reaction in mouse is triggered by a long-lasting calcium signaling produced by a chain of openings of several calcium channels, a low-voltage-activated (LVA) calcium channel, an inositol trisphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R), and the store-operated calcium channel TRP2. Since mature sperm cells are refractory to patch clamp experiments, we study the functional interactions among those sperm calcium channels in spermatogenic cells. We have studied the role of cytosolic calcium in voltage-dependent facilitation of low voltage-activated calcium channels. Calcium concentration was modified through the inclusion of the calcium buffers, EGTA and BAPTA, in the recording pipette solution, and by addition of calcium modulators like thapsigargin and the calcium ionophore A23187. We demonstrate that lowering calcium concentration below resting level allows to evidence a voltage-dependent facilitation. We also show that LVA calcium channels present strong voltage-dependent inhibition by thapsigargin. This effect is independent of cytosolic calcium elevation secondary to calcium store depletion and to the activation of TRP channels. Our data evidence an interesting functional relationship, in this cell type, between LVA channels and proteins whose activity is related to calcium filling state of the endoplasmic reticulum (presumably TRP channels and inositol triphosphate receptor). These relationships may contribute to the regulation of calcium signaling during acrosome reaction of mature sperm cell.   2002 Elsevier Science (USA)

**Key Words:** mouse; spermatogenic cells; calcium channel, T-type calcium channel; TRP calcium channel; capacitative calcium entry; inositol 1,4,5 trisphosphate receptor; acrosome reaction.

## INTRODUCTION

Calcium is a nonmetabolized second messenger and different types of calcium pumps and calcium channels contribute to regulate its concentration in the cell. There are several types of calcium channels, as classified by gating stimulus. Voltage-dependent calcium channels represent one of these classes. They are opened by depolarization of the plasma membrane. This relationship between gating and membrane depolarization is not always perfect since some of the calcium channels are reluctant to be activated by depolarization. However, large and short depolarizations to positive potential or an increase of depolarization frequency are able to move these channels from a reluctant state to a willing state. This phenomenon has been termed voltage-dependent facilitation and was first described in chromaffin cells (Fenwick *et al.*,

1982). It was subsequently found in cardiac myocytes, neurons, and in several other cell types (reviewed by Dolphin, 1996). Voltage-dependent facilitation has been explained by various molecular mechanisms. These include (1) relief of tonic G-protein inhibition, (2) cAMP-dependent phosphorylation (Sculptoreanu *et al.*, 1993), or (3) calcium-dependent biophysical changes (Zygmunt and Maylie, 1990). Voltage-dependent facilitation allows to increase calcium influx and calcium signaling when action potential frequency increases. For instance, the physiological role of facilitation is to increase the secretion of catecholamin during stress in chromaffin cells (Artalejo *et al.*, 1990).

Voltage-dependent facilitation has also been described in rodent spermatogenic cells (Arnoult *et al.*, 1997). In these cells, facilitation involves low-voltage-activated (LVA) calcium channels and is due to the relief, induced by large depolarization, of a tonic tyrosine-phosphorylation inhibition. However, in spite of the existence of a facilitation in spermatogenic cells, there is no obvious evidence yet for a

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: (33) 4 38 78 50 41. E-mail: carnoult@cea.fr.

physiological role of either facilitation or tyrosine-phosphorylation in those cells. This lack of evident physiological role stems from the fact that the resting membrane potential of these cells is largely depolarized and that LVA channels are inactivated in these conditions. The same observation holds true for sperm cells before capacitation (Arnoult *et al.*, 1999). However, LVA channels acquire a physiological importance during capacitation since the resting membrane potential shifts from depolarized toward hyperpolarized potentials. This shift in membrane potential clearly represents a first priming step in the activation of LVA channels. What appears less clear to date is how the phosphorylation state of the channel evolves during capacitation and subsequently during the beginning of acrosome reaction. One can only speculate that the dephosphorylation of LVA channels may represent the second step in the activation of the channels. In such a scheme, facilitation potentially represents a mechanism to release the second step of LVA channel inhibition. LVA channel regulation thus appears as a central mechanism for the triggering of calcium signaling of acrosome reaction, which involves two other types of calcium channels, an  $IP_3R$  (Walensky and Snyder, 1995) and Trp2 (Jungnickel *et al.*, 2001). Spermatogenic cells are a relevant system to study mature sperm LVA channel regulation because (1) spermatogenic cells are suitable for patch-clamp experiments, whereas it has been impossible so far to record ionic currents from mature sperm cells (Ren *et al.*, 2001) and (2) it is suspected that LVA channel properties are identical to those present in mature sperm cells (Arnoult *et al.*, 1996, 1999; Santi *et al.*, 1996). As ion channels can be controlled by several additional mechanisms other than simply membrane potential and phosphorylation/dephosphorylation (Espinosa *et al.*, 2000; Lopez-Gonzalez *et al.*, 2001), we examined other forms of LVA channel regulation. A better knowledge of spermatogenic LVA calcium channel regulations should give important clues to understand how mature sperm cells control calcium influx via those channels and then control the triggering of acrosome reaction.

In this manuscript, we demonstrate that spermatogenic LVA calcium channels can be facilitated by mechanisms different than phosphorylation/dephosphorylation. The second type of facilitation present in this cell type is regulated by intracellular calcium concentration. We also show that LVA calcium channels present strong voltage-dependent inhibition by thapsigargin-induced calcium store depletion. Calcium increases triggered by permeation through an ionophore or dialysis from the pipette solution have no effect. Moreover, dialysis of high concentrations of EGTA or BAPTA through the pipette is unable to reverse thapsigargin-induced calcium current inhibition.

Our data evidence in this cell type a unique functional relationship between LVA and calcium channels whose activity is related to calcium filling state of the endoplasmic reticulum (TRP channels and  $IP_3$  receptor), that may contribute to the regulation of calcium signaling during acrosome reaction of mature sperm cell.

## METHODS

### Chemicals

A23187, tyrphostin A47, and thapsigargin (from Calbiochem) have been dissolved in DMSO. The percentage of contaminant DMSO in the recording solution never goes above 0.01% v/v. Control experiments demonstrated that this solvent had no effect on calcium current amplitude even at concentrations of 0.02% ( $n = 7$ ; data not shown).

### Preparation of Spermatogenic Cells

Seminiferous tubules were isolated from the testes of OF1 mice (16 weeks old; Iffa Credo, France) and incubated at 37°C for 30 min in 3 ml of a preservation solution (in mM): NaCl 150, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 12, D-glucose 11, (pH 7.4) supplemented with collagenase type IA (1 mg/ml; Sigma). Tubules were rinsed twice in collagenase-free medium and cut into 2-mm sections. Spermatogenic cells were individualized by manual trituration and settled/attached into culture dishes coated with Cell-Tak (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA). Pachytene spermatocytes and round spermatids are the prominent cell types obtained from the diploid meiotic and the haploid postmeiotic stages of spermatogenesis, respectively. These cells are readily distinguished based on cellular and nuclear morphology (Romrell *et al.*, 1976). These stages were thus routinely used for electrophysiological recording. However, similar results were obtained with both stages and the data were pooled for presentation. The amplitude of the current is proportional to the size of the cell, and the amplitudes vary from -30/-50 pA for round spermatids to -80/-150 pA for pachytene spermatocytes.

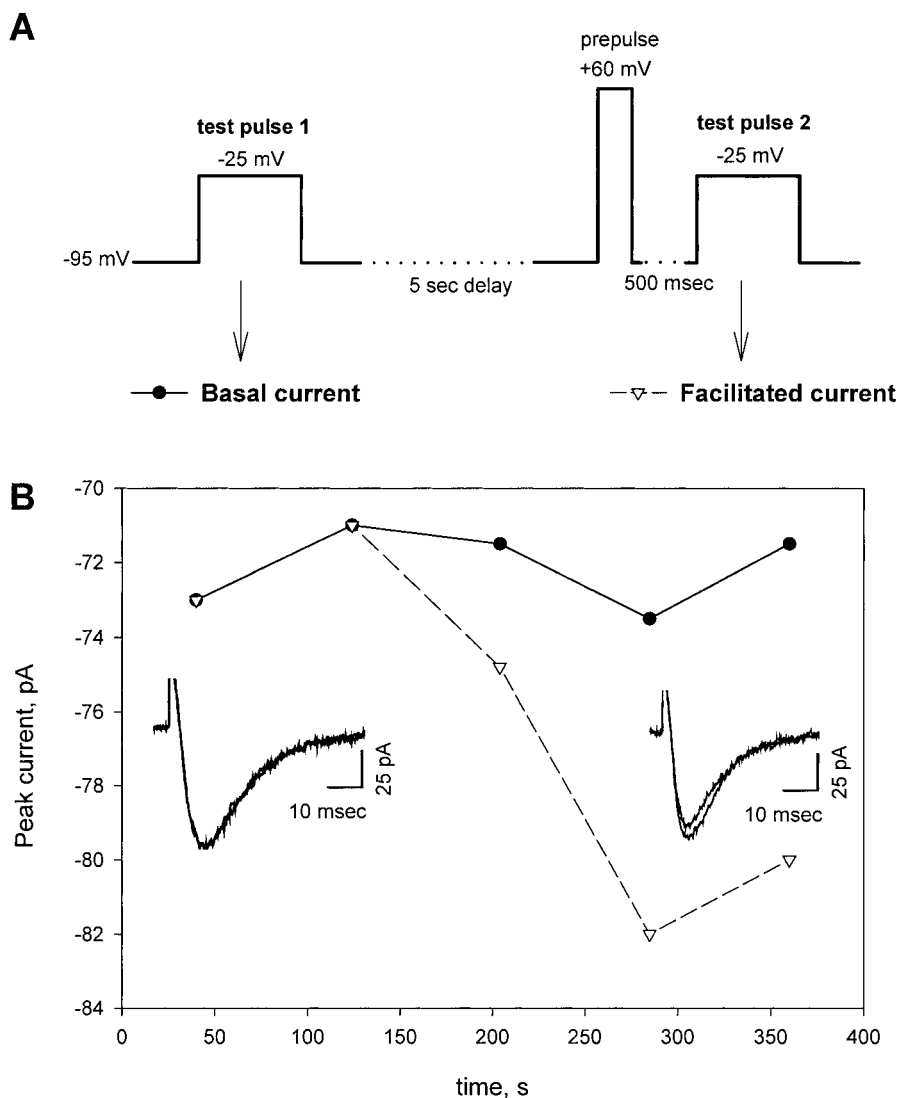
### Electrophysiological Recordings

Ca<sup>2+</sup> currents were recorded in the whole-cell configuration of patch-clamp technique and analyzed by using Biopatch (BioLogic, France). Pipettes were pulled from Corning #7052 glass (Gardner Glass Co., CA) and fire polished. Pipette resistance was 5–7 M $\Omega$ . Currents were obtained with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments). All traces were corrected on-line for leak and capacitance currents, filtered at 2 kHz, and digitized at 10 kHz. Other details of the voltage protocols were provided in Results. Data are typically expressed as peak current amplitudes.

The pipette solution was designed to eliminate all K<sup>+</sup> currents and consisted of the following components (in mM): Cs-glutamate 130, D-glucose 5, Hepes 10, MgCl<sub>2</sub> 2.5, Mg<sub>2</sub>ATP 4, EGTA-Cs 10, pH 7.2 (adjusted with CsOH). When different pipette solutions are used, details are provided in the Results section. For recording experiments, the preservation solution was changed to a recording solution that consisted of the following (in mM): NaCl 100, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 10, MgCl<sub>2</sub> 1, TEA-Cl 26, Na-lactate 6, Hepes 10, and D-glucose 3.3, pH 7.4 (adjusted with NaOH). The cells are isolated in a 1-ml chamber and perfused at a rate of 4–8 ml/min. All experiments are performed at room temperature (~25°C).

### Statistical Studies

When necessary, the data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (S.D.) and compared with *t*-test performed with the software SigmaPlot (SPSS Inc.).



**FIG. 1.** Perfusion of pipette solution into the cell induces voltage-dependent facilitation. (A) Voltage protocol used to evidence facilitation in spermatogenic cells. The cell is maintained at a holding potential of  $-95$  mV. The basal current is produced by a depolarization step from  $-95$  to  $-25$  mV. The facilitated current is produced by a 100-ms depolarizing prepulse that is delivered 500 ms prior to an activating depolarization of similar amplitude to the control step. (B) Time course of appearance of facilitation.  $t = 0$  s corresponds to the starting point of the whole-cell configuration. (Insets) Superimposed traces of basal and facilitated currents 40 and 285 s after membrane breakage. Peak basal current (●) and peak facilitated current (▽).

## RESULTS

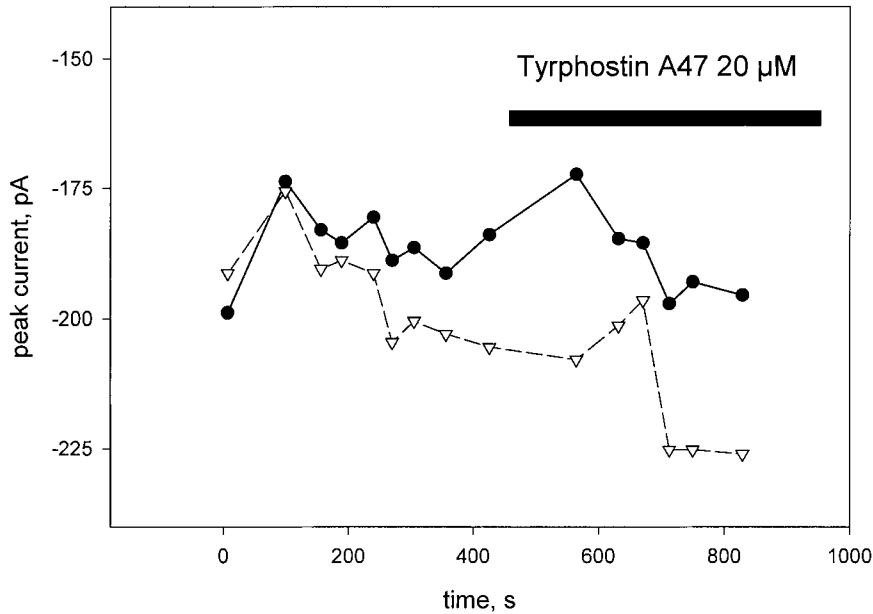
### *Evidence of a New Type of Voltage-Dependent Facilitation in Spermatogenic Cells*

As facilitation can be sustained by many different mechanisms, we studied whether LVA channel facilitation in spermatogenic cells could be induced by mechanisms different than a phosphorylation/dephosphorylation cycle.

**Voltage-dependent facilitation is elicited by pipette solution perfusion.** Voltage-dependent facilitation can be measured by a classical prepulse protocol (Fig. 1A), as

previously described (Arnoult *et al.*, 1997). When this protocol is applied in spermatogenic cells, immediately after establishing the patch-clamp whole-cell configuration, 95% of the cells present no voltage-dependent facilitation (Fig. 1B). However, voltage-dependent facilitation appears progressively with a maximum after 5–10 min of cell perfusion. The average increase in current amplitude following facilitation was  $11.3 \pm 6.3\%$  ( $n = 16$ ) after 10 min in whole-cell configuration with a pipette solution containing 10 mM EGTA. This observation suggests that voltage-dependent facilitation of LVA channels may be





**FIG. 2.** Voltage-dependent facilitation induced by cell dialysis is not modulated by tyrphostin. Bath application of 20  $\mu\text{M}$  tyrphostin A47 (black bar) at  $t = 450$  s after membrane breakage does not prevent facilitation.  $t = 0$  s corresponds to the starting point of the whole-cell configuration. Representative experiment of  $n = 3$ . Same voltage protocol to evidence facilitation as indicated in Fig. 1. Peak basal current (●) and peak facilitated current (▽).

under the inhibitory control of a diffusible second messenger that is washed-out by the intracellular dialysis of the cell.

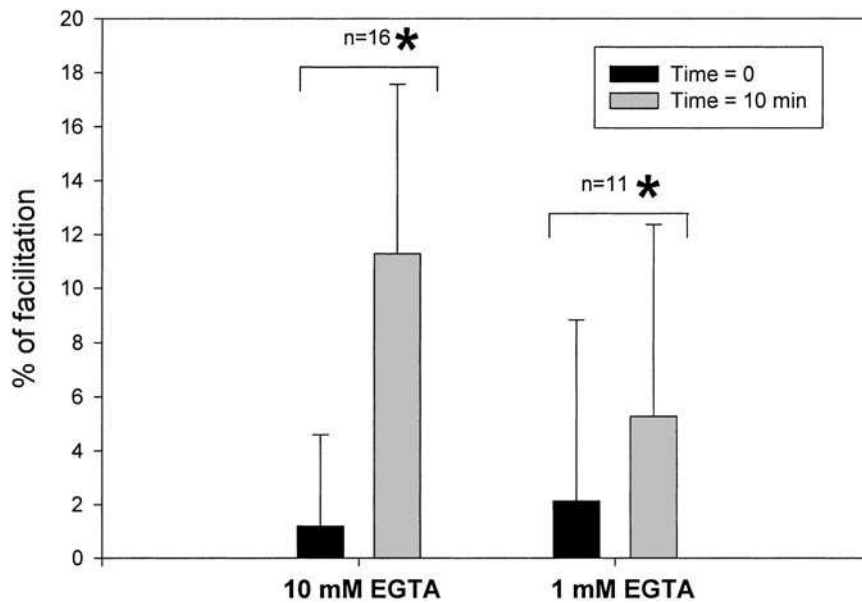
If this interpretation holds true, it suggests that the addition of appropriate second messengers in the pipette solution represents an appropriate mean to counteract the appearance or properties of voltage-dependent facilitation. We found that voltage-dependent facilitation is still present following addition of GTP or cAMP (data not shown). Moreover, ATP is added in all the pipette solutions used: solutions containing 10 mM EGTA, 1 mM EGTA, and 10  $\mu\text{M}$  free calcium. Only the pipette solution containing 10 mM EGTA elicits a voltage-dependent facilitation (see below). Then, ATP should not interfere on the voltage-dependent facilitation.

**Perfusion-induced voltage-dependent facilitation is not modulated by tyrosine-kinase inhibitor.** A voltage-dependent facilitation has already been described in spermatogenic cells of CD1 mice strain. In OF1 mice strain, voltage-dependent facilitation appears only with cell dialysis, contrary to what is observed in spermatogenic cells from the CD1 strain. This difference in behavior of voltage-dependent facilitation suggests that the mechanisms underlying this process are different in these strains. To test this hypothesis, we tested whether voltage-dependent facilitation of OF1 spermatogenic cells is modulated by tyrphostin A47, a tyrosine kinase inhibitor which was very potent on the facilitation in CD1 strain (Arnoult *et al.*, 1997). Figure 2 shows that bath application of 20  $\mu\text{M}$  tyrphostin A47 does

not abolish the voltage-dependent facilitation as expected from our previous report on CD1 strain ( $n = 3$ ). In CD1-derived spermatogenic cells, the voltage-dependent facilitation induced by cell-dialysis has not been evidenced, probably owing to the fact that it is hidden by the large dephosphorylation-induced potentiation.

### Effects of Cytoplasmic Calcium Modulators on Voltage-Dependent Facilitation

**Free cytoplasmic calcium concentration modulates LVA voltage-dependent facilitation.** We further investigated why cell dialysis induces voltage-dependent facilitation in spermatogenic cells. Cytoplasmic calcium is known to modulate voltage-dependent facilitation of calcium channels in cardiomyocytes (Fedida *et al.*, 1988). In order to study whether calcium may affect calcium currents and facilitation, we altered cytoplasmic calcium level by changing the EGTA concentration in the pipette solution. We measured voltage-dependent facilitation with either 1 or 10 mM EGTA concentration in the pipette solution. Clearly, the level of voltage-dependent facilitation is proportional to EGTA concentration (Fig. 3). As described previously in Fig. 1, cell perfusion with 10 mM EGTA in the pipette induces a significant rise in voltage-dependent facilitation ( $11.3 \pm 6.3\%$ ,  $n = 16$ ) after 10 min of dialysis. A similar experiment with 1 mM EGTA produces a smaller facilitation ( $5.3 \pm 7.1\%$ ,  $n = 11$ ), demonstrating that free calcium concentration probably acts as an inhibitor of facilitation, calcium



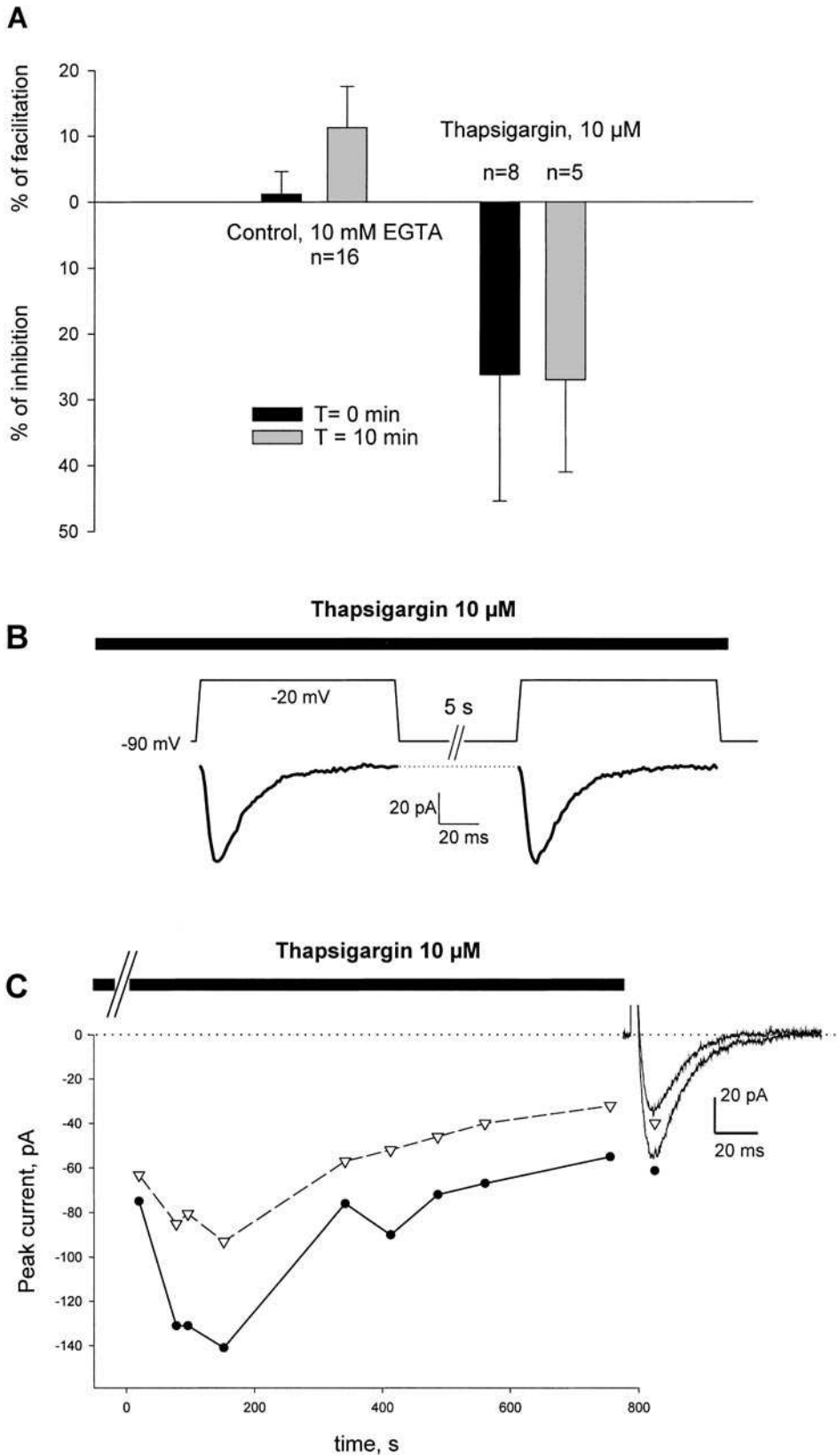
**FIG. 3.** Facilitation is a function of EGTA concentration in the pipette solution. Average amount of facilitation in spermatogenic cells is compared at  $t = 0$  (black bars) and 10 min (gray bars) after cell dialysis with two different EGTA concentrations in the pipette. Data with 10 mM EGTA correspond to the mean  $\pm$  S.D. of  $n = 16$  different cells obtained from 12 different males and data with 1 mM EGTA correspond to the mean  $\pm$  S.D. of  $n = 11$  different cells obtained from 8 different males. The facilitation between 10 mM EGTA and 1 mM EGTA is statistically different (\*,  $P \leq 0.05$  with  $t$ -test).

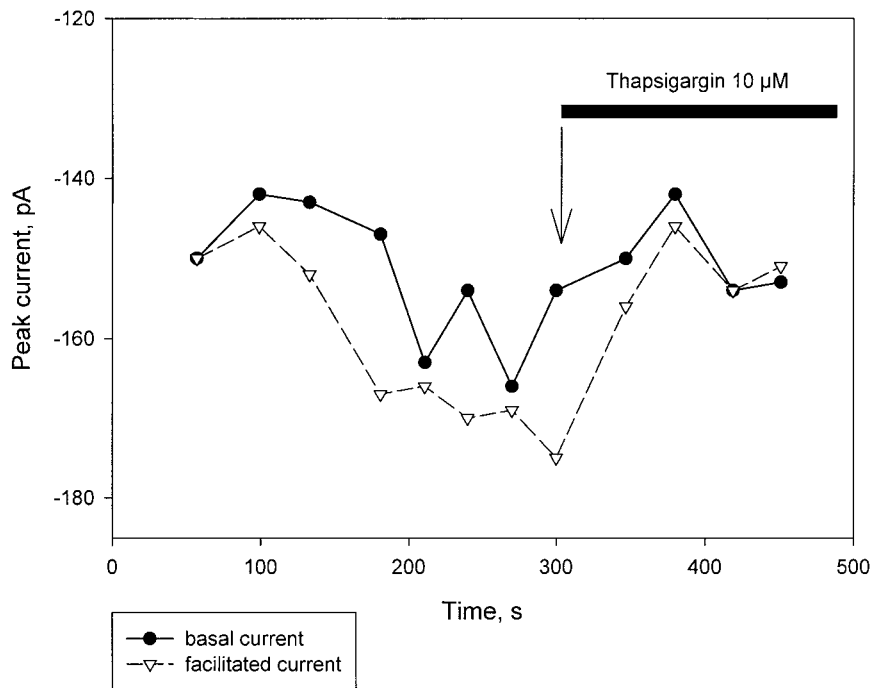
concentration in the pipette solution increasing 10-fold from 0.2 to 2.6 nM with 10 mM EGTA and 1 mM EGTA, respectively. Free  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations have been determined with the *Alex* program (Vivaudou et al., 1991), assuming a concentration of total contaminant calcium of  $\sim 25 \mu\text{M}$  in solutions deprived of nominal calcium salts. If, as admitted, free ion concentrations in cells are close or at least proportional to those of the pipette solution, these concentrations are well below the basal calcium concentration that is assumed to be 100 nM in spermatogenic cells (Trevino et al., 1998) and then unusual for a calcium-dependent event. However, we are studying a phenomenon, which occurs during calcium channel openings: the calcium concentration in the vicinity of the channel should transiently rise to unknown and more physiological levels because the buffering of calcium by EGTA is slow. Then, one should not infer  $K_d$  values from the values of free calcium concentrations in the pipette solution and evidence of voltage-dependent facilitation is rather due to a difference in buffering capacity when pipette solution changes from 1 to 10 mM EGTA.

**Thapsigargin modulates LVA voltage-dependent facilitation.** The results obtained with EGTA suggest that increased cytosolic calcium concentration can inhibit voltage-dependent facilitation. We next determined whether calcium elevation by another mean than a change in EGTA concentration in the pipette could also affect facilitation. Thapsigargin is known to produce a sustained increase in calcium concentration in spermatogenic cells

(Trevino et al., 1998). Thapsigargin (10  $\mu\text{M}$ ) was added in the bath solution at least 30 min before recording. Figure 4A compares the amount of facilitation produced in these cells in the absence and presence of thapsigargin, respectively. Whereas a facilitation clearly develops over 10 min, thapsigargin produces a voltage-dependent inhibition immediately present after breaking the seal; inhibition that is maintained over the 10-min recording period. On average, the prepulse produced a decrease of  $26.2 \pm 19.2\%$  ( $n = 8$ ,  $t = 0$  min) and  $27.0 \pm 14.0\%$  ( $n = 5$ ,  $t = 10$  min) in the presence of thapsigargin compared with an increase of  $2.1 \pm 6.7\%$  ( $n = 16$ ,  $t = 0$  min) and  $11.3 \pm 6.3\%$  ( $n = 16$ ,  $t = 10$  min) in untreated cells. Lower concentration of thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ) produces an inhibition of the prepulse treated current as well (data not shown). However, the extent of inhibition is lower with 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin ( $14.2 \pm 6.6\%$  ( $n = 8$ )) instead of  $26.2 \pm 19.2\%$  for 10  $\mu\text{M}$  thapsigargin, at  $t = 0$ .

This decrease in current amplitude is really triggered by the prepulse protocol itself since application of thapsigargin has no effect on the amplitude of the second depolarization-induced current in the absence of a prepulse (Fig. 4B). The recordings made on current amplitude at  $t = 0$  and 10 min demonstrate that the inhibition in current amplitude produced by the prepulse in the presence of thapsigargin does not evolve with cell dialysis (Fig. 4A). This suggests that EGTA dialysis of the cell has no effect on the thapsigargin-induced prepulse inhibition contrary to the facilitation observed in the absence of thapsigargin. Figure 4C illus-





**FIG. 5.** Time course of the effect of thapsigargin application on voltage-dependent facilitation induced by cell dialysis. Cell is dialyzed with 10 mM EGTA in the pipette solution.  $t = 0$  s corresponds to the starting point of the whole-cell configuration. At  $t = 300$  s, bath perfusion of  $10 \mu\text{M}$  thapsigargin (black bar) inhibits voltage-dependent facilitation induced by dialysis. Same voltage protocol to evidence facilitation as indicated in Fig. 1: Peak basal current (●) and peak facilitated current (▽). Representative experiment of  $n = 4$ .

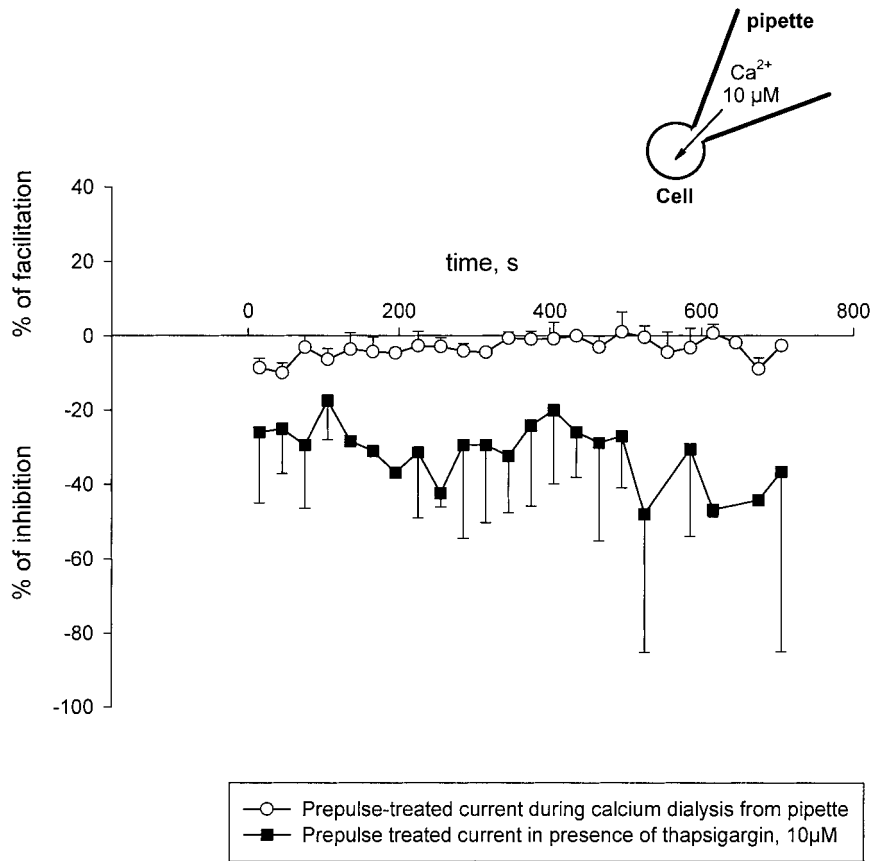
trates the time course of the current amplitudes before and after prepulse in thapsigargin-treated cells during EGTA dialysis. In agreement with an inhibitory role of a high cytosolic calcium concentration level on calcium channels, calcium currents are initially low, then progressively increase indicating the effective dialysis of EGTA and the efficient cytosolic calcium buffering. In contrast, the inhibitory effect of the prepulse is maintained throughout the recording period. Moreover, thapsigargin inhibits or masks the voltage-dependent facilitation induced by EGTA dialysis. The decrease of the amplitude of the current at the end of the recording period is likely due to the run-down of the current. However, we did not notice a correlation between the amplitude of the run-down and the presence of thapsi-

gargin (data not shown). Moreover, we studied the effect of thapsigargin in the absence of EGTA in the pipette, and we did record same level of inhibition of the prepulse-treated current (data not shown). Therefore, the inhibition of the prepulse-treated current is not due to EGTA.

Figure 5 demonstrates that thapsigargin produces a full inhibition on the facilitation after 2 min of application on the cell. Overall, these observations suggest that the effect of thapsigargin may be a consequence of calcium store-depletion independently of cytosolic calcium increase.

**The thapsigargin effect is not due to a generalized cytosolic calcium elevation.** To evaluate the role of calcium in thapsigargin-induced reduction of the prepulse-treated current, we tested how voltage-dependent inhibi-

**FIG. 4.** Thapsigargin inhibits voltage-dependent facilitation. (A) Average amount of facilitation/reduction in spermatogenic cells in control condition [10 mM EGTA, at  $t = 0$  (black bars) and 10 min (gray bars)] is compared with the prepulse effect in the presence of  $10 \mu\text{M}$  thapsigargin. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (B) Absence of thapsigargin effect on LVA current amplitude in the absence of prepulse. (Upper trace) Depolarizations from a holding potential of  $-95$  mV to a test potential of  $-25$  mV; 5-s interval between two depolarizations. (Lower trace) Corresponding recorded currents. (C) Time course of currents during cell dialysis in the presence of thapsigargin. Cells have been incubated at least 30 min with  $10 \mu\text{M}$  thapsigargin prior to electrophysiological study.  $t = 0$  s corresponds to the starting point of the whole-cell configuration. Representative experiment of  $n = 5$ . Same voltage protocol to evidence facilitation as indicated in Fig. 1: Peak basal current (●) and peak prepulse-treated current (▽). Recordings presented at the right of the graph are superimposed current traces obtained at 750 s during the last challenge: basal current (●) and prepulse-treated current (▽).



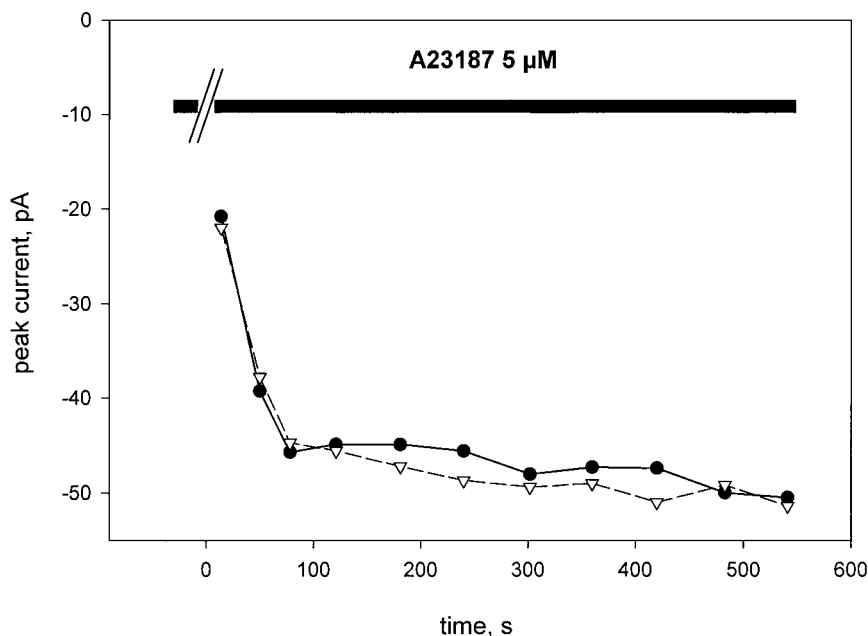
**FIG. 6.** Calcium dialysis through the pipette solution has no effect on voltage-dependent facilitation contrary to thapsigargin. The rate of facilitation/inhibition induced by the prepulse has been measured during calcium dialysis through a pipette solution containing  $10 \mu\text{M}$  free calcium concentration ( $\circ$ ,  $n = 3$ ).  $t = 0$  s corresponds to the starting point of the whole-cell configuration. In comparison, the rate of inhibition of prepulse-treated current induced by incubation with  $10 \mu\text{M}$  thapsigargin (at least 30 min) is shown ( $\blacksquare$ ,  $n = 5$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  S.D.

tion of the calcium current would be modified if cytosolic calcium was increased by different protocols. First, we increased cytosolic calcium by dialyzing the cell with a pipette solution containing  $10 \mu\text{M}$  free  $\text{Ca}^{2+}$ . The pipette solution was designed with Alex program (Vivaudou *et al.*, 1991) and consisted of the following components (in mM): Cs-glutamate 140, D-glucose 5, Hepes 10,  $\text{MgCl}_2$  5,  $\text{Mg}_2\text{ATP}$  3, EGTA-Cs 5,  $\text{CaCl}_2$  4.95, pH 7.2 (adjusted with CsOH). As generally accepted, the free calcium concentration in the cell cytoplasm should reach in about a few tenths of a second a concentration close to  $10 \mu\text{M}$ . This cytoplasmic calcium increase does neither produce a reduction of the prepulse treated current (Fig. 6,  $n = 3$ ), even after 10 min of dialysis, nor a facilitation which was expected since facilitation required calcium concentrations be lowered to nanomolar levels (Fig. 4). In Fig. 6, we also show for comparison the thapsigargin effect on the prepulse-treated calcium current. Again, it should be noticed that the calcium current reduction, induced by thapsigargin, is maintained

throughout the experiment, in spite of the fact that, in these experiments, cytoplasmic calcium concentration should decrease since cells are dialyzed with  $10 \text{ mM}$  EGTA (Fig. 6,  $n = 5$ ).

In a second set of experiments, we used A23187, a calcium ionophore, to produce a generalized calcium increase. Contrary to thapsigargin, and like calcium dialysis through the pipette solution, a 15-min incubation of spermatogenic cells with  $5 \mu\text{M}$  A23187 before seal breakage does not produce prepulse-induced inhibition (Fig. 7,  $n = 5$ ). However, like thapsigargin-treated cells, dialysis of A23187-incubated cells with EGTA increases the calcium currents (basal and prepulse-treated) demonstrating that A23187 was effective in increasing cytosolic calcium concentration (Fig. 7).

**BAPTA, a fast calcium chelator, does not reverse LVA voltage-dependent reduction induced by thapsigargin.** From our data, it would appear that the effect of thapsigargin on the prepulse-treated current does not occur through



**FIG. 7.** The calcium ionophore A23187 has no effect on voltage-dependent facilitation. Time course of the effect of A23187 incubation on voltage-dependent facilitation induced by dialysis. Cells have been incubated at least 15 min with 5  $\mu\text{M}$  A23187 prior to electrophysiological study (black bar).  $t = 0$  s corresponds to the starting point of the whole-cell configuration. Representative experiment of  $n = 5$ . Same voltage protocol to evidence facilitation as indicated in Fig. 1: peak basal current (●) and peak facilitated current (▽).

the bias of a generalized cytosolic calcium increase since neither 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  in the pipette nor A23187 are able to reproduce the effect of thapsigargin. However, one may not rule out that the effect of thapsigargin may be related to a very localized calcium increase near the LVA channels not easily mimicked by other calcium elevation means. In order to test this hypothesis, we studied the effect of BAPTA, given that the rapid Ca binding by BAPTA is generally used as a tool to identify local Ca effects (Zong and Hofmann, 1996; You *et al.*, 1997). Figure 8 illustrates the time course of current amplitude change in thapsigargin-treated cells during BAPTA dialysis. Dialysis of BAPTA from the pipette during 7 min was unable to reverse the inhibition of the prepulse-treated current.

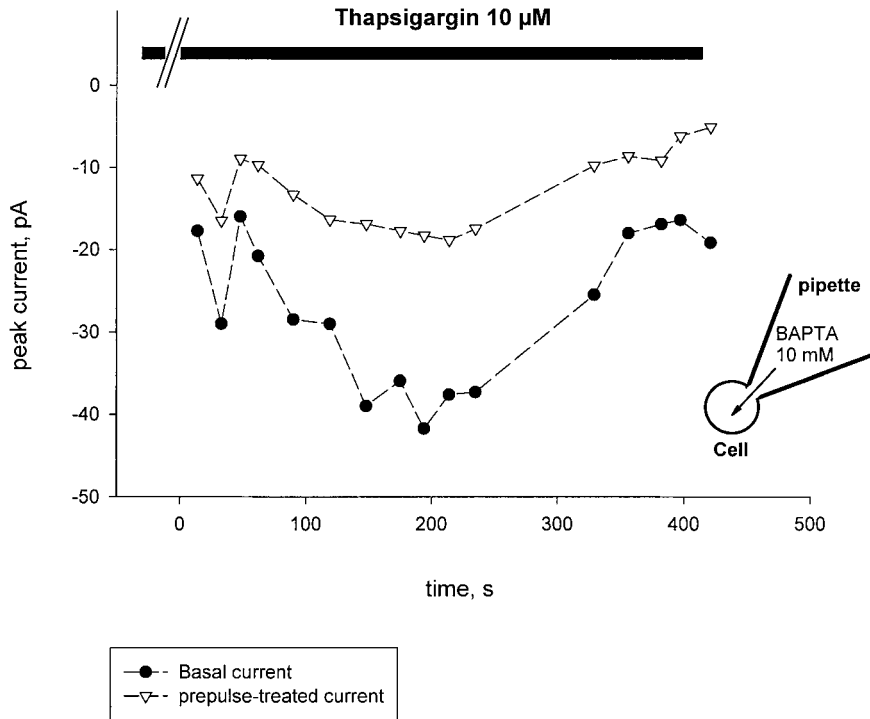
These data suggest that the thapsigargin effect is not related to cytosolic calcium concentration contrary to the calcium current facilitation. These data uncover a novel peculiar relationship between the filling state of internal calcium stores and LVA channel activity.

## DISCUSSION

In this manuscript, we studied the role of cytosolic calcium in the voltage-dependent facilitation of calcium channels in spermatogenic cells. We also investigated the influence of the calcium filling state of the endoplasmic reticulum on the properties of the LVA channels. Our data

demonstrate that, under basal nanomolar cytosolic calcium concentrations, a voltage-dependent facilitation of LVA channels is readily evidenced. Increasing calcium concentration through the use of the A23187 calcium ionophore or calcium perfusion of the cell through the pipette solution produces an inhibition of the facilitation. In addition, incubation of cells with the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase blocker, thapsigargin, not only occludes the observed facilitation, but also produces a voltage-dependent inhibition of the LVA currents.

At the physiological level, LVA channels play a crucial role in the sperm acrosome reaction. Three different types of calcium channels are successively activated during mouse acrosome reaction (Walensky and Snyder, 1995; O'Toole *et al.*, 2000). Low-voltage activated calcium channels are the first to be activated (Arnoult *et al.*, 1996, 1999). Calcium influx through LVA channels is itself required for the activation of two other calcium channels, an IP3 receptor and a TRP2 channel (Jungnickel *et al.*, 2001). Since the activation of LVA channels is the initiating event of calcium signaling during acrosome reaction, regulation of these channels should have a particularly high physiological relevance. Curiously, however, little is known on LVA channel regulation in general and in these cells in particular. There is no doubt that LVA channels should be as richly regulated than HVA calcium channels (Catterall, 2000). In fact, preliminary evidences suggest diverse regulation of LVA channels. In frog atrial cells, voltage-dependent facili-



**FIG. 8.** BAPTA does not prevent the thapsigargin effect. Time course of the effect of 10 mM BAPTA dialysis on thapsigargin-induced voltage-dependent inhibition. Thapsigargin (10  $\mu$ M) was added 40 min prior to electrophysiological study.  $t = 0$  s corresponds to the starting point of the whole-cell configuration.  $n = 2$  experiments. Same voltage protocol as indicated in Fig. 1: peak basal current (●) and prepulse-treated peak current (▽).

tation is due to the transient voltage-dependent relief of a tonic inhibitory G-protein regulation (Alvarez *et al.*, 1996). In newt olfactory receptor cells, T-type calcium current is up-regulated by cGMP-dependent phosphorylation (Kawai and Miyachi, 2001). Tyrosine phosphorylation is also responsible for a form of voltage-dependent facilitation in spermatogenic cells of CD1 mice strain (Arnoult *et al.*, 1997).

In this manuscript, we demonstrate the existence of a calcium-dependent, voltage-dependent facilitation in spermatogenic cells of OF1 mice strain. One of the remaining questions about this calcium-induced voltage-dependent facilitation is the physiological role of such phenomena. Our data illustrate that LVA channel regulation is still more diverse than expected. At low cytosolic calcium concentration, LVA channel recruitment is facilitated by membrane depolarization. This process should facilitate the contribution of LVA channels to calcium signaling and the acrosome reaction. At higher concentration, when LVA channel activation is no longer required, this process is inhibited. At the molecular level, calcium-dependent facilitation is reportedly due to changes in calcium-dependent inactivation of HVA calcium channels in myocytes (Fedida *et al.*, 1988). To date, there is no evidence to lead us to believe that calcium modifies directly inactivation of LVA

channels. Moreover, we did not observe a kinetic difference in the time course of inactivation of the prepulse-modulated LVA current (data not shown). Finally, it should be emphasized that, during the prepulse, no calcium enters through the LVA calcium channel, since at +60 mV the current is outward. The molecular mechanism whereby calcium buffering produces a voltage-dependent facilitation thus remains to be investigated.

We made a particularly interesting observation through the use of thapsigargin. Submicromolar thapsigargin inhibits a SERCA-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and has two cellular consequences. First, in a short bursting event, it empties the internal calcium stores for a long period of time. Second, it activates store-operated channels (TRP channels) leading to a long-lasting calcium influx from the external medium. Previous studies demonstrate the presence of various TRP channels in spermatogenic cells and also that thapsigargin effectively produces a cytoplasmic calcium increase (Trevino *et al.*, 1998). In this study, we used 10  $\mu$ M thapsigargin to get a maximal effect to modulate voltage-dependent facilitation, since 1  $\mu$ M produces a weaker effect. In sperm or in spermatogenic cells, such a concentration appears to be required to get full activation of TRP channels (Walensky and Snyder, 1995; Jungnickel *et al.*, 2001; Trevino *et al.*, 1998). Sperm SERCA calcium ATPase may

be less sensitive to thapsigargin than other cell types, suggesting that they may be encoded by different isoforms. In our hands, this drug produces not only a loss of voltage-dependent facilitation but also an inhibition of the current amplitude that follows the prepulse. We speculate that the loss of facilitation produced by thapsigargin is related to a general cytosolic calcium increase presumably following the activation of TRP channels. Similar absence of facilitation are observed by using A23187 or  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded pipettes. The inhibition of current amplitude that follows the prepulse in the presence of thapsigargin cannot easily be related to a calcium effect. First, a fast calcium chelator, such as BAPTA, is unable to reverse the thapsigargin effect which rules out the possibility that, calcium, entering via TRP channels located in very close spatial proximity to the LVA channels, acts as a regulator of LVA channels. Second, neither A23187 nor increased cytosolic calcium mimic the effect of thapsigargin. As with the facilitation, prepulse-induced inhibition in the presence of thapsigargin is not due to calcium itself. With regards to the molecular mechanisms at stake for the effect of thapsigargin, we are facing a situation in which calcium is not the contributing factor of the phenomena observed. It is therefore not excluded that both the facilitation and the thapsigargin-induced inhibition share one or several common pathways. This drug has two major long-lasting molecular effects: the change in  $\text{IP}_3$  receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) state due to luminal calcium depletion from the endoplasmic reticulum and activation of TRP channels. The prepulse-induced current inhibition occurring in the presence of thapsigargin is also long-lasting suggesting a direct link between these processes. We can only surmise that there may be a preferential LVA/ $\text{IP}_3\text{R}$ , LVA/TRP or LVA/TRP/ $\text{IP}_3\text{R}$  relationship. Among the various combinations, we favor the first one owing to analogous functional relationships that have been deciphered between ryanodine receptors, homologous to  $\text{IP}_3\text{R}$ , and voltage-dependent calcium channels both in skeletal muscles (Marty *et al.*, 1994) and in brain (Chavis *et al.*, 1996). In sperm cells, this concept of a molecular proximity of these two channel types is particularly relevant. Indeed,  $\text{IP}_3\text{R}$  may be organized in a microdomain of the acrosome in order to have interaction with some components of the plasma membrane and this specific membranes organization has already been suggested for its involvement in TRP channel activation (Kiselyov *et al.*, 1998; Patterson *et al.*, 1999). This hypothesis may explain why LVA channels play such a crucial role in the triggering of calcium release via  $\text{IP}_3\text{R}$  and acrosome reaction in sperm cell, in spite of the presence of different HVA (High-voltage-activated)  $\alpha$  subunits (Wenemuth *et al.*, 2000).

## ACKNOWLEDGMENT

M.D.W. is a recipient of an ACI grant from the French Ministry of Scientific Research.

## REFERENCES

- Alvarez, J. L., Rubio, L. S., and Vassort, G. (1996). Facilitation of T-type calcium current in bullfrog atrial cells: Voltage-dependent relief of a G protein inhibitory tone. *J. Physiol. (Lond.)* **491**, 321–334.
- Arnoult, C., Cardullo, R. A., Lemos, J. R., and Florman, H. M. (1996). Activation of mouse sperm T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13004–13009.
- Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M., and Florman, H. M. (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6757–6762.
- Arnoult, C., Lemos, J. R., and Florman, H. M. (1997). Voltage-dependent modulation of T-type calcium channels by protein tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **16**, 1593–1599.
- Artalejo, C. R., Ariano, M. A., Perlman, R. L., and Fox, A. P. (1990). Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature* **348**, 239–242.
- Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 521–555.
- Chavis, P., Fagni, L., Lansman, J. B., and Bockaert, J. (1996). Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature* **382**, 719–722.
- Dolphin, A. C. (1996). Facilitation of  $\text{Ca}^{2+}$  current in excitable cells. *Trends Neurosci.* **19**, 35–43.
- Espinosa, F., Lopez-Gonzalez, I., Munoz-Garay, C., Felix, R., De La Vega-Beltran J. L., Kopf, G. S., Visconti, P. E., and Darszon, A. (2000). Dual regulation of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FEBS Lett.* **475**, 251–256.
- Fedida, D., Noble, D., and Spindler, A. J. (1988). Mechanism of the use dependence of  $\text{Ca}^{2+}$  current in guinea-pig myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* **405**, 461–475.
- Fenwick, E. M., Marty, A., and Neher, E. (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)* **331**, 599–635.
- Jungnickel, M. K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J. R., and Florman, H. M. (2001). Trp2 regulates entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat. Cell Biol.* **3**, 499–502.
- Kawai, F., and Miyachi, E. (2001). Modulation by cGMP of the voltage-gated currents in newt olfactory receptor cells. *Neurosci. Res.* **39**, 327–337.
- Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L., and Muallem, S. (1998). Functional interaction between  $\text{InsP}_3$  receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* **396**, 478–482.
- Lopez-Gonzalez, I., De La Vega-Beltran, J. L., Santi, C. M., Florman, H. M., Felix, R., and Darszon, A. (2001). Calmodulin antagonists inhibit T-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* **236**, 210–219.
- Marty, I., Robert, M., Villaz, M., De Jongh, K., Lai, Y., Catterall, W. A., and Ronjat, M. (1994). Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2270–2274.
- O'Toole, C. M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A., and Florman, H. M. (2000).  $\text{Ca}^{2+}$  entry through store-operated



- channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1571–1584.
- Patterson, R. L., van, R. D., and Gill, D. L. (1999). Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry: Evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* **98**, 487–499.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L., and Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**, 603–609.
- Romrell, L. J., Bellve, A. R., and Fawcett, D. W. (1976). Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Dev. Biol.* **49**, 119–131.
- Santi, C. M., Darszon, A., and Hernandez-Cruz, A. (1996). A dihydropyridine-sensitive T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current is the main  $\text{Ca}^{2+}$  current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am. J. Physiol.* **271**, C1583–C1593.
- Sculptoreanu, A., Rotman, E., Takahashi, M., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1993). Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel alpha 1 subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10135–10139.
- Trevino, C. L., Santi, C. M., Beltran, C., Hernandez-Cruz, A., Darszon, A., and Lomeli, H. (1998). Localisation of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: Possible functional implications. *Zygote* **6**, 159–172.
- Vivaudou, M. B., Arnoult, C., and Villaz, M. (1991). Skeletal muscle ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels recorded from sarcolemmal blebs of split fibers: ATP inhibition is reduced by magnesium and ADP. *J. Membr. Biol.* **122**, 165–175.
- Walensky, L. D., and Snyder, S. H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell Biol.* **130**, 857–869.
- Wennemuth, G., Westenbroek, R. E., Xu, T., Hille, B., and Babcock, D. F. (2000).  $\text{CaV}2.2$  and  $\text{CaV}2.3$  (N- and R-type)  $\text{Ca}^{2+}$  channels in depolarization-evoked entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into mouse sperm. *J. Biol. Chem.* **275**, 21210–21217.
- You, Y., Pelzer, D. J., and Pelzer, S. (1997). Modulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current by fast and slow  $\text{Ca}^{2+}$  buffering in guinea pig ventricular cardiomyocytes. *Biophys. J.* **72**, 175–187.
- Zong, X., and Hofmann, F. (1996).  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of the class C L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel is a property of the alpha 1 subunit. *FEBS Lett.* **378**, 121–125.
- Zygmunt, A. C., and Maylie, J. (1990). Stimulation-dependent facilitation of the high threshold calcium current in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* **428**, 653–671.

Received for publication February 25, 2002

Revised August 5, 2002

Accepted September 11, 2002

Published online October 24, 2002

## Conclusion.

Dans ce manuscrit nous démontrons que les courants calciques portés par les canaux T peuvent être augmenté par deux voies différentes. La première, déjà décrite, correspond à une phosphorylation du canal T sur des résidus tyrosines (Arnoult et al., 1997) ; la deuxième est nouvelle et passe par une régulation par le calcium cytosolique. En faisant varier le calcium cytosolique, nous avons découvert qu'une facilitation dépendante du voltage apparaissait lors de la diminution de la concentration intracellulaire en calcium. Nous montrons également que le courant T facilité présente une forte inhibition par la thapsigargine. Cette inhibition dépend du voltage.

Nous avons étudié le rôle du calcium cytosolique sur la facilitation dépendante du voltage des canaux T. Nous avons fait diminuer la concentration calcique en utilisant des tampons calciques: EGTA et BAPTA. La facilitation dépendante du voltage n'apparaît que lorsque la concentration de calcium cytoplasmique est abaissée à des niveaux de l'ordre du nanomolaire. Nous avons également étudié l'effet d'une forte concentration de calcium en utilisant l'A23187 qui est ionophore calcique ou en imposant une concentration très élevée de calcium (10  $\mu$ M) dans la solution pipette. Nous avons fait varier l'état de remplissage des stocks calciques en utilisant la thapsigargine. L'addition de thapsigargine inhibe la facilitation dépendante du voltage.

### *1) Rôle du calcium dans la facilitation.*

Certains canaux sont maintenus dans un état inactivé dans la cellule. La facilitation consiste à recruter un plus grand nombre de canaux pour un signal spécifique. Et non pas à potentialiser l'entrée de calcium à travers des canaux déjà activés. Pour mettre en évidence la facilitation nous avons utilisé un protocole précis :

La cellule est maintenue à un potentiel de  $-90$  mV. Le courant basal est produit par un saut de potentiel de  $-90$  mV à  $-20$  mV. Pour mesurer la facilitation, un prépulse dépolarisant de 100 ms à  $+60$  mV est réalisé 500 ms avant une dépolarisation d'amplitude similaire au premier saut de potentiel ayant permis de mesurer le courant basal.

Dans les cellules spermatogéniques, la facilitation apparaît progressivement au cours de l'enregistrement en cellule entière. Elle est sous le contrôle d'un messager diffusible qui disparaît au cours de la dialyse du milieu intracellulaire par le milieu de la pipette de patch. En effet, la configuration cellule entière de la technique du patch clamp permet d'imposer une

composition voulue du milieu intracellulaire par l'intermédiaire de la pipette d'enregistrement. L'EGTA est l'un des éléments essentiels de la solution contenue dans la pipette d'enregistrement et sa variation permet l'apparition de la facilitation dépendante du voltage. L'application d'un inhibiteur des tyrosines kinases n'inhibe pas la facilitation comme il avait déjà été montré sur les cellules spermatogéniques de souris CD1 (Arnoult et al., 1997). Il apparaît donc que cette facilitation est sous le contrôle de la concentration de calcium et plus spécifiquement sous le contrôle de faible concentration de calcium. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons fait varier la concentration en EGTA dans la solution de la pipette d'enregistrements. La facilitation est proportionnelle à la quantité d'EGTA. Lorsqu'on augmente la quantité d'EGTA, la concentration en calcium baisse et la facilitation est plus importante. Le calcium intracellulaire apparaît comme un inhibiteur de la facilitation. Nous avons voulu utiliser un autre moyen d'augmenter la concentration calcique intracellulaire. L'addition de thapsigargine 30 min avant l'enregistrement montre une absence de facilitation et même une diminution significatif du courant soumis au prépulse. Ces résultats concordent avec notre hypothèse. Nous démontrons ainsi un nouveau mode de régulation de la facilitation dépendante du voltage des canaux.

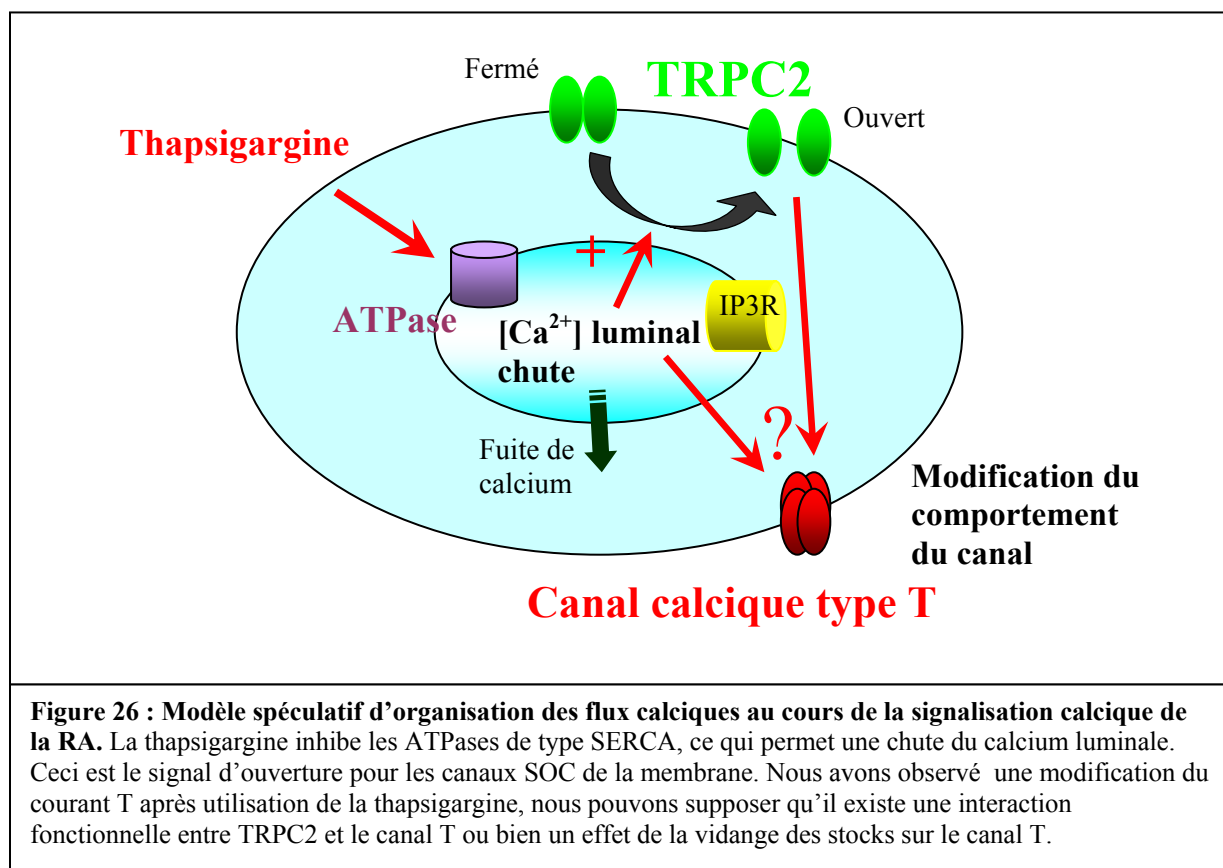
Cependant on peut s'interroger sur la réalité physiologique de ce phénomène. A des niveaux faibles de calcium cytosoliques, le recrutement des canaux de type T est facilité par la dépolarisation de la membrane et permet ainsi une meilleur contribution des canaux de type T à la signalisation calcique de la réaction acrosomique. Cependant, le recrutement n'est plus nécessaire dans la deuxième phase de la réaction acrosomique où le calcium cytosolique est élevé et où les canaux calciques de type T n'interviennent plus.

Si l'importance physiologique de cette régulation reste à démontrer, la modulation de cette régulation par la thapsigargine nous révèle une relation entre les différents canaux.

## *2) Inhibition du courant soumis au prépulse par la thapsigargine.*

Au cours de notre étude de l'effet du calcium sur la facilitation dépendante du voltage, nous avons pu observé que l'utilisation de la thapsigargine inhibe à la fois la facilitation mais induit en plus une nette diminution du courant soumis au prépulse. Ainsi, la thapsigargine provoque une modification physiologique qui a un effet sur le canal LVA. La thapsigargine est un inhibiteur des pompes  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases des stocks calciques. Elle permet une vidange durable des stocks calciques et par conséquent les canaux calciques sensibles au niveau de remplissage des stocks sont activés. La modification du courant soumis au prépulse n'est pas due à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Nous avons testé l'effet de

l'augmentation de calcium pour mimer l'effet de la thapsigargine en utilisant un ionophore calcique et en perfusant les cellules avec de fortes concentrations de calcium. Ces conditions ne permettent pas de retrouver l'effet de la thapsigargine. Nous avons également testé l'effet de la diminution de calcium par l'inclusion de BAPTA dans la pipette d'enregistrement ; le BAPTA un chélateur plus rapide du calcium que l'EGTA et n'empêche pas l'inhibition du courant soumis au prépulse en présence de thapsigargine. Ces résultats suggèrent que ce phénomène pourrait résulter de la modification conformationnelle subit par les différents canaux calciques impliqués dans la voie de régulation induite par la thapsigargine. Nos données révèlent une interaction fonctionnelle entre les canaux LVA et les protéines dont l'activité est liée à l'état de remplissage des stocks calciques. Il semble exister une relation étroite entre les trois acteurs de la signalisation calcique de la réaction acrosomique (Figure 26). Nous avons donc mis en évidence une interaction fonctionnelle entre les canaux LVA/IP3R/TRPC. Ces résultats soulignent l'importance de la trilogie LVA/IP3R/TRPC dans la RA.





*Article 2.*

*Caractérisation biophysique et pharmacologique des courants calciques de type T dans les souris KO pour le canal calcique Cav3.1 ( $\alpha 1_G$ ) : Cav3.2 ( $\alpha 1_H$ ) est le canal calcique principal dans les cellules spermatogéniques sauvages.*



## Introduction.

Pour mieux comprendre les interactions moléculaires entre les 3 canaux calciques impliqués dans la signalisation calcique de la réaction acrosomique, il est important de connaître la nature du canal T qui est l'élément déclenchant de la signalisation.

Comme je l'ai expliqué dans la partie Introduction, les canaux calciques voltages dépendants sont des protéines hétéro-oligomériques constituées d'une sous-unité principale  $\alpha 1$ , et généralement de deux sous-unités auxiliaires  $\beta$  et  $\alpha 2\delta$ . La sous-unité  $\alpha 1$  constitue le pore ionique et est capable de former un canal fonctionnel lorsqu'elle est exprimée seule dans un système d'expression hétérologue.

Les canaux calciques de type T sont dépourvus de sous-unités auxiliaires. Ces courants calciques de type T sont obtenus par expression, soit de la sous-unité  $\alpha 1_G$  seule, soit de la sous-unité  $\alpha 1_H$ , soit encore de la sous-unité  $\alpha 1_I$ .

Dans les cellules spermatogéniques, des études de RT-PCR ont révélé la présence de transcrits pour  $\alpha 1_G$  et  $\alpha 1_H$  (Espinosa et al., 1999). Ainsi les courants T dans les cellules spermatogéniques utilisent deux sous-unités  $\alpha 1$  différentes. L'absence de sous-unités  $\alpha 1_I$  est remarquable et signifie que la présence spécifique de ces 2 sous-unités est fondamentale pour ces cellules. Chaque sous-unité possède des caractéristiques et des régulations différentes qui sont essentielles pour la signalisation calcique de la RA. Le ratio entre les deux types n'a pu être établi. Nous nous sommes interrogés si la présence des 2 sous-unités était importante. Afin de répondre à cette question, nous avons caractériser les courants T dans les cellules spermatogéniques de la souris KO pour  $\alpha 1_G$  et comprendre le rôle respectif de chacune de ces sous-unités. L'élaboration d'une souris KO fournit beaucoup d'opportunités. Cela permet de connaître l'importance fonctionnelle et physiologique d' $\alpha 1_G$  ainsi que les propriétés biophysiques et pharmacologiques natives d' $\alpha 1_H$ .





# Biophysical and Pharmacological Characterization of Spermatogenic T-Type Calcium Current in Mice Lacking the $Ca_v3.1$ ( $\alpha_{1G}$ ) Calcium Channel: $Ca_v3.2$ ( $\alpha_{1H}$ ) Is the Main Functional Calcium Channel in Wild-Type Spermatogenic Cells

SÉVERINE STAMBOULIAN,<sup>1</sup> DAESOO KIM,<sup>2</sup> HEE-SUP SHIN,<sup>2</sup> MICHEL RONJAT,<sup>1</sup> MICHEL DE WAARD,<sup>1</sup>  
AND CHRISTOPHE ARNOULT<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CEA/Grenoble, Laboratoire "Canaux Ioniques et Signalisation",  
Unité mixte INSERM E9931, 17 rue des martyrs,  
F-38054 Grenoble Cedex 9, France

<sup>2</sup>National CRI Center for Calcium and Learning,  
Korea Institute of Science and Technology, Cheongryang,  
Seoul, Republic of Korea

Mammalian acrosome reaction (AR) requires successive activation of three different types of calcium channels (T-type channels, Inositol-3-phosphate (InsP3) receptors, and TRPC2 channels). All the calcium signaling is under the control of the activation of the first-one, a T-type calcium channel. The molecular characterization of the T-type calcium channel is still a matter of debate, previous reports showing the presence of transcripts for  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  subunits. Using mice deficient for  $Ca_v3.1$  subunit, we show that the T-type current density in spermatogenic cells is not reduced in deficient mice versus control mice. We characterized the biophysical and pharmacological properties of T-type current in spermatogenic cells from  $Ca_v3.1$  deficient mice. Biophysical and pharmacological properties of spermatogenic T-type current from wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice demonstrate that  $Ca_v3.3$  does not contribute to T-type current. Moreover, nickel and amiloride inhibit T-type currents in deficient and wild-type mice with similar potencies. These results demonstrate that T-type currents in spermatogenic cells is due to  $Ca_v3.2$  subunit and that  $Ca_v3.1$  contributes to a very negligible extent to the T-type currents. Thus, the deficient  $Ca_v3.1$  mouse model allows the characterization of native  $Ca_v3.2$  currents in spermatogenic cells. Spermatogenic  $Ca_v3.2$  currents present specific feature in comparison to the cloned  $Ca_v3.2$  current so far. More particularly, the time-dependence of recovery from short-term inactivation of native spermatogenic  $Ca_v3.2$  is close to 100 millisecond, a value expected for  $Ca_v3.1$  current. *J. Cell. Physiol.* 200: 116–124, 2004.

© 2003 Wiley-Liss, Inc.

Acrosome reaction (AR), the first step of fertilization, is an exocytotic event, allowing sperm to cross the zona pellucida and to become competent for fusion with the oocyte. ZP3, one of the three glycoproteins present in the zona pellucida, represents the physiological agonist of the AR. The fusion of the outer acrosome membrane with the plasma membrane is dependent of a cytoplasmic calcium rise. The calcium signaling requires the successive opening of at least three different types of calcium channels: first, voltage-dependent calcium channels, localized in the plasma membrane, are activated. These channels belong to the T-type calcium channel family (Arnoult et al., 1996; Santi et al., 1996). Subsequently, an Inositol-3-phosphate (InsP3) receptor, localized in the outer membrane of acrosome, is activated (Walensky and Snyder, 1995; O'Toole et al.,

2000). Indeed, acrosome is not only a secretion vesicle but also an operational calcium store (De Blas et al., 2002). The depletion of this store finally leads to the activation of TRPC2 channel, a store-operated calcium channel (Jungnickel et al., 2001). The T-type calcium channels represent the key triggering element for the

\*Correspondence to: Christophe Arnoult, CEA/Grenoble, Laboratoire "Canaux Ioniques et Signalisation", Unité mixte INSERM E9931, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9-France. E-mail: carnoult@cea.fr

Received 16 July 2003; Accepted 27 October 2003

DOI: 10.1002/jcp.10480

calcium signaling in sperm cells. Indeed, the opening of the T-type calcium channels elicits a very short transient calcium rise, about 1 sec after application of ZP3, which controls the activation of the InsP3 receptor and subsequently the TRPC2 store-operated calcium channel (Arnoult et al., 1999). Also, pharmacological antagonists of T-type calcium channels inhibit the calcium signaling downstream elicited by ZP3. As a calcium signaling starter, spermatogenic T-type channels are strongly regulated: different groups have shown that this channel is regulated by estradiol and bovine serum albumin (BSA; Espinosa et al., 2000), calmodulin (Lopez-Gonzalez et al., 2001), phosphorylation (Arnoult et al., 1997), calcium level in the calcium stores, and calcium itself (Stambouljian et al., 2002). Moreover, T-type calcium channels can be strongly controlled by membrane potential. Contrary to high-voltage activated calcium channels, resting membrane potentials above  $-55$  mV drive the channel to its inactivation state, and have the ability to block any subsequent calcium influx. Sperm cells use this voltage strategy to control T-type calcium activation. Indeed to prevent any activation of T-type calcium channel in the testis or before sperm cells reach the oocytes, sperm cells remain depolarized before the end of the capacitation, hyperpolarization occurring just before fertilization (Arnoult et al., 1999). Because of the physiological importance of these channels in AR, many groups have worked on the molecular characterization of T-type channels in spermatogenic cells (Lievano et al., 1996; Espinosa et al., 1999; Sakata et al., 2001; Jagannathan et al., 2002). Owing to the impossibility of recording calcium currents in mature sperm cells, spermatogenic cells are routinely used instead to characterize voltage-dependent sperm calcium channels. Previous studies have shown that spermatogenic cells represent a good model to study voltage-dependent calcium currents of mature sperm cells. Voltage-dependent calcium channels are subdivided in high-voltage and low-voltage-activated calcium channels, represented by L, N, P/Q, R, and T-type calcium channels, respectively. At the molecular level, 10 different genes code for voltage-dependent calcium channel  $\alpha_1$  subunits, the pore subunit. Currently, there are three different types of  $\alpha_1$  subunit for T-type calcium channels,  $Ca_v3.1$  ( $\alpha_{1G}$ ),  $Ca_v3.2$  ( $\alpha_{1H}$ ), and  $Ca_v3.3$  ( $\alpha_{1I}$ ). From expression studies, currents arising from either one of these three different channel types, have different pharmacological and biophysical properties (Klockner et al., 1999; McRory et al., 2001; Chemin et al., 2002). mRNA coding for both  $Ca_v3.1$  (Sakata et al., 2001) and  $Ca_v3.2$  (Jagannathan et al., 2002) have been found in spermatogenic cells and it is generally accepted that both  $\alpha_1$  subunits are likely responsible for the T-type current recorded. However, the specific contribution of each channel to the spermatogenic T-type current is not known. This fact has prevented investigators from comparing the biophysical and pharmacological properties of native T-type current from spermatogenic cells with those of cloned channels. The development of a transgenic mice deficient in  $Ca_v3.1$  provides many opportunities. First, the functional and physiological importance of  $Ca_v3.1$  can be assessed. Second, the biophysical and pharmacological properties of the channels that remain expressed, here  $Ca_v3.2$ , can be investigated

in isolation. In the article, we compare for the first time the biophysical properties of T-type channels from wild-type spermatogenic cells with those of spermatogenic cells isolated from  $Ca_v3.1$  deficient mice. We also compare the properties of spermatogenic T-type channels from the knock-out mice with those of various cloned T-type channels. We show that male mice lacking  $Ca_v3.1$  calcium channels are fully fertile. The current density of T-type current is not modified in spermatogenic cells from  $Ca_v3.1$  knock-out mice. Moreover, pharmacological and biophysical calcium current properties of wild-type spermatogenic cells are not different of those of  $Ca_v3.1$  deficient spermatogenic cells; these findings evidence that T-type channels formed by  $Ca_v3.2$  subunits represent the main functional channels present in wild-type spermatogenic cells. The biophysical properties of spermatogenic  $Ca_v3.2$  current differ from  $Ca_v3.2$  channels cloned so far, suggesting the existence of new  $Ca_v3.2$  isoforms.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells preparation

$Ca_v3.1$  deficient mice have been described previously (Kim et al., 2001). The genotype of all  $Ca_v3.1$  deficient animals used had been checked by polymerase chain reaction (PCR; Kim et al., 2001). Control mice corresponded to the litter of the crossing of male 129/SV-Pas with female C57BL/6 (Charles River, France). Seminiferous tubules were isolated from the testes of mice (8–16-weeks-old) and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min in 3 ml of a solution containing (mM): NaCl (150), KCl (5),  $CaCl_2$  (2),  $MgCl_2$  (1),  $NaH_2PO_4$  (1),  $NaHCO_3$  (12), D-glucose (11), pH 7.3, and collagenase type IA (1 mg/ml; Sigma, France). Tubules were rinsed twice in collagenase-free medium and cut into 2 mm sections. Spermatogenic cells were obtained by manual trituration and attached to culture dishes coated with Cell-Tak (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA). Pachytene spermatocytes and round spermatids are the prominent cell types obtained from the diploid meiotic and the haploid post-meiotic stages of spermatogenesis, respectively. These cells are readily distinguished based on cellular and nuclear morphology (Romrell et al., 1976). These stages were routinely used for electrophysiological recordings. However, similar results were obtained with both stages and data were pooled for presentation.

### Electrophysiological recordings

$Ca^{2+}$  currents were recorded in the whole-cell configuration of patch-clamp technique. Pipettes were pulled from Corning no. 7052 glass (Gardner Glass Co., CA) and fire polished. Pipette resistance was 1–3 M $\Omega$ . Currents were obtained with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). All traces were corrected for leak currents, filtered at 2 kHz, and digitized every 0.1 msec. Other details of the voltage protocols used in this study are provided in the "Results."

The pipette solution was designed to eliminate all  $K^+$  currents and consisted of the following components (mM): Cs-glutamate (130), D-glucose (5), HEPES (10),  $MgCl_2$  (2.5),  $Mg_2ATP$  (4), EGTA-Cs (10), pH 7.2 (adjusted with 1 N CsOH). For experiments, the bath solution was changed to a recording solution that consisted of the following (mM): NaCl (100), KCl (5),  $CaCl_2$  (2),  $MgCl_2$  (1),

TEA-Cl (26), Na-lactate (6), HEPES (10), 3.3 D-glucose, and pH 7.4 (adjusted with 1 N NaOH). For pharmacological study, the calcium concentration was raised to 10 mM in order to be able to compare  $IC_{50}$  from this study with Arnoult et al. (1998). The cells were isolated in a 1 ml chamber and perfused at a rate of 4–8 ml/min. All experiments were done at room temperature ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ). Nickel was dissolved in water. Amiloride was dissolved in DMSO (stock solution 200 mM).

#### RT-PCR amplification

Messenger RNA from adult mice testes were prepared from tissue with the Dynabeads isolation kit (Dyna France S.A., Compiègne-France). Each RT-PCR reaction was performed in a total volume of 25  $\mu\text{l}$  in the presence of 30 or 60 ng of mRNA using the Superscript<sup>TM</sup> One step<sup>TM</sup> RT-PCR system (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France).

A 370 bp product from wild-type (two different strains—OF<sub>1</sub> and cross 129/SV-Pas  $\times$  C57BL/6) and deficient mice cDNA (GeneBank database accession no. NM\_021415) was amplified using primers 5'-GGCTGGGCACCATGAACTAC (nucleotides 1799–1819 of Cav3.2) and 5'-GTAAACTCATAGACTCCATG (nucleotides 2151–2170). Primers had been designed to hybridize to two different exons and to avoid unspecific genomic DNA amplification. Reverse transcription was achieved within 30 min of incubation at  $45^{\circ}\text{C}$ . Amplification was obtained after 40 cycles of temperature: 30 sec at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 sec at  $44^{\circ}\text{C}$ , and 30 sec at  $72^{\circ}\text{C}$ . We checked that product increase at 40 cycles was in the exponential phase, by testing the PCR product quantities produced at 27, 30, 33, 36, and 40 cycles.

As control for the mRNA preparation and quantification, a 192 bp cDNA product HPRT cDNA was amplified using the forward primers 5'-TGTAATGACCAGTCAA-CAGGG and the reverse primer 5'-TGGCTTATATC-CAACACTTCG. Reverse transcription was achieved within 30 min of incubation at  $45^{\circ}\text{C}$ . Amplification was obtained after 33 cycles: 30 sec at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 sec at  $44^{\circ}\text{C}$ , and 30 sec at  $72^{\circ}\text{C}$ . Again, we checked that product increase at 33 cycles was in the exponential phase, by testing the quantity produced at 27, 30, 33, 36, and 40 cycles.

#### Statistical analysis

For the two group comparisons, Student's *t*-test was used; means were considered statistically different when the *P*-value was less than 0.05. All the data are expressed as mean  $\pm$  SD.

#### RESULTS

Because two articles have already published that mRNA coding for Cav3.1 subunit is present in mouse spermatogenic cells (Espinosa et al., 1999; Sakata et al., 2001) and human spermatogenic cells (Jagannathan et al., 2002), we first wanted to check if the fertility of male mice lacking Cav3.1 channel was modified. To control the fertility in Cav3.1 deficient male mice, we followed two reproduction parameters: i) the delay between mating (when female is introduced to the male, day 0) and pups delivery; and ii) the size of the litter. As shown in Figure 1, no statistically significant difference had been noticed between wild-type and knock-out mice.

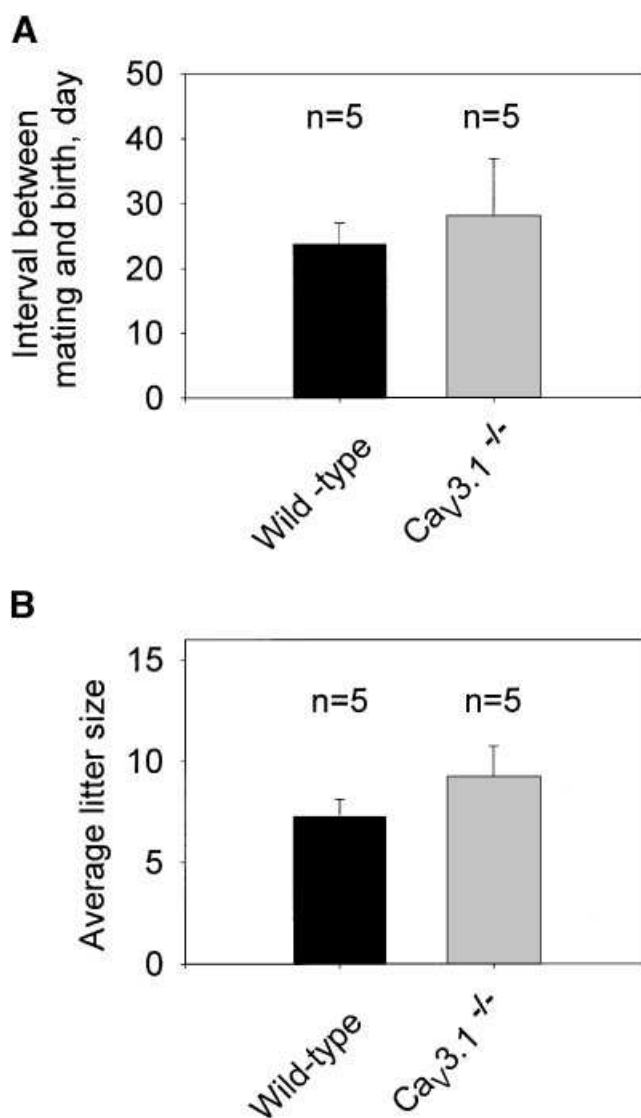


Fig. 1. Reproduction parameters of Cav3.1 deficient mice. **A:** Histogram showing the delay between the mating (introduction of the female in the cage of the male) and the birth of the pups; *n* = 5. **B:** Average litter size; *n* = 5. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD.

As T-type calcium channels are known to be crucial for AR, and because of the absence of effect on fertility parameters of male mice lacking Cav3.1, we investigated the consequences of the absence of Cav3.1 channels on T-type calcium current density in spermatogenic cells. In 2 mM external calcium, and for a depolarization from a holding potential of  $-95$  mV to a test potential of  $-25$  mV, the spermatogenic calcium current densities of wild-type and Cav3.1 deficient mice were  $3.57 \pm 1.14$  pA/pF (*n* = 8) and  $3.43 \pm 0.92$  pA/pF (*n* = 9), respectively. These current densities were thus not statistically different (Fig. 2).

Three reasons could explain the absence of current density decrease in male deficient for Cav3.1: (i) Cav3.1 channels were not present as functional channels in spermatogenic cells, (ii) Cav3.1 channels contributed

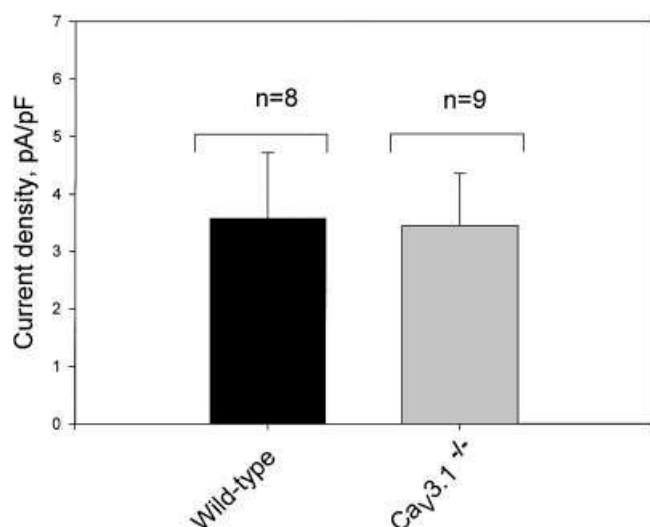


Fig. 2. Low-voltage calcium current densities in spermatogenic cells. Peak currents were measured during a depolarization from a holding potential (HP) of  $-95$  mV to a test potential (TP) of  $-25$  mV. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD.

to only a very small extent to T-type current in spermatogenic cells, or (iii) it evidenced a phenomena of compensation for  $Ca_v3.1$  deficiency by an other low voltage-activated calcium channel.

To understand why T-type current density in mice lacking  $Ca_v3.1$  was not decreased, we decided to compare the biophysical and pharmacological properties of T-type currents in wild-type mice and mice lacking  $Ca_v3.1$ .

#### Biophysical properties of T-type currents

First, we studied activation parameters like voltage-dependence and kinetics of activation. Figure 3A presents superimposed traces obtained at different test potentials from a holding potential of  $-105$  mV to different test potentials. Figure 3B shows the IV curves obtained in 2 mM external  $Ca^{2+}$  for both types of mice. The maximum amplitude of the current was obtained for test potentials of  $-35$  mV for wild-type mice and of  $-41$  mV for  $Ca_v3.1$  deficient mice. Though a slight difference could be observed in half-activation potential ( $V_{1/2} = -51.2 \pm 1.9$  (n = 5) for wild-type vs.  $-57.5 \pm 5.4$  (n = 6) for  $Ca_v3.1$  deficient mice) between these cells from these two mice, this was not statistically different ( $P > 0.05$ ).

Figure 3C presents the activation constant time as a function of test potential for both wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient animals. The activation phase was best fitted by a single exponential ( $f(t) = Ae^{-t/\tau} + C$ ) to the rise phase of calcium current. For a depolarization from a holding potential of  $-105$  mV to a test potential of  $-25$  mV, the time constants ( $\tau$ ) were  $2.29 \pm 0.42$  (n = 4) and  $1.95 \pm 0.31$  (n = 5) for wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice, respectively. No statistical difference between both animals had been noticed.

Second, we studied the inactivation parameters of the current in both spermatogenic cell types. Three parameters had been followed: fast inactivation, steady-state

inactivation, and recovery from short-term inactivation. Figure 4A presents the inactivation constant time as a function of test potential for both wild-type and deficient animals. The inactivation phase was best fitted by a single exponential ( $f(t) = Ae^{-t/\tau} + C$ ) to the decay phase of calcium current. For a depolarization from a holding potential of  $-105$  mV to a test potential of  $-25$  mV, the time constants ( $\tau$ ) were  $16.1 \pm 2.6$  (n = 4) and  $13.6 \pm 3.6$  (n = 5) for wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice, respectively (Fig. 4B). No statistical difference between both types of animal had been noticed; the fast inactivation kinetics were thus similar. Figure 4C presents the steady-state inactivation curve. The holding potential leading to the inactivation of half of the current ( $V_{1/2}$ ) were:  $V_{1/2} = -73.4 \pm 5.7$  (n = 5) for wild-type versus  $-77.9 \pm 4.3$  (n = 5) for  $Ca_v3.1$  deficient mice. As noticed by the wide error bars, the slight mean difference in half-inactivation potential was not statistically different ( $P > 0.05$ ). However, the large variations in inactivation properties of spermatogenic T-type calcium currents in deficient mice were suggestive of a molecular heterogeneity for the remaining channel types. In published reports, most of the parameters concerning the biophysical properties of various cloned  $Ca_v3$  type calcium currents are very close, except the recovery from short-term inactivation (Klockner et al., 1999; McRory et al., 2001; Chemin et al., 2002). If  $Ca_v3.1$  contributed to a large extent to the spermatogenic T-type current, the absence of  $Ca_v3.1$  should have led to an increase in the recovery delay of short-term inactivation. The kinetics of recovery from inactivation were similar for wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice (Fig. 4C). The curve was best fitted with a single exponential ( $I/I_{max} = y_0 + a(1 - \exp^{-t/\tau})$ ), the time constant being 104 msec (n = 5) and 116 msec (n = 5) for wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice, respectively.

#### Pharmacology

If biophysical properties of cloned  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  channels are very close, their pharmacological properties are pretty different.  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  display marked differences in nickel and amiloride sensitivities. Indeed, the  $IC_{50}$  for nickel goes from 12  $\mu$ M for  $Ca_v3.2$  to 250  $\mu$ M for  $Ca_v3.1$  in HEK cells (Lee et al., 1999). For amiloride,  $IC_{50}$  goes from 167  $\mu$ M for  $Ca_v3.2$  (Williams et al., 1999) to value above 5 mM for murine cloned  $Ca_v3.1$  in HEK cells (Lacinova et al., 2000). We determined the nickel and amiloride potencies on spermatogenic wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice. Figure 5 presents the inhibition curve for nickel and amiloride. For nickel, we found an  $IC_{50}$  of 14  $\mu$ M for  $Ca_v3.1$  deficient mice versus 18  $\mu$ M in wild-type mice. For amiloride, we observed an  $IC_{50}$  of 420  $\mu$ M for the knock-out mice versus 460  $\mu$ M for wild-type mice. These values were thus very similar to those published for cloned  $Ca_v3.2$  channels.

#### Semi-quantitative RT-PCR study

A mechanism of compensation for  $Ca_v3.1$  deficiency by overexpression of another low-voltage-activated calcium channel (likely to be  $Ca_v3.2$ —see “Discussion”) could have explained the absence of current density decrease in male deficient for  $Ca_v3.1$ . If the hypothesis of an over-expression of  $Ca_v3.2$  was true, then we should have measured an increase of mRNA coding for  $Ca_v3.2$

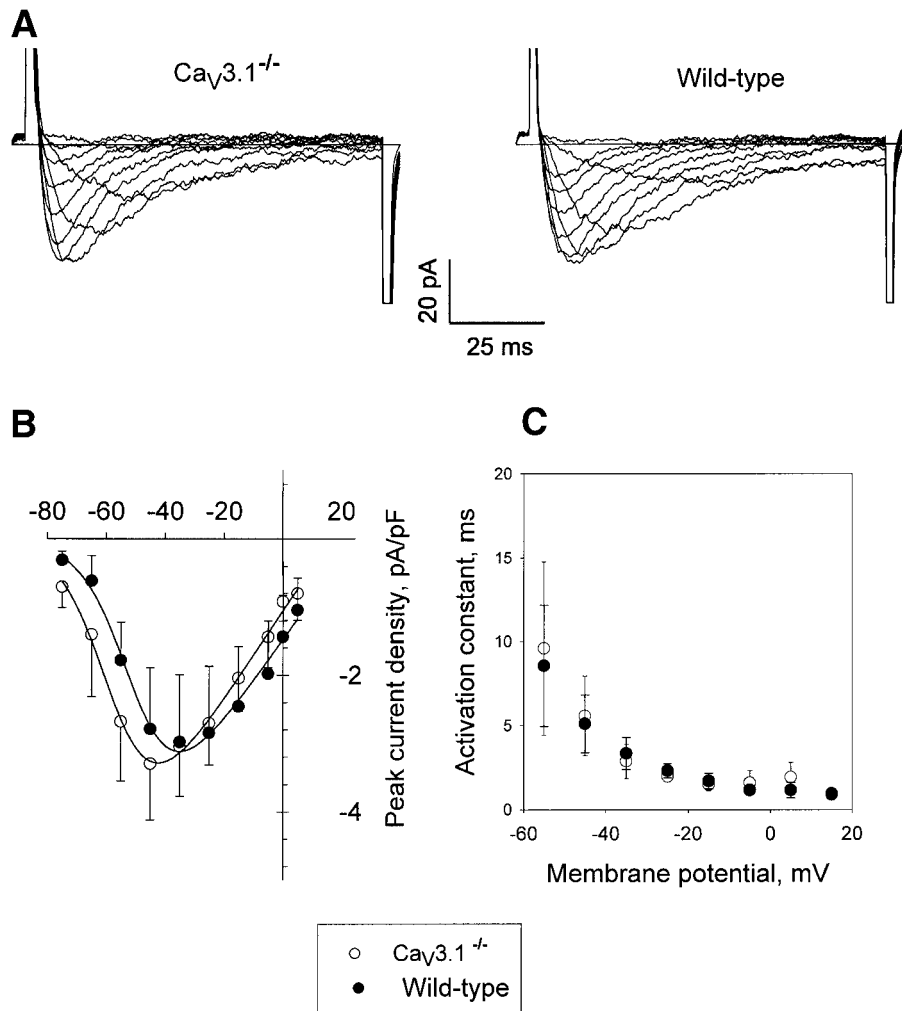


Fig. 3. Activation parameters of spermatogenic calcium current from wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice. **A**: Superimposed traces obtained by depolarization from a HP of  $-105$  mV to different test potentials. External calcium concentration, 2 mM. **B**: Current-voltage relationship (IV curves)—HP  $-105$  mV. (●) Wild-type and

(○)  $Ca_v3.1$  deficient mice. **C**: Plot of mean activation time constants against different test potentials. Time constants are obtained by fitting the rise of the current with a single exponential. (●) Wild-type and (○)  $Ca_v3.1$  deficient mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD.

quantity in deficient mice. To address this question, we performed semi-quantitative RT-PCR experiments. To check that equal amounts of mRNA had been used in each condition tested, we analyzed at the same time the transcripts of *HPRT*, a low expression house-keeping gene. Figure 6A presents the results of RT-PCR experiments. Figure 6B is a control experiment, showing that  $Ca_v3.2$  product increase at 40 cycles was in the exponential phase, since doubling the mRNA concentration (30–60 ng) led to an important increase of  $Ca_v3.2$  cDNA density (average of two different mRNA extractions from  $Ca_v3.1$  deficient mice). The densities of the RT-PCR bands had been measured by a Fluorimager  $SI^{\text{TM}}$ . The histogram in Figure 6C presents the average ratio for  $Ca_v3.2$  expression (density of  $Ca_v3.2$  cDNA band divided by the density of *HPRT* cDNA band) of two different mRNA extractions. We also tested the ratio for  $Ca_v3.2$  expression in  $OF_1$  control mice. Again,  $OF_1$ -derived spermatogenic cells did not present lower  $Ca_v3.2$  expression.

## DISCUSSION

### $Ca_v3.3$ does not contribute to spermatogenic T-type currents in wild-type and $Ca_v3.1$ deficient mice

Among various members of  $Ca_v3$  channel types, the activation and inactivation kinetics of  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  are very similar. On the other hand, the activation and inactivation kinetics of  $Ca_v3.3$  differ markedly from both other subunits: cloned  $Ca_v3.3$  subunit displays kinetics seven-times as slow as  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  subunits. At  $-25$  mV, the activation time constant goes from around 2 msec (for  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$ ) to around 10 msec for  $Ca_v3.3$  and the inactivation time constant goes from around 15 msec (for  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$ ) to around 100 msec for  $Ca_v3.3$  (Klockner et al., 1999). Moreover, the pharmacological properties of  $Ca_v3.3$  calcium current are different of those described for  $Ca_v3.2$  current: nickel inhibits  $Ca_v3.3$  current with an  $IC_{50}$  of 216  $\mu$ M (Lee et al., 1999) and amiloride with an

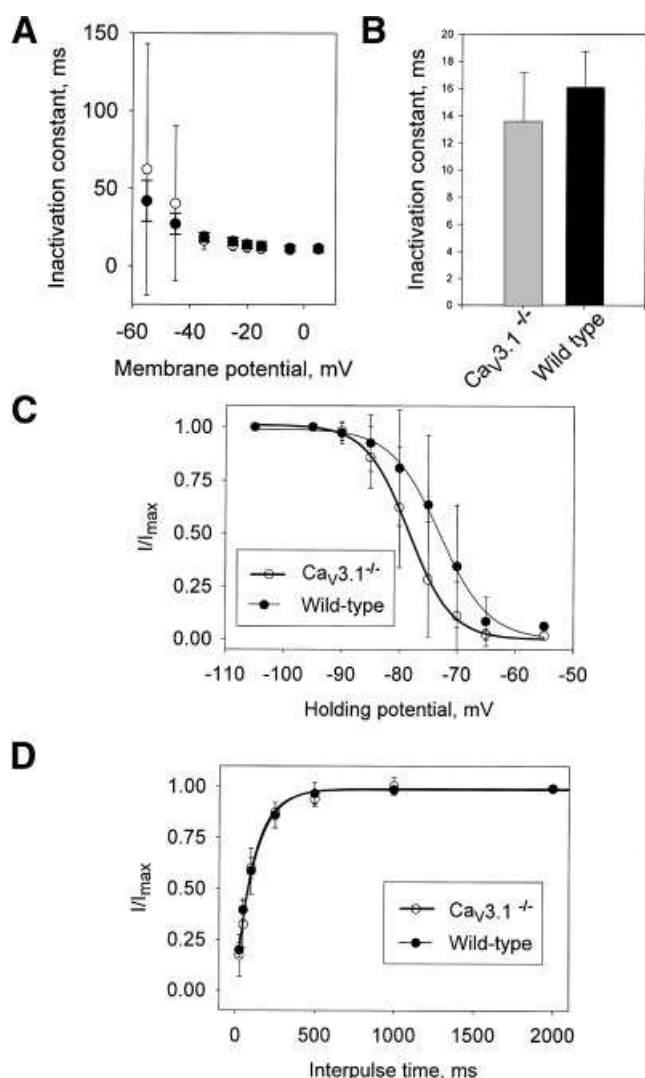


Fig. 4. Inactivation parameters of spermatogenic calcium current from wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice. **A:** Plot of mean inactivation time constants against different test potentials. Time constants are obtained by fitting the decay of the current with a single exponential. (●) Wild-type and (○)  $Ca_v3.1$  deficient mice. **B:** Histogram showing the mean inactivation time constant measured for a depolarization from a HP of  $-105$  mV to a TP of  $-25$  mV for wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice. **C:** Steady state inactivation curve. The amplitude of the current is normalized to the maximum current amplitude. Test potential of  $-25$  mV. Holding potential from  $-105$  to  $-55$  mV. Data were fitted with a Boltzman equation (plain lines).  $V_{1/2}$  are  $-73.3$  and  $-77.9$  mV for wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice, respectively. (●) Wild-type and (○)  $Ca_v3.1$  deficient mice. **D:** Recovery from short-term inactivation. Recovery were measured with a protocol of two depolarization pulses of 100 msec with increasing interpulse duration. Plot of the normalized peak current as a function of the interpulse duration. HP  $-105$  mV. Curves are fitted with single exponential. Recovery time constants are 106 msec for wild-type and 116 msec for deficient mice. (●) Wild-type and (○)  $Ca_v3.1$  deficient mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD.

$IC_{50}$  higher than 1 mM (P. Lory, personal communication). The activation and inactivation time constants measured in wild-type cells (2.3 and 16.6 msec, respectively), the absence of change in  $Ca_v3.1$  deficient mice (1.9 and 13.6 msec, respectively) and the pharmacologi-

cal properties of wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice suggest that  $Ca_v3.3$  channels are unlikely to contribute significantly to T-type currents in spermatogenic cells. These data rather suggest that in  $Ca_v3.1$  deficient mice, the remaining subunit is mainly  $Ca_v3.2$ .

### **$Ca_v3.2$ is the main calcium current in wild-type spermatogenic cells**

If  $Ca_v3.1$  subunit was participating to a non-negligible part of the T-type current in spermatogenic cells, then we should have observed a difference in the pharmacological properties between T-type currents measured in wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice. However, we did not measure any difference between T-type currents measured in these two mice.

$Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  display marked differences in their pharmacology, more particularly their sensitivity to nickel and amiloride. Nickel inhibits  $Ca_v3.1$  with an  $IC_{50}$  of 250  $\mu$ M and  $Ca_v3.2$  with an  $IC_{50}$  of 12  $\mu$ M (Lee et al., 1999). If  $Ca_v3.1$  subunits were functional and present at non-negligible level in spermatogenic cells, then nickel should not inhibit calcium currents in wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice with the same potency. We tested this hypothesis and we found that nickel is as potent on calcium currents from  $Ca_v3.1$  deficient mice as on calcium current from wild-type mice (that could potentially be a mix of  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  currents). The potency of amiloride on  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  is also very different. Amiloride inhibits  $Ca_v3.2$  with an  $IC_{50}$  of around 170  $\mu$ M (Williams et al., 1999) and amiloride has almost no effect on  $Ca_v3.1$  (Lacinova et al., 2000). In spite of this marked difference, amiloride was as potent on calcium currents recorded from wild-type as on currents from  $Ca_v3.1$  deficient mice.

Although the presence of mRNA coding for  $Ca_v3.1$  subunits in spermatogenic cells has been evidenced, these results indicate clearly that  $Ca_v3.1$  subunit contributes to a negligible part of the T-type current recorded in murine spermatogenic cells. The T-type current is mainly due to the opening of  $Ca_v3.2$  subunits.

### **Unique feature of spermatogenic $Ca_v3.2$ calcium current**

The absence of  $Ca_v3.1$  subunit in deficient mice allowed us to characterize the biophysical properties of pure native  $Ca_v3.2$  subunit in a physiological context. Previous results concerning the biophysic properties of T-type currents in spermatogenic cells had unfortunately been obtained with a calcium concentration of 10 mM in the bath (Hagiwara and Kawa, 1984; Arnoult et al., 1996; Santi et al., 1996). In this study, the use of a physiological concentration of 2 mM external calcium allowed us to compare mouse spermatogenic  $Ca_v3.2$  currents with currents from cloned  $Ca_v3.2$  channels and to determine biophysical properties of T-type current corresponding to a physiological situation. Indeed, biophysical properties of voltage-dependent calcium channels are strongly dependent of the external calcium concentration. Because sperm cells control the activation of T-type channels by changing the resting potential during capacitation (Arnoult et al., 1999), the knowledge of the parameters of the steady-state inactivation with physiological calcium concentration is also fundamental.

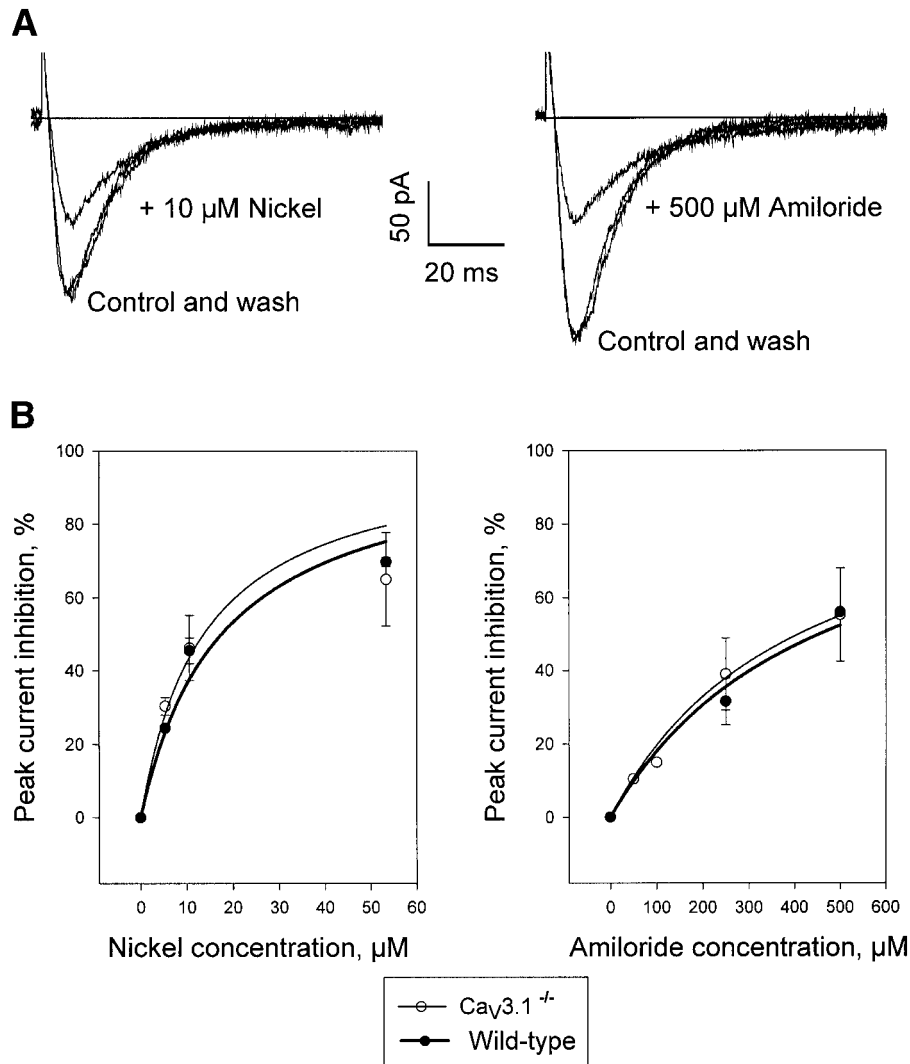


Fig. 5. Amiloride and nickel inhibition of the spermatogenic calcium currents from wild-type and  $Ca_V3.1$  deficient mice. **A**: Representative current traces showing the current inhibition by nickel and amiloride in spermatogenic cells from  $Ca_V3.1$  deficient mice. HP of  $-95$  mV, test potential of  $-25$  mV. External Calcium concentration is  $10$  mM. **B**: Dose-response relationships for the inhibition of peak current

amplitude by nickel and amiloride. Data were fit with the equation  $I = (I_{max} \times [C]) / (k_{50} + [C])$ , where  $I$  is the inhibition of current (% of control),  $I_{max}$  is the maximum inhibition,  $k_{50}$  is the inhibitory constant, and  $[C]$  the inhibitor concentration. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. (●) Wild-type and (○)  $Ca_V3.1$  deficient mice.

Most of the biophysical characteristics of spermatogenic  $Ca_V3.2$  currents, measured in this study, are in good accordance with previously published data concerning cloned  $Ca_V3.2$  currents in HEK cells. However, the time dependence of recovery from short-term inactivation was unexpected for such a subunit. Indeed, if  $Ca_V3.1$  and  $Ca_V3.2$  share a lot of biophysical properties, their kinetics of recovery from short-term inactivation are markedly different, as already published in all the different studies. The kinetic of recovery of  $Ca_V3.1$  is three-times as fast as  $Ca_V3.2$ . Even the slowest recovery kinetic amongst all the different alternative-splicing variants of  $Ca_V3.1$ , is much faster than the recovery kinetic of  $Ca_V3.2$  (Chemin et al., 2001). The value found for the remaining current in spermatogenic cells from  $Ca_V3.1$  deficient mice, that is  $Ca_V3.2$ , was much faster

than previously published values. This value is close to those obtained for  $Ca_V3.1$ . This unique feature for  $Ca_V3.2$  calcium channel may be related to a new isoform or to a modification in properties of a known isoform, such as a specific phosphorylation or the association of a yet unknown auxiliary T-type subunit. In human spermatogenic cells, two isoforms ( $\alpha_{1H-a}$  and  $\alpha_{1H-b}$ ) had been evidenced (Jagannathan et al., 2002). Most of the isoforms of T-type channels ( $Ca_V3.1$  and  $Ca_V3.2$ ) correspond to modifications in II–III and III–IV linkers and, from studies on high-voltage activated channels (Hering et al., 2000), it is known that these linkers are strongly involved in calcium channel inactivations. The presence of different  $Ca_V3.2$  isoforms is also suggested by the important standard deviation of the  $V_{1/2}$  of the steady-state inactivation. The slight difference recorded



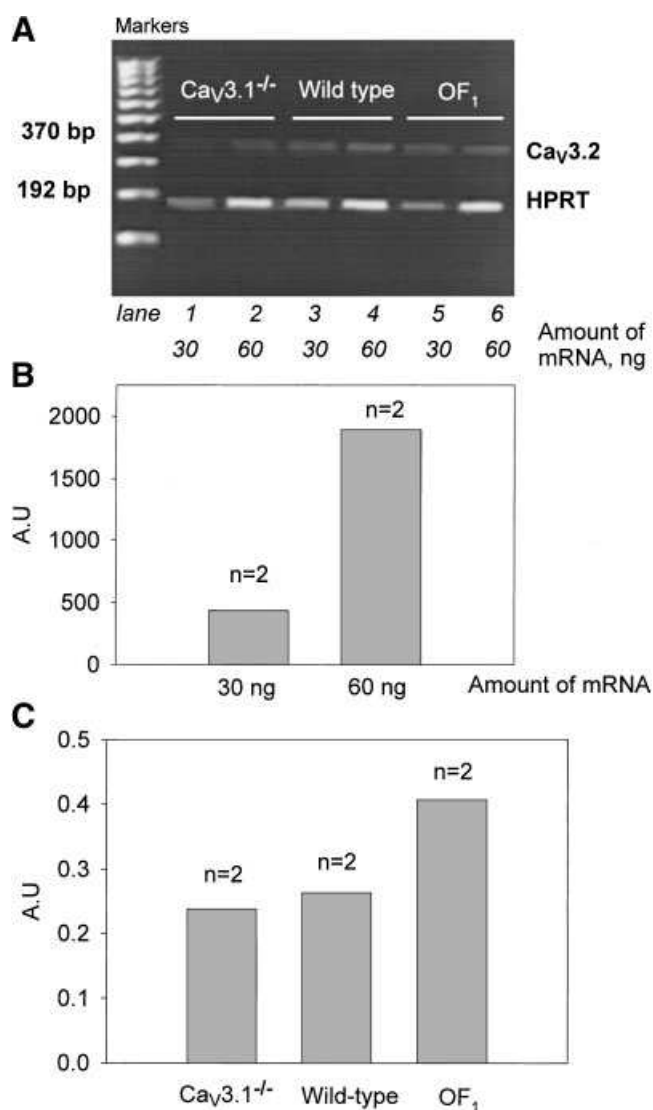


Fig. 6. Semi-quantitative study of  $Ca_v3.2$  expression in spermatogenic cells from wild-type and  $Ca_v3.1$  deficient mice. **A:** Agarose gel showing the amplification of a 370 bp product by RT-PCR by using specific primers for  $Ca_v3.2$ . During the same experiment, mRNA for HPRT were amplified with specific primers (192 bp). Lanes 1 and 2, mRNA from  $Ca_v3.1$  deficient mice, lanes 3 and 4, mRNA from wild-type mice (cross between 129/SV-Pas and C57BL/6), and lanes 5 and 6, mRNA from  $OF_1$  mice. Two concentrations of mRNA have been amplified to check that we are in the exponential phase of product amplification: 30 ng (lanes 1, 3, and 5) and 60 ng (lanes 2, 4, and 6). The 370 bp product has been sequenced and corresponds to the sequence of  $Ca_v3.2$  mRNA. **B:** Histogram showing the densities of  $Ca_v3.2$  band measured with a fluorimager™ SI with two concentrations of mRNA (30 and 60 ng) obtained from  $Ca_v3.1$  deficient mice. Average values of two different mRNA extractions. **C:** Histogram showing the densities of  $Ca_v3.2$  bands measured with a fluorimager™ SI. Values have been normalized by plotting the ratio of the  $Ca_v3.2$  band intensity (30 ng) to HPRT band intensity (30 ng). Average of two different mRNA extractions for the three types of mice.

in I/V curves and steady-state inactivation parameters may be related to expression of different isoforms in wild-type and deficient mice. The shift of  $-5$  mV in the steady state inactivation curve is unlikely to be due to the absence of  $Ca_v3.1$  because it is known from the study

of others that,  $Ca_v3.1$  subunit has identical (Klockner et al., 1999; Chemin et al., 2002) or more depolarized (McRory et al., 2001)  $V_{1/2}$  values. Again, this result is likely due to the expression of different  $Ca_v3.2$  isoforms. Though biophysical parameters are not the most reliable parameters to define channel types, the pharmacological findings combined with the present biophysical considerations clearly appear to conclusively point to the important role of  $Ca_v3.2$  in defining spermatogenic T-type channels.

#### Presence of functional $Ca_v3.1$ subunits in spermatogenic cells

If it is now clear that T-type currents in spermatogenic cells is mainly due to  $Ca_v3.2$  subunits, the presence of  $Ca_v3.1$  mRNA raises the question of the existence of functional  $Ca_v3.1$  subunits. The presence of mRNA is not always correlated with the presence of a functional calcium channel: mRNA of  $Ca_v2.3$  is highly expressed in spermatogenic cell, however, no  $Ca_v2.3$  current is recorded at this stage (Sakata et al., 2001). In  $Ca_v3.1$  deficient and control mice, the  $IC_{50}$  for nickel and amiloride are slightly different of those already published concerning spermatogenic T-type currents. Indeed, in  $CD_1$  mice, the  $IC_{50}$  values are  $35 \mu M$  for nickel and  $240 \mu M$  for amiloride (Arnoult et al., 1998). Moreover, in  $CD_1$  mice, voltage facilitation of T-type currents due to tyrosine phosphorylation has been observed. However, such facilitation is not present in  $OF_1$  (Stamboulia et al., 2002) and in 129/SV  $\times$  C57BL/6 mice (data not shown). This difference may be related to a higher expression level of  $Ca_v3.1$  in  $CD_1$  than in other mouse strains. It would be important to address this question by performing single cell RT-PCR in order to correlate the level of expression of  $Ca_v3.1$  with tyrosine-dependent phosphorylation.

#### $Ca_v3.2$ biophysical parameters and AR

The absence of  $Ca_v3.1$  channel in spermatogenic cells does not allow to exclude the presence of these channels in mature sperm cells. A lot of required proteins for sperm physiology will be operational only later after pachytene spermatocyte or round spermatid stages. However, the knock-out of  $Ca_v3.1$  gene has no effect on reproduction phenotype. Moreover, the pharmacology of AR in mature sperm cells is not in agreement with the presence of  $Ca_v3.1$ . Indeed, AR is strongly inhibited by low concentrations of nickel and amiloride (Arnoult et al., 1996, 1999), both specific inhibitor of  $Ca_v3.2$  channels versus  $Ca_v3.1$  channels. These two results above concerning mature sperm cells are in good agreement with our main result, demonstrating that  $Ca_v3.2$  is the main calcium channel in spermatogenic cells, and strongly suggest that  $Ca_v3.2$  would be the main calcium channel involved in AR in mature sperm cells. Our data does not exclude the presence of  $Ca_v3.1$  in sperm cell, but rather suggest that  $Ca_v3.1$  channels would have a minor role in sperm physiology.

The data presented in this article have been obtained at a physiological calcium concentration of 2 mM. From activation parameters and steady-state inactivation parameters, it appears that a depolarization of 30 mV from a holding potential of  $-80$  mV is sufficient to obtain an important calcium influx. Studies with fluorescent

membrane potential dyes have shown on single sperm cells that after capacitation, the resting membrane potential of sperm cells reaches such values (Arnoult et al., 1999). Currently, no data are available concerning (i) the amplitude of depolarization, and (ii) the channel responsible for the depolarization. However our results indicate that small depolarizations ( $-80$  to  $-50$  mV) are sufficient to activate most of the T-type calcium channels and thus to trigger the AR. This depolarization may be due to the opening of only one type of cationic conductance.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Jo Moutin and N. Pochon for technical assistance and helpful comments for the RT-PCR analysis.

### LITERATURE CITED

- Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. 1996. Activation of mouse sperm T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13004–13009.
- Arnoult C, Lemos JR, Florman HM. 1997. Voltage-dependent modulation of T-type calcium channels by protein tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 16:1593–1599.
- Arnoult C, Villaz M, Florman HM. 1998. Pharmacological properties of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current of mouse spermatogenic cells. *Mol Pharmacol* 53:1104–1111.
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6757–6762.
- Chemin J, Monteil A, Bourinet E, Nargeot J, Lory P. 2001. Alternatively spliced  $\alpha(1G)$  ( $\text{Ca}(V)3.1$ ) intracellular loops promote specific T-type  $\text{Ca}(2+)$  channel gating properties. *Biophys J* 80:1238–1250.
- Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Bourinet E, Nargeot J, Lory P. 2002. Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms ( $\alpha(1G)$ ,  $\alpha(1H)$  and  $\alpha(1I)$ ) to neuronal excitability. *J Physiol* 540:3–14.
- De Blas G, Michaut M, Trevino CL, Tomes CN, Yunes R, Darszon A, Mayorga LS. 2002. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* 277:49326–49331.
- Espinosa F, Lopez-Gonzalez I, Serrano CJ, Gasque G, De La Vega-Beltran JL, Trevino CL, Darszon A. 1999. Anion channel blockers differentially affect T-type  $\text{Ca}(2+)$  currents of mouse spermatogenic cells,  $\alpha(1E)$  currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev Genet* 25:103–114.
- Espinosa F, Lopez-Gonzalez I, Munoz-Garay C, Felix R, De La Vega-Beltran JL, Kopf GS, Visconti PE, Darszon A. 2000. Dual regulation of the T-type  $\text{Ca}(2+)$  current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FEBS Lett* 475:251–256.
- Hagiwara S, Kawa K. 1984. Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J Physiol* 356:135–149.
- Hering S, Berjukow S, Sokolov S, Marksteiner R, Weiss RG, Kraus R, Timin EN. 2000. Molecular determinants of inactivation in voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Physiol* 528(part 2):237–249.
- Jagannathan S, Punt EL, Gu Y, Arnoult C, Sakkas D, Barratt CL, Publicover SJ. 2002. Identification and localization of T-type voltage operated calcium channel subunits in human male germ cells—expression of multiple isoforms. *J Biol Chem* 277:8449–8456.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. 2001. Trp2 regulates entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 3:499–502.
- Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW, Shin HS. 2001. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking  $\alpha(1G)$  T-type  $\text{Ca}(2+)$  channels. *Neuron* 31:35–45.
- Klockner U, Lee JH, Cribbs LL, Daud A, Hescheler J, Pereverzev A, Perez-Reyes E, Schneider T. 1999. Comparison of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents induced by expression of three cloned  $\alpha(1)$  subunits,  $\alpha(1G)$ ,  $\alpha(1H)$  and  $\alpha(1I)$ , of low-voltage-activated T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Eur J Neurosci* 11:4171–4178.
- Lacinova L, Klugbauer N, Hofmann F. 2000. Regulation of the calcium channel  $\alpha(1G)$  subunit by divalent cations and organic blockers. *Neuropharmacology* 39:1254–1266.
- Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E. 1999. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: Low concentrations selectively block  $\alpha(1H)$ . *Biophys J* 77:3034–3042.
- Lievano A, Santi CM, Serrano CJ, Trevino CL, Bellve AR, Hernandez-Cruz A, Darszon A. 1996. T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and  $\alpha(1E)$  expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 388:150–154.
- Lopez-Gonzalez I, De La Vega-Beltran JL, Santi CM, Florman HM, Felix R, Darszon A. 2001. Calmodulin antagonists inhibit T-type  $\text{Ca}(2+)$  currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. *Dev Biol* 236:210–219.
- McRory JE, Santi CM, Hamming KS, Mezeyova J, Sutton KG, Baillie DL, Stea A, Snutch TP. 2001. Molecular and functional characterization of a family of rat brain T-type calcium channels. *J Biol Chem* 276:3999–4011.
- O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. 2000.  $\text{Ca}(2+)$  entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 11:1571–1584.
- Romrell LJ, Bellve AR, Fawcett DW. 1976. Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Dev Biol* 49:119–131.
- Sakata Y, Saegusa H, Zong S, Osanai M, Murakoshi T, Shimizu Y, Noda T, Aso T, Tanabe T. 2001. Analysis of  $\text{Ca}(2+)$  currents in spermatocytes from mice lacking  $\text{Ca}(v)2.3$  ( $\alpha(1E)$ )  $\text{Ca}(2+)$  channel. *Biochem Biophys Res Commun* 288:1032–1036.
- Santi CM, Darszon A, Hernandez-Cruz A. 1996. A dihydropyridine-sensitive T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current is the main  $\text{Ca}^{2+}$  current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am J Physiol* 271:C1583–C1593.
- Stambouliau S, Waard MD, Villaz M, Arnoult C. 2002. Functional interaction between mouse spermatogenic LVA and thapsigargin-modulated calcium channels. *Dev Biol* 252:72–83.
- Walensky LD, Snyder SH. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* 130:857–869.
- Williams ME, Washburn MS, Hans M, Urrutia A, Brust PF, Prodanovich P, Harpold MM, Stauderman KA. 1999. Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J Neurochem* 72:791–799.



## Conclusion.

Nous avons effectué ici une caractérisation moléculaire des courants T dans les cellules spermatogéniques. Pour cela, nous avons utilisé les cellules spermatogéniques de la souris KO pour la sous unité  $\alpha_{1G}$ . La présence de transcrit pour  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1H}$  a été montré précédemment. Nous bénéficions d'un modèle de souris qui permet de mettre en évidence l'influence de l'une ou l'autre sous-unité dans les cellules spermatogéniques sauvage. Cette souris est épileptique et ne présente qu'un phénotype neuronal. Nous avons montré que l'absence de courant  $\alpha_{1G}$  n'influence pas les paramètres de reproduction. L'étude de la densité des courants T n'indique aucune différence entre les souris déficiente pour  $\alpha_{1G}$  et les souris contrôle. En effet, nos données montrent que la sous unité majoritaire dans les cellules spermatogéniques est la sous unité  $\alpha_{1H}$ . Nous avons donc pu caractériser les courants  $\alpha_{1H}$  natifs dans les cellules spermatogéniques. Ces propriétés sont différentes par rapport à celles qui avaient été révélées par transfection dans des modèles d'études hétérologues.

*1) La sous-unité  $\alpha_{1G}$  n'est pas indispensable pour la reproduction et les courants T.*

Bien que des transcrits pour  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1H}$  aient été identifiés dans les cellules spermatogéniques, nos résultats montrent que la sous-unité  $\alpha_{1G}$  n'est pas primordiale dans les courants T qui initient la RA. En effet, les souris déficientes pour  $\alpha_{1G}$  sont des souris normales au niveau de la fécondité et la densité de courant T dans les cellules spermatogéniques est identique à celle des souris contrôles. Deux hypothèses peuvent être émises : soit  $\alpha_{1G}$  n'est pas réellement impliquée dans ces courants, soit il existe une compensation par surexpression de la sous-unité  $\alpha_{1H}$ .

L'absence de différence entre les courants observés chez la souris déficiente pour  $\alpha_{1G}$  et la souris contrôle montre que la sous-unité restante chez le KO est la sous-unité  $\alpha_{1H}$ . Nous pouvons exclure toute participation de la sous-unité  $\alpha_{1I}$  dans les courants T des cellules spermatogéniques des souris sauvages et déficiente pour  $\alpha_{1G}$ . Cette sous-unité qui est le troisième membre de la famille des canaux T n'a pas été identifiée en RT-PCR. Cependant, on ne peut pas exclure une transcription plus tardive. La sous-unité  $\alpha_{1I}$  possède des caractéristiques très différentes par rapport aux sous-unités  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1H}$  : son activation et son inactivation sont beaucoup plus lente. Les caractéristiques biophysiques et pharmacologiques des courants que nous avons identifié ne sont pas en accord avec la présence de la sous unité  $\alpha_{1I}$ .

2)  $\alpha 1H$  est la sous- unité majoritaire.

Nous avons ensuite comparé les propriétés biophysiques et pharmacologiques des courants T dans les cellules spermatogéniques du KO  $\alpha 1_G$  par rapport au contrôle. Ces propriétés ne diffèrent pas de façon significative, confirmant notre hypothèse que  $\alpha 1_H$  est la sous-unité majoritaire. Les cellules spermatogéniques du KO  $\alpha 1_G$  constitue un bon modèle pour connaître les propriétés natives de la sous unité  $\alpha 1_H$ . Ces propriétés correspondent à celle obtenues dans les modèles d'expressions hétérologues à l'exception de la cinétique de récupération de l'inactivation rapide. Ce phénomène peut être du :

- soit à l'existence de nouvelles isoformes d' $\alpha 1_H$  dans les cellules spermatogéniques
- soit à l'absence d'un paramètre de régulation dans les systèmes d'expression hétérologue.

La caractérisation pharmacologique confirme l'exclusivité de la présence d' $\alpha 1_H$  dans les cellules spermatogéniques. Les sous-unités  $\alpha 1_G$  et  $\alpha 1_H$  diffèrent beaucoup au niveau de leur sensibilité au nickel et à l'amiloride. Or les sensibilités que nous avons enregistrées sont très proches de celles d' $\alpha 1_H$ . Nous avons également vérifié, par RT-PCR, la quantité de transcrits pour  $\alpha 1_H$  dans les cellules spermatogéniques KO, sauvages et d'une autre lignée de souris (OF1).  $\alpha 1_H$  n'est pas surexprimée dans les cellules spermatogéniques de la souris KO.

Les caractéristiques biophysiques et pharmacologiques que nous avons obtenus correspondent également aux données publiées sur la RA. Maintenant que nous avons identifié le canal  $\alpha 1_H$  comme étant le principal acteur des courants T des cellules spermatogéniques, nous allons pouvoir mieux comprendre les mécanismes de régulation de la signalisation calcique au cours de la RA.

*Article en préparation*

*Les canaux calciques LVA du spermatozoïde : étude  
chez les souris déficientes en  $\alpha 1_H$ .*



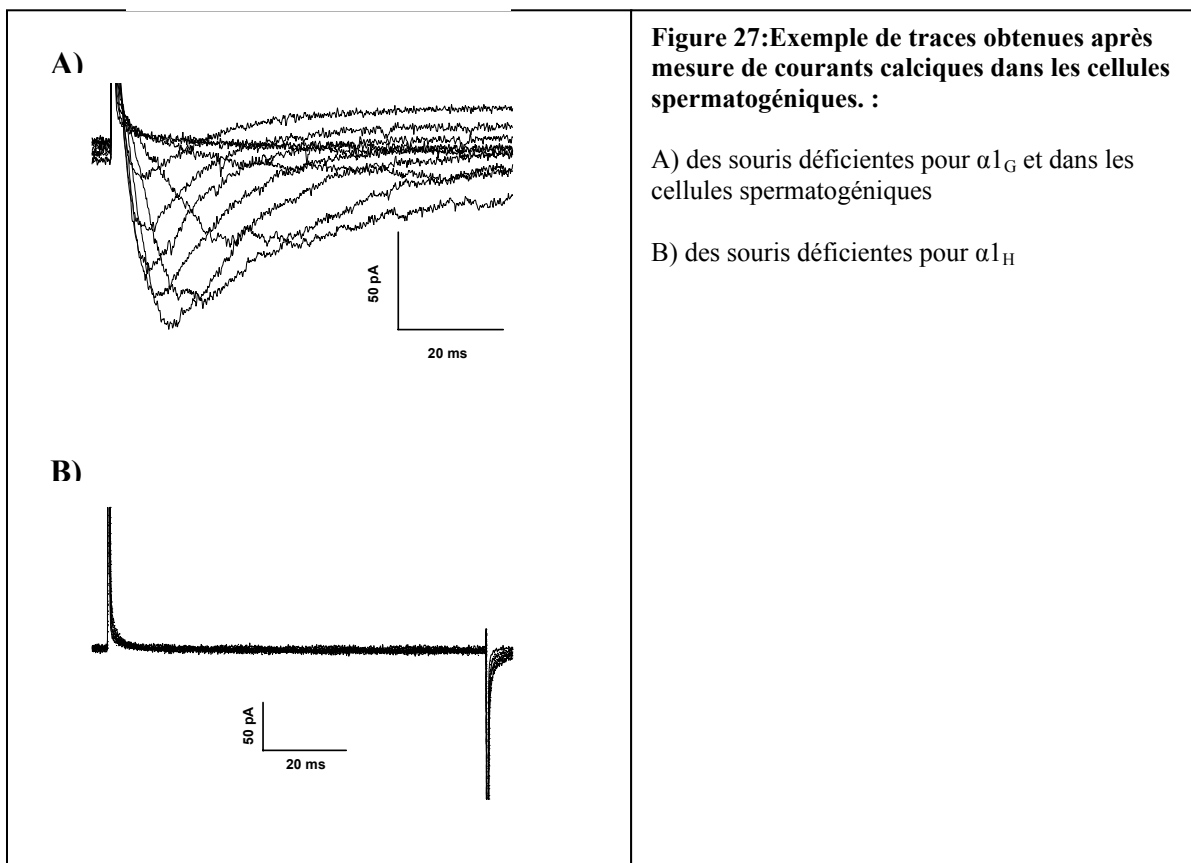
## Introduction

Après avoir étudié les courants T dans cellules spermatogéniques de la souris déficientes en  $\alpha 1_G$ , nous avons conclu que la sous-unité majoritaire des courant T était la sous-unité  $\alpha 1_H$ . Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons démarré une collaboration avec le laboratoire de Kevin Campbell qui possède une souris déficiente pour  $\alpha 1_H$ . Cette souris présente des fonctions coronaires anormales (Chen et al., 2003) mais aucun déficit de fertilité n'a été observé. Nous démarrons actuellement une étude de cette souris déficiente pour  $\alpha 1_H$  et je vais vous présenter nos premiers résultats.

## Résultats

### 1) Etude des courants calciques dans les cellules spermatogéniques de la souris déficiente pour $\alpha 1_H$ .

La mesure des courants calciques des cellules spermatogéniques de la souris déficiente pour  $\alpha 1_H$  confirme nos hypothèses. En effet, le courant calcique entrant disparaît chez la souris déficiente pour  $\alpha 1_H$ . Le courant de type T dans les cellules spermatogéniques est essentiellement due à  $\alpha 1_H$  (Figure 27)

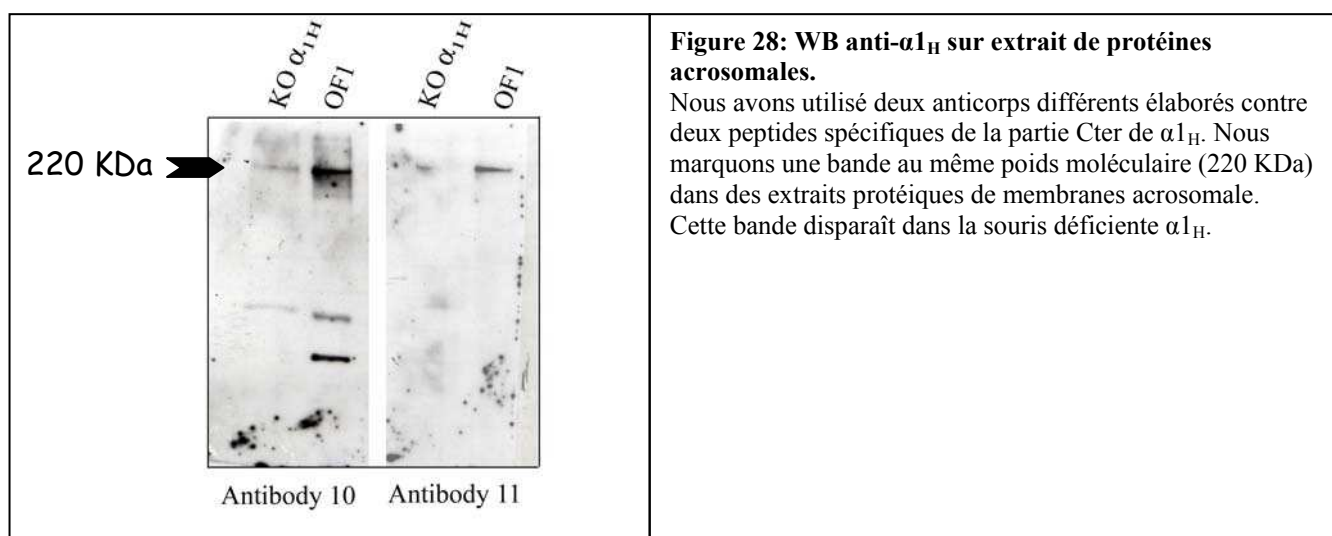




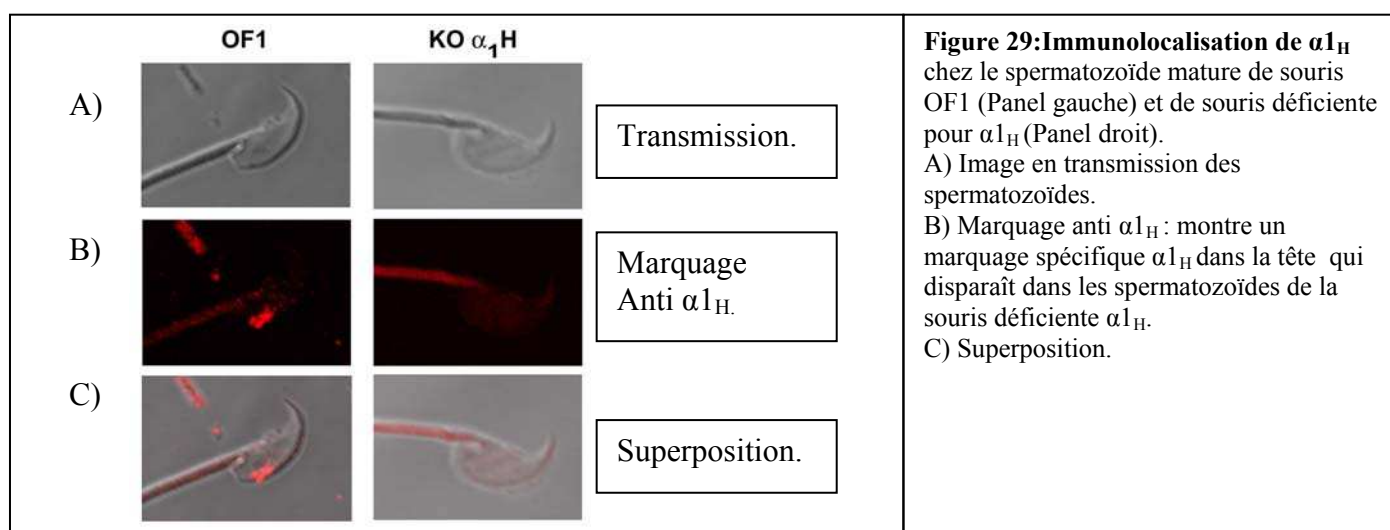
## 2) Localisation de $\alpha 1_H$ dans le spermatozoïde mature.

A l'heure actuelle, aucune donnée n'existe sur la localisation des canaux T dans le spermatozoïde mature. Nous avons élaboré de nouveaux anticorps contre  $\alpha 1_H$  et utilisé la souris déficiente pour  $\alpha 1_H$  pour attester de la spécificité de notre anticorps.

Une étude en WB montre la présence d' $\alpha 1_H$  dans un extrait protéique de membrane acrosomale de spermatozoïde mature. Deux anticorps différents dirigés contre  $\alpha 1_H$  reconnaissent la même bande dans un extrait de membrane acrosomal de souris OF1. Cette protéine est absente chez la souris déficiente pour  $\alpha 1_H$  (Figure 28).

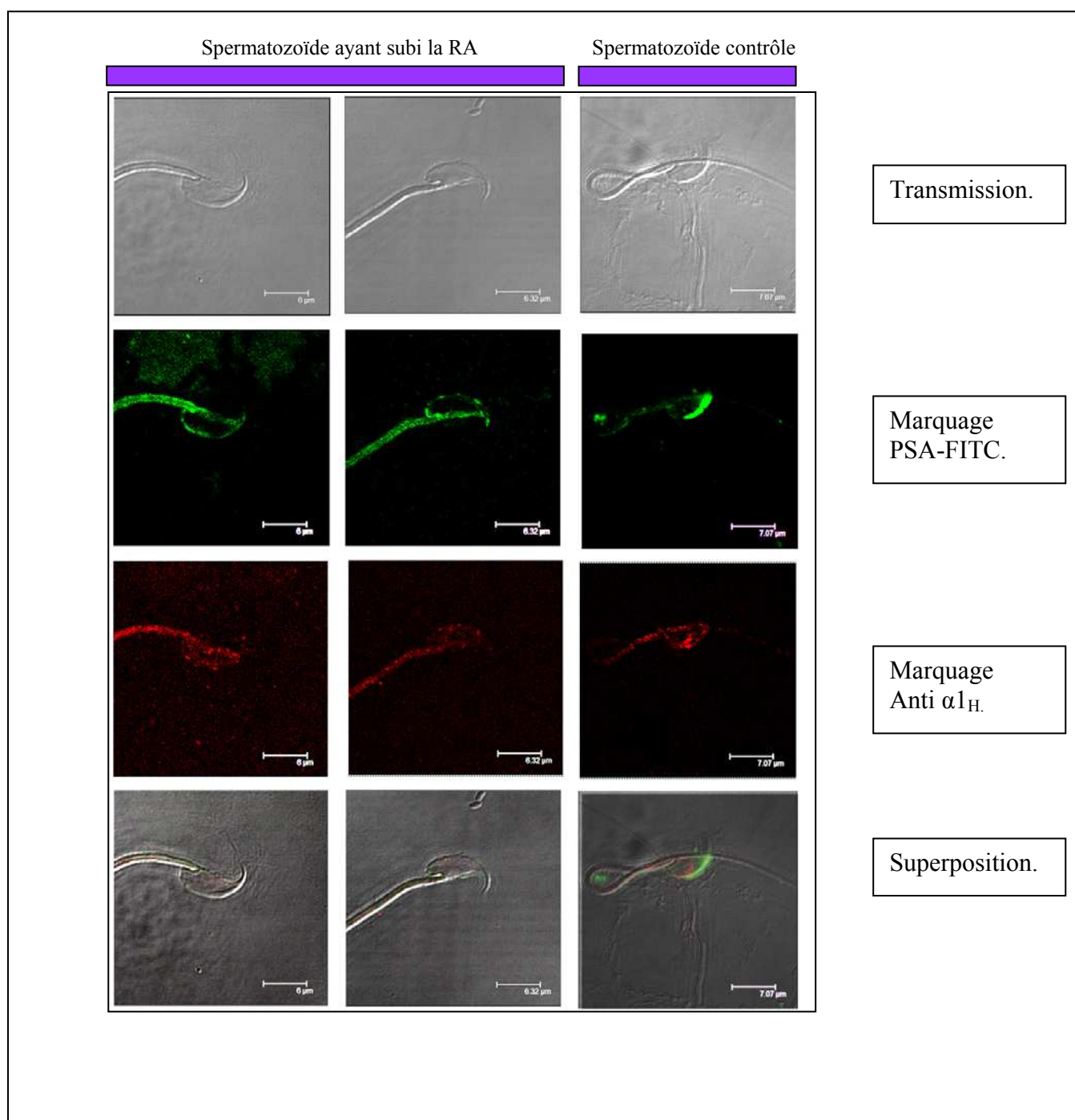


L'utilisation d'anticorps anti- $\alpha 1_H$  sur spermatozoïdes matures montre un marquage à la base du croissant acrosomal chez la souris OF1. Ce marquage disparaît complètement chez la souris déficiente pour  $\alpha 1_H$  (Figure 29).



**Figure 29: Immunolocalisation de  $\alpha 1_H$**  chez le spermatozoïde mature de souris OF1 (Panel gauche) et de souris déficiente pour  $\alpha 1_H$  (Panel droit).  
 A) Image en transmission des spermatozoïdes.  
 B) Marquage anti  $\alpha 1_H$ : montre un marquage spécifique  $\alpha 1_H$  dans la tête qui disparaît dans les spermatozoïdes de la souris déficiente  $\alpha 1_H$ .  
 C) Superposition.

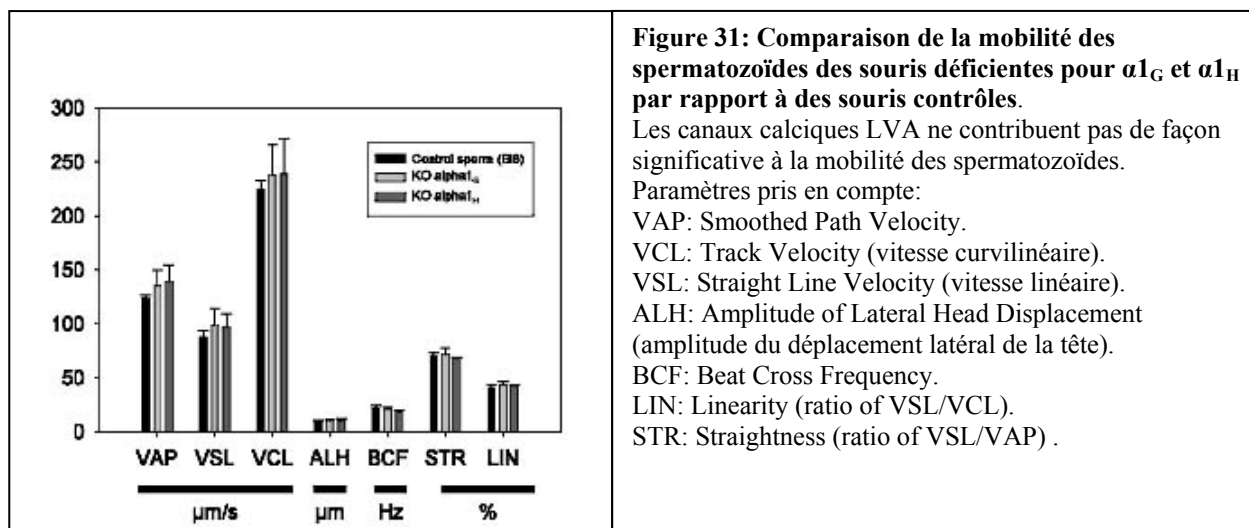
Afin d'affiner la localisation d' $\alpha 1_H$ , nous avons réalisé des marquages  $\alpha 1_H$  sur des spermatozoïdes contrôle et sur des spermatozoïdes qui ont accompli leur RA. Le marquage disparaît chez les spermatozoïdes qui n'ont plus d'acrosome. Ces données nous permettent de supposer qu' $\alpha 1_H$  est localisée au niveau de la membrane plasmique qui fusionne avec la membrane acrosomale au cours de la RA (Figure 30).



**Figure 30 : Immunolocalisation d' $\alpha 1_H$  au niveau de spermatozoïdes contrôle et de spermatozoïdes ayant accompli leur RA.**

Les spermatozoïdes sont marqués au PSA-FITC (marquage vert) et avec un anticorps contre  $\alpha 1_H$  (marquage rouge). L'acrosome est marqué en vert dans les spermatozoïdes intacts (colonne de droite), alors que la tête ne montre plus aucun marquage chez les spermatozoïdes ayant effectué leur RA (colonnes de gauche).

Lors de nos immunomarquages, nous avons pu remarquer un léger marquage au niveau du flagelle. Nous avons alors voulu vérifier si  $\alpha 1_H$  et  $\alpha 1_G$  avaient un rôle dans le mouvement du flagelle. Nous avons comparé différents paramètres de motilité des spermatozoïdes des souris déficientes pour  $\alpha 1_H$  et  $\alpha 1_G$  par rapport aux spermatozoïdes de souris contrôle. Nous n'avons pas observé de différences significatives, ce qui nous permet de dire qu' $\alpha 1_H$  et  $\alpha 1_G$  n'ont pas de rôle dans la motilité du spermatozoïde (Figure 31).



**Figure 31: Comparaison de la motilité des spermatozoïdes des souris déficientes pour  $\alpha 1_G$  et  $\alpha 1_H$  par rapport à des souris contrôles.**

Les canaux calciques LVA ne contribuent pas de façon significative à la motilité des spermatozoïdes.

Paramètres pris en compte:

VAP: Smoothed Path Velocity.

VCL: Track Velocity (vitesse curvilinéaire).

VSL: Straight Line Velocity (vitesse linéaire).

ALH: Amplitude of Lateral Head Displacement (amplitude du déplacement latéral de la tête).

BCF: Beat Cross Frequency.

LIN: Linearity (ratio of VSL/VCL).

STR: Straightness (ratio of VSL/VAP) .

## Conclusion.

Nos données actuelles sur l'étude de la souris déficiente pour  $\alpha 1_H$ , nous ont permis de montrer que

- 1) dans les cellules spermatogéniques que le courant T est un courant  $\alpha 1_H$
- 2)  $\alpha 1_H$  est localisé en vis-à-vis de la membrane acrosomale et se situe au niveau du point d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  lors de la RA (Kirkman-Brown et al., 2000).
- 3) les spermatozoïdes des souris déficientes pour  $\alpha 1_G$  et  $\alpha 1_H$  ne présente pas de défaut de motilité.

Il nous reste à montrer l'impact de la disparition de la signalisation calcique d' $\alpha 1_H$  sur la réaction acrosomique. Le canal T est essentiel au cours de la RA. Il est responsable du courant transitoire qui initie la RA. Si  $\alpha 1_H$  est la sous-unité majoritaire dans les cellules spermatogéniques et qu'elle se localise au niveau du croissant acrosomal, on peut imaginer qu' $\alpha 1_H$  soit le canal responsable du courant transitoire qui initie la RA. Nous envisageons de vérifier si ce courant transitoire est toujours présent chez les spermatozoïdes des souris déficientes en  $\alpha 1_H$ .

*Article 3.*

*La junctate, une protéine associée à l'IP3R, est présente dans les spermatozoïdes de souris et interagit avec les canaux TRPC2 et TRPC5 mais pas avec TRPC1.*



## **Introduction.**

TRPC2 est essentiel pour l'induction de la RA par ZP3 (Jungnickel et al., 2001). Cependant la souris déficiente pour TRPC2 est fertile (Stowers et al., 2002). Ce phénomène est assez fréquent lors d'inactivation de gènes. Lors de la suppression d'un gène, l'organisme est capable de surexprimer d'autres protéines afin de contrecarrer la mutation. Ainsi, même si la souris déficiente pour TRPC2 est fertile, cela ne signifie pas que TRPC2 ne soit pas essentiel à la RA. L'organisme peut surexprimer d'autres protéines (vraisemblablement d'autres TRPCs) pour jouer le rôle de TRPC2.

Depuis la découverte du domaine de liaison pour l'IP<sub>3</sub>R au niveau de TRPC2, il a été suggéré que l'activation de ce canal pourrait être due à un couplage conformationnel induit par la vidange des stocks entre le récepteur à l'IP<sub>3</sub> et TRPC2. Cependant des données récentes ont montré que la junctate une protéine associée à l'IP<sub>3</sub>R participe également à l'ouverture de TRPC3 (Treves et al., 2004). Qu'en est-il dans le spermatozoïde ? Nous avons recherché la présence de cette protéine par trois différentes approches. Nous avons mis en évidence son interaction avec TRPC2, TRPC5 mais pas TRPC1. Les TRPCs possèdent différents modes d'activation selon le système cellulaire où ils s'expriment. Dans les neurones de l'organe voméronasal, TRPC2 est activé par le DAG de manière indépendante des stocks calciques (Lucas et al., 2003) alors que dans les cellules spermatogéniques son activation est liée au niveau de remplissage des stocks (Jungnickel et al., 2001). Nous avons voulu vérifier si l'utilisation d'un analogue du DAG (OAG) ne déclenchait pas la RA.



## Junctate, an inositol 1,4,5-triphosphate receptor associated protein, is present in rodent sperm and binds TRPC2 and TRPC5 but not TRPC1 channels

S everine Stamboulia<sup>a</sup>, Marie-Jo Moutin<sup>a</sup>, Susan Treves<sup>b</sup>, Nathalie Pochon<sup>a</sup>,  
Didier Grunwald<sup>a</sup>, Francesco Zorzato<sup>c</sup>, Michel De Waard<sup>a</sup>,  
Michel Ronjat<sup>a</sup>, Christophe Arnoult<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>CEA/Grenoble, Laboratoire "Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies" Unité mixte INSERM U607, 17 rue des martyrs,  
F-38054 Grenoble Cedex 9, France

<sup>b</sup>Department of Anesthesiology and Research, University of Basel Kantosspital, Basel, Switzerland

<sup>c</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Patologia Generale, Universit  di Ferrara, Via Borsari 46, 44100 FERRARA, Italy

Received for publication 28 February 2005, revised 29 July 2005, accepted 1 August 2005

### Abstract

The acrosome reaction, the first step of the fertilization, is induced by calcium influx through Canonical Transient Receptor Potential channels (TRPC). The molecular nature of TRPC involved is still a debated question. In mouse, TRPC2 plays the most important role and is responsible for the calcium plateau. However, TRPC1 and TRPC5 are also localized in the acrosomal crescent of the sperm head and may participate in calcium signaling, especially in TRPC2-deficient mice. Activation of TRPC channels is an unresolved question in germ and somatic cells as well. In particular, in sperm, little is known concerning the molecular events leading to TRPC2 activation. From the discovery of IP3R binding domains on TRPC2, it has been suggested that TRPC channel activation may be due to a conformational coupling between IP3R and TRPC channels. Moreover, recent data demonstrate that junctate, an IP3R associated protein, participates also in the gating of some TRPC.

In this study, we demonstrate that junctate is expressed in sperm and co-localizes with the IP3R in the acrosomal crescent of the anterior head of rodent sperm. Consistent with its specific localization, we show by pull-down experiments that junctate interacts with TRPC2 and TRPC5 but not with TRPC1. We focused on the interaction between TRPC2 and junctate, and we show that the N-terminus of junctate interacts with the C-terminus of TRPC2, both in vitro and in a heterologous expression system. We show that junctate binds to TRPC2 independently of the calcium concentration and that the junctate binding site does not overlap with the common IP3R/calmodulin binding sites.

TRPC2 gating is downstream phospholipase C activation, which is a key and necessary step during the acrosome reaction. TRPC2 may then be activated directly by diacylglycerol (DAG), as in neurons of the vomeronasal organ. In the present study, we investigated whether DAG could promote the acrosome reaction. We found that 100  $\mu$ M OAG, a permeant DAG analogue, was unable to trigger the acrosome reaction.

Altogether, these results provide a new hypothesis concerning sperm TRPC2 gating: TRPC2 activation may be due to modifications of its interaction with both junctate and IP3R, induced by depletion of calcium from the acrosomal vesicle.

  2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Sperm; Acrosome reaction; Calcium channels; TRPC channels; TRPC1; TRPC2; TRPC5; Junctate; Inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R)

### Introduction

The acrosome reaction (AR), the first step of fertilization, is an exocytotic event allowing sperm to cross the zona pellucida and to become competent for fusion with the

\* Corresponding author. Fax: +33 4 38 78 50 41.

E-mail address: [carnoult@cea.fr](mailto:carnoult@cea.fr) (C. Arnoult).



oocyte. Contrary to classical exocytotic events, the sperm AR is regulated by a multifaceted intracellular calcium rise. This calcium increase is due to the consecutive openings of three different types of calcium channels: (i) a voltage activated channel, (ii) the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) and finally (iii) a store-operated channel. The first channel type to be activated is on the plasma membrane, belongs to the low-voltage activated calcium channels family (Arnoult et al., 1996), and our recent data strongly suggest that this channel is a  $Ca_v3.2$  channel (Stambouliau et al., 2004). This channel is activated few hundred of milliseconds after the binding of the zona pellucida glycoprotein ZP3 on its yet uncharacterized receptor and is responsible of a short calcium transient (Arnoult et al., 1999). The role of the transient calcium entry via  $Ca_v3.2$  channel is still a matter of debate. It may modulate other calcium channels involved in the downstream intracellular calcium rise (Stambouliau et al., 2002). The second channel type to be activated is the intracellular IP3R, present in the outer membrane of the sperm acrosome (Walensky and Snyder, 1995), contrary to other cell types where it is present in the endoplasmic reticulum. Then, the acrosome, known to be a vesicle of secretion, plays also a role as a calcium store (De Blas et al., 2002; Herrick et al., 2004). ZP3 activates, via a G protein, a phospholipase C (PLC), an enzyme that produces two secondary messengers, inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG). PLC activation is a necessary step since inhibitors of PLC block the AR (O'Toole et al., 2000). The production of IP3 by PLC activates IP3R and leads to the emptying of the specific sperm calcium store, the acrosome. Finally, the third channel, a store-operated calcium channel (SOC), is activated.

Store-operated calcium channels are activated by the depletion of intracellular calcium stores. In vertebrates, the seven members of TRPC proteins (TRPC1–7) are proposed to be classical representatives of these channels (Montell, 2001). In sperm, different types of TRPC channels are present such as TRPC1, 2, 3 and 5 (Castellano et al., 2003; Jungnickel et al., 2001; Sutton et al., 2004; Trevino et al., 2001). Among them, it is accepted that TRPC2 plays the major role during the mouse acrosome reaction because specific inhibition of TRPC2 blocks the slow calcium rise and the sperm exocytosis (Jungnickel et al., 2001). However, TRPC2-deficient mice do not present fertility troubles (Stowers et al., 2002), suggesting that other members of the TRPC family present in sperm may be up-regulated to compensate the lack of TRPC2. TRPC1 and TRPC5 are potentially able to compensate the lack of TRPC2 since their cellular localization overlaps perfectly the acrosomal crescent (Sutton et al., 2004).

The mechanism of activation of SOC is still a matter of debate. To summarize, three different ways of activation have been described: (1) SOC are activated via secondary messenger like Calcium Influx Factor (CIF) (Randriamampita and Tsien, 1993), (2) SOC activation depends on some

extent on exocytosis (Yao et al., 1999) and (3) the IP3R, localized vis a vis the plasma membrane in microdomains of the ER, interacts with SOC, allowing its direct activation after calcium store emptying (Kiselyov et al., 1998), in a mechanism similar to what already described for the coupling between ryanodine receptor and the dihydropyridine receptor in skeletal muscle cells. This latest mode of gating was clearly demonstrated only for TRPC channels. In agreement with the third hypothesis, we have recently shown that TRPC3 activation is modulated by junctate, an endoplasmic membrane protein which is a partner of the IP3R (Treves et al., 2004). TRPC3 current amplitude induced by carbachol perfusion is strongly reduced by dialysis of a peptide encompassing the N-terminus of junctate via a patch pipette. Because the lumen part of the junctate has calcium binding domains, it has been hypothesized that junctate could be the sensor of store depletion and that structural modification of junctate may be the first molecular event leading to TRPC3 activation. Finally, it is important to point out that some TRPC channels are not activated by calcium store depletion but rather by DAG and, to complicate the debate, that a same type of TRPC channel can be activated in different ways depending on its tissues distribution or density expression (Vazquez et al., 2003).

The TRPC2  $Ca^{2+}$ -permeable channel is a functional channel in rodent (Vannier et al., 1999), specifically expressed in vomeronasal organ where it plays a key role in pheromone detection (Stowers et al., 2002), in testis where it plays a key role in AR (Jungnickel et al., 2001) and in erythroblast where it controls erythropoietin-induced differentiation and proliferation (Chu et al., 2002). Biochemical results demonstrating the presence of IP3R binding sites on TRPC2 strongly suggest that TRPC2 could be activated by a direct interaction with IP3R (Tang et al., 2001). However, the mode of activation of TRPC2 appears quite variable depending on the cell type considered. In neurons of the vomeronasal organ, TRPC2 is clearly activated directly by DAG, independently of the IP3R activation (Lucas et al., 2003). On the other hand, in erythroblast, the TRPC2 activation requires a functional interaction with IP3R since mutations of the known binding sites on TRPC2 for IP3R lead to an inhibition of TRPC2 activation by erythropoietin (Tong et al., 2004). In contrast to these cell types, the mechanism of activation of TRPC2 in sperm is less understood. It has been shown that IP3R and TRPC2 are localized in the same sperm region, the acrosomal crescent (Jungnickel et al., 2001). Moreover, calcium release via IP3R is necessary for Rab3-activated acrosome reaction (De Blas et al., 2002), and, finally, the calcium entry induced by thapsigargin, a classical inhibitor of SERCA type calcium ATPase, is inactivated by specific antibodies against TRPC2 (Jungnickel et al., 2001), suggesting that the acrosomal calcium emptying is sufficient to activate TRPC2. These results, taken together, suggest that the store depletion via IP3R activation is an important step in TRPC2 activation.

Since junctate is an important actor of calcium signaling involving TRPC channels in heterologous expression systems (Treves et al., 2004), we decided to investigate the presence of junctate in sperm. In order to evaluate its potential involvement in sperm calcium signaling during acrosome reaction, we explored the possibility for junctate to be a molecular partner of TRPC channels putatively involved in AR, that are TRPC1, TRPC2 and TRPC5.

In this paper, we show that junctate is present in mouse and rat sperm and is localized in the acrosomal crescent of the anterior sperm head. Junctate is not only an IP3R associated protein but binds also directly on TRPC2, a TRPC involved in AR and on TRPC5, a TRPC overlapping the acrosomal crescent. On the other hand, TRPC1, also present in the acrosomal crescent, does not bind junctate. We show that the amino-terminal domain of junctate interacts with the carboxyl-terminal domain of TRPC2 (TRPC2-Cter). The binding site of junctate on TRPC2 is different than (1) the IP3R binding site (named also CIRB for **C**almodulin **I**P3R **B**inding site) described earlier (Tang et al., 2001) and (2) the calmodulin binding sites. The presence of junctate in the acrosomal region, the biochemical evidences that junctate and TRPC2 are able to interact tightly, and the fact that DAG does not promote acrosome reaction provides new hypothesis concerning TRPC2 activation in sperm: TRPC2 activation may be due to modifications of its interaction with both junctate and IP3R, induced by depletion of calcium from acrosomal vesicle.

## Material and methods

### Cell culture and transfection

HEK-293 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin and transiently transfected with pEGFP-junctate, TRPC1 or TRPC5 containing plasmids, using JetPEI from Qbiogene according to the instructions of the manufacturer. Two days after transfection, transfected and control cells were collected and re-suspended in RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP 40, 0.5% DOC) complemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, EDTA-free, Roche).

### Acrosomal membrane preparation

Sperm were obtained from OF1 mice (16 weeks old, Charles River) by manual trituration of caudae epididymis.

To obtain an acrosomal-membrane-enriched fraction, sperm were capacitated in M2 (Sigma) supplemented with BSA (20 mg/ml, pH 7.4) for 1 h at 37°C. Sperm were pelleted (500 g, 10 min) and treated with 10  $\mu$ M A23187 during 30 min at 37°C in the presence of a cocktail of

protease inhibitors. Sperm were then centrifuged 5 min at 1000  $\times$  g. The supernatant was collected and subsequently ultra-centrifuged at 100,000  $\times$  g for 1 h at 4°C. The pellet was re-suspended in RIPA buffer containing: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP 40, 0.5% DOC, complemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, EDTA-free, Roche).

### DNA construct

#### Expression of the recombinant proteins

A His-tag (6 His) fusion protein, starting three amino acids before the TRP box, containing the full COOH-terminal domain of TRPC2 was obtained as follows: a 747 bp cDNA corresponding to amino acid residues 925–1172 (NM\_011644) was obtained by PCR using the following primers: forward primer 5'-CATGCCATGGTCAAGCTT-CAGAAGATCGAGGATGATGCTG-3' and reverse primer 5'-GCTTCTAGAGTTAGGACTCGCCCTTGGTCTC-CAG-3. This construct was then inserted in frame into the multiple cloning sites of the His-tag pMR78 vector (Arnaud et al., 1997) and verified by sequencing. The His-tag is located at the N-terminus of the fusion protein. The recombinant plasmid was then transformed into *E. coli* BL 21 (Invitrogen) in order to express the His-TRPC2-Cter fusion protein. The fusion protein was purified with an Ni-NTA agarose column (Qiagen) according to the instructions of the manufacturer.

GFP-junctate was constructed as previously described (Treves et al., 2004).

### RT-PCR amplification

Messenger RNA from adult mice testes and brains was prepared from tissue with the Dynabeads isolation kit (Dyna). Each RT-PCR reaction was performed in a total volume of 25  $\mu$ l in the presence of 30 ng of mRNA using the Superscript TM One step RT-PCR system (Invitrogen).

Sense and reverse primers were respectively 5'-TTTT-GTGCATGGATTGAAGAA-3' (nucleotides 40–61 of junctate AF302653) and 5'-TCGACCAAGTCAAACCACAC-3' (nucleotides 130–149 of junctate). Reverse transcription was achieved within 30 min of incubation at 45°C. Amplification was obtained after 40 cycles of temperature: 30 s at 94°C, 30 s at 48°C and 30 s at 72°C. Elongation was done at 72°C during 10 min.

A 185 bp product was obtained in both tissues and purified using Nucleospin (Macherey Nagel). These cDNA products were amplified in the same conditions as above and subsequently sequenced.

As control for the mRNA preparation and quantification, a 192 bp cDNA product from Hypoxanthine Phospho Ribosyl Transferase (HPRT) cDNA was amplified using the forward primers 5'-TGTAATGACCAGTCAACAGGG-3' and the reverse primer 5'-TGGCTTATATCCAACACTT-CG-3 (data not shown).

### Western blot analysis

Proteins were separated on 12% polyacrylamide denaturing gels and electro-transferred for 90 min at 350 mA to Immobilon P transfer membrane (Millipore). The membranes were then blocked 60 min with 4% non-fat dry milk (Biorad) in PBS Tween 0.1%. The primary antibody was added and incubated overnight at 4°C. After washing in PBS Tween 0.1%, the secondary antibody (anti-rabbit Jackson lab.) was added at 1:10,000 during 3 h at room temperature. The membrane was washed and incubated 1 min in HRP substrate (Western Lightning, Perkin-Elmer Life Science). The reactive proteins were detected using chemiluminescence assay followed by exposure to Biomax film (Kodak).

The presence of junctate in sperm membrane fraction and in acrosomal enriched fraction was tested using antibody raised against its carboxyl-terminus (Treves et al., 2000) at a final concentration of 1 µg/ml.

Antibodies against green fluorescent protein (GFP) (Santa Cruz Biotechnology) was used to purify junctate during immunoprecipitation and for Western blotting diluted at 1:5000.

Monoclonal anti-polyhistidin (Sigma) was used at a dilution of 1:10,000.

Antibodies against TRPC1 and TRPC5 were from Alomone.

### Immunoprecipitation and pull-down experiments

#### Immunoprecipitation of TRPC2-Cter with GFP-junctate

GFP antibody (0.8 µg/ml) was incubated with protein A (Dynabeads Protein A, Dynal) 30 min at room temperature. Beads were rinsed with 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA (free calcium concentration = 10 µM) pH 7.5, three times and incubated overnight with total protein extracts from HEK-293 cells transiently transfected with pEGFP-junctate (Treves et al., 2004). After three washes, beads were incubated with the fusion protein TRPC2-Cter containing the His-tag during 2 h at 4°C. Beads are then washed five times, and bound proteins were eluted by boiling 5 min at 95°C in Laemmli sample buffer. Control was performed with total protein extract from untransfected HEK-293 cell.

#### Immunoprecipitation of TRPC2-Cter, TRPC5 and TRPC1 with biotinylated junctate peptide on streptavidin beads

Biotinylated peptide corresponding to the amino-terminus of junctate (MAEDKETKHGGHKNRKGGLSGT-SK-biotin) or biotin was incubated 30 min at room temperature with streptavidin beads (Dynabeads M280 Streptavidin, Dynal).

Beads were washed three times with a buffer containing in mM: Tris 50 pH 7.5, NaCl 100, CaCl<sub>2</sub> 5, EGTA 5 and 100 µM or 10 nM free Ca<sup>2+</sup>. Beads were blocked during 1 h with BSA (0.2 mg/ml) and then incubated with purified His-

TRPC2-Cter or with total protein extracts from HEK-293 cells transiently transfected with plasmids containing TRPC1 or TRPC5 overnight at 4°C in the presence of a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, EDTA-free, Roche). Beads were washed two times, and bound proteins were eluted by boiling 5 min in Laemmli sample buffer.

#### Immunoprecipitation of TRPC2-Cter with calmodulin-sepharose beads

Calmodulin-sepharose 4B (Amersham Biosciences) was incubated 45 min with TRPC2-Cter diluted in a solution containing in mM: Tris 50 pH 7.5, NaCl 100, CaCl<sub>2</sub> 5, EGTA 5 and BSA 2 mg/ml. Bound proteins were eluted by boiling 5 min in Laemmli sample buffer.

For competition studies, F2q peptide (amino acids 669–698 of IP3R) was synthesized by Neosystem-Strasbourg F.

#### Immunohistochemistry and indirect immunofluorescence

Sperm were harvested from the caudae epididymis, washed in PBS and fixed in 4% PFA for 30 min on ice. Fixed sperm were allowed to air-dry on poly-L-lysine-coated slides. The slides were washed in PBS (3 × 5 min), 50 mM NH<sub>4</sub>Cl (2 × 15 min), PBS (3 × 5 min), 0.1% triton X-100 (15 min) and PBS (3 × 5 min). Slides were blocked with 1% BSA and 2% normal goat serum during 60 min at room temperature. Slides were incubated overnight at 4°C, in the presence of an antibody against junctate (Treves et al., 2000) and/or an antibody against IP3R (gift from Dr. Mikoshiba Tokyo-Japan), diluted in the blocking solution at 1/100 and 1/2000 respectively. Slides were then incubated 60 min with a secondary antibody (Alexa fluor 546 or Alexa fluor 488—Molecular probes), diluted at 1/800 and washed in PBS (3 × 5 min). Slides were analyzed on a confocal laser scanning microscope (Leica TCS-SP2, Mannheim).

#### BIAcore analysis

Real time surface plasmon resonance (SPR) experiments were performed on a BIAcore biosensor system 1000 at 25°C with a constant flow rate of running buffer 100 µM free calcium (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA) or with a buffer containing 10 nM free calcium (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EGTA). Biotinylated junctate peptide or biotin was immobilized on the sensor chip surface coated with streptavidin (sensor chip SA). Various concentrations of purified TRPC2-Cter were injected onto the coupled surfaces. Regeneration of the sensor chip for subsequent injections was accomplished by injecting SDS 0.01%, 0.02% and 0.03%.

#### Acrosome reaction assays

Sperm were harvested from OF1 mice and allowed to swim in M2 medium for 10 min. Sperm were then capacitated for 45 min at 37°C in M16 medium containing

20 mg/ml BSA. The different modulators of acrosome reaction (A23187, OAG) were added in the capacitation medium, and sperm were incubated for further 30 min. Sperm were then fixed in 4% PFA and stained with coomassie blue.

M2 and M16 medium, 1-oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG) and A23187 were from Sigma.

## Results

### *Junctate is present in rodent sperm and localized in the acrosomal crescent of the anterior sperm head*

Because IP3 production was shown to be necessary for acrosome reaction and junctate was shown to be an important regulating protein of IP3R-dependent calcium influx, we decided to seek this protein in mature sperm cells. Three different approaches have been used to demonstrate the presence of junctate in sperm. First, we checked the presence of junctate in mouse testis by RT-PCR, using a sense primer designed in the non-codant amino-terminal part of the protein and an antisense primer spanning across transmembrane and luminal part of the protein. The PCR product amplified from mRNA has a size of 180 bp, as expected (Fig. 1A). Identity of the product was confirmed by sequence analysis of the band (data not shown).

Our second approach was to demonstrate the presence of the protein junctate by Western blot using a polyclonal

antibody (Treves et al., 2000). Junctate, as IP3R, is generally present in the endoplasmic membranes. However, in mature sperm cells, where the endoplasmic reticulum is absent, endoplasmic membrane proteins like IP3R are localized in the acrosomal membrane. Thus, membrane preparation enriched in acrosomal membrane should present a higher concentration of junctate than in a sperm crude membrane extract. To obtain a membrane preparation enriched with outer acrosomal membranes, capacitated sperm were treated with the calcium ionophore A23187 to promote AR. Secretion vesicles, corresponding to plasma membrane and outer acrosomal membranes merged together, were purified by centrifugation (see Material and methods section) and the presence of junctate studied by Western blot analysis (Fig. 1B). For mouse sperm, 3 bands were stained with apparent molecular weight (MW) of 41, 43 and 45 kDa respectively. We also checked the presence of junctate in similar membrane preparation obtained from rat sperm. In rat, the antibody immunodecorated only one band at 43 kDa (Fig. 1B). The 3 bands observed in mouse preparation likely correspond to different isoforms of junctate. Three junctate isoforms have indeed already been described in mouse cardiac cells with apparent molecular weight between 40 and 53 kDa.

The acrosomal localization of junctate was confirmed by immunostaining experiments of rat and mouse sperm cells. In both species, the polyclonal antibody against junctate stained the acrosomal crescent of the anterior sperm head (Figs. 2A–B). Such result is particularly interesting since the IP3R was shown to be localized in the same subcellular area (Walensky and Snyder, 1995). We, then, performed colocalization experiments using antibodies directed against IP3R and junctate. Figs. 2C–F show that both proteins colocalize in the same subcellular area, i.e. the acrosomal crescent.

Altogether, these results demonstrate that junctate is present in sperm and sub-localized in the acrosomal crescent of the anterior sperm head, in the vicinity of the IP3R.

The presence of junctate in the sperm acrosomal region and the facts that junctate (1) binds to TRPC3 in HEK-293 cells and (2) regulates TRPC3-dependent calcium influx induced by carbachol (Treves et al., 2004) raise the question of a direct interaction of junctate with the different TRPC involved in AR (i.e. TRPC2) or overlapping the acrosomal crescent (i.e. TRPC1 and TRPC5).

### *Junctate binds to the carboxyl-terminus of TRPC2*

Junctate tagged by GFP was expressed in HEK-293 cells. As expected, in a Western blot, an antibody against GFP immunodecorated a band around 70 kDa corresponding to GFP-junctate (Fig. 3A). Then, expressed GFP-junctate was immobilized on sepharose beads coated with an antibody directed against GFP and incubated with a fusion protein corresponding to the full carboxyl-terminus of TRPC2

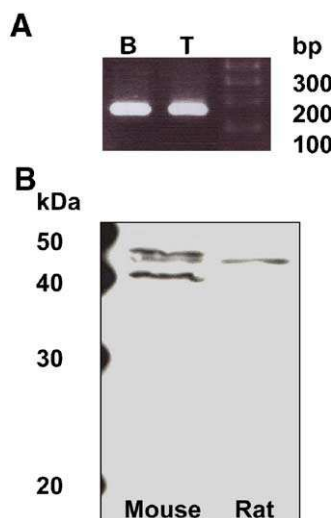


Fig. 1. Junctate is present in sperm. (A) cDNA products obtained after RT-PCR from brain (B) and testis (T) poly A mRNA, using junctate-specific primers. The testis 185 bp product sequence aligns with junctate sequence (data not shown). (B) Western blot showing the presence of junctate in a membrane fraction enriched with outer acrosomal membrane from mouse and rat sperm, using anti-junctate-specific antibody. On the left, visualization of proteins standards (lane truncated) used to estimate the molecular weight.

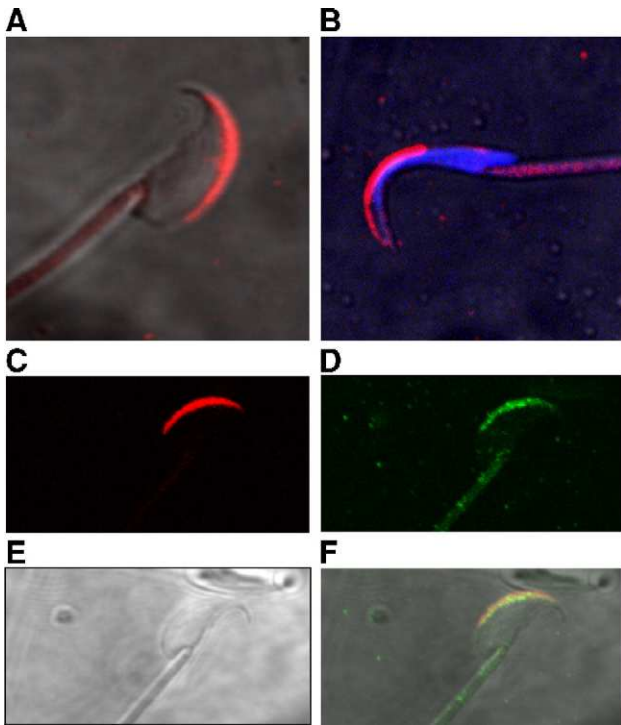


Fig. 2. Junctate is present in the acrosomal crescent of the anterior head. Immunolocalization of junctate in sperm head of mouse (A) and rat (B) evidenced with a junctate-specific antibody. Junctate is localized in the acrosomal crescent of the anterior head. Blue staining in rat sperm head corresponds to the nucleus stained with TOPRO stain. Co-immunolocalization of junctate (C) and IP3R (D) in the same mouse sperm head. (E) Transmitted light image (DIC) and (F) overlay of images presented in panels C–E showing the co-localization of both proteins.

(TRPC2-Cter). In this experiment and in the following, the TRPC2-Cter fusion protein was tagged with histidin residues at its N-terminus (His-TRPC2-Cter) for purification and was evidenced in Western blots with an antibody against its histidin tag. Fig. 3B shows that the fusion protein corresponding to the carboxyl-terminus of TRPC2 was bound to immobilized GFP-junctate (Fig. 3B, lane 3), whereas the non-bound fraction (lane 2) was highly depleted in His-TRPC2-Cter. The bound fraction on sepharose beads incubated with cell extracts of control HEK-293 did not contain His-TRPC2-Cter (Fig. 3B, lane 5), all the fusion protein being present in the non-bound fraction (lane 4). Our result clearly demonstrates that TRPC2, and more precisely its C-terminal cytosolic domain, physically interacts with junctate.

*The amino-terminus of junctate binds the carboxyl-terminus of TRPC2 in a calcium-independent manner*

In order to confirm the binding of junctate on TRPC2 channels and also to determine which part of junctate is involved in this binding, a peptide, encompassing the 30 amino acids of its amino-terminus (junctate-Nter), was synthesized because only the junctate-Nter can potentially interact with TRPC2 since its carboxyl-terminus is lu-

minal. The junctate-Nter peptide was tagged with biotin and was attached to streptavidin-coated beads. Then, His-TRPC2-Cter fusion proteins were incubated overnight with the coated beads. Fig. 4A shows that beads specifically coated with junctate-Nter peptide retained TRPC2 fusion protein (Fig. 4A, lanes 1 and 3), whereas beads coated with biotin only did not retain the fusion protein (Fig. 4A, lanes 2 and 4). Because calcium is well known to modify binding of calcium-dependent proteins, we checked the binding of TRPC2 in two different calcium conditions: 10 nM and 100  $\mu$ M free calcium. We show that the binding of TRPC2 on junctate is calcium-independent since His-TRPC2-Cter binds on junctate-Nter in the presence of 100  $\mu$ M (Fig. 4A, lane 1) or 10 nM (Fig. 4A, lane 3) free calcium. We also tested the binding of TRPC2 onto junctate in 1 mM  $Ca^{2+}$ , an experimental approach mimicking  $Ca^{2+}$  release conditions: this calcium concentration does not modify the binding (data not shown).

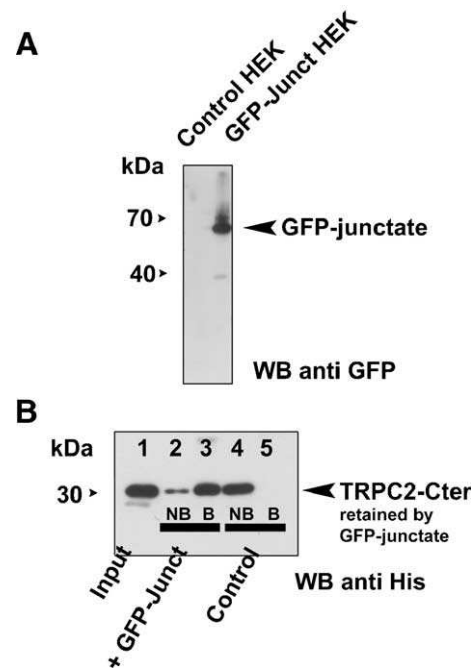


Fig. 3. Junctate and TRPC2-Cter are partners. (A) Expression of GFP-junctate in HEK-293 cells. Western blot using anti-GFP antibody in HEK-293 cells. Lane 1: protein extract from non-transfected cells; lane 2: protein extract from HEK-293 cells transfected with GFP-junctate. Antibody against GFP immunodecorates a protein of around 65 kDa, as expected, since GFP has a molecular weight of 27 kDa and junctate of 40 kDa. (B) Coprecipitation of TRPC2-Cter with GFP-junctate. Protein A beads were coated with an antibody against GFP. Then, two types of cell extracts were incubated with the beads: one from GFP-junctate transfected HEK cells (labeled “GFP-junctate”) and one from non-transfected HEK cells (labeled “control”). Finally, TRPC2 fusion protein (lane 1: Input) was incubated overnight with the beads. Only in the presence of junctate-GFP TRPC2 was immobilized on the beads (lane 3 bound fraction (B)), the supernatant being depleted in TRPC2 fusion protein (lane 2, non-bound fraction (NB)). Lanes 4 and 5 correspond to the beads incubated with cell extract without GFP-junctate. TRPC2 is present in the non-bound fraction (lane 4) and not in the bound fraction (lane 5).

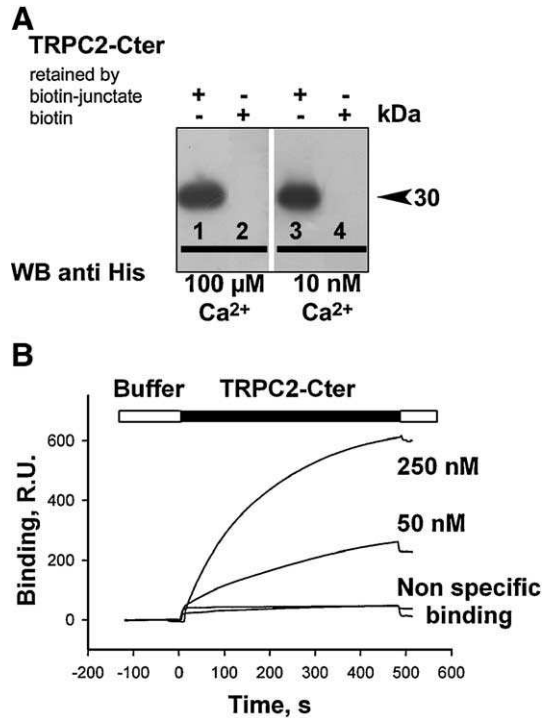


Fig. 4. The junctate amino-terminus interacts with the TRPC2 carboxyl-terminus, and this binding is calcium-independent. (A) Western blot of the bound fractions, showing the binding of TRPC2 on the beads, after pull down of His-TRPC2-Cter with biotinylated junctate-Nter peptide immobilized on streptavidin beads. Biotinylated junctate-Nter peptide was immobilized on streptavidin beads and then incubated with His-TRPC2-Cter. Beads coated with biotin only correspond to a control experiment. His-TRPC2-Cter is immunodecorated with an anti-histidin antibody. This experiment was done in two different calcium concentrations: 100  $\mu$ M (lanes 1 and 2) and 10 nM (lanes 3 and 4). Lanes 1 and 3 show the bound fraction in presence of biotinylated junctate-Nter peptide on beads. Lanes 2 and 4 show the bound fraction on beads coated with biotin only (control). Lanes are extracted from the same gel but rearranged. (B) SPR measurements showing the interaction of TRPC2-Cter (at concentrations of 50 and 250 nM as indicated) with biotinylated junctate-Nter immobilized on the surface of the matrix (total). Control traces (non-specific binding) were obtained with biotin immobilized on the surface of the matrix in a different flow cell and correspond to the non-specific TRPC2-Cter on the surface of the matrix (bulk + NS). The running buffer used contained 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl and 10 nM free calcium concentration.

In order to confirm the binding of junctate-Nter on TRPC2, experiments using the surface plasmon resonance (SPR) technique (Biacore) have been carried out. Biotinylated junctate-Nter was covalently bound on a streptavidin matrix, and TRPC2 fusion protein was introduced in the running buffer. Fig. 4B shows specific interaction of TRPC2 with biotinylated junctate-Nter. Control experiments have been also carried out, using a matrix covered with only biotin (Fig. 4B, non-specific binding). This experiment confirms clearly that carboxyl-terminus of TRPC2 binds to amino-terminus of junctate.

Altogether, our results show that the 30 N-terminal amino acids of junctate are sufficient to bind to the C-terminal domain of TRPC2 and that this interaction is calcium-independent.

### Junctate binds also to TRPC5 but not to TRPC1

Because TRPC1 and TRPC5 are also expressed in a region similar to junctate, we checked if the biotinylated junctate-Nter peptide attached to streptavidin beads retains specifically TRPC1 or TRPC5. By Western blot, using an antibody directed against TRPC5, a protein of a molecular weight of 110 kDa is specifically evidenced in HEK-293 cells transiently transfected with a plasmid containing TRPC5 (Fig. 5A). Total protein extracts from HEK-293 cells, transfected with TRPC5 cDNA, were incubated overnight with the beads coated with biotinylated junctate-Nter peptide. Fig. 5A shows that beads specifically coated with junctate-Nter peptide retained expressed TRPC5 protein (Fig. 5A, lane 5). On the other hand, beads coated with biotin only did not retain TRPC5 (Fig. 5A, lane 3). Subsequently, we tested, by an identical

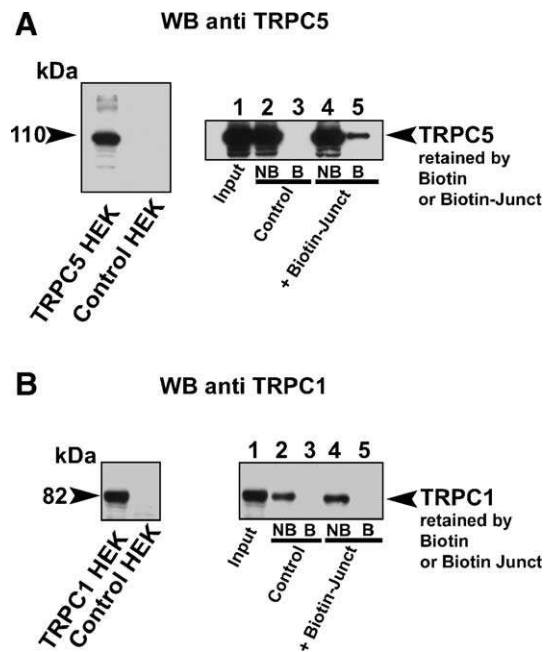


Fig. 5. Junctate binding onto TRPC1 and TRPC5. (A) TRPC5 binds onto the C-terminus of junctate. Left: TRPC5 transiently expressed in HEK-293 cells were specifically evidenced by Western blot. Right: Western blot showing the binding of TRPC5 on the beads, after pull down of TRPC5 with biotinylated junctate-Nter peptide immobilized on streptavidin beads. Biotinylated junctate-Nter peptide was immobilized on streptavidin beads and then incubated with protein extract of cells transiently transfected with TRPC5 cDNA. Only in the presence of biotinylated junctate-Nter TRPC5 was immobilized on the beads (Lane 5 bound fraction (B)); lane 4, non-bound fraction (NB). Lanes 2 and 3 correspond to a same cell extract incubated with beads coated with biotin only (control experiment). In the control experiment, TRPC5 is not retained (lane 3 bound fraction (B)); lane 2, non-bound fraction (NB). Lane 1 corresponds to cell extract (input). TRPC5 is immunodecorated with an anti-TRPC5 antibody. (B) TRPC1 does not bind onto the C-terminus of junctate. Left: Western blot showing expression of TRPC1 in HEK cells transiently transfected with TRPC1 cDNA. Right: Western blot showing the absence of binding of TRPC1 on the beads, after pull down of TRPC1 with biotinylated junctate-Nter peptide immobilized on streptavidin beads. The protocol is identical as presented in panel A for TRPC5.

approach, the ability of the same beads to retain TRPC1. By Western blot, we checked that a protein of a molecular weight of 82 kDa is specifically evidenced in HEK-293 cells transiently transfected with TRPC1 cDNA (Fig. 5B), using an antibody directed against TRPC1. In contrast to what was observed with TRPC5, junctate-coated beads did not keep TRPC1. These results show that junctate is able to bind onto specific TRPC channel isoforms only. Thus, junctate binds onto TRPC2 and TRPC5 but not onto TRPC1.

*TRPC2 has distinct binding sites for junctate and IP3R/calmodulin*

It has previously been shown that TRPC2 carboxyl-terminus contains binding sites for the IP3R and calmodulin (CaM) (Tang et al., 2001). Tang and collaborators characterized two binding sites for IP3R on the carboxyl-terminus of TRPC2. The first one, localized between amino acids 901 and 936 of TRPC2, was named CIRB (Calmodulin IP3R Binding site) because not only IP3R, but also CaM is able to bind to it. CaM and IP3R are in competition at the CIRB, and a small peptide from the IP3R, named F2v (amino acids 681–698 of the IP3R), blocks the interaction between CIRB and CaM with an  $IC_{50}$  of 21  $\mu$ M. The second binding site for IP3R is localized between amino acids 944 and 1072 of TRPC2. Although CaM binds to the same region of the protein, no data are available concerning mutual exclusion of IP3R and CaM at this second binding site of TRPC2. We attempted to determine if junctate binding site and the IP3R and calmodulin binding sites overlap. To determine whether junctate and IP3R share the same interaction site, we used a peptide from the IP3R, named F2q (amino acids 669–698 of the IP3R), which is longer than F2v and known to interact also with both IP3R binding sites of TRPC2. In a first set of experiments, we confirmed whether F2q is able to interact with the full carboxyl-terminus of TRPC2 fusion protein. To check the binding of F2q on TRPC2, we used the property of F2q to inhibit the interaction of CaM on the CIRB sequence of TRPC2 (Tang et al., 2001).

His-TRPC2-Cter fusion protein was incubated with calmodulin-sepharose beads, and bound proteins were evidenced by Western blot. Fig. 6A shows that His-TRPC2-Cter binds to CaM-sepharose in both 10 nM (lane 1) and 100  $\mu$ M (lane 3) tested calcium concentrations. When 0.1  $\mu$ M His-TRPC2-Cter fusion protein was preincubated with 20  $\mu$ M F2q peptide, the interaction of His-TRPC2-Cter with CaM-sepharose was completely blocked (Fig. 6A, lanes 2 and 4). This experiment confirms previous data showing that F2q peptide and CaM bind to TRPC2 on a common site (CIRB domain).

We then examined the possibility that the junctate-Nter peptide modulates TRPC2 binding on CaM-sepharose beads (Fig. 6B). The preincubation of His-TRPC2-Cter

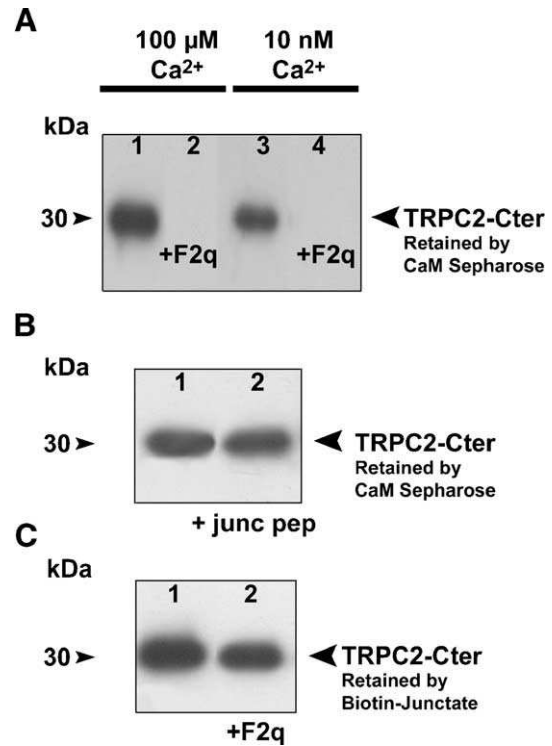


Fig. 6. Binding site of junctate on TRPC2 is different on IP3 receptor sites. (A) F2q peptide prevents TRPC2 binding on calmodulin-sepharose beads in a calcium-independent manner. Western blot of the bound fractions on the CaM-sepharose beads with an anti-histidin antibody, showing the binding of TRPC2. When TRPC2-Cter was incubated with CaM-sepharose beads, TRPC2 was kept within the beads (lane 1 with  $[Ca^{2+}] = 100 \mu$ M and lane 3 with  $[Ca^{2+}] = 10 \text{ nM}$ ). When TRPC2-Cter is preincubated with 20  $\mu$ M F2q peptide 30 min before addition to CaM-sepharose beads, TRPC2 was no longer holding on the beads (lane 2 with  $[Ca^{2+}] = 100 \mu$ M and lane 4 with  $[Ca^{2+}] = 10 \text{ nM}$ ). Lanes are extracted from the same gel but rearranged. (B) 25  $\mu$ M junctate peptide is unable to block TRPC2 binding on CaM-sepharose beads. Western blot of the bound fractions on CaM-sepharose beads with an anti-histidin antibody, showing the binding of TRPC2. When His-TRPC2-Cter was incubated with CaM-sepharose beads, TRPC2 was kept within the beads (lane 1 with  $[Ca^{2+}] = 100 \mu$ M). Preincubation with 25  $\mu$ M biotinylated junctate-Nter peptide, 30 min before addition to CaM-sepharose beads, does not prevent TRPC2 binding on the beads (lane 2). (C) F2q peptide is unable to modify His-TRPC2-Cter binding on biotinylated junctate-Nter peptide. Biotinylated junctate-Nter peptide was first bound on streptavidin beads. Western blot of the bound fractions on the streptavidin beads with an anti-histidin antibody, showing the binding of TRPC2. This Western blot evidences the specific binding of His-TRPC2-Cter on biotinylated junctate-Nter peptide immobilized on streptavidin beads (lane 1). Preincubation with 20  $\mu$ M F2q peptide, 30 min before addition to streptavidin beads, does not prevent TRPC2 binding on the beads (lane 2).

fusion protein with 25  $\mu$ M junctate-Nter peptide did not prevent TRPC2 binding to CaM-sepharose (Fig. 6B, lane 2). This result strongly suggests that junctate binding site and CaM binding sites are different. We then examined the ability of junctate to bind on TRPC2 when both IP3R binding sites are supposedly occupied by F2q peptide (Fig. 6C): His-TRPC2-Cter fusion protein was incubated with 20  $\mu$ M F2q and then challenged for the binding to streptavidin beads coated with biotinylated junctate-Nter peptide. Fig.

6C shows that F2q interaction with TRPC2 has no effect on His-TRPC2-Cter binding on junctate-Nter peptide, contrary to its action on the binding of TRPC2 onto CaM-sepharose. These results demonstrate that the binding site of junctate on TRPC2 is different from the common binding sites for the IP3R and CaM.

#### *DAG does not promote acrosome reaction*

Currently, two modes for TRPC2 activation have been proposed: via the second messenger DAG in neurons of the vomeronasal organ or via a direct interaction with the IP3R. The fact that TRPC2 has both IP3R and junctate as biochemical partners does not allow rejecting the hypothesis of a direct activation of TRPC2 by DAG in sperm because activation of PLC is a necessary step during acrosome reaction. Indeed, U73122, an inhibitor of PLC, blocks ZP3-activated calcium influx. We evaluated the direct effect of DAG on sperm acrosome reaction. Fig. 7 shows that 100  $\mu$ M OAG does not increase the number of acrosome-reacted sperm in comparison with a control medium containing no specific activators of the AR (Fig. 7, bar labeled OAG versus bar labeled control). We checked that a calcium ionophore increases the number of acrosome-reacted sperm (Fig. 7, bar labeled A23187). The fact that the medium used to promote capacitation increases the level of spontaneous acrosome-reacted sperm indicates that sperm are ready to be activated by physiological agonists of the AR (Fig. 7, bar labeled No Cap versus bar labeled control).

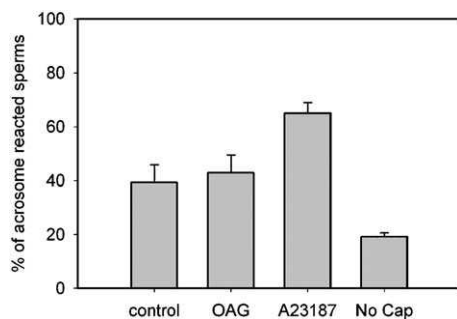


Fig. 7. OAG does not promote acrosome reaction. Histograms showing the percent of acrosome-reacted sperm cells in different conditions: 45 min after the beginning of capacitation in a medium containing 20 mg/ml BSA, 100  $\mu$ M OAG, a permeant analogue of DAG was introduced in the medium of capacitation, and sperm were incubated for further 30 min. Three different types of control experiments were performed: (1) sperm incubated during 75 min in a medium with a low concentration of BSA (0.1 mg/ml) that does not support capacitation (bar labeled No Cap), (2) sperm incubated 75 min in the medium supporting the sperm capacitation (with 20 mg/ml BSA) (bar labeled control) and (3) sperm incubated for further 30 min with 10  $\mu$ M A23187, a calcium ionophore, after an initial 45 min of incubation in the capacitation medium (bar labeled A23187). Sperm were then fixed and stained with coomassie G250 to assess the acrosomal status. The number of acrosome-reacted sperm cells was determined. For each experiment, more than 150 sperm cells have been counted,  $n = 3$  independent experiments. The difference between OAG and control bars is not statistically different ( $t$  test).

## Discussion

In this paper, we demonstrate the following points. Firstly, in rodents, junctate is expressed in sperm and localized in the same subcellular area as IP3R, i.e. the acrosomal crescent of the anterior sperm head.

Secondly, junctate interacts with two TRPC, TRPC2 and TRPC5, both channels being putatively involved in calcium signaling during AR. In the other hands, junctate is not a molecular partner of TRPC1, which is also present in the sperm acrosomal crescent.

Thirdly, the amino-terminus of junctate interacts with the carboxyl-terminus of TRPC2. The binding site of junctate on TRPC2 is different than (1) the CIRB (Calmodulin IP3R Binding site) IP3R binding site described earlier (Tang et al., 2001) and (2) the calmodulin binding sites. We also confirmed in this paper previous results regarding the TRPC2 interaction with IP3R and calmodulin. Finally, DAG is not sufficient to promote a significant increase of the rate of acrosome reaction by itself.

#### *Junctate is present in sperm*

The gene coding for junctate produces also two other proteins: junctin and aspartyl beta-hydroxylase. The three splice variants of the same gene, junctate, junctin and aspartyl beta-hydroxylase, have different patterns of expression and different cellular roles. Aspartyl beta-hydroxylase is expressed at different levels in almost all tissues tested and also in testis (Dinchuk et al., 2000). This protein is involved in post-translational protein processing. Junctin is expressed in cardiac and skeletal muscles (Treves et al., 2000), in which it regulates the activation of the ryanodine receptor. Because of the choice of the primers, both junctate and junctin mRNA, but not aspartyl beta-hydroxylase mRNA, were potentially amplified. However, junctin is not expressed in non-muscle tissue (Lim et al., 2000; Treves et al., 2000), and its expression as followed by real-time RT-PCR is null in testis (Dinchuk et al., 2000). On the other hand, junctate is expressed in all tissues tested, except skeletal muscles (Hong et al., 2001; Treves et al., 2000). The band amplified by RT-PCR in sperm should thus correspond to junctate. The fact that we amplified only one band was perfectly expected. The primers flank a fully conserved sequence common to all splice variants of junctate and junctin and should thus amplify only one band. In Western blot experiments, the antibody used has been designed against the non-catalytic part of the aspartyl beta-hydroxylase and then recognized specifically junctate and aspartyl beta-hydroxylase, but not junctins (Treves et al., 2000). However, all expressed splice variants of aspartyl beta-hydroxylase have a molecular weight higher than 60 kDa (Dinchuk et al., 2000), and bands stained below 50 kDa most likely correspond to junctate.

In mouse, Western blot analysis shows that the antibody against junctate immunodecorates three bands in the range



of 40 to 45 kDa from acrosomal membrane extract. The fact that Western blots reveal different bands in the range of 40–50 kDa was not surprising since it has already been described that there are different splice variants of junctate, especially in mouse cardiac cells (Hong et al., 2001). This result suggests that different isoforms of junctate are present in mouse sperm, contrary to the rat where only one band is stained.

In rabbit kidney, a lower weight of 32 kDa for junctate has already been described (Treves et al., 2000). This difference may be due to murine specific glycosylation of junctate proteins. Indeed, the mouse cardiac isoforms show similar apparent molecular weights in the range of 40–53 kDa, whereas their predicted MW from cDNA sequence are 23.7, 28.5 and 29.9 kDa (Hong et al., 2001), and humbug, a truncated transcript of aspartyl beta-hydroxylase lacking the catalytic domain, has an apparent MW of 60 kDa, whereas its predicted MW from cDNA sequence is 35 kDa (Dinchuk et al., 2000). This glycosylation difference may be due to species differences since human junctate has 29 amino acids in excess over mouse junctate. This difference may also be due to testis-specific splice variants, as known for many proteins that possess specific variant in testis.

#### *Junctate binds to TRPC2 and TRPC5 but not to TRPC1*

We have previously shown that junctate binds to TRPC3 (Treves et al., 2004). In this paper, we clearly showed that TRPC2 and TRPC5 bind also to junctate. These results suggest that junctate is an important partner of TRPC channels. In native cells, it has been previously shown that TRPC1 and TRPC5 form heteromers (Strubing et al., 2001). Therefore, although junctate does not bind to TRPC1 purified from HEK-293 cells transiently transfected with a

plasmid containing TRPC1, it is possible that, in sperm, junctate binds to TRPC1/TRPC5 heterotetramer channels.

TRPC2 interacts with junctate by its carboxyl-terminus. It is sensible to think that the carboxyl-terminus of other interacting TRPC channels plays a crucial role in the binding to junctate. The fact that TRPC1 has the shortest C-terminus among the different TRPC channels may suggest that the junctate binding site is not located in its C-terminus.

#### *Binding sites on carboxyl-terminus of TRPC2*

So far, two proteins have been described to interact with the carboxyl-terminus of TRPC2: the IP3R and calmodulin (Tang et al., 2001). Both proteins bind onto two domains: one is localized between amino acids 901–936 (CIRB, domain 1) and the other domain is localized between amino acids 944–1072 of TRPC2 (domain 2). In this study, we describe a third protein that interacts with the carboxyl-terminus of TRPC2, i.e. junctate. We demonstrate that the binding site of junctate is distinct from the CIRB (domain 1) and the domain 2. Moreover, our results give new insights concerning IP3R and CaM bindings on TRPC2.

Firstly, from studies on TRPC4 (Tang et al., 2001), it has been shown that there is no mutual exclusion of IP3R and calmodulin on domain 2, contrary to the domain 1 (CIRB domain). For TRPC2, no data are available concerning mutual exclusion of IP3R and CaM on domain 2. If we hypothesize that the binding of IP3R on domain 1 does not interfere with the binding of IP3R on domain 2, the fact that the F2q peptide completely blocks the binding of the full carboxyl-terminus of TRPC2 on CaM-sepharose indicates a mutual exclusion of IP3R and calmodulin on both domains 1 and 2. Therefore, TRPC2 would present two

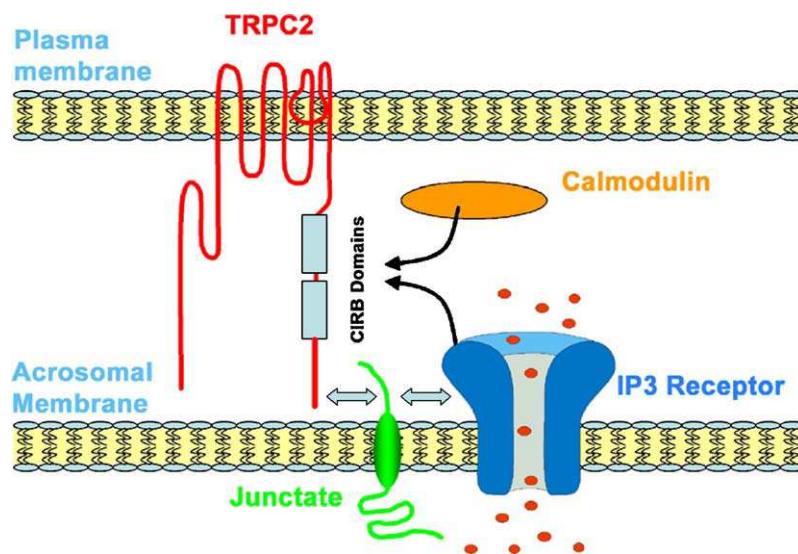


Fig. 8. Model of calcium channel organization in sperm head membranes. TRPC2 is a plasma membrane channel, and its C-terminal domain possesses two Calmodulin IP3R Binding sites (CIRB) allowing direct interactions either with the IP3R or calmodulin. TRPC2 contains also in its C-terminus a binding domain for junctate, a protein located in the acrosomal membrane and known to interact also with the IP3R.

CIRB instead of one. Moreover, the fact that the binding of His-TRPC2-Cter on CaM-sepharose in the presence of F2q is abolished also suggests that these two domains are the only CaM-binding domains present in the carboxyl-terminus of TRPC2. It may be important to notice that the absence of competition between the IP3R and CaM on the domain 2 of TRPC4 (localized between amino acids 781–864) may be due to the fact that the competition experiments have been performed using the shorter F2v peptide (10 amino acids shorter), instead of the F2q peptide.

Secondly, earlier studies, using a short fragment of TRPC4, encompassing domain 1 (CIRB domain, amino acids 901–936) showed that the binding of CaM on TRPC4 is calcium-dependent. The calcium dependence of domain 2 was not tested (Tang et al., 2001). In this paper, we tested the full carboxyl-terminus of TRPC2, containing both CaM domains. In our conditions, the full carboxyl-terminus of TRPC2 binds to CaM in a calcium-independent manner.

In conclusion, we demonstrate in this study that TRPC2 behaves differently than TRPC4: firstly, the binding of F2q on both domains 1 and 2 of TRPC2 blocks CaM binding, and, secondly, at least one CaM binding site of TRPC2 is calcium-independent.

#### *TRPC2 activation*

We have shown that (1) junctate is localized in the same subcellular area as the IP3R, the acrosomal crescent of the anterior sperm head and (2) the amino-terminus of junctate interact with the carboxyl-terminus of TRPC2. Moreover, we previously described that the amino-terminus of junctate binds also to the IP3R (Treves et al., 2004). These results, taken together, suggest that calcium signaling during the AR involves a supramolecular complex of two calcium channels, one localized in the plasma membrane and the other one in the outer acrosomal membrane associated with at least two regulating proteins which are junctate and calmodulin (Fig. 8).

The rate of calcium increase necessary to trigger the acrosome reaction has to be fast, and slowing this rate abolishes the acrosome reaction (Jungnickel et al., 2001). Because of the small volume of the cytoplasm in sperm cell and because we used high concentration of OAG (100  $\mu$ M), intracellular OAG concentration should increase very fast. However, this cytoplasmic burst of OAG fails to induce the acrosome reaction. We think that this result strongly suggests that endogenous DAG production during the acrosome reaction is not sufficient to trigger by itself a sudden and large TRPC2 activation, necessary for a fast rate of calcium increase. The fact that junctate, like the IP3R, binds to TRPC2 rather suggests that junctate and IP3R are involved in TRPC2 activation. Indeed, we have previously shown that junctate is able to modulate TRPC3 activation (Treves et al., 2004) and a similar mechanism is expected for TRPC2. This result provides a new hypothesis concerning TRPC2 activation in sperm: TRPC2 activation may be

due to modifications of the bindings of both junctate and IP3R on TRPC2 induced by store depletion.

Previous studies have shown that the gating of TRPC channels is dependent on their level of expression in cell lines (Vazquez et al., 2003). This work points out the importance of studying TRPC channel activation and regulation in the physiological context of differentiated cells, like sperm. Indeed, as a function of its tissue localization, TRPC2 is activated by different mechanisms: in sperm and erythroblast, TRPC2 activation appears dependent on store depletion, in contrast to neurons of the vomeronasal organ, where TRPC2 activation is dependent on an increase of DAG concentration. In sperm and in erythroblasts, long splice variants were detected, in contrast to neurons of the vomeronasal organ, where only the short splice variant is expressed (Hofmann et al., 2000). This difference in the mechanisms of activation is not due to the absence of the IP3R binding motif in the short splice variant since the carboxyl-termini of both splice variants are identical. This difference is rather due to a specific targeting of TRPC2 in sperm in microdomains of plasma membrane specialized in interactions with the acrosome membrane. So far, no proteins have been described to bind to the first specific 300 amino acids of the long splice variants of TRPC2. Enkurin, a new partner of TRPC channels which bind to amino-terminus of TRPC (Sutton et al., 2004), is probably not be involved in specific targeting since this protein is expressed in both testis and vomeronasal organ.

#### **Acknowledgments**

We are grateful to Yasuo Mori for TRPC1, TRPC2 and TRPC5 cDNA clones and Norbert Weiss for technical help.

#### **References**

- Arnaud, N., Cheynet, V., Oriol, G., Mandrand, B., Mallet, F., 1997. Construction and expression of a modular gene encoding bacteriophage T7 RNA polymerase. *Gene* 199, 149–156.
- Arnault, C., Cardullo, R.A., Lemos, J.R., Florman, H.M., 1996. Activation of mouse sperm T-type  $Ca^{2+}$  channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13004–13009.
- Arnault, C., Kazam, I.G., Visconti, P.E., Kopf, G.S., Villaz, M., Florman, H.M., 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6757–6762.
- Castellano, L.E., Trevino, C.L., Rodriguez, D., Serrano, C.J., Pacheco, J., Tsutsumi, V., Felix, R., Darszon, A., 2003. Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett.* 541, 69–74.
- Chu, X., Cheung, J.Y., Barber, D.L., Birnbaumer, L., Rothblum, L.I., Conrad, K., Abrasonis, V., Chan, Y.M., Stahl, R., Carey, D.J., Miller, B.A., 2002. Erythropoietin modulates calcium influx through TRPC2. *J. Biol. Chem.* 277, 34375–34382.

- De Blas, G., Michaut, M., Trevino, C.L., Tomes, C.N., Yunes, R., Darszon, A., Mayorga, L.S., 2002. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* 277, 49326–49331.
- Dinchuk, J.E., Henderson, N.L., Burn, T.C., Huber, R., Ho, S.P., Link, J., O'Neil, K.T., Focht, R.J., Scully, M.S., Hollis, J.M., Hollis, G.F., Friedman, P.A., 2000. Aspartyl beta-hydroxylase (Asph) and an evolutionarily conserved isoform of Asph missing the catalytic domain share exons with junctin. *J. Biol. Chem.* 275, 39543–39554.
- Herrick, S.B., Schweissinger, D.L., Kim, S.W., Bayan, K.R., Mann, S., Cardullo, R.A., 2004. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J. Cell. Physiol.* 202, 663–671.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T., 2000. Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochem. J.* 351, 115–122.
- Hong, C.S., Kwak, Y.G., Ji, J.H., Chae, S.W., Kim, d.H., 2001. Molecular cloning and characterization of mouse cardiac junctate isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 882–887.
- Jungnickel, M.K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J.R., Florman, H.M., 2001. Trp2 regulates entry of  $Ca^{2+}$  into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat. Cell Biol.* 3, 499–502.
- Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L., Muallem, S., 1998. Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396, 478–482.
- Lim, K.Y., Hong, C.S., Kim, D.H., 2000. cDNA cloning and characterization of human cardiac junctin. *Gene* 255, 35–42.
- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., 2003. A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40, 551–561.
- Montell, C., 2001. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE* 1–17 ([http://www.stke.sciencemag.org/cgi/content/full/OC\\_sigtrans;2001-90/re1](http://www.stke.sciencemag.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2001-90/re1)).
- O'Toole, C.M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R.A., Florman, H.M., 2000.  $Ca^{2+}$  entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell* 11, 1571–1584.
- Randriamampita, C., Tsien, R.Y., 1993. Emptying of intracellular  $Ca^{2+}$  stores releases a novel small messenger that stimulates  $Ca^{2+}$  influx. *Nature* 364, 809–814.
- Stamboulian, S., De Waard, M., Villaz, M., Arnoult, C., 2002. Functional interaction between mouse spermatogenic LVA and thapsigargin-modulated calcium channels. *Dev. Biol.* 252, 72–83.
- Stamboulian, S., Kim, D., Shin, H.S., Ronjat, M., De Waard, M., Arnoult, C., 2004. Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *J. Cell Physiol.* 200, 116–124.
- Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C., Koentges, G., 2002. Loss of sex discrimination and male–male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295, 1493–1500.
- Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Clapham, D.E., 2001. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29, 645–655.
- Sutton, K.A., Jungnickel, M.K., Wang, Y., Cullen, K., Lambert, S., Florman, H.M., 2004. Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Dev. Biol.* 274, 426–435.
- Tang, J., Lin, Y., Zhang, Z., Tikunova, S., Birnbaumer, L., Zhu, M.X., 2001. Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J. Biol. Chem.* 276, 21303–21310.
- Tong, Q., Chu, X., Cheung, J.Y., Conrad, K., Stahl, R., Barber, D.L., Mignery, G., Miller, B.A., 2004. Erythropoietin-modulated calcium influx through TRPC2 is mediated by phospholipase C{gamma} and IP3R. *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* 287, C1667–C1678.
- Treves, S., Feriotto, G., Moccagatta, L., Gambari, R., Zorzato, F., 2000. Molecular cloning, expression, functional characterization, chromosomal localization, and gene structure of junctate, a novel integral calcium binding protein of sarco(endo)plasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 39555–39568.
- Treves, S., Franzini-Armstrong, C., Moccagatta, L., Arnoult, C., Grasso, C., Schrum, A., Ducreux, S., Zhu, M.X., Mikoshiba, K., Girard, T., Smida-Rezgui, S., Ronjat, M., Zorzato, F., 2004. Junctate is a key element in calcium entry induced by activation of InsP3 receptors and/or calcium store depletion. *J. Cell Biol.* 166, 537–548.
- Trevino, C.L., Serrano, C.J., Beltran, C., Felix, R., Darszon, A., 2001. Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett.* 509, 119–125.
- Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X., Birnbaumer, L., 1999. Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative  $Ca^{2+}$  entry channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2060–2064.
- Vazquez, G., Wedel, B.J., Trebak, M., St. John, B.G., Putney Jr., J.W., 2003. Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation. *J. Biol. Chem.* 278, 21649–21654.
- Walensky, L.D., Snyder, S.H., 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 130, 857–869.
- Yao, Y., Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M., Tsien, R.Y., 1999. Activation of store-operated  $Ca^{2+}$  current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* 98, 475–485.

## Conclusion.

Dans ce troisième article, nous avons montré que la junctate est exprimée dans le spermatozoïde. Cette protéine est localisée dans la même région que l'IP3R au niveau du croissant acrosomal de la tête du spermatozoïde. Nous avons également montré que la junctate pouvait interagir avec TRPC2 et TRPC5. Cette interaction est indépendante du calcium en ce qui concerne TRPC2 et ne chevauche pas les domaines d'interactions avec l'IP3R et la CaM. L'utilisation d'OAG ne permet pas de déclencher la RA.

### *1) La junctate est présente dans le spermatozoïde de souris.*

Nous avons utilisé trois approches différentes pour montrer que la junctate était présente dans le spermatozoïde. Par RT-PCR, une bande spécifique de la junctate apparaît en utilisant à la fois des ARN extraits de cerveaux et des ARNs extraits de testicules. Nous avons utilisé des oligonucléotides spécifiques des parties conservées entre les différentes isoformes de la junctate caractérisées chez la souris (Hong et al., 2001). En revanche par Western-Blot nous avons utilisé un anticorps polyclonal dirigés contre la partie Nter de la protéine. L'utilisation de cet anticorps sur des extraits protéiques enrichis en membranes acrosomales de souris et de rat, nous indique qu'il existerait trois isoformes de la junctate chez la souris dont le poids moléculaire serait de 41, 43 et 45 KDa. Chez le rat, une seule bande apparaît à 45 KDa. Par immunomarquage, nous pouvons observer que la junctate se situe dans la même région que l'IP3R au niveau du croissant acrosomal dans la partie antérieure de la tête du spermatozoïde. Ainsi, la junctate est une protéine de la tête du spermatozoïde étroitement localisée avec l'IP3R avec qui elle possède un domaine de liaison. La proximité de ces deux protéines suggère fortement que la junctate pourrait être un protagoniste de la RA. Nous avons émis l'hypothèse que la junctate pourrait participer au lien entre les deux canaux calciques responsables du plateau calcique de la RA.

### *2) La junctate interagit par sa partie Nter avec TRPC2 Cter, TRPC5 mais pas avec TRPC1.*

Sur la base des études précédentes concernant l'interaction de TRPC3 avec la junctate (Treves et al., 2004), nous avons réalisé des expériences de « pull-down » entre la junctate étiquetée GFP et une protéine de fusion comprenant la partie Cter de TRPC2 étiquetée histidine. La partie Cter de TRPC2 est cytosolique et comprend la plupart des sites

d'interactions des partenaires connus pour cette protéine. La protéine GFP-junctate, préalablement immobilisée par un anticorps anti GFP sur des billes protéines A, est capable de lier spécifiquement la partie Cter de TRPC2. Après avoir caractérisé l'interaction entre ces deux protéines, nous avons voulu connaître quelle partie de la junctate était responsable de cette interaction. L'utilisation d'un peptide biotinylé comprenant la partie Nter cytosolique de la junctate nous apprend qu'il s'agit bien de la partie cytosolique qui interagit avec TRPC2 comme pour TRPC3. De plus, cette interaction est indépendante de la concentration calcique. Nous avons envisagé que la junctate était capable de lier TRPC2 lorsque la concentration en calcium était élevée et qu'elle aurait un rôle de senseur de calcium cytosolique. En effet, la junctate possède des sites de liaison pour le calcium dans sa partie Cter. La partie Cter de la junctate est intraluminaire ainsi la junctate pourrait aussi bien être le senseur du calcium intraluminaire. Nous avons également montré que la partie Nter de la junctate pouvait lier le canal TRPC5 mais pas TRPC1. TRPC5 et TRPC1 sont localisés dans le même compartiment cellulaire que TRPC2 (Sutton et al., 2004) et sont des bons candidats de substitution à TRPC2 dans la souris déficiente pour TRPC2. Il est important de préciser que TRPC1 est plus court que TRPC5 dans sa partie Cter, la partie manquante pourrait comprendre la zone d'interaction. De plus, TRPC1 et TRPC5 peuvent s'associer en multimères pour former un canal cationique fonctionnel dans le cerveau de Mammifères (Strubing et al., 2001). TRPC1 et TRPC5 pourrait également s'associer dans le spermatozoïde de Mammifères pour former un canal SOC fonctionnel et la junctate n'interagirait qu'avec TRPC5.

Pour conclure, la partie Nter de la junctate est capable d'interagir avec deux TRPCs localisés dans la tête du spermatozoïde et cette interaction ne dépend pas du calcium en ce qui concerne TRPC2.

### *3) TRPC2 est un canal TRPC impliqué dans un complexe macro-multimoléculaire.*

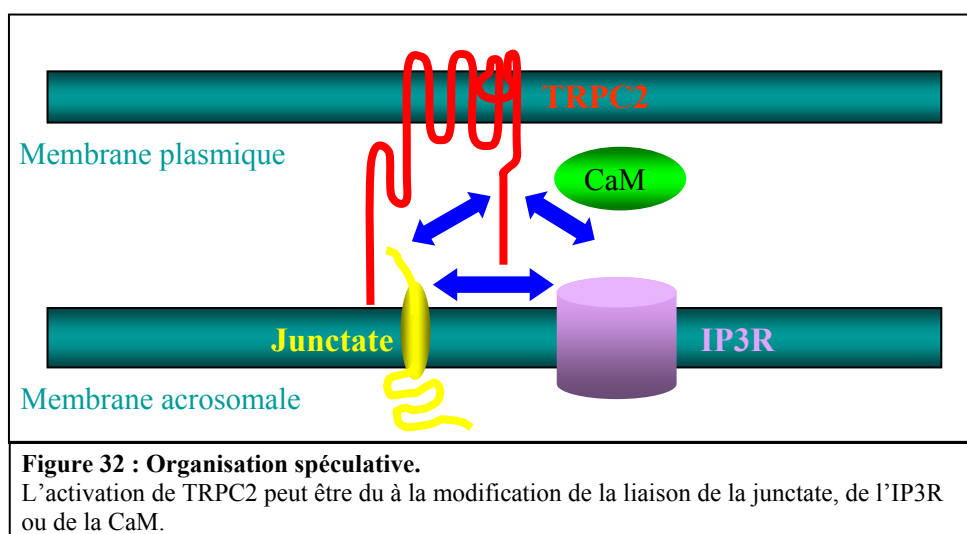
Les canaux TRPCs possèdent au niveau de leur domaine Cter un domaine appelé CIRB (Calmodulin IP3R Binding Site). Ce domaine comprend un site de liaison à la calmoduline et à l'IP3R. Il existe une exclusion mutuelle de l'un ou l'autre au niveau de ce domaine. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la junctate dans le complexe moléculaire TRPC2/IP3R, nous avons voulu vérifier si la junctate pouvait empêcher la liaison de l'un ou l'autre des partenaires connus. Après avoir vérifié que le peptide F2q qui comprend la séquence spécifique de l'IP3R qui interagit avec le CIRB de TRPC2 empêchait la fixation de la calmoduline, nous avons pu observer que TRPC2 était toujours capable de lier la CaM en présence de junctate et de lier la junctate en présence de F2q. Ceci en présence et en

absence de calcium. Nous pouvons conclure que la junctate n'interagit pas avec TRPC2 au niveau du CIRB. Pour les autres TRPCs, l'exclusion mutuelle de la CaM et de l'IP3R est dépendante du calcium mais ce n'est pas le cas ici. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons utilisé le Cter entier alors que lors des études précédentes (Tang et al., 2001), ils avaient utilisé un peptide plus court (acide aminé 901/ acide aminé 936).

Bien qu'il ait été montré que TRPC2 était activé suite à la vidange des stocks intracellulaires (Jungnickel et al., 2001), nous avons voulu vérifier si le DAG n'était pas capable à lui seul de provoquer l'ouverture de ce canal comme dans les neurones de l'organe voméronasal (Lucas et al., 2003). Nous avons soumis les spermatozoïdes à un analogue du DAG (OAG) et observé que le nombre de spermatozoïdes effectuant leur RA n'était pas plus élevé.

Des études précédentes ont montré que le mode d'activation des canaux TRPCs pouvait varier en fonction de leur niveau d'expression (Vazquez et al., 2003). Ceci met en évidence la difficulté d'étudier l'activation et la régulation des canaux TRPCs dans les systèmes d'expression hétérologue et la nécessité de rester dans un contexte physiologique. La RA nous fournit un contexte physiologique pour identifier le mode d'activation et la régulation de TRPC2. Nous pouvons conclure que, dans ce modèle, l'activation de TRPC2 pour initier la RA ne dépend pas du DAG.

Cette étude montre que TRPC2 fait partie d'un complexe macro-multimoléculaire qui comprend : l'IP3R/Junctate/CaM. Son activation semble être la conséquence d'un changement de conformation de ces protagonistes suite à la vidange des stocks calciques intracellulaire (Figure 32).





Au cours de cette thèse, nous avons pu apporter des éléments importants concernant les différentes interactions qui existaient entre les canaux calciques impliqués dans la RA du spermatozoïde de Mammifères. Les différents flux calciques qui rythment la RA sont étroitement liés. Nous avons mis en évidence une interaction fonctionnelle entre les canaux de type T/IP3R /TRPC2. Ainsi, bien que le canal T soit le premier à s'activer au cours de la RA, l'activation des autres canaux calciques qui s'activent ultérieurement modifie ces caractéristiques biophysiques. Il existe une interconnectivité étroite entre les différents protagonistes de la signalisation calcique de la RA. La caractérisation moléculaire de ce canal T révèle que les courants T sont en majorité des canaux  $\alpha_{1H}$ . La mise en évidence d'une nouvelle protéine, la junctate, au niveau du croissant acrosomal de la tête du spermatozoïde et de son interaction avec TRPC2 fournit de nouvelles données sur les mécanismes d'activation des flux calciques qui rythment la RA.

### ***1) Rôle des canaux T.***

L'activation du canal de type T étant très importante, ce canal doit être finement régulé. L'étude de souris déficientes pour  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1H}$ , nous a permis de caractériser la sous-unité majoritaire  $\alpha_{1H}$  qui constitue les courants T dans les cellules spermatogéniques. Nous avons pu définir les caractéristiques biophysiques de la sous-unité  $\alpha_{1H}$  des cellules spermatogéniques dans la souris déficiente en  $\alpha_{1G}$ . Ces caractéristiques sont différentes des courants calciques  $\alpha_{1H}$  exprimés dans les systèmes d'expression hétérologues et révèlent soit la présence d'une nouvelle isoforme dans les cellules spermatogéniques, soit l'existence d'une protéine régulatrice. Afin de mieux comprendre les différentes voies de régulations du canal T, il serait intéressant de cloner cette nouvelle isoforme. Le clonage nécessite l'élaboration de sondes spécifiques. Nous pouvons concevoir des sondes à partir des isoformes déjà connues et observer après RT-PCR le nombre de bandes présentes. Si une bande apparaît à un poids moléculaire différent par rapport aux isoformes identifiées, nous pouvons supposer que cette bande correspond à la nouvelle isoforme. L'ADNc obtenu après RT-PCR pourra être séquencé. Si la séquence présente des différences par rapport aux autres isoformes codant pour  $\alpha_{1H}$ , nous pourrions élaborer des sondes spécifiques de la nouvelle isoforme pour cloner l'ensemble du gène.

Une fois le canal T caractérisé, nous allons pouvoir déterminer comment les différents protagonistes de la signalisation calcique de la RA sont unis. Nous avons mis en évidence une



interaction fonctionnelle entre le canal T et les canaux calciques dont l'activité dépend du niveau de remplissage du stock calcique intracellulaire.

Nous pouvons envisager une interaction entre le canal T et l'IP3R. Deux mécanismes ont été identifiés dans l'organisme pour activer le relâchement de calcium via l'IP3R à la suite de l'activation d'un canal calcique dépendant du voltage. Le premier, identifié dans les cellules cardiaques, est appelé Calcium Induced Calcium Release et consiste en un couplage chimique entre un canal calcique dépendant du voltage HVA (DHPR) situé au niveau de la membrane plasmique et le récepteur à la ryanodine du réticulum. L'entrée de calcium via le canal membranaire va activer le canal intracellulaire. Le second, identifié dans les cellules du muscle squelettique, initie le couplage excitation-contraction. Le canal calcique récepteur aux dihydropyridines et le récepteur à la ryanodine se trouvent face à face. Le changement de conformation du DHPR induit par une dépolarisation provoque son couplage direct avec le récepteur à la ryanodine. Ce couplage direct permet le relâchement de calcium du réticulum sarcoplasmique via le RyR qui est à l'origine du mécanisme de la contraction de la fibre musculaire. En s'inspirant de ces deux mécanismes, nous pouvons imaginer qu'il existe un couplage direct entre le canal T et l'IP3R initié par le changement de conformation du canal T lorsqu'il est activé par la dépolarisation.

Cependant, on peut également envisager qu'il existe une interaction directe entre les deux canaux calciques situés au niveau de la membrane plasmique. La proximité de ces canaux semble favoriser cette hypothèse. Il serait intéressant de vérifier si  $\alpha_{1H}$  peut interagir directement avec TRPC2 ou par le biais de protéines intermédiaires. Afin de déterminer ces interactions, nous pouvons utiliser des techniques de protéomiques qui consistent à coupler des expériences d'immunoprécipitations à des analyses de spectrométrie de masse. L'élaboration d'anticorps spécifiques contre  $\alpha_{1H}$ , nous permettra de précipiter en « pull-down » les partenaires putatifs. Ceci pourra être effectué soit à partir d'extrait protéiques acrosomales, soit après surexpression dans des systèmes d'expressions hétérologues. Les partenaires sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse.

Il a été montré que les courants T pouvaient être facilités dans les cellules spermatogéniques de souris CD1 par une phosphorylation sur des résidus tyrosines (Arnoult et al., 1997). Mais, cette régulation n'existe pas dans les lignées de souris OF1. La phosphorylation est un processus classiquement utilisé pour les cellules pour moduler les conductances ioniques. Il serait intéressant de connaître les mécanismes de phosphorylation concernant la nouvelle isoforme  $\alpha_{1H}$ . Nous pourrions visualiser l'effet d'inhibiteurs de kinases sur les courant calciques T dans les cellules spermatogéniques de la souris déficiente

pour  $\alpha_{1G}$  par des techniques de patch-clamp. De manière plus ciblée, nous pourrions visualiser si  $\alpha_{1H}$  peut être phosphorylée par des kinases commerciales comme la PKA ou la PKC par des techniques d'incorporation de phosphate radioactif.

L'acquisition de la souris déficiente pour  $\alpha_{1H}$  nous a ouvert de nombreuses perspectives. Ces souris sont fertiles mais aucune étude concernant le niveau de fertilité n'a été réalisée. Afin de vérifier si la RA s'effectue normalement, nous pouvons comparer le nombre de spermatozoïdes qui ont effectué leur RA en présence de zone pellucide chez la souris déficiente pour  $\alpha_{1H}$  par rapport à des souris sauvages. Cette souris représente un modèle unique où les courants calciques T sont absents dans les cellules spermatogéniques. Au cours de la signalisation calcique de la RA, les canaux T sont responsables du courant transitoire calcique. Nous devons vérifier si ce courant transitoire est toujours présent chez les spermatozoïdes de la souris déficiente pour  $\alpha_{1H}$ . L'expérience consiste à incuber les spermatozoïdes, préalablement chargés avec une sonde calcique, avec des zones pellucides solubilisées et observer avec un microscope à fluorescence avec une résolution temporelle très rapide la présence ou non du transitoire calcique. Nous pouvons également visualiser sur spermatozoïde mature, par microscopie à fluorescence, si l'élévation calcique de la RA présente toujours les mêmes caractéristiques. Le fait que 1) nos immunolocalisations de la sous-unité  $\alpha_{1H}$  situent la protéine dans la même région et que 2) le point de départ de l'élévation de calcium au cours de la RA initié par la thapsigargine ou par la progestérone se situe dans la région post-acrosomale (Fukami et al., 2003 ; Kirkman-Brown et al., 2000 ; Shirakawa and Miyazaki, 1999) suggèrent l'existence de microdomaines calciques où l'entrée de  $Ca^{2+}$  est nécessaire. La proximité de ces canaux soulève de nouveau la question d'un partenariat moléculaire privilégié.

## ***2) Importance des autres canaux.***

Si au moins trois types différents de canaux calciques contrôlent la signalisation calcique dans la réaction acrosomique, plusieurs indices nous permettent cependant de penser que d'autres canaux calciques pourraient jouer des rôles importants dans cette signalisation calcique compliquée. Les premiers indices proviennent des résultats obtenus avec les souris transgéniques. En effet, ni les souris déficientes pour les deux types de sous unités  $\alpha 1$  ( $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1H}$ ), ni les souris déficientes pour TRPC2, ne sont stériles. Ces données suggèrent que d'autres canaux calciques sont présents et sont capables de prendre le relais lors de l'absence de certains acteurs privilégiés. De même, certains résultats pharmacologiques restent pour

l'instant sans explication. Par exemple, certaines dihydropyridines comme le PN200-110, classiques des canaux calciques à haut seuil d'activation sont d'excellents inhibiteurs de la réaction acrosomique ( $IC_{50} = 0,1 \mu M$ ). D'ailleurs, certains canaux calciques sont présents dans le spermatozoïde mature sans que l'on ne connaisse actuellement leurs rôles. Il existe une grande variété de canaux calciques dépendants du voltage à haut seuil d'activation (HVA) dans le spermatozoïde mature (Wennemuth et al., 2000 ; Westenbroek and Babcock, 1999) (Tableau 4).

	Canal	Sous-unité	Courant	Présence d'ARN messenger dans cellules spermatogéniques.	Présence de la protéine dans le spermatozoïde.
HVA	Ca <sub>v</sub> 1.1	$\alpha_{1S}$	L		
	Ca <sub>v</sub> 1.2	$\alpha_{1C}$	L	+	+
	Ca <sub>v</sub> 1.3	$\alpha_{1D}$	L		
	Ca <sub>v</sub> 1.4	$\alpha_{1F}$	L		
	Ca <sub>v</sub> 2.1	$\alpha_{1A}$	P/Q	+	+
	Ca <sub>v</sub> 2.2	$\alpha_{1B}$	N		+
	Ca <sub>v</sub> 2.3	$\alpha_{1E}$	R		+

**Tableau 4: Nomenclature, composition, expression des canaux calciques voltage dépendant HVA dans le spermatozoïde .**

Ces résultats, obtenus par immuno-histochimie, ne sont pas supportés par l'enregistrement de ces types de canaux calciques par électrophysiologie. En effet, l'étude des canaux ioniques du spermatozoïde bute sur le fait que la technique du patch-clamp n'est pas possible sur les spermatozoïdes. La technique alternative qui consiste à enregistrer les courants dans les cellules spermatogéniques des testicules n'a révélé la présence que de courants T. Ainsi, l'expression ou la traduction des canaux calciques HVA doivent se réaliser dans les étapes ultimes de la spermatogenèse, stades auxquels nous n'avons pas accès par les techniques d'électrophysiologie. Le rôle putatif de ces canaux est renforcé par les résultats qui montrent l'existence d'une délétion dans les transcrits pour les canaux calciques de type L dans les testicules d'homme infertile avec varicocèles (Benoff et al., 2005). Il serait souhaitable de mieux appréhender le rôle des canaux calciques HVA dans la physiologie spermatique. Pour cela, nous envisageons une stratégie originale qui consiste à éteindre l'expression de l'ensemble de ce type de canaux. L'expression d'une séquence spécifique, appelé « séquence-poison », permet l'inactivation fonctionnelle de tous les HVA dans des cellules de Mammifères en culture.

Cette séquence code pour :

- les domaines extra-cellulaires et transmembranaires de l'antigène CD8alpha humain,
- la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha_{1A}$  de lapin
- la protéine fluorescente GFP.

Son mécanisme d'action consiste à séquestrer les sous-unités  $\beta$  responsable de l'adressage des sous-unités  $\alpha_1$  au niveau de la membrane plasmique. La « séquence poison » exprimée va interagir par le biais de sa séquence « BID » (Beta Interaction Domain) située au niveau de la boucle I-II avec les sous-unités  $\beta$  endogènes et empêcher ainsi le ciblage des sous-unités  $\alpha_1$ . Cet outil moléculaire fournit de nouvelles perspectives dans l'étude des canaux HVA *in vivo*. Il serait intéressant d'éteindre spécifiquement l'expression dans les testicules. Ceci nécessite l'élaboration d'une souris transgénique dont l'expression du transgène serait localisée dans les testicules. Nous pouvons envisager de placer l'expression de la « séquence poison » en aval du promoteur de la protamine. L'expression testiculaire spécifique de la « séquence poison » pourra être suivi facilement grâce à la fluorescence de la protéine GFP ou par des études d'immunohistochimie dirigées contre l'antigène CD8. L'élaboration de ces souris transgéniques est une très bonne alternative à la conception de souris déficientes pour l'ensemble des canaux HVA et permettra une meilleure compréhension du rôle des canaux calciques HVA.

### **3) Les canaux TRPCs.**

Nous avons mis en évidence un nouveau partenaire pour TRPC2. Mais nous n'avons pas pu vérifier l'impact fonctionnel de la junctate sur l'ouverture du canal TRPC2. Il a été montré que la junctate pouvait diminuer l'influx calcique à travers TRPC3 (Treves et al., 2004). Nous pouvons supposer que c'est également le cas pour TRPC2. Pour cela, nous envisageons de tester l'effet du peptide junctate sur des courants TRPC2 exprimés dans des systèmes d'expression hétérologues. Pour cela, nous faisons face à un problème d'expression de TRPC2. Le canal TRPC2 reste localisé à l'intérieur de la cellule et ne s'exporte pas à la membrane. Il nous faut trouver le facteur (niveau de transfection, temps d'expression) et les meilleures conditions pour tester l'effet de la junctate sur TRPC2. TRPC5 s'exprime plus facilement que TRPC2, nous pouvons effectuer des expériences préliminaires sur TRPC5.

Le rôle des TRPCs est essentiel au cours de la RA. Ces canaux ont été également impliqués dans d'autres étapes de la fécondation comme la mobilité spermatique. Des immunolocalisations situent TRPC1, 3, 4 et 6 dans le flagelle du spermatozoïde (Castellano et

al., 2003). L'utilisation d'antagonistes des canaux TRPCs montre que ces protéines pourraient jouer un rôle dans le contrôle du mouvement flagellaire humain. Nous pourrions étendre notre étude des souris KO à l'étude de la souris KO pour TRPC2 (Stowers et al., 2002). Bien que cette souris soit fertile, il serait intéressant de caractériser l'impact de l'absence de TRPC2 sur la signalisation calcique de la RA chez cette souris. Nous supposons que TRPC5 et TRPC1 s'associent en multimères pour jouer le rôle de TRPC2. Pour vérifier cela, nous pourrions effectuer des immunolocalisations de TRPC1 et TRPC5 dans les spermatozoïdes des souris déficientes pour TRPC2. Nous pouvons tester l'effet de l'inhibition de ce canal sur la réaction acrosomique et observer la disparition du courant résiduel observé lors de l'inhibition de TRPC2 dans des souris normales (Jungnickel et al., 2001). Il n'existe pas d'inhibiteurs spécifiques de ces canaux mais nous pourrions visualiser l'effet du peptide junctate.

Tous les canaux TRPCs possèdent au moins un site de liaison pour la CaM (Tang et al., 2001). Ceci suggère que cette protéine possède un rôle important dans la modulation de l'activité de ces canaux. En effet, la CaM est capable de moduler le délai entre le relâchement de calcium du réticulum endoplasmique et l'activation de l'influx calciques via TRPC1 (Vaca and Sampieri, 2002). La CaM joue un rôle important dans l'activation de TRPC5 qui possède un deuxième site de liaison de la CaM en plus du domaine CIRB (Ordaz et al., 2005). L'application de CaM augmente l'activation de TRPC5 et la mutation du domaine CIRB inhibe cette activation. La plupart des études concernant le mode d'activation des TRPCs ont été réalisées après réexpression de ces canaux dans des systèmes d'expression hétérologue. Leur activation nécessite le couplage avec à un récepteur. Il n'existe aucune certitude que les mécanismes identifiés ainsi, soient présents dans l'organisme. Nous avons réalisé une étude unique du rôle du DAG sur la RA. La RA nous fournit un moyen de tester l'effet d'un agoniste sur l'activation de TRPC2. L'accomplissement de la RA est une conséquence de l'activation de TRPC2. Ainsi, si le DAG est incapable de promouvoir la RA, cela signifie que le DAG n'a pas activé TRPC2 directement. Nous bénéficions d'un modèle unique d'analyse *in vivo* de l'activation des canaux calciques par le biais de la RA. L'autre mode d'activation de TRPC2 identifié est un couplage direct avec l'IP3R. Afin de caractériser le mode d'activation de TRPC2 au cours de la RA, nous pouvons observer l'effet du peptide IP3R F2q (article 3) sur la RA. Le peptide ne pouvant diffuser librement à travers la membrane du spermatozoïde, il nous faut trouver un moyen de faire pénétrer ce peptide. Nous pouvons envisager d'utiliser des spermatozoïdes perméabilisés.

La compétition entre la CaM et l'IP3R pourrait être un argument suffisant pour expliquer l'activation des SOCs. TRPC2 est le seul TRPC à posséder un site de liaison de la

CaM au niveau de sa partie Nter (Yildirim et al., 2003). La CaM semble jouer un rôle important dans l'activation de TRPC2.

#### ***4) La junctate.***

Nous avons caractérisé une nouvelle protéine dans le spermatozoïde, la junctate. La junctate est une protéine du réticulum connue pour interagir avec l'IP3R (Treves et al., 2000); (Treves et al., 2004). L'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie Cter de la junctate montre trois bandes dans un extrait acrosomal de souris et une seule bande chez le rat. Ces résultats suggèrent la présence de différents isoformes pour la junctate. Trois différentes isoformes cardiaques ont été identifiées chez la souris (Hong et al., 2001). Afin d'identifier les isoformes présentes dans les testicules, nous pourrions cribler une bande d'ADNc de testicules. Par souci de conformité, j'utiliserai une sonde dérivée de la junctine de chien (Treves et al., 2000 ; Hong et al., 2001). Le clonage des isoformes testiculaires de la junctate nous permettra de connaître les caractéristiques fonctionnelles de cette protéine. A ce stade, l'élaboration d'une souris déficiente pour la junctate semble indispensable pour évaluer le rôle exact de cette protéine. S'il existe différentes isoformes, nous ciblerons une partie commune à toutes les isoformes pour obtenir une souris déficiente pour tous les différents types de Junctate.

La junctate possède de nombreux résidus avec des charges négatives au niveau de sa partie Cter qui est la partie intraluminale. C'est au niveau de ces résidus que la junctate lie le calcium lumenale (Treves et al., 2000). L'expression de la junctate dans des systèmes d'expressions hétérologues augmentent l'amplitude du pic et le relâchement de calcium par activation de récepteurs couplés à l'activation de l'IP3R. La junctate pourrait jouer un rôle de senseurs de la concentration calcique intraluminale et serait capable de transmettre l'information : « stocks calciques vides » jusqu'aux canaux calciques de la membrane plasmique. Afin de vérifier notre hypothèse, il serait intéressant de vérifier si l'expression d'une junctate mutée au niveau de ces sites de liaison du calcium conserve son effet sur l'amplitude du courant calcique.

La junctate, la junctine et l'aspartate  $\beta$  hydroxylase sont issues de l'épissage alternatif du même gène. La junctate est homologue à la junctine dans sa partie Nter puis elle est homologue à l'aspartate  $\beta$  hydroxylase dans sa partie Cter. Il est important de remarquer que seulement quelques acides aminés différencient la junctate de l'aspartate  $\beta$  hydroxylase. La séquence spécifique de la junctate est MAEDK alors que pour l'aspartate  $\beta$  hydroxylase, il s'agit de PGARE. On peut se poser la question si les quelques acides aminés qui débutent la

junctions sont primordiales pour la fonction de la protéine. L'utilisation d'un peptide contenant les 30 premiers acides aminés de l'aspartate  $\beta$  hydroxylase pour des expériences d'interaction avec TRPC2 montrera l'importance de cette séquence. L'aspartate  $\beta$  hydroxylase est une protéine impliquée dans l'hydroxylation post-traductionnelle des résidus acide aspartique/asparagine. Cette protéine qui possède une large distribution dans l'organisme (Dinchuk et al., 2000) pourrait jouer un rôle dans le spermatozoïde.

Nous avons montré que le site d'interaction de la junction avec TRPC2 ne se situait pas au niveau du domaine CIRB. L'identification du site exact de cette interaction est une étape essentielle pour comprendre le rôle exact de la junction sur l'activation de TRPC2. Pour cela, nous pouvons effectuer des mutations aléatoires ou dirigées dans la séquence de TRPC2 et observer la persistance de l'interaction ou faire des protéines de fusion de 30-50 acides aminés et rechercher celle qui permet la fixation de la junction.

### ***5) Etude des courants calciques dans les ovocytes.***

L'étude de la signalisation calcique *in vivo* nécessite de trouver des modèles cellulaires adaptés. Au cours de cette thèse, j'ai utilisé le spermatozoïde de Mammifères dont la RA est gouvernée par une signalisation calcique unique dans l'organisme qui nécessite l'ouverture successive de trois différents types de canaux calciques. Cependant, l'ovocyte est un modèle très utilisé. Les ovocytes les plus utilisés sont les ovocytes de Xénope, mais de nombreuses études maintenant emploient l'œuf d'ascidie ou d'étoile de mer ou encore d'oursins. Ces modèles ont l'avantage d'avoir des cycles cellulaires moins longs. Le gamète femelle est très facilement manipulable, il est possible d'effectuer des microinjections d'ARN, de protéines ou d'ADNc directement dans le noyau. Au cours de l'activation du développement de l'œuf qui suit la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte, des vagues calciques s'enchaînent. L'initiation semble être gouvernée par la libération du « sperm factor » qui est une PLC $\zeta$  responsable de la libération de calcium des stocks calciques intracellulaires (Swann et al., 2004). A l'heure actuelle, le rôle des canaux T dans l'activation du développement est mal connu. Les courants HVA et LVA varient dans l'ovocyte et dans les premiers stades du développement (Day et al., 1998). Nous envisageons d'observer si l'activation du développement est modifiée chez les souris déficientes pour  $\alpha 1_G$  et  $\alpha 1_H$ . Pour cela, nous pouvons observer les caractéristiques des vagues calciques (fréquence et amplitude) dans des ovocytes fécondés. Les ovocytes de souris sont des cellules facilement « patchable ». Il serait intéressant d'observer les caractéristiques des courants calciques T.

**-A-**

Arnoult,C., Cardullo,R.A., Lemos,J.R., and Florman,H.M. (1996a). Activation of mouse sperm T-type Ca<sup>2+</sup> channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 13004-13009.

Arnoult,C., Kazam,I.G., Visconti,P.E., Kopf,G.S., Villaz,M., and Florman,H.M. (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 6757-6762.

Arnoult,C., Lemos,J.R., and Florman,H.M. (1997). Voltage-dependent modulation of T-type calcium channels by protein tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* *16*, 1593-1599.

Arnoult,C., Villaz,M., and Florman,H.M. (1998). Pharmacological properties of the T-type Ca<sup>2+</sup> current of mouse spermatogenic cells. *Mol. Pharmacol.* *53*, 1104-1111.

Arnoult,C., Zeng,Y., and Florman,H.M. (1996b). ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell Biol.* *134*, 637-645.

Artalejo,C.R., Dahmer,M.K., Perlman,R.L., and Fox,A.P. (1991). Two types of Ca<sup>2+</sup> currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type [published erratum appears in *J Physiol (Lond)* 1991 Jun;437:765]. *J. Physiol. (Lond.)* *432*:681-707, 681-707.

**-B-**

Babcock,D.F. and Hille,B. (1998). Mitochondrial oversight of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* *8*, 398-404.

Bean,B.P. (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* *340*, 153-156.

Benoff,S. (1998). Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. *Front Biosci.* *3*, D1220-D1240.

Benoff,S., Goodwin,L.O., Millan,C., Hurley,IR., Pergolizzi,R.G., and Marmar,JL. (2005). Deletions in L-type calcium channel alpha1 subunit testicular transcripts correlate with testicular cadmium and apoptosis in infertile men with varicoceles. *Fertil. Steril.* *83*, 622-634.

Berridge,M.J. (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* *312*, 1-11.

Bezprozvanny,I., Watras,J., and Ehrlich,B.E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* *351*, 751-754.

Bleil,J.D. and Wassarman,P.M. (1980). Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* *76*, 185-202.



Boehning,D., Mak,D.O., Foskett,J.K., and Joseph,S.K. (2001). Molecular determinants of ion permeation and selectivity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 276, 13509-13512.

Boulay,G., Brown,D.M., Qin,N., Jiang,M., Dietrich,A., Zhu,M.X., Chen,Z., Birnbaumer,M., Mikoshiba,K., and Birnbaumer,L. (1999). Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14955-14960.

Bourinet,E., Soong,T.W., Sutton,K., Slaymaker,S., Mathews,E., Monteil,A., Zamponi,G.W., Nargeot,J., and Snutch,T.P. (1999). Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nature Neurosci.* 2, 407-415.

Bray,C., Son,J.H., and Meizel,S. (2002). A nicotinic acetylcholine receptor is involved in the arosome reaction of human sperm initiated by recombinant human ZP3. *Biol. Reprod.* 67, 782-788.

-C-

Castellano,LE., Trevino,C.L., Rodriguez,D., Serrano,C.J., Pacheco,J., Tsitsumi,V., Felix,R., and Darszon,A. (2003). Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett.* 541, 69-74.

Chemin,J., Monteil,A., Bourinet,E., Nargeot,J., and Lory,P. (2001). Alternatively spliced alpha(1G) (Ca(V)3.1) intracellular loops promote specific T-type Ca(2+) channel gating properties. *Biophys. J.* 80, 1238-1250.

Chen,C.C., Lamping,K.G., Nuno,D.W., Barresi,R., Prouty,S.J., Lavoie,J.L., Cribbs,L.L., England,SK., Sigmund,CD., Weiss,R.M., Williamson,RA., Hill,JA., and Campbell,K.P. (2003). Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 302, 1416-1418.

Chiarella,P., Puglisi,R., Sorrentino,V., Boitani,C., and Stefanini,M. (2004). Ryanodine receptors are expressed and functionally active in mouse spermatogenic cells and their inhibition interferes with spermatogonial differentiation. *J. Cell. Sci.* 117, 4127-4134.

Chu,X., Cheung,J.Y., Barber,D.L., Birnbaumer,L., Rothblum,L.I., Conrad,K., Abrasonis,V., Chan,Y.M., Stahl,R., Carey,D.J., and Miller,B.A. (2002). Erythropoietin modulates calcium influx through TRPC2. *J. Biol. Chem.* 277, 34375-34382.

Chu,X., Tong,Q., Wozney,J., Zhang,W., Conrad,K., Mazack,V., Stahl,R., Barber,D.L., and Miller,B.A. (2005). Identification of an N-terminal TRPC2 splice variant which inhibits calcium influx. *Cell Calcium* 37, 173-182.

Chu,X., Toro,L., Cheung,J.Y., Wozney,J., Conrad,K., Mazack,V., Zhang,W., Stahl,R., Barber,D.L., and Miller,B.A. (2004). Interaction of TRPC2 and TRPC6 in erythropoietin modulation of calcium influx. *J. Biol. Chem.* 279, 10514-10522.

Clozel, J.P., Ertel, E.A., and Ertel, S.I. (1997). Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *J. Hypertens.* *15*, S17-S25.

Cox, T. and Peterson, R.N. (1989). Identification of calcium conducting channels in isolated boar sperm plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *161*, 162-168.

Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., and Perez-Reyes, E. (1998). Cloning and characterization of  $\alpha 1H$  from human heart, a member of the T-type  $Ca^{2+}$  channel gene family. *Circ. Res.* *83*, 103-109.

Crompton, M. (2000). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J. Physiol* 11-21.

**-D-**

Davis, B.K. (1981). Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *78*, 7560-7564.

Day, M.L., Johnson, M.H., and Cook, D.I. (1998). Cell cycle regulation of a T-type calcium current in early mouse embryos. *Pflugers Arch.* *436*, 834-842.

De Blas, G., Michaut, M., Trevino, C.L., Tomes, C.N., Yunes, R., Darszon, A., and Mayorga, L.S. (2002). The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* *277*, 49326-49331.

Dietrich, A., Mederos, Y., Schnitzler, M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaja, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., Essin, K., Pinkenburg, O., Luft, F.C., Gudermann, T., and Birnbaumer, L. (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 6980-6989.

Dinchuk, J.E., Henderson, N.L., Burn, T., Huber, R., Ho, S.E., Link, J., O'Neil, K., Foch, R.J., Scully, M.S., Hollis, J.M., Hollis, G.F., and Friedman, P.A. (2000). Aspartyl beta-hydroxylase (Asph) and an evolutionarily conserved isoform of Asph missing the catalytic domain share exons with junctin. *J. Biol. Chem.* *275*, 39554.

**-E-**

Engelke, M., Friefrich, O., Budde, P., Schafer, C., Niemann, U., Zitt, C., Jungling, E., Rocks, O., Luckoff, A., and Frey, I. (2002). Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *FEBS Lett.* *523*, 193-199.

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

Espinosa, F., Lopez-Gonzalez, I., Munoz-Garay, C., Felix, R., De La Vega-Beltran, J.L., Kopf, G.S., Visconti, P.E., and Darszon, A. (2000). Dual regulation of the T-type  $Ca^{2+}$

current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FEBS Lett.* *475*, 251-256.

Espinosa,F., Lopez-Gonzalez,I., Serrano,C.J., Gasque,G., De La Vega-Beltran JL, Trevino,C.L., and Darszon,A. (1999). Anion channel blockers differentially affect T-type Ca(2+) currents of mouse spermatogenic cells, alpha1E currents expressed in Xenopus oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev. Genet.* *25*, 103-114.

**-F-**

Fearon,I.M., Randall,A.D., Perez-Reyes,E., and Peers,C. (2000). Modulation of recombinant T-type Ca2+ channels by hypoxia and glutathione. *Pflugers Arch.* *441*, 181-188.

Ferris,C.D., Cameron,A.M., Bredt,D.S., Haganir,R.L., and Snyder,S.H. (1991a). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase at serines 1755 and 1589. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *175*, 192-198.

Ferris,C.D., Haganir,R.L., Bredt,D.S., Cameron,A.M., and Snyder,S.H. (1991b). Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 2232-2235.

Ferris,C.D., Haganir,R.L., and Snyder,S.H. (1990). Calcium flux mediated by purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in reconstituted lipid vesicles is allosterically regulated by adenine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 2147-2151.

Florman,H.M. (1994). Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca2+ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* *165*, 152-164.

Florman,H.M., Corron,M.E., Kim,T.D., and Babcock,D.F. (1992). Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* *152*, 304-314.

Florman,H.M., Tombes,R.M., First,N.L., and Babcock,D.F. (1989). An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca2+ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* *135*, 133-146.

Florman,H.M. and Wassarman,P.M. (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* *41*, 313-324.

Franzini-Armstrong,C., Kenney,L.J., and Varriano-Marston,E. (1987). The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J. Cell Biol.* *105*, 49-56.

Freichel,M., Suh,S.H., PFufer,A., Scheig,U., Trost,C., Weissgerber,P., Biel,M., Phillip,S., Freise,D., Droogmans,G., Hofmann,F., Flockerzi,V., and Nilius,B. (2001). Lack of an endothelial store-operated Ca2+ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4-/- mice. *Nat. Cell Biol.* *3*, 121-127.

Freichel,M., Vennekens,R., Olausson,J., Hoffmann,M., Müller,C., Stoltz,S., Scheunemann,J., Weibgerber,B., and Flockerzi,V. (2004). Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1352-1358.

Fukami,K., Yoshida,M., Inoue,T., Kurokawa,M., Fissore,R.A., Yoshida,N., Mikoshiba,K., and Takenawa,T. (2003). Phospholipase Cdelta4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J. Cell Biol.* 161, 79-88.

**-G-**

Gailly,P. and Colson-Van Schoor,M. (2001). Involvement of trp-2 protein in store-operated influx of calcium in fibroblasts. *Cell Calcium* 30, 157-165.

Garcia,M.A. and Meizel,S. (1999). Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biol. Reprod.* 60, 102-109.

Giannini,G., Conti,A., Mammarella,S., Scrobogna,M., and Sorrentino,V. (1995). The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J. Cell Biol.* 128, 893-904.

Greve,J.M. and Wassarman,P.M. (1985). Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.* 181, 253-264.

Hille,B. (1994). Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends. Neurosci.* 17, 531-536.

**-H-**

Hirota,J., Michikawa,T., Natsume,T., Furuichi,T., and Mikoshiba,K. (1999). Calmodulin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release through the purified and reconstituted inositol1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *FEBS Lett.* 456, 322-326.

Hofmann,T., Schaefer,M., Schultz,G., and Gudermann,T. (2000). Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochem. J.* 351, 115-122.

Hong,CS., Kwak,YG., Ji,JH., Chae,SW., and Kim do,H. (2001). Molecular cloning and characterization of mouse cardiac junctate isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 882-887.

**-I-**

Ikemoto,N., Ronjat,M., Meszaros,L.G., and Koshita,M. (1989). Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 28, 6764-6771.

**-J-**

Jahn,R. and Sudhof,T.C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 863-911.

Jayaraman,T., Ondrias,K., Ondriasova,E., and Marks,A.R. (1996). Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* 272, 1492-1494.

Jiang,Q.X., Thrower,E.C., Chester,D.W., Ehrlich,B.E., and Sigworth,F.J. (2002). Three-dimensional structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at 24 Å resolution. *EMBO J.* 21, 3575-3581.

Jungnickel,M.K., Marrero,H., Birnbaumer,L., Lemos,J.R., and Florman,H.M. (2001). Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat. Cell Biol.* 3, 499-502.

**-K-**

Kaplin,A.I., Snyder,S.H., and Linden,D.J. (1996). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-selective stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediates hypoxic mobilization of calcium. *J. Neurosci.* 16, 2002-2011.

Kirkman-Brown,J.C., Bray,C., Stewart,P.M., Barratt,C.L., and Publicover,S.J. (2000). Biphasic elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev. Biol.* 222, 326-335.

Kiselyov,K., Xu,X., Mozhayeva,G., Kuo,T., Pessah,I., Mignery,G., Zhu,X., Birnbaumer,L., and Muallem,S. (1998). Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396, 478-482.

Klugbauer,N., Marais,E., Lacinova,L., and Hofmann,F. (1999). A T-type calcium channel from mouse brain. *Pflugers Arch.* 437, 710-715.

Komalavilas,P. and Lincoln,T.M. (1994). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 8701-8707.

**-L-**

Lacerda,A.E., Kim,H.S., Ruth,P., Perez-Reyes,E., Flockerzi,V., Hofmann,F., Birnbaumer,L., and Brown,A.M. (1991). Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature* 352, 527-530.

Lee,J.H., Daud,A.N., Cribbs,L.L., Lacerda,A.E., Pereverzev,A., Klockner,U., Schneider,T., and Perez-Reyes,E. (1999a). Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J. Neurosci.* 19, 1912-1921.

Lee, J.H., Gomora, J.C., Cribbs, L.L., and Perez-Reyes, E. (1999b). Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block  $\alpha 1H$ . *Biophys. J.* *77*, 3034-3042.

Leresche, N., Hering, J., and Lambert, R.C. (2004). Paradoxical potentiation of neuronal T-type  $Ca^{2+}$  current by ATP at resting membrane potential. *J. Neurosci.* *24*, 5592-5602.

Leybold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F., and Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 6376-6381.

Lievano, A., Santi, C.M., Serrano, C.J., Trevino, C.L., Bellve, A.R., Hernandez-Cruz, A., and Darszon, A. (1996). T-type  $Ca^{2+}$  channels and  $\alpha 1E$  expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* *388*, 150-154.

Liman, E.R., Corey, D.P., and Dulac, C. (1999). TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 5791-5796.

Liman, E.R. and Innan, H. (2003). Relaxed selective pressure on an essential component of pheromone transduction in primate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 3328-3332.

Litscher, E.S., Juntunen, K., Seppo, A., Penttila, L., Niemela, R., Renkonen, O., and Wassarman, P.M. (1995). Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro. *Biochemistry* *35*, 3980-3985.

Lopez-Gonzalez, I., De La Vega-Beltran, J.L., Santi, C.M., Florman, H.M., Felix, R., and Darszon, A. (2001). Calmodulin antagonists inhibit T-type  $Ca^{2+}$  currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* *236*, 210-219.

Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2003). A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* *40*, 551-561.

Lytton, J. and Nigam, S.K. (1992). Intracellular calcium: molecules and pools. *Curr. Opin. Cell. Biol.* *4*, 220-226.

**-M-**

Marty, I., Robert, M., Villaz, M., De Jongh, K., Lai, Y., Catterall, W.A., and Ronjat, M. (1994). Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 2270-2274.

Matsumoto, M. and Nagata, E. (1999). Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor knock-out mice: their phenotypes and their meaning in neuroscience and clinical practice. *J. Mol. Med.* *77*, 406-411.

McClesky, E.W. (1994). Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* *4*, 204-312.

- Meizel,S. (1997). Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 56, 569-574.
- Minke,B. and Cook,B. (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol. Rev.* 82, 429-472.
- Miyakawa,T., Mizushima,A., Hirose,K., Yamazawa,T., and Bezprozvanny,I. (2001). Ca(2+)-sensor region of IP(3) receptor controls intracellular Ca(2+) signaling. *EMBO J.* 20, 1674-1680.
- Monteil,A., Chemin,J., Bourinet,E., Mennessier,G., Lory,P., and Nargeot,J. (2000a). Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 275, 6090-6100.
- Monteil,A., Chemin,J., Leuranguer,V., Altier,C., Mennessier,G., Bourinet,E., Lory,P., and Nargeot,J. (2000b). Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. *J. Biol. Chem.* 275, 16530-16535.
- Montell,C. (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE.* 2001, [http://stke.sciencemag.org/cgi/content/OC\\_sigtrans;2001-90re1](http://stke.sciencemag.org/cgi/content/OC_sigtrans;2001-90re1).
- Montell,C. (2005). The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci. STKE.* re3.
- Montell,C., Birnbaumer,L., and Flockerzi,V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108, 595-598.
- Moran,M.M., Xhu,H., and Clapham,D.E. (2004). TRP ion channels in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 362-369.

**-N-**

- Nakagawa,T., Okano,H., Furuichi,T., Aruga,J., and Mikoshiba,K. (1991). The subtypes of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are expressed in a tissue-specific and developmentally specific manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 6244-6248.
- Nargeot,J. and Charnet,P. (1994). Diversité moléculaire des canaux calciques : du gène à la fonction. *Médecine/Science* 10, 1293-1308.
- Newcomb,R., Szoke,B., Palma,A., Wang,G., Chen,X., Hopkins,W., Cong,R., Miller,J., Urge,L., Tarczy-Hornoch,K., Loo,J.A., Dooley,D.J., Nadasdi,L., Tsien,R.W., Lemos,J., and Miljanich,G. (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37, 15353-15362.

**-O-**

- O'Toole,C.M., Arnoult,C., Darszon,A., Steinhardt,R.A., and Florman,H.M. (2000). Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell* 11, 1571-1584.

Ogawa,K., Asai,D.J., and Brokaw,C.J. (1977). Properties of an antiserum against native dynein 1 from sea urchin sperm flagella. *J. Cell Biol.* 73, 182-192.

Ordaz,B., Tang,J., Xiao,R., Salgado,A., Sampieri,A., Zhu,M.X., and Vaca,L. (2005). Calmodulin and Calcium Interplay in the Modulation of TRPC5 Channel Activity: IDENTIFICATION OF A NOVEL C-TERMINAL DOMAIN FOR CALCIUM/CALMODULIN-MEDIATED FACILITATION. *J. Biol. Chem.* 280, 30788-30796.

**-P-**

Parrish,J.J., Susko-Parrish,J., and First,N.L. (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.* 41, 683-699.

Patterson,R.L., Boening,D., and Snyder,S.H. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 437-465.

Perez-Reyes,E. (1998). Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 313-318.

Perez-Reyes,E. (2003). Molecular physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 83, 117-161.

Piedras-Renteria,E.S. and Tsien,R.W. (1998). Antisense oligonucleotides against alpha1E reduce R-type calcium currents in cerebellar granule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7760-7765.

Pigozzi,D., Tombal,B., Ducret,T., Vacher,P., and Gailly (2004). Role of store-dependent influx of Ca<sup>2+</sup> and efflux of K<sup>+</sup> in apoptosis of CHO cells. *Cell Calcium* 36, 421-430.

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

Putney,J.W.J. (2004). Store-operated calcium channels: how do we measure them, and why do we care? *Sci. STKE.* pe37.

**-R-**

Randriamampita,C. and Tsien,R.Y. (1993). Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature* 364, 809-814.

Ren,D., Navarro,B., Perez,G., Jackson,A.C., Hsu,S., Shi,Q., Tilly,J.L., and Clapham,D.E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603-609.

Ross,C.A., Meldosi,J., Milner,T.A., Satoh,T., Supattapone,S., and Snyder,S.H. (1989). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature* 339, 468-470.



-S-

- Sakmann,B. and Neher,E. (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Physiol.* *46*, 455-472.
- Santi,C.M., Darszon,A., and Hernandez-Cruz,A. (1996). A dihydropyridine-sensitive T-type  $Ca^{2+}$  current is the main  $Ca^{2+}$  current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am. J. Physiol.* *271*, C1583-C1593.
- Santi,C.M., Santos,T., Hernandez-Cruz,A., and Darszon,A. (1998). Properties of a novel pH-dependent  $Ca^{2+}$  permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function. *J. Gen. Physiol.* *112*, 33-53.
- Sculptoreanu,A., Scheuer,T., and Catterall,W.A. (1993). Voltage-dependent potentiation of L-type  $Ca^{2+}$  channels due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Nature* *364*, 240-243.
- Shirakawa,H. and Miyazaki,S. (1999). Spatiotemporal characterization of intracellular  $Ca^{2+}$  rise during the acrosome reaction of mammalian spermatozoa induced by zona pellucida. *Dev. Biol.* *208*, 70-78.
- Shorofsky,S.R. and Balke,C.W. (2001). Calcium currents and arrhythmias: insights from molecular biology. *Am. J. Med.* *110*, 127-140.
- Simpson,P.B. and Russell,J.T. (1998). Role of mitochondrial  $Ca^{2+}$  regulation in neuronal and glial cell signalling. *Brain Res.* *26*, 72-81.
- Stowers,L., Holy,TE., Meister,M., Dulac,C., and Koentges,G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 1493-1500.
- Strubing,C., Krapivinsky,G., Krapivinsky,L., and Clapham,D.E. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* *29*, 645-655.
- Sudhof,T.C. (2002). Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem.* *277*, 7629-7632.
- Supattapone,S., Danoff,S.K., Theibert,A., Joseph,S.K., Steiner,J., and Snyder,S.H. (1988). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 8747-8750.
- Sutton,KA., Jungnickel,M.K., Cullen,K., Lambert,S., and Florman,H.M. (2004). Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Dev. Biol.* *274*, 426-435.
- Swann,K., Larman,LG., Saunders,CM., and Lai,FA. (2004). The cytosolic sperm factor that triggers  $Ca^{2+}$  oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction.* *127*, 431-439.

**-T-**

- Tang,J., Lin,Y., Zhang,Z., Tikunova,S., Birnbaumer,L., and Zhu,M.X. (2001). Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J. Biol. Chem.* 276, 21303-21310.
- Tong,Q., Chu,X., Cheung,J.Y., Conrad,K., Stahl,R., Barber,D.L., Mignery,G., and Miller,B.A. (2004). Erythropoietin-modulated calcium influx through TRPC2 is mediated by phospholipase Cgamma and IP3R. *Am. J. Physiol.* 287, 1667-1678.
- Toru,S., Murakoshi,T., Ishikawa,K., Saegusa,H., Fujigasaki,H., Uchihara,T., Nagayama,S., Osanai,M., Mizusawa,H., and Tanabe,T. (2000). Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters P-type calcium channel function. *J. Biol. Chem.* 275, 10893-10898.
- Treves,S., Feriotto,G., Moccagatta,L., Gambari,R., and Zorzato,F. (2000). Molecular cloning, expression, functional characterization, chromosomal localization, and gene structure of junctate, a novel integral calcium binding protein of sarco(endo)plasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 39555-39568.
- Treves,S., Franzini-Armstrong,C., Moccagatta,L., Arnoult,C., Schrum,A., Ducreux,S., Zhu,M.X., Mikoshiba,K., Girard,T., Smida-Rezgui,S., Ronjat,M., and Zorzato,F. (2004). Junctate is a key element in calcium entry induced by activation of InsP3 receptors and/or calcium store depletion. *J. Cell Biol.* 166, 537-548.
- Trevino,C.L., Santi,C.M., Beltran,C., Hernandez-Cruz,A., Darszon,A., and Lomeli,H. (1998). Localisation of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications. *Zygote.* 6, 159-172.
- Trevino,C.L., Serrano,C.J., Beltran,C., Felix,R., and Darszon,A. (2001). Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett.* 509, 119-125.
- Tsien,R.W., Ellinor,P.T., and Horne,W.A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends. Pharmacol. Sci.* 12, 349-354.
- Tu,J.C., Xiao,B., Yuan,J., Lanahan,A.A., Leoffert,K., Li,M., Linden,D.J., and Worley,P.F. (1998). Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron.* 1998 Oct;21(4):717-26. *Neuron* 21, 717-726.

**-V-**

- Vaca,L. and Sampieri,A. (2002). Calmodulin modulates the delay period between release of calcium from internal stores and activation of calcium influx via endogenous TRP1 channels. *J. Biol. Chem.* 277, 42178-42187.
- Vannier,B., Peyton,M., Boulay,G., Brown,D., Qin,L., Jiang,M., Zhu,X., and Birnbaumer,L. (1999). Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 2060-2064.

Vazquez,G., Wedel,B.J., Azziz,O., Trebak,M., and Putney,J.W.J. (2004). The mammalian TRPC cation channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1742, 21-36.

Vazquez,G., Wedel,B.J., Trebak,M., St John,B.G., and Putney,J.W., Jr. (2003). Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation. *J. Biol. Chem.* 278, 21649-21654.

Venkatachalam,K., Van rossum,D.B., Patterson,R.L., Ma,H.T., and Gill,D.L. (2002). The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat. Cell Biol.* 4, E263-E272.

Visconti,P.E., Bailey,J.L., Moore,G.D., Pan,D., Olds-Clarke,P., and Kopf,G.S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137.

Visconti,P.E., Ning,X., Fornes,M.W., Alvarez,J.G., Stein,P., Connors,S.A., and Kopf,G.S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* 214, 429-443.

-W-

Walensky,L.D. and Snyder,S.H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 130, 857-869.

Wassarman,P.M. and Mortillo,S. (1991). Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int. Rev. Cytol.* 130, 85-109.

Wedel,B.J., Vazquez,G., McKay,R.R., Bird,G.St.J., and Putney,J.W.J. (2003). A calmodulin/inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP3 receptor-independent process. *J. Biol. Chem.* 278, 25758-25765.

Welsby,P.J., Wang,H., Wolfe,J.T., Colbran,R.J., Johnson,M.L., and Barrett,P.Q. (2003). A mechanism for the diet regulation of T-Type Calcium Channels by Ca<sup>2+</sup>/CaMKII. *J. Neurosci.* 23, 10116-10121.

Wennemuth,G., Westenbroek,R.E., Xu,T., Hille,B., and Babcock,D.F. (2000). CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca<sup>2+</sup> channels in depolarization-evoked entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm. *J. Biol. Chem.* 275, 21210-21217.

Westenbroek,R.E. and Babcock,D.F. (1999). Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel alpha1 subunits in sperm. *Dev. Biol.* 207, 457-469.

Weyand,I., Godde,M., Frings,S., Weiner,J., Muller,F., Altenhofen,W., Hatt,H., and Kaupp,U.B. (1994). Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* 368, 859-863.

Wiesner,B., Weiner,J., Middendorff,R., Hagen,V., Kaupp,U.B., and Weyand,I. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca<sup>2+</sup> entry into sperm. *J. Cell Biol.* 142, 473-484.

Wolfe, J.T., Wang, H., Howard, J., Garrison, J.C., and Barrett, P.Q. (2003). T-type calcium channel regulation by specific G-protein betagamma subunits. *Nature* 424, 209-213.

Wolfe, J.T., Wang, H., Perez-Reyes, E., and Barrett, P.Q. (2002). Stimulation of recombinant Ca(v)3.2, T-type, Ca(2+) channel currents by CaMKIIgamma(C). *J. Physiol* 538, 343-355.

Worley, P.F., Baraban, J.M., Colvin, J.S., and Snyder, S.H. (1987). Inositol trisphosphate receptor localization in brain: variable stoichiometry with protein kinase C. *Nature* 325, 159-161.

**-X-**

Xiao, B., Tu, J.C., Petralia, R.S., Yuan, J., Doan, A., Breder, C., Ruggiero, A., Lanahan, A.A., Wenthold, R.J., and Worley, P.F. (1998). Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* 21, 707-716.

**-Y-**

Yanagimachi, R. (1994). *Mammalian Fertilization. The Physiol of Reprod*, E Knobil, J. D. Neill Eds (Raven New York) 152-162.

Yao, Y., Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M., and Tsien, R.Y. (1999). Activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* 98, 475-485.

Yee, H.F., Weiss, J.N., and Langer, G.A. (1989). Neuraminidase selectively enhances transient Ca<sup>2+</sup> current in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 256, C1267-C1272.

Yildirim, E., Dietrich, A., and Birnbaumer, L. (2003). The mouse C-type transient receptor potential 2 (TRPC2) channel: alternative splicing and calmodulin binding to its N terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 2220-2225.

Yuan, J.P., Kiselyov, K., Shin, D.M., Chen, J., Shcheynikov, N., Kang, S.H., Dehoff, M.H., Schwarz, M.K., Seeburg, P.H., Muallem, S., and Worley, P.F. (2003). Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell* 114, 777-789.

**-Z-**

Zeng, Y., Clark, E.N., and Florman, H.M. (1995). Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* 171, 554-563.

Zhang, Y., Cribbs, L.L., and Satin, J. (2000a). Arachidonic acid modulation of alpha1H, a cloned human T-type calcium channel. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H184-H193.

Zhang,Z., Tang,J., Tikunova,S., Johnson,J.D., Chen,Z., Qin,N., Dietrich,A., Stefani,E., Birnbaumer,L., and Zhu,M.X. (2000b). Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98, 3168-3173.



## RESUME

La réaction acrosomique (RA) de Mammifères nécessite l'ouverture successive de trois canaux calciques : un canal calcique activé par de faibles dépolarisations (LVA), le récepteur à l'IP<sub>3</sub> et un canal activé par la vidange des stocks (SOC) TRPC2. Nos données montrent une intéressante interaction fonctionnelle entre le canal LVA et les protéines dont l'activité est liée au niveau de remplissage du réticulum (vraisemblablement les canaux TRPCs et l'IP<sub>3</sub>R). Toute la signalisation calcique de la RA est sous le contrôle du canal LVA qui est le premier à s'activer. En utilisant les souris déficientes pour Cav3.1 et Cav3.2, nous avons montré que la sous-unité Cav3.2 est la sous-unité majoritaire dans les cellules spermatogéniques sauvages. Nos données fournissent également de nouvelles hypothèses concernant l'activation de TRPC2 : celle-ci pourrait être due à des modifications de son interaction avec la junctate et l'IP<sub>3</sub>R, induite par la vidange des stocks calciques intracellulaires.

**Mots clés :** canaux calciques, réaction acrosomique, spermatozoïde, souris, Type T, TRPC2, IP<sub>3</sub>R, facilitation, junctate, Cav3.1, Cav3.2.

The acrosome reaction in mouse is triggered by a long lasting calcium signaling produced by a chain of openings of several calcium channels, a low voltage-activated (LVA) calcium channel, an inositol trisphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R) and the store-operated calcium channel TRP2. Our data evidence an interesting functional relationship, in this cell type, between LVA channels and proteins whose activity is related to calcium filling state of the endoplasmic reticulum (presumably TRP channels and Inositol triphosphate Receptor). All the calcium signalling is under the control of the activation of the first-one, a T-type calcium channel. Using mice deficient for the CaV3.1 and CaV3.2 subunit, we show that CaV3.2 represent the main functional channels in wild-type spermatogenic cells. Our results provide a new hypothesis concerning sperm TRPC2 gating: TRPC2 activation may be due to modifications of its interaction with both junctate and IP<sub>3</sub>R, induced by acrosome depletion.

**Keywords:** calcium channel, acrosome reaction, sperm, mouse, T-type, TRPC2, IP<sub>3</sub>R, facilitation, junctate, Cav3.1, Cav3.2.