



HAL
open science

LE NAADP, UN MESSAGER LIBERANT DU CALCIUM:ETUDE DE L'IMPLICATION DES RESERVES ACIDES ET ROLE DE CD38 DANS LA VOIE DE SYNTHESE

Alexis Menteyne

► **To cite this version:**

Alexis Menteyne. LE NAADP, UN MESSAGER LIBERANT DU CALCIUM:ETUDE DE L'IMPLICATION DES RESERVES ACIDES ET ROLE DE CD38 DANS LA VOIE DE SYNTHESE. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT: . tel-00159587

HAL Id: tel-00159587

<https://theses.hal.science/tel-00159587>

Submitted on 3 Jul 2007

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 PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Ecole doctorale Signalisation, Neurosciences, Endocrinologie et Reproduction

Présentée et soutenue publiquement par
Alexis MENTEYNE

Le 27 juin 2007

**LE NAADP, UN MESSAGER LIBERANT DU
CALCIUM:
ETUDE DE L'IMPLICATION DES RESERVES ACIDES
ET ROLE DE CD38 DANS LA VOIE DE SYNTHESE**

Directeurs de Thèse : MM. Gérard BAUX et José CANCELA

JURY

M. Marc le Maire

Président

M^{me} Marie Jo Moutin

Rapporteur

M. Fabien Van Coppenolle

Rapporteur

M. Régis Bobé

M. Gérard Baux

M. José Manuel Cancela

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Gérard Baux qui m'a permis d'intégrer le laboratoire de neurobiologie cellulaire et moléculaire.

Je remercie José Manuel Cancela de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche, et d'avoir encadré ce travail scientifique, de même que Gilles Charpentier.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel du laboratoire pour son accueil chaleureux.

Je tiens à remercier M. Marc le Maire d'avoir accepté de présider le jury et Mme Marie Jo Moutin , M. Fabien Van Coppenolle et M. Régis Bobe d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier l'AFM, pour son soutien financier sans lequel ce travail n'aurait pu être possible.

Enfin et surtout, je remercie mes parents et amis qui m'ont soutenu tout au long de ce travail de thèse.

Liste des abréviations	6
Liste des Figures	7

PARTIE I : ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES RESERVES CALCIQUES IMPLIQUEES DANS LA REPONSE AU NAADP, UN MESSAGER LIBERANT DU Ca^{2+} , ET LEUR RELATION AVEC LES AUTRES MESSAGERS CADPR ET IP_3 DANS LES CELLULES ACINEUSES DE PANCREAS EXOCRINE 9

A) Signalisation calcique	10
1) L'ion calcium et les phénomènes physiologiques	10
2) Mécanismes de base de la signalisation calcique	11
3) Les canaux calciques et le mécanisme de CICR	11
4) Mécanismes de formation de signaux calciques élémentaires	12
5) Mécanisme d'oscillations calciques	13
6) Découverte du NAADP dans l'ovocyte d'Oursin	15
7) Implication du NAADP dans les cellules de mammifère	18
8) Réserves intracellulaires de calcium	20
<i>Maintien de la concentration de Ca^{2+} dans le RE</i>	20
<i>Autres réserves calciques intracellulaires</i>	22
B) La signalisation calcique dans les cellules acineuses de pancréas exocrine	24
1) La cellule acineuse de pancréas, un bon modèle d'étude des signaux calciques	24
2) Des réponses agonistes-spécifiques	25
a) Réponses à l'ACh	29
b) Réponses à la CCK	29
3) Maintien de la concentration de Ca^{2+} dans le cytoplasme	31
4) Un nouveau messenger atypique impliqué dans la réponse à la CCK, le NAADP	31
5) Genèse des signaux calciques complexes par coopération des messagers intracellulaires dans le pancréas exocrine	34
6) Caractéristiques des différentes réserves intracellulaires impliquées dans la signalisation	34
a) Le réticulum endoplasmique	35
b) Les réserves acides	37
<i>Les lysosomes</i>	37
<i>Les granules de zymogène</i>	37
c) L'enveloppe nucléaire	38
Generation of specific Ca^{2+} signals from Ca^{2+} stores and endocytosis by differential coupling to messengers	39
7) Présentation de l'article et Objectifs	40
C) Matériels et méthodes I : Méthodes utilisées dans l'article Current Biology	42
1) Préparation des cellules acineuses de pancréas exocrine	42
2) Imagerie calcique en microscopie confocale	42
a) Utilisation des sondes calciques	42
<i>Principe de fonctionnement</i>	43
<i>La Sonde calcique Fluo-4 AM</i>	43

<i>La sonde calcique Mag-Fluo-4 AM</i>	44
<i>La sonde LysoTracker Red</i>	44
b) Acquisition et traitement des images	45
3) Enregistrements électrophysiologiques des variations du calcium intracellulaire	45
a) Principe de la technique du patch-clamp	45
b) Dispositif expérimental	46
c) Protocole expérimental	47
D) Discussion et données supplémentaires	55
1) Discussion des différents modèles proposés pour expliquer les signatures calciques dans les cellules acineuses de pancréas exocrine	55
<i>Modèle proposé par Yamasaki (Yamasaki et al., 2004) : le NAADP recrute un organite spécifique</i>	55
<i>Modèle proposé par Gerasimenko (Gerasimenko et al., 2006) : les messagers ne recrutent pas d'organite spécifique</i>	56
2) Effets des différentes concentrations de GPN sur la fluorescence au LysoTracker Red et réponses aux agonistes	58
<i>Effets des différentes doses de GPN sur les réponses aux agonistes</i>	58
<i>Effets des agonistes sur la fluorescence au LysoTracker Red</i>	59
3) Rôle de l'endocytose	60
E) Données préliminaires non publiées sur l'entrée de Ca²⁺, les lysosomes et l'endocytose	65
1) Effets du GPN sur les oscillations calciques induites par le NAADP et relation avec le Ca ²⁺ extracellulaire	65
2) Traitement des cellules par un inhibiteur des SOC	65
3) Traitement des cellules par un inhibiteur de l'endocytose	66
4) Nouveau modèle de coopération des messagers et rôle de l'endocytose dans les signaux calciques (Menteyne et al., 2006)	68
PARTIE II : ETUDE DE LA SYNTHÈSE DU NAADP DANS DIFFÉRENTS TISSUS ET RELATION A CD38	72
A) Introduction bibliographique	73
1) ADP ribosyl cyclases chez les invertébrés	73
a) Synthèse de cADPR et NAADP chez les invertébrés	73
<i>Synthèse de cADPR</i>	73
<i>Synthèse de NAADP</i>	74
b) Régulation des ADP ribosyl cyclases chez les invertébrés	74
2) ADP ribosyl cyclases chez les mammifères	77
a) CD38	77
b) CD157	77
c) ADP ribosyl cyclases autres que CD38	78
d) Régulation des ADP ribosyl cyclases de mammifère.	80
e) Localisation des ADP ribosyl cyclases	82
3) Synthèse de NAADP en réponse à une stimulation	84
4) Métabolisme du NAADP	85
5) Objectifs	85
6) Méthodes expérimentales	86

a)	Méthode de dosage de l'activité de synthèse de NAADP par l'ADPribosyl cyclase	86
b)	Autres méthodes	86
B)	Matériels et méthodes II : Dosage de la synthèse du NAADP par l'ADPribosyl cyclase en HPLC	86
a)	Principe de la technique	87
b)	Dispositif expérimental et analyse en HPLC	87
c)	Prélèvement des tissus et protocole de dosage	88
	<i>Prélèvement de tissus</i>	88
	<i>Protocole expérimental</i>	89
	<i>Dosage des protéines dans les échantillons</i>	90
d)	Souris CD38 ^{-/-}	90
C)	Résultats	92
1)	Ubiquité de l'activité de synthèse de NAADP à travers les tissus	92
2)	L'enzyme CD38 est la principale enzyme de synthèse du NAADP (cas particulier du cerveau)	94
3)	Rôle possible du Ca ²⁺ dans la modulation de l'enzyme de synthèse CD38	97
4)	Modulation de la synthèse de NAADP par la L-Arginine dans les muscles squelettiques	99
5)	Cyclases et Pathologies	101
a)	Muscle et souris <i>mdx</i>	101
	<i>Souris mdx</i>	101
	<i>Effets de l'ACh</i>	102
b)	Cancer et ADP ribosyl cyclases	104
c)	Synthèse de NAADP dans d'autres espèces animales	106
D)	Discussion des données biochimiques	108
	CONCLUSIONS, PERSPECTIVES	111
	Bibliographie citée	114

Liste des abréviations

ACh, Acétylcholine
ADPrP, ADP ribose Phosphate
AMPc, Adénosine Mono phosphate cyclique
ATP, Adénosine tris Phosphate
BSA, bovine serum albumine
Ca²⁺, ion calcium
cADPR, Adénosine Di Phosphate ribose cyclique
CCK, Cholécystokinine
CI1, cathepsin inhibitor 1
CICR, Calcium induced-Calcium release
CIF, Calcium influx Factor
RE, réticulum endoplasmique
EGTA, éthylène glycol bis (2-aminoethyl éther)-N,N,N'N'-tetra acétique acid
Fluo 4 AM: Fluo 4 acetoxy méthyl ester
GFP, Green fluorescent protein
GMPc, Guanosine Mono Phosphate cyclique
GPI, Glycophosphatidyl inositol
GPN, Gly-Phe-Beta-Naphtylamide
HPLC, chromatographie liquide à haute performance
IP₃, Inositol tris phosphate
IP₃R, Récepteur à l'IP₃
LTD, long term depression
NAADP, Acide Nicotinique Adénine dinucléotide phosphate
NO, monoxyde d'azote
PMCA, Plasma membrane Ca²⁺ ATPase
RyR, Récepteur à la Ryanodine
SMOC, Second messenger operated channel
SOC, store operated channel
SOCE, Store operated Ca²⁺ entry
SERCA, Sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium pumps
SPCA, Secretory pathway Ca²⁺ ATPase
Tg, Thapsigargine
TFA, acide tri-fluoro-acétique
TRP, transient receptor potential
UV, ultra-violet
v-ATPases, ATPases de type vacuolaire
ZG, granules de zymogène

Liste des Figures

Figure 1 : Les messagers intracellulaires libérant du calcium

Figure 2 : Oscillations calciques induites par différentes doses d'agonistes dans les cellules acineuses de pancréas exocrine

Figure 3 : Le modèle cellule acineuse de pancréas exocrine

Figure 4: Pharmacologie des agonistes et des messagers les cellules acineuses de pancréas exocrine, et « two pool model »

Figure 5: Modèles proposés

Article publié dans Current Biology “Generation of specific Ca^{2+} signals from Ca^{2+} stores and endocytosis by differential coupling to messengers”

Figure 6: Supplemental data S1 de l'article

Figure 7: Supplemental data S2 de l'article

Figure 8: Rôle de l'endocytose dans les réponses au NAADP

Figure 9: Modèle proposé pour expliquer comment les agonistes extracellulaires initient leurs réponses calciques en recrutant différentes réserves acides et le RE par leurs messagers respectifs

Figure 10: Expériences contrôle

Figure 11: Synthèse du cADPR et du NAADP par l'ADPribosyl cyclase.

Figure 12: Méthode de dosage de l'activité de synthèse du NAADP par HPLC

Figure 13: Synthèse ubiquitaire du NAADP

Figure 14: Importance de CD38 dans la synthèse de NAADP

Figure 15: Absence d'activité de synthèse de NAADP dans les synaptosomes de souris CD38
-/-

Figure 16: Expériences sur la possible modulation de la synthèse de NAADP par le calcium dans les muscles squelettiques et la moelle épinière

Figure 17: Modulation de l'activité de synthèse de NAADP par la L-Arginine

Figure 18: Synthèse de NAADP dans les muscles contrôle C57 et mdx

Figure 19: Traitement des muscles C57 et mdx par l'ACh

Figure 20: Activité de synthèse de NAADP et cancer

Figure 21: Activité de synthèse de NAADP dans d'autres espèces

**Partie I : Etude pharmacologique des réserves calciques
impliquées dans la réponse au NAADP, un messenger libérant du
Ca²⁺, et leur relation avec les autres messagers cADPR et IP₃ dans
les cellules acineuses de pancréas exocrine**

A) Signalisation calcique

1) L'ion calcium et les phénomènes physiologiques

L'ion calcium (Ca^{2+}) est un second messenger intracellulaire universel. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la contraction musculaire, la libération de neurotransmetteur, la sécrétion d'enzyme, l'expression génique, ou encore la mort cellulaire (Berridge et al., 2003; Petersen et al., 2005). Les agonistes extracellulaires tels que les hormones et les neurotransmetteurs déclenchent des signaux calciques complexes par l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire ou par la libération de Ca^{2+} à partir de réserves intracellulaires (Berridge et al., 2003; Cancela, 2001; Petersen et al., 2005; Rizzuto et Pozzan, 2006).

Pour pouvoir contrôler toutes ces fonctions à partir d'un seul messenger, le Ca^{2+} , la cellule fait appel à une « boîte à outils » de signalisation qui lui permet de former une réponse calcique spécifique à la fonction voulue (Berridge et al., 2003; Spitzer et al., 2005). Ces outils sont constitués par des réserves intracellulaires de Ca^{2+} , des récepteurs, des pompes et des canaux calciques. Ainsi, l'élévation de Ca^{2+} intracellulaire peut être locale ou globale, de durée variable, et former des gradients, ou même des oscillations. Ces oscillations peuvent elles même coder l'information sous forme de fréquence ou d'amplitude. Par exemple, des élévations locales de Ca^{2+} peuvent déclencher la sécrétion d'enzyme, le guidage du cône de croissance ou la relaxation des muscles lisses (Jagggar et al., 2000; Petersen et Cancela, 2000; Petersen et al., 1994; Zheng, 2000), tandis que les élévations globales du Ca^{2+} intracellulaire peuvent contrôler l'expression des gènes ou la contraction des muscles lisses (Berridge et al., 1998; Jagggar et al., 2000). De plus, il a pu être montré que la fréquence des oscillations contrôlait l'expression des gènes (Dolmetsch et al., 1998) et le métabolisme mitochondrial (Thomas et al., 1996). Les mécanismes impliqués dans la genèse de ces signaux sont encore mal connus, malgré les efforts des chercheurs pour comprendre leur implication dans les réponses physiologiques aux hormones et aux neurotransmetteurs (Cancela, 2001; Cancela et al., 2000; Lee, 2001; Petersen, 2005; Rizzuto et Pozzan, 2006).

2) Mécanismes de base de la signalisation calcique

Ces signaux calciques sont rendus possibles par des gradients importants de concentration entre le cytoplasme, les différents compartiments cellulaires, et le milieu extracellulaire. Le principal réservoir de Ca^{2+} intracellulaire est le réticulum endoplasmique (RE), mais d'autres organites pourraient participer aux réponses, comme les granules de sécrétion et les mitochondries. Si la concentration de Ca^{2+} cytosolique basale est proche de 100 nM, la concentration extracellulaire est généralement de 1 mM, tandis que celle des réserves intracellulaires est variable, avec une concentration de l'ordre de 500 μM pour le RE, qui constitue la principale réserve intracellulaire (Demaurex et Frieden, 2003; Garcia et al., 2006; Mogami et al., 1998; Park et al., 2000; Rizzuto et Pozzan, 2006) et d'environ 15 mM pour les granules de sécrétion (Gerasimenko et al., 1996a; Nicaise et al., 1992). Il est donc possible de provoquer d'importantes élévations de Ca^{2+} dans le cytoplasme soit par un influx, soit en libérant le Ca^{2+} de ces réserves. Ces mouvements de Ca^{2+} se font par l'ouverture de canaux calciques spécifiques. Les canaux libérant du Ca^{2+} des réserves intracellulaires sont principalement les récepteurs à la ryanodine (RyR) et à l' IP_3 (IP_3R) présents sur la membrane du RE. Les canaux permettant l'influx de Ca^{2+} extracellulaire sont portés par la membrane plasmique et peuvent appartenir à la famille des récepteurs-canaux, des canaux voltage-dépendants, des TRP, ...etc. Des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et des ATPases pompes à Ca^{2+} de la membrane plasmique (Plasma membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA) participent également des mouvements de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique.

La concentration cytosolique de Ca^{2+} est donc le bilan des entrées de Ca^{2+} extracellulaire, de la libération à partir de réserves intracellulaires, de l'extrusion et de la re-capture du Ca^{2+} cytosolique dans les compartiments intracellulaires.

Au cours de mon travail de doctorat, je me suis surtout intéressé à l'origine intracellulaire des signaux calciques.

3) Les canaux calciques et le mécanisme de CICR

Les principaux canaux permettant de libérer du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires sont les récepteurs à l'inositol tris phosphate (IP_3) et à la ryanodine (IP_3R et RyR) situés sur la membrane du RE (Berridge et al., 2003; Solovyova et Verkhatsky, 2003). Ces deux types de récepteurs ont une structure très semblable, constituée d'un tétramère (Berridge, 1993; Ehrlich et al., 1994; Henzi et MacDermott, 1992; Lai et al., 1989; Ma et al., 2004; Taylor et al., 2004;

Tsien et Tsien, 1990), et tous deux sont capables du mécanisme d'amplification « Ca^{2+} induced Ca^{2+} release » (CICR), c'est à dire que le Ca^{2+} sensibilise lui même ces récepteurs au cours d'un mécanisme explosif (Adkins et Taylor, 1999; Gyorko, 1999; Pessah et al., 1985). Dans le cas des IP_3R , le Ca^{2+} doit agir en co-agoniste avec l' IP_3 . Les IP_3R sont aussi sensibles à la concentration de Ca^{2+} sur la face luminale du RE, et une augmentation de cette concentration abaisse leur seuil d'activation (Missiaen et al., 1992a; Missiaen et al., 1991; Missiaen et al., 1992b; Tregear et al., 1991). Cette sensibilité des récepteurs dépend aussi des sous unités qui les composent (Choe et Ehrlich, 2006; Ross et al., 1992), et de leur phosphorylation. En plus de pouvoir être modulé par le Ca^{2+} et son ligand naturel, l' IP_3 , le récepteur à l' IP_3 peut être modulé par des protéines liant le Ca^{2+} (Ca^{2+} binding proteins) (Bootman et al., 2002a; Yang et al., 2002) comme la calmoduline, (Kasri et al., 2006; Patel et al., 1997), et d'autres protéines régulatrices, qui peuvent agir à la fois sur la face cytosolique et luminale des IP_3R (Choe et Ehrlich, 2006). L' IP_3R réagit au Ca^{2+} de façon biphasique : il est stimulé par le Ca^{2+} jusqu'à une certaine concentration ($>0,5 \mu\text{M}$) où il s'inactive (Finch et al., 1991). Les RyR, déjà sensibles au Ca^{2+} peuvent aussi être sensibilisés par l'ADP ribose cyclique (cADPR).

Si le RyR est capable de CICR en réponse au Ca^{2+} seul, l' IP_3R , lui nécessite une synergie du Ca^{2+} avec le messenger secondaire IP_3 . Cette propriété de CICR permet à la fois une amplification du signal, et une propagation de celui-ci le long du RE. Le RyR peut ainsi amplifier l'élévation de Ca^{2+} intracellulaire provoquée par un canal voisin, IP_3R ou RyR, et ainsi participer à la propagation du signal par le phénomène de vague régénérative ou CICR (Bootman et al., 2002a; Cancela, 2001).

4) Mécanismes de formation de signaux calciques élémentaires

Les signaux calciques observés dans les cellules sont variables dans l'espace et dans le temps. Des événements calciques élémentaires très localisés peuvent être produits par l'ouverture d'un nombre restreint de récepteurs. Ces événements calciques élémentaires, étudiés en imagerie calcique sont de deux types :

- Les « sparks », qui correspondent à l'ouverture d'un groupe de RyR, appelé « cluster » et qui ont été décrits dans le muscle cardiaques (Cannell et Soeller, 1999; Cheng et al., 1993). L'augmentation de Ca^{2+} des sparks s'étend sur environ $2 \mu\text{m}$ et est très brève, mettant 10 ms à

atteindre son maximum, puis 20 autres ms à diminuer de moitié. Cet événement peut s'arrêter de lui-même, grâce au pouvoir tampon du cytoplasme (Bootman et al., 2002b).

- Les « puffs » sont provoqués par l'ouverture d'un cluster d'IP₃R (Parker et al., 1996; Reber et Schindelholz, 1996; Yao et al., 1995). Ce sont des événements plus longs que les sparks, qui mettent 50 ms à atteindre leur maximum, et qui mettent 2 à 300 ms à disparaître (Rizzuto et Pozzan, 2006).

La coordination de ces signaux calciques élémentaires permet de former des signaux complexes et des élévations de Ca²⁺ globales par transmission du signal d'un cluster de récepteurs à ses voisins, et les vagues calciques se propagent ainsi par un mécanisme « régénératif ».

La genèse d'événements calciques élémentaires pourrait impliquer les RyR et les IP₃R dans un même cluster, comme dans les cellules musculaires de la veine porte (Boittin et al., 1998). Cette implication conjointe se retrouve également dans les cellules de pancréas exocrine (Cancela et al., 2000) où les IP₃R et les RyR existent dans le même site d'initiation du signal calcique induit par les agonistes extracellulaires.

Ainsi, le signal calcique peut être amplifié et transmis de proche en proche par ces groupes de récepteurs IP₃R et RyR, puisque le Ca²⁺ libéré par un cluster diffuse et sensibilise le cluster voisin.

5) Mécanisme d'oscillations calciques

L'accumulation et la coordination de ces petits événements calciques unitaires permet de produire des événements globaux ou complexes de type vague calcique grâce à ce phénomène régénératif de CICR (Berridge, 1997; Berridge, 2006; Cancela, 2001; Lechleiter et al., 1991; Parker et al., 1996; Rizzuto et Pozzan, 2006; Thomas et al., 1996).

Les réponses aux agonistes pourraient être expliquées par une distribution particulière des canaux libérant du Ca²⁺ ou des pompes à Ca²⁺ (Cancela, 2001; Cancela et al., 2000; Lee et al., 1997a; Lee et al., 1997b; Leite et al., 1999; Petersen et al., 1994), ainsi que par les propriétés des canaux. Ainsi, le RyR est stimulé par le Ca²⁺ en quelques millisecondes, et cette propriété d'autoamplification permet l'initiation des oscillations. Le RyR s'inactive ensuite en quelques secondes, sans pour autant devenir réfractaire à une nouvelle stimulation (Gyorke et Palade, 1994; Rizzuto et Pozzan, 2006; Zahradnik et al., 2005). De même, l'IP₃R est sensible au Ca²⁺, ce qui facilite l'initiation des oscillations (Berridge et Galione, 1988; Harootunian et al., 1991;

Thomas et al., 1996). Le phénomène de CICR permet l'amplification et la propagation des signaux calciques par les IP₃R et les RyR, et le fait que ces canaux soient inhibés par de fortes concentrations de Ca²⁺ ou par le complexe Ca²⁺/calmoduline (Adkins et Taylor, 1999; Gyorke, 1999; Taylor et Laude, 2002) participe à la formation d'oscillations lorsque l'IP₃R est stimulé par l'IP₃.

Dans certains types cellulaires, comme les cellules des glandes salivaires d'insecte, l'influx de Ca²⁺ pourrait également servir au démarrage de la réponse calcique, et au maintien du Ca²⁺ dans les réserves intracellulaires mobilisées par la réponse (Berridge, 2004). Entre deux pics, le Ca²⁺ cytosolique redevient proche de sa concentration de repos, et du Ca²⁺ extracellulaire entre, puis est pompé dans le RE où il sensibilise les IP₃R en augmentant la concentration luminale de Ca²⁺ en attendant le prochain pic (Missiaen et al., 1991; Tanimura et Turner, 1996). La vitesse d'entrée du Ca²⁺ pourrait donc être l'élément qui détermine le temps entre chaque pic calcique, et l'IP₃ provoquerait une libération de Ca²⁺ à la fois en sensibilisant ses récepteurs sur la face cytosolique, et via le Ca²⁺ luminal en favorisant le phénomène de « Store-Operated Ca²⁺ entry » (SOCE). Ainsi, dans les cellules des glandes salivaires d'insecte, le Ca²⁺ entrerait entre les pics calciques provoqués par l'IP₃ (Berridge, 1994). L'étendue spatiale de ces signaux calciques est limitée par les tampons calciques cytosoliques, et après une élévation du Ca²⁺ cytosolique, sa concentration revient à la normale par l'action de pompes calciques situés sur la membrane plasmique et sur la membrane des réserves intracellulaires (Thorn, 1996). A ce niveau, les pompes SERCA jouent un rôle important dans les oscillations, puisque la vitesse à laquelle elles re-pompent le Ca²⁺ à l'intérieur du RE va influencer sur la fréquence des oscillations en déterminant la concentration de Ca²⁺ à proximité directe des RyR et des IP₃R de la membrane du RE (Lechleiter et al., 1998; Menteyne et al., 2006; Morgan et Jacob, 1998; Petersen et al., 1991a).

Dans les cellules acineuses de pancréas exocrine, les oscillations pourraient également être expliquées par la modulation ou l'activation de mêmes récepteurs intracellulaires et protéines G (Muallem et Wilkie, 1999; Schulz et al., 1999). Ces protéines G couplent les récepteurs aux agonistes extracellulaires (Luo et al., 1999; Xu et al., 1998; Xu et al., 1999) à des enzymes comme la Phospholipase C, A2 ou D, ou encore l'adénylate cyclase (Muallem et Wilkie, 1999; Petersen et al., 1994; Schulz et al., 1999). Le couplage spécifique de ces protéines G aux récepteurs membranaires aux agonistes serait assuré par des RGS (regulators of G protein signalling) (Luo et al., 2004; Luo et al., 1999; Muallem et Wilkie, 1999; Xu et al., 1999). Ces

RGS, en modulant les protéines G liées aux récepteurs membranaires, pourraient participer aux réponses agonistes-spécifiques en permettant des productions de messagers selon un mode oscillatoire ou selon des cinétiques variées (Sneyd et al., 2006; Yamasaki et al., 2005).

6) Découverte du NAADP dans l'ovocyte d'Oursin

La découverte des messagers secondaires libérant du Ca^{2+} à partir de réserves intracellulaires IP_3 (Streb et al., 1984), cADPR (Lee et al., 1989), et finalement Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) (Lee et Aarhus, 1995) a permis de mieux comprendre comment ces signaux complexes sont générés (Figure 1).

Ces messagers se définissent à partir de plusieurs critères : ils doivent être produits en réponse à la fixation d'un agoniste extracellulaire sur son récepteur, posséder une enzyme de synthèse, une cible intracellulaire sur laquelle ils vont agir, et enfin participer à une fonction physiologique. Les messagers secondaires libérant du Ca^{2+} agissent sur des récepteurs canaux situés sur les réserves intracellulaires pour en libérer du Ca^{2+} . L' IP_3 libère du Ca^{2+} par fixation sur les IP_3R du RE, tandis que le cADPR serait un modulateur des RyRs eux aussi présents sur le RE (Berridge, 2002). Plus récemment découvert, le messenger NAADP agirait sur un récepteur qui n'a pas encore pu être cloné, mais qui est dépourvu d'activité CICR (Chini et Dousa, 1996). Les expériences pionnières sur ce messenger ont été faites dans un modèle d'invertébré, l'œuf d'oursin. Ces expériences ont permis de dégager les principales caractéristiques de la réserve sensible au NAADP. Chez l'œuf d'oursin, la réponse calcique due au NAADP n'est pas abolie par l'héparine, un inhibiteur des IP_3R , et par les antagonistes du cADPR et des RyR procaïne, ruthenium red et 8-amino cADPR (Chini et al., 1995; Lee et Aarhus, 1995; Perez-Terzic et al., 1995). De même, la vidange du RE par la thapsigargine n'abolit pas la réponse au NAADP (Churchill et al., 2002; Genazzani et Galione, 1996). Enfin, le NAADP à faible dose ne provoque pas de libération de Ca^{2+} et empêche d'autres réponses par un phénomène d'auto-désensibilisation. La réserve intracellulaire responsable des signaux calciques dus au NAADP peut donc être pharmacologiquement séparée de celle répondant à l' IP_3 et au cADPR. Ce modèle cellulaire permet aussi une stratification des organites intracellulaires par centrifugation en gradient de sucrose, ce qui a permis de montrer que les réserves mobilisées par l' IP_3 et le cADPR sont également physiquement séparées de celles mobilisées par le NAADP (Lee et Aarhus, 2000). Enfin, ces expériences de

fractionnement cellulaire ont montré que dans ces cellules, la fraction libérant du Ca^{2+} en réponse au NAADP est distincte de la fraction contenant les mitochondries, insensible à la thapsigargine, et ne présente pas de CICR, contrairement à celles mobilisées par IP_3 et cADPR.

De plus, un faisceau d'indices penche en faveur d'un récepteur spécifique au NAADP. Sa solubilisation dans l'homogénat d'œuf d'oursin montre que la protéine isolée, qui lie le NAADP, serait bien plus petite (470 kDa) que les IP_3R et RyR (respectivement 1000 et 2000 kDa) et a permis de confirmer la voie du NAADP comme étant une voie de signalisation calcique à part entière, avec enzyme de synthèse, messenger, récepteur, et réserve sensible (Berridge et al., 2002b; Bezin et al., 2006; Galione et Petersen, 2005).

Le fait que le récepteur au NAADP, par opposition aux IP_3R ou RyR , ne présente pas d'activité CICR, est un argument supplémentaire en faveur d'un récepteur indépendant (Chini et Dousa, 1996). Enfin, des expériences de binding avec du ^{32}P -NAADP dans des microsomes d'œuf d'oursin ont montré que le ^{32}P -NAADP avait un site de fixation spécifique avec un Kd de 300 pM (Berridge et al., 2002b; Patel et al., 2000). De plus, cette liaison peut être inhibée de façon compétitive par du NAADP froid, mais pas par du cADPR (Aarhus et al., 1996).

Chez l'oursin, le NAADP serait impliqué dans l'initiation du flash cortical qui se produit lors de la fécondation, et les niveaux de NAADP augmentent dans les spermatozoïdes lors de leur contact avec la gangue gélatineuse de l'œuf (Billington et al., 2002; Churchill et al., 2003). Du fait de son mécanisme original d'inactivation de son récepteur, le NAADP pourrait aussi constituer une forme de mémoire temporelle et spatiale du signal calcique chez l'oursin (Churchill et Galione, 2001). Ainsi, une inactivation locale des récepteurs par le NAADP modèlera l'aspect spatial de la réponse suivante à ce messenger. Cette forme de mémoire pourrait même se faire de façon intrinsèque au récepteur, puisque celui-ci semble pouvoir « se souvenir » du temps pendant lequel il a été exposé à son ligand (Churamani et al., 2006).

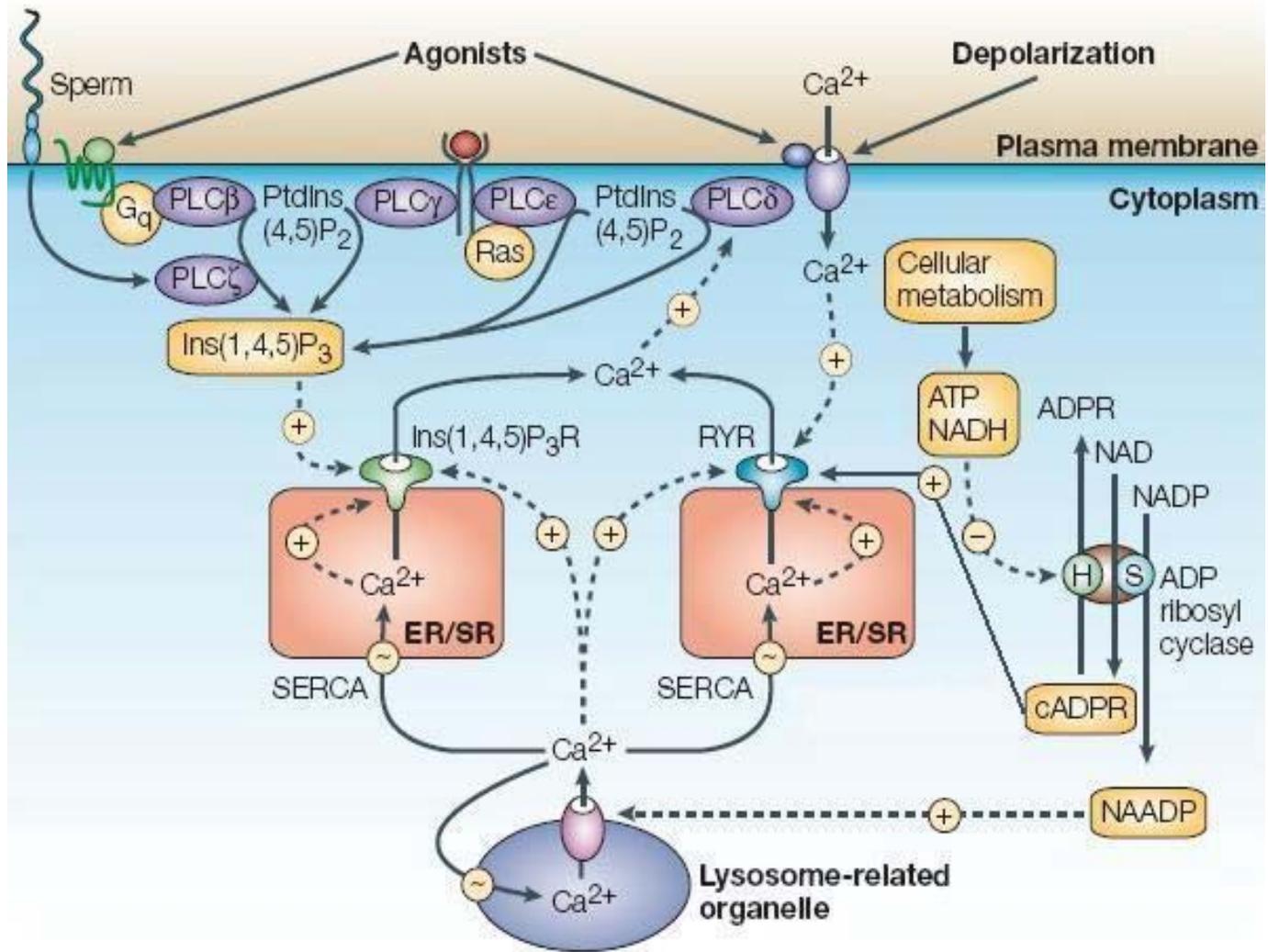


Figure 1: Les messagers intracellulaires libérant du Ca^{2+}

Le Ca^{2+} et l' IP_3 sont les deux seconds messagers classiques capables d'activer les récepteurs RyR et IP_3R . La libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires peut être provoquée par l'entrée de Ca^{2+} au travers des canaux de la membrane plasmique. L' IP_3 est produit par différentes PLC impliquées dans les différentes voies de signalisation. Le cADPR et le NAADP sont des seconds messagers découverts plus récemment. Ils sont produits par l'ADP ribosyl cyclase, qui a une activité synthase (S) et une activité hydrolase (H). Le cADPR est un modulateur de la libération de Ca^{2+} par les RyR. Le NAADP provoque la libération de Ca^{2+} d'un organite apparenté aux lysosomes en activant des récepteurs spécifiques qui n'ont pas été identifiés à ce jour. Le NAADP pourrait aussi activer des RyR du RE (d'après Berridge et al., 2003).

7) Implication du NAADP dans les cellules de mammifère

Depuis la découverte du NAADP comme messenger secondaire libérant du Ca^{2+} dans le pancréas exocrine, de nombreux auteurs ont étudié son implication possible dans différents systèmes cellulaires. Il a ainsi pu être montré que le NAADP libérait du Ca^{2+} dans de nombreux types cellulaires et que la voie du NAADP était impliquée dans différents processus physiologiques, comme la poussée neuritique, les réponses aux hormones et aux neurotransmetteurs, et la sécrétion d'insuline (Brailoiu et al., 2005; Cancela et al., 2003; Cancela et al., 1999; Cancela et al., 2000; Cancela et al., 2002; Lee, 2003; Masgrau et al., 2003; Patel et al., 2001). Les mécanismes de synthèse du NAADP seront discutés en détail dans la deuxième partie de cette thèse.

Dans les cellules acineuses de pancréas exocrine, le NAADP à 50 nM provoque des oscillations calciques nécessitant des IP_3R et des RyR fonctionnels, et est impliqué dans les oscillations calciques induites par l'hormone cholécystokinine (CCK) (Cancela, 2001; Cancela et al., 2000). Le NAADP est également impliqué dans les élévations de Ca^{2+} dues au glucose dans les cellules Bêta du pancréas endocrine (Masgrau et al., 2003; Mitchell et al., 2003).

Dans les lymphocytes T, l'injection de NAADP provoque des oscillations calciques, même en présence d'antagonistes de l' IP_3 et du cADPR, et l'inactivation de sa voie par auto-désensibilisation bloque la réponse à la formation du complexe TCR/CD3 (Berg et al., 2000). Dans ce type cellulaire, une entrée de Ca^{2+} participe à la réponse au NAADP (Langhorst et al., 2004), tout comme dans les œufs d'étoile de mer (Moccia et al., 2003).

Dans les lymphocytes T, les RyR seraient impliqués directement dans la réponse au NAADP, car l'inhibiteur des RyR Ruthenium Red et le « knock down » du gène des RyR de type 3 provoque l'abolition des pics calciques en réponse au NAADP, avec toutefois une élévation lente du Ca^{2+} intracellulaire (Berg et al., 2000; Dammermann et Guse, 2005).

Dans les microsomes de muscle cardiaque, le NAADP se fixe et libère du Ca^{2+} (Bak et al., 2001). La libération de Ca^{2+} en réponse au NAADP a aussi pu être montrée dans des microsomes préparés à partir de cellules mésangiales de rein (Yusufi et al., 2001) et

d'hépatocytes (Mandi et al., 2006), suggérant là aussi un rôle du NAADP dans l'homéostasie calcique de ces cellules.

Dans le système nerveux, le NAADP a des sites de fixation dans tout le cerveau, distincts de ceux de l'IP₃ et du cADPR, avec une fixation plus forte dans la medulla, le mésencéphale, le thalamus, et dans une moindre mesure, dans le cortex (Patel et al., 2000). De plus, les membranes de cerveau sont capables de synthétiser et de dégrader le NAADP, et les microsomes de cerveau libèrent du Ca²⁺ en réponse à l'application de NAADP (Bak et al., 1999).

Dans les neurones néocorticaux en culture, le NAADP administré via des liposomes provoque une libération de Ca²⁺ à partir d'une réserve acide, et peut, avec l'IP₃ et le cADPR potentialiser l'effet du sérum et du NGF sur la croissance des neurites (Brailoiu et al., 2005). Le NAADP pourrait provoquer la différenciation Ca²⁺-dépendante des cellules de la lignée PC12 en neurones (Brailoiu et al., 2006), et serait aussi impliqué dans la neurotransmission chez l'aplysie (Chameau et al., 2001) et la grenouille (Brailoiu et al., 2001).

Dans les cellules gliales et les neurones corticaux, l'application extracellulaire de 10 à 100 µM de NAADP induit des signaux calciques variables, allant de l'élévation globale aux oscillations, et ce, de façon réversible. Le mécanisme d'action du NAADP appliqué de façon extracellulaire n'est pas clairement établi, mais le temps de latence nécessaire suggère que le NAADP est internalisé et agit de manière intracellulaire, mobilisant des réserves de type lysosome et également des réserves thapsigargine-sensibles, ainsi qu'une entrée de Ca²⁺ extracellulaire (Heidemann et al., 2005).

Il a aussi été suggéré que dans les astrocytes de l'hippocampe, l'application extracellulaire de NAADP agirait plutôt par activation des récepteurs purinergiques, enclenchant de fait une signalisation intracellulaire par l'IP₃, et de façon indépendante des réserves acides intracellulaires (Singaravelu et Deitmer, 2006).

Pour d'autres auteurs, dans une lignée de leucocytes basophiles, l'application extracellulaire de NAADP, même à faibles doses, est suivie d'une internalisation du messenger et déclencherait des oscillations calciques (Billington et al., 2006).

8) Réserves intracellulaires de calcium

Pour constituer une réserve de Ca^{2+} intracellulaire directement mobilisable par les second messagers, un organelle doit avoir un mécanisme de remplissage pour pomper le Ca^{2+} à l'intérieur; des protéines tampons pour séquestrer le Ca^{2+} , comme la calséquestrine et la calréticuline, et enfin un ou plusieurs récepteurs-canaux de libération comme les IP_3R ou les RyR (Figure 1).

Le RE, en plus de son rôle dans la synthèse de protéines (Palade, 1975; Wileman et al., 1991) constitue le principal réservoir de Ca^{2+} intracellulaire, et est porteur des RyR et des IP_3R (Berridge, 2002; Burdakov et al., 2005; Petersen et al., 1993; Rizzuto et Pozzan, 2006). Son remplissage et le maintien du Ca^{2+} à l'intérieur du lumen est assuré par des pompes SERCA (Sarcoplasmic-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase)(Foletti et al., 1995; MacLennan et al., 1992) dont l'activation dépend de la concentration de Ca^{2+} dans le lumen du RE (Berridge et al., 2003; Mogami et al., 1998) .

L'activité de ces pompes SERCA peut être inhibée par un alcaloïde végétal, la thapsigargine (Lytton et al., 1991; Thastrup, 1990). Comme le réticulum endoplasmique perd du Ca^{2+} en permanence (Thastrup, 1990), il peut être vidé par un traitement à la thapsigargine et est donc qualifié de réserve « thapsigargine-sensible ». Cette fuite de Ca^{2+} permanente se ferait à travers le pore du translocon qui se comporterait comme un canal de fuite (Flourakis et al., 2006; Lomax et al., 2002; Van Coppenolle et al., 2004).

Maintien de la concentration de Ca^{2+} dans le RE

Lors des réponses calciques, les réserves intracellulaires sont partiellement vidées, et pour maintenir la concentration de Ca^{2+} dans ces réserves, il existe des mécanismes pour permettre leur re-remplissage (Berridge, 2004; Clapham, 1995; Parekh et Putney, 2005). Cet aspect de la signalisation calcique a été surtout étudiée dans le cas de l' IP_3 , qui libère du Ca^{2+} à partir du RE, et il existe plusieurs hypothèses pour expliquer cette entrée de Ca^{2+} dans le cytoplasme et qui va permettre de recharger les réserves :

l'une appelée SOCE (Store Operated Ca^{2+} entry) où des canaux de la membrane plasmique, les SOC (store operated channels)(Gill et al., 1996; Parekh et Penner, 1997; Parekh et Putney,

2005) s'ouvrent en réponse à la vidange du RE et laissent entrer du Ca^{2+} extracellulaire qui est ensuite pompé dans le RE.

L'activation de ces SOC pourrait se faire par l'intermédiaire d'un messager, le Calcium Influx Factor (CIF), produit par le RE quand il se vide, mais l'identité de ce CIF n'a pas pu être précisée (Bolotina et Csutora, 2005). D'autres canaux laissant entrer du Ca^{2+} extracellulaire sont qualifiés de SMOC (Second messenger operated channels), comme les ARC (Arachidonate activated channel) (Shuttleworth et al., 2004) qui sont activés par l'acide arachidonique produit par la phospholipase A2 lors de la stimulation par agoniste (Mignen et al., 2005). Les canaux proposés comme étant des SOC sont les canaux cationiques TRP (transient receptor potential) (Ambudkar et al., 2006), et les CRAC (Ca^{2+} release activated channel), bien qu'aucun TRP ne corresponde exactement aux caractéristiques des SOCE (Clapham, 2003; Nilius, 2004; Parekh, 2006). En effet, les TRP peuvent se comporter à la fois comme des SOC et des SMOC, ce qui complique l'identification de leur rôle physiologique (Bolotina et Csutora, 2005; Vanden Abeele et al., 2004).

La superfamille des TRP compte de nombreux membres (Woodard et al., 2007), qui sont classés en sept sous-familles notés TRPC (pour canonical), TRPM (Melastatin), TRPV (Vanilloid), TRPA, TRPP (Polycystin), TRPML (mucolipin), et TRPN. Les TRP ont une spécificité variable pour le Ca^{2+} et peuvent être activés par des stimulus variés, comme la température et les stimuli mécaniques (TRPV, TRPA), ou par des ligands. Par exemple, les TRPC peuvent être modulés par le PIP2, le DAG produit par la PLC, et être inhibés par le Ca^{2+} (Woodard et al., 2007). Le TRPM2 s'ouvrirait en réponse à la fixation de cADPR, d'ADPRibose, du NAD^+ , et d' H_2O_2 (Fliegert et al., 2007; Kolisek et al., 2005; Togashi et al., 2006). La participation des TRP dans le phénomène de SOCE impliquerait surtout les TRPC (Woodard et al., 2007).

Une autre hypothèse pour expliquer l'activation de l'entrée de Ca^{2+} est appelée « couplage conformationnel » et propose une interaction du RE avec la membrane plasmique via les IP_3R (Irvine, 1990; Putney, 1986; Wedel et al., 2003) au niveau d'une zone de jonction où le RE et la membrane plasmique sont physiquement proches (Huser et al., 1999). Là, l' IP_3 pourrait directement activer des IP_3R couplés aux canaux d'entrée de Ca^{2+} extracellulaire et ainsi provoquer l'entrée de Ca^{2+} dans le RE. Une autre possibilité est que l' IP_3 agit sur des IP_3R non couplés mais très proches de la zone de jonction, provoquant une vidange localisée du RE, en déclenchant ainsi un mécanisme de SOCE (Berridge, 2004). Les TRPC pourraient être

les canaux membranaires qui participent à l'entrée de Ca^{2+} par couplage conformationnel avec les IP_3R du RE (Treves et al., 2004).

Autres réserves calciques intracellulaires

En plus du RE, d'autres organites ont été proposés comme étant capables de stocker du Ca^{2+} et d'en libérer en réponse à une stimulation.

Les mitochondries sont capables de capter du Ca^{2+} cytosolique, puis de le libérer progressivement, participant ainsi à la signalisation calcique (Hajnoczky et al., 1995; Jouaville et al., 1995; Park et al., 2001; Rizzuto et Pozzan, 2006; Tinel et al., 1999).

En dehors du RE et des mitochondries, les réserves intracellulaires de Ca^{2+} sont mal connues. L'appareil de Golgi serait lui aussi une réserve calcique qui serait mobilisable par l' IP_3 dans les cellules Hela en réponse à une stimulation par l'histamine (Missiaen et al., 2004; Pinton et al., 1998).

Les vésicules de sécrétion contiennent d'importantes quantités de Ca^{2+} (Nicaise et al., 1992) et pourraient le libérer en réponse aux messagers IP_3 , cADPR, et NAADP comme cela a été suggéré dans plusieurs types cellulaires (Gerasimenko et al., 2006; Mitchell et al., 2003; Quesada et al., 2001). Par exemple, il a été montré dans les cellules Bêta du pancréas endocrine que le NAADP pouvait provoquer des oscillations calciques (Johnson et Misler, 2002), en libérant du Ca^{2+} à partir des vésicules de sécrétion d'insuline, (Mitchell et al., 2003).

Les lysosomes ont aussi été proposés comme étant des réserves calciques mobilisables, notamment par le NAADP (Churchill et al., 2002; Kinnear et al., 2004; Menteyne et al., 2006; Srinivas et al., 2002; Yamasaki et al., 2004).

Enfin, l'enveloppe nucléaire, située en continuité avec le RE, répond aux messagers secondaires (Alonso et al., 2006; Malviya et Klein, 2006; Malviya et al., 1990; Santella et Carafoli, 1997), et cette réserve serait thapsigargine-sensible (Gerasimenko et al., 2003a; Gerasimenko et al., 2003b; Petersen et al., 1998).

La distribution cellulaire de ces organites et leur équipement en récepteurs aux messagers secondaires et en pompes de remplissage, participerait au modelage des réponses calciques (Lee, 2004; Lee et al., 1997a; Lee et al., 1997b; Leite et al., 2002; Leite et al., 1999).

Ainsi, la localisation des différents types de canaux d'influx de Ca^{2+} sur la membrane plasmique, des pompes d'extrusion, et l'existence de réserves intracellulaires de Ca^{2+} variées pouvant être recrutées par des messagers devraient permettre d'expliquer la variété et la complexité des réponses calciques observées (Bootman et al., 2002b; Cancela, 2001; Cancela et al., 2002; Galione et Churchill, 2002; Lee, 2000; Lee, 2004).

B) La signalisation calcique dans les cellules acineuses de pancréas exocrine

Le pancréas est une glande allongée qui contient deux tissus: le pancréas endocrine, représenté par les îlots de Langerhans et qui a un rôle essentiel dans la régulation de la glycémie en sécrétant l'insuline et le glucagon; et le pancréas exocrine, qui est responsable de la synthèse et de la sécrétion des enzymes digestives (Palade, 1975). Le pancréas exocrine est constitué de cellules sécrétrices organisées en acini. Ces cellules sont hautement polarisées, avec un pôle apical sécréteur formant le lumen des acini, et un pôle basolateral au contact du milieu intérieur. Le « jus » pancréatique est libéré dans le canal pancréatique (de Wirsung) et se déverse dans le duodénum au niveau de l'ampoule de Vaters. La sécrétion de ces enzymes digestives se fait sous contrôle nerveux et hormonal dans le cadre de la digestion (Konturek et al., 2003).

1) La cellule acineuse de pancréas, un bon modèle d'étude des signaux calciques

La cellule acineuse de pancréas exocrine est un excellent modèle pour l'étude de la signalisation calcique, et des messagers impliqués. En effet, ces cellules présentent des réponses calciques variées sur le plan spatio-temporel, et les réponses calciques dépendent presque exclusivement de réserves intracellulaires de Ca^{2+} (Cancela, 2001; Petersen et al., 1994). Dans ces cellules, les deux principaux agonistes, le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) et l'hormone CCK déclenchent des signaux calciques complexes et stimulent la sécrétion d'enzymes digestives par exocytose des granules de zymogène au niveau de la membrane apicale (Maruyama et Petersen, 1994; Palade, 1975) (Figure 2). Cette exocytose a pu être mesurée par dosage des enzymes pancréatiques (Rinderknecht et al., 1979; Valentijn et al., 1999), par mesure de la capacitance de la membrane plasmique (Maruyama, 1989), et par des mesures optiques (Giovannucci et al., 1998; Nemoto et al., 2001). Cette exocytose se fait à des endroits préférentiels de la membrane, et les granules éloignés de la membrane peuvent fusionner avec ceux qui y sont déjà accrochés, à la manière d'un collier de perles, pour libérer leurs enzymes dans le lumen (Nemoto et al., 2001). Le cytosquelette d'actine est

également impliqué dans le cycle exocytose-endocytose qui a lieu au niveau de la membrane apicale (Muallem et al., 1995; Turvey et Thorn, 2004; Valentijn et al., 1999).

Les études en imagerie montrent que les réponses calciques à l'ACh et à la CCK sont initiées au niveau d'un seul site apical, où seraient rassemblés les récepteurs à l'IP₃, au NAADP et au cADPR (Cancela et al., 2000; Cancela et al., 2002; Kasai et Augustine, 1990; Thorn et al., 1994; Thorn et al., 1993), et il est maintenant admis que les messagers coopèrent pour générer les signaux calciques complexes qui accompagnent les différentes fonctions physiologiques (Bezin et al., 2006; Cancela et al., 2003; Cancela et al., 1999; Cancela et al., 2000; Cancela et Petersen, 2002; Gerasimenko et al., 2006; Yamasaki et al., 2004; Yamasaki et al., 2005).

2) Des réponses agonistes-spécifiques

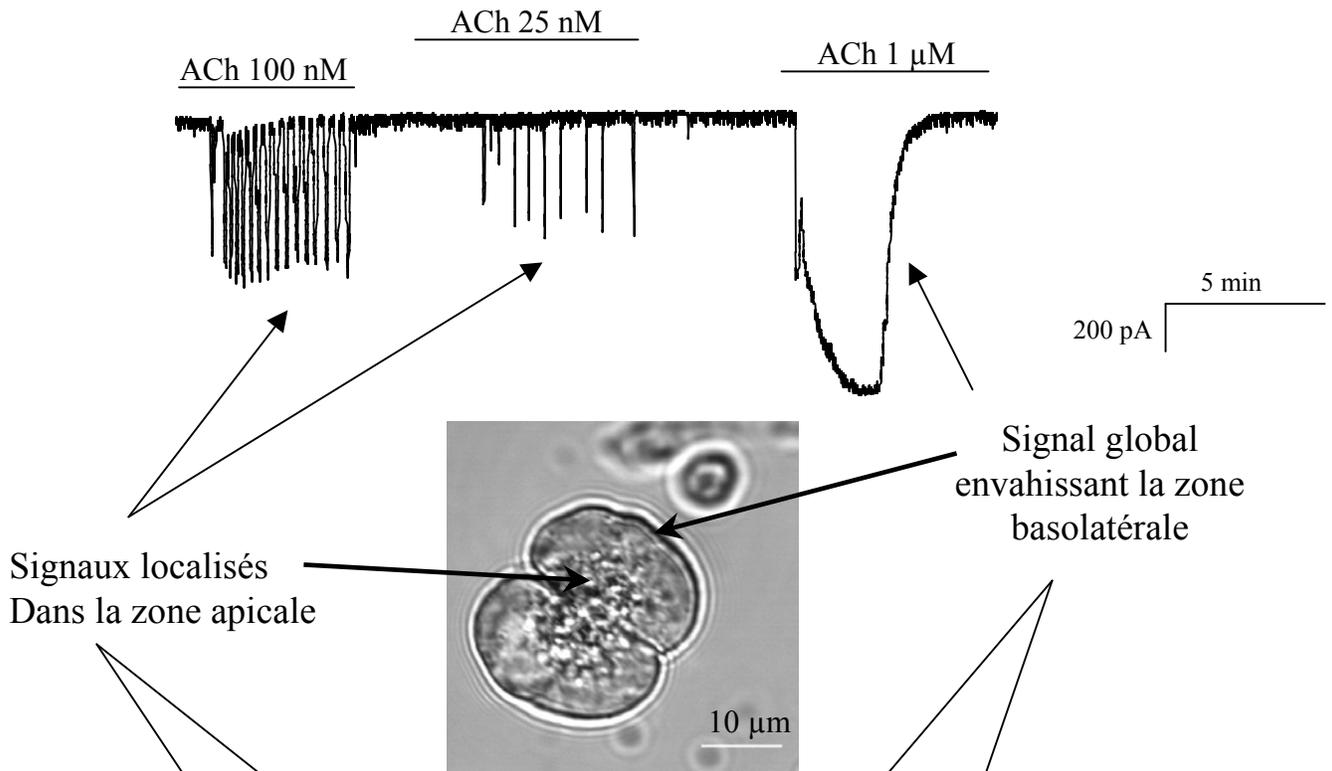
Les signaux calciques impliqués sont agoniste-spécifiques (Petersen et al., 1991a; Yule et al., 1991), et les deux agonistes extracellulaires stimulent la sécrétion d'enzymes digestives. Ces signaux calciques peuvent être localisés ou globaux, et le type de réponse calcique est conditionné par l'agoniste et par sa concentration (Figure 2):

A faibles doses (25 nM), l'ACh induit des oscillations calciques localisées (Petersen et al., 1991b; Thorn et al., 1993; Yule et al., 1991), tandis que la CCK (doses physiologiques : 1-10 pM) provoque des oscillations localisées avec de temps à autre une vague globale (Petersen et al., 1991b; Thorn et al., 1993). A de plus fortes concentrations, les deux agonistes provoquent des augmentations globales de Ca²⁺ dans les cellules. Ce modèle cellulaire a notamment permis la découverte de l'implication de l'IP₃ dans la réponse à l'ACh (Streb et al., 1984; Streb et al., 1985), et du rôle de messenger du NAADP dans les cellules de mammifère par son implication dans la réponse à la CCK (Cancela et al., 1999).

Les réponses de type oscillations calciques courtes sont cantonnées dans la zone sécrétrice en position apicale des cellules (Petersen et al., 1994). Le confinement du signal calcique est dû à la barrière mitochondriale qui ceinture la partie apicale (Park et al., 2001; Tinel et al., 1999)(Figure 3A). En effet, les mitochondries peuvent prévenir la diffusion du Ca²⁺ en le stockant pour le libérer plus tard et de manière lente (Jouaville et al., 1995; Pozzan et al., 1994; Rizzuto et Pozzan, 2006; Rutter et Rizzuto, 2000; Thomas et al., 2006; Tinel et al., 1999), et permettent ainsi de maintenir le signal calcique dans la zone apicale (Johnson et al., 2002; Park et al., 2001; Tinel et al., 1999) où il va permettre l'exocytose des granules de zymogène (Giovannucci et al., 1998; Maruyama et al., 1993).

Les signaux globaux sont de longue durée, initiés dans cette même zone apicale (Kasai et Augustine, 1990), et se transmettent à l'ensemble de la cellule en formant une vague calcique pour gagner la partie basolatérale.

A



B

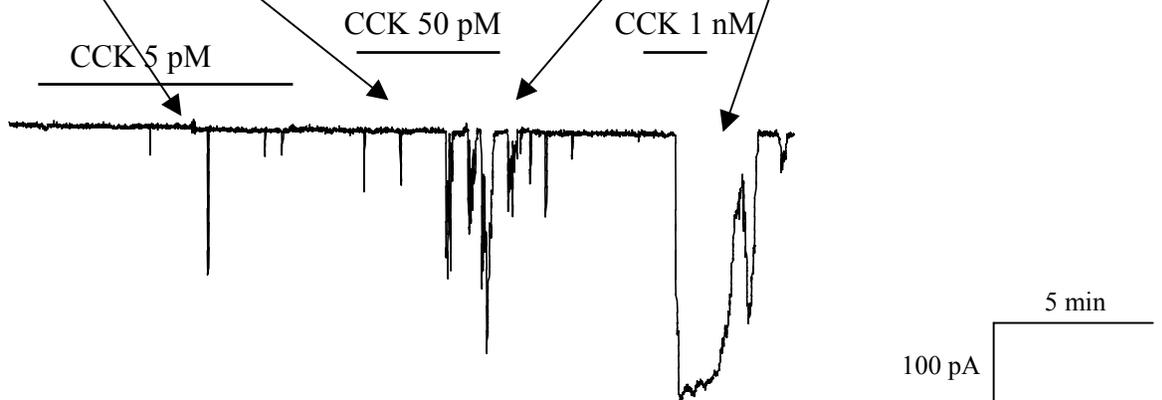


Figure 2: Oscillations calciques induites par différentes doses d'agonistes dans les cellules acineuses de pancréas exocrine

Enregistrements par la technique du patch-clamp en mode cellule entière des variations du Ca^{2+} cytosolique. Les agonistes ACh (A) et CCK (B) induisent des oscillations calciques initiées dans la zone apicale. A faible doses d'agoniste (25 nM ACh, 1-10 pM CCK), ce signal calcique reste restreint dans cette zone apicale, tandis qu'à des doses plus fortes, les agonistes provoquent un signal calcique global qui envahit toute la cellule.

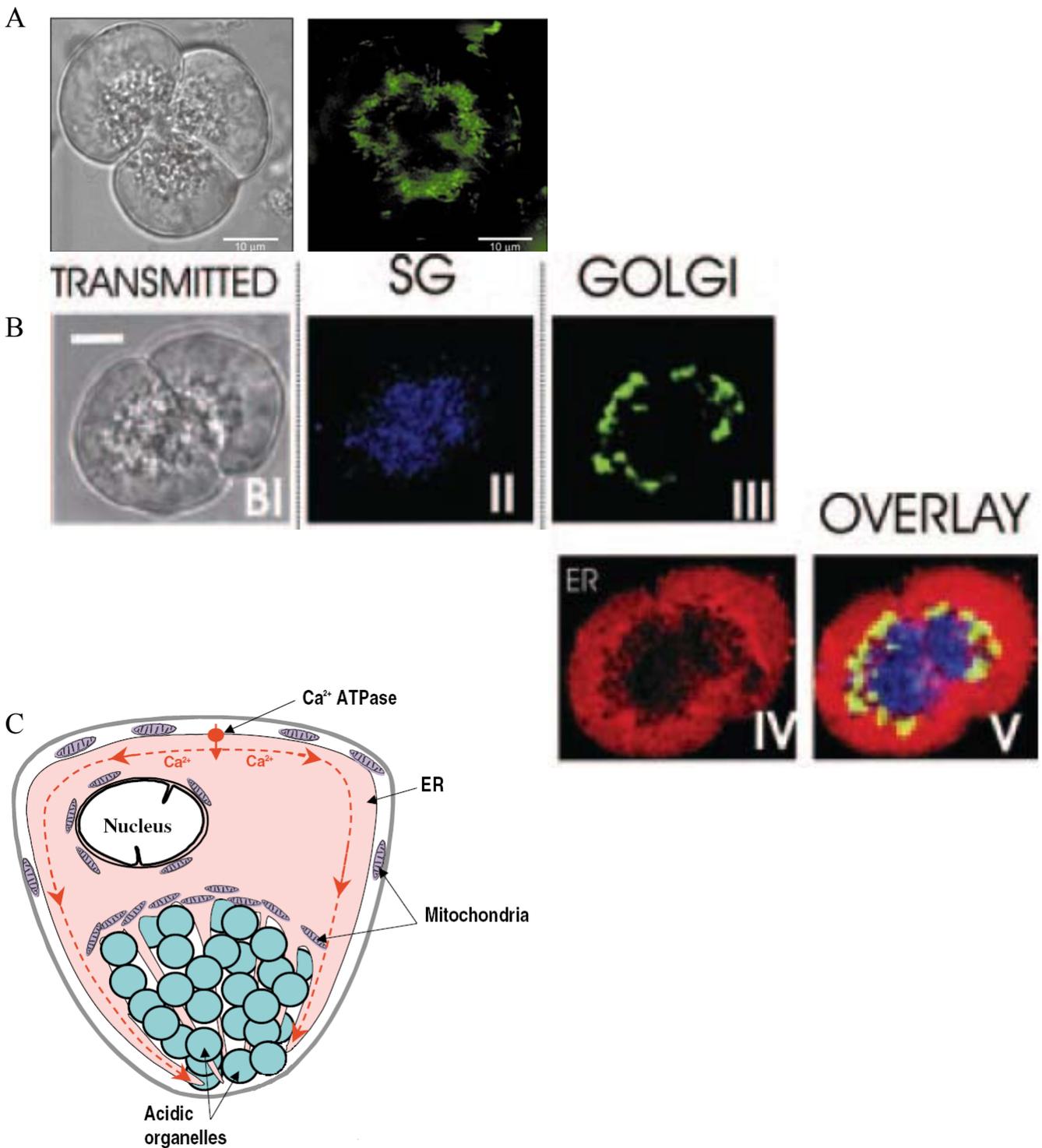


Figure 3: Le modèle cellule acineuse de pancréas exocrine

La dissociation des acini permet d'obtenir des doublets et triplets de cellules de pancréas exocrine. Le marquage des différents organites intracellulaires montre l'organisation très polarisée de ces cellules.

A. Doublet de cellules et distribution des mitochondries en vert (D'après Tinel et al., 1999).

B. En bleu, les granules de sécrétion dans la région apicale; en vert, l'appareil de golgi; en rouge, le RE, (d'après Dolman et al., 2005). Cette organisation polarisée est très importante dans l'organisation spatiale et temporelle des signaux calciques.

C. Schéma récapitulant l'organisation des principaux organites intracellulaires (D'après Gerasimenko et al., 2006).

a) Réponses à l'ACh

L'ACh est produite et libérée par le système nerveux entérique (Konturek et al., 2003). Elle agit sur des récepteurs muscariniques de type M3, et ces récepteurs peuvent être en état de faible ou forte affinité pour ce ligand, ce qui modifie la réponse fonctionnelle (Williams et al., 1993). Le récepteur à l'ACh est couplé via des protéines G, à la phospholipase C (PLC), qui hydrolyse du phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) de la membrane plasmique et produit de l'IP₃ et du diacyl glycérol (DAG) (Berridge, 1993; Berridge, 2005).

L'IP₃ va agir sur ses récepteurs (IP₃R) situés sur les fins prolongements du réticulum endoplasmique qui pénètrent la zone apicale et provoquer des oscillations calciques (Cancela et al., 2000; Mogami et al., 1997; Park et al., 2000; Petersen et al., 1994; Streb et al., 1984; Thorn et al., 1994; Thorn et al., 1993).

Parallèlement, la PI₃ kinase produit du PIP₃ qui pourrait inhiber l'activité des pompes SERCA (Fischer et al., 2004). En plus de l'IP₃, la réponse à l'ACh implique le cADPR et les RyR (Cancela, 2001; Cancela et al., 2002; Fukushi et al., 2001; Yamasaki et al., 2005). Le cADPR provoque des oscillations calciques dans le pancréas exocrine et a pour cible les RyR (Thorn et al., 1994), mais sa présence n'est pas indispensable aux oscillations calciques localisées induites par l'ACh (Cancela et al., 2000; Cancela et al., 1998). Il serait plutôt impliqué dans les réponses globales (Cancela et al., 2002).

Les travaux sur d'autres types cellulaires montrent que le cADPR agirait comme un modulateur de ces RyR (Galione et al., 1991; Lee, 1997; Meszaros et al., 1993), même si son mode d'action n'est pas clairement défini. Seuls les RyR de type II et III sont sensibles au cADPR, mais pas le RyR de type I (Guse et al., 1999; Lee, 1997; Meszaros et al., 1993; Sonnleitner et al., 1998).

Plus récemment, l'implication du cADPR dans les réponses à l'ACh a été confirmée par la mise en évidence d'un lien entre la stimulation des récepteurs cholinergiques et la synthèse endogène de cADPR (Fukushi et al., 2001; Yamasaki et al., 2005).

b) Réponses à la CCK

La CCK est produite par les cellules endocrines de l'intestin grêle et les neurones du tractus gastro-intestinal (Liddle, 1997; Petersen et al., 1994).

il existe deux types de récepteurs à la CCK, A et B et ce sont tous les deux des récepteurs couplés à des protéines G. La forme A est présente dans le pancréas exocrine de souris et dans le cerveau et est peu sensible à la gastrine. La forme B, également appelé récepteur à la gastrine est couplée à la voie de l'IP₃ et est présente dans le cerveau et dans le pancréas exocrine de certaines espèces, comme le porc ou le chien, mais pas chez le rat et la souris (Clerc et al., 2002; Saillan-Barreau et al., 1998).

Dans le pancréas exocrine de souris, seul le récepteur à la CCK de type A est présent, et il possède deux sites de fixation d'affinités différentes. Il a été suggéré que le site de haute affinité commanderait les oscillations calciques, la synthèse de protéines et la sécrétion d'enzymes tandis que le site de basse affinité qui est activé lors d'une stimulation par une forte dose d'agoniste (100 pM-1 nM) provoquerait la synthèse d'IP₃ (Matozaki et al., 1990), une forte élévation de Ca²⁺ intracellulaire, et inhiberait ainsi la sécrétion. Cependant, il n'y a pas de synthèse d'IP₃ lorsque les cellules sont stimulées par des doses physiologiques de CCK (1-10 pM), bien que les IP₃R soient impliqués dans les oscillations calciques induites. En effet, le blocage des IP₃R par l'héparine inhibe les réponses calciques à la CCK. La CCK active également d'autres voies de signalisation, comme la voie des MAP kinases, et des tyrosines kinases cytosoliques (Daulhac et al., 1999; Tapia et al., 1999). Il est aussi notable que la CCK induit la croissance pancréatique (Yamamoto et al., 2003).

La voie du cADPR est également recrutée dans les oscillations calciques induites par la CCK (Cancela et al., 2000; Cancela et Petersen, 1998; Cancela et al., 2002; Yamasaki et al., 2005). En effet, le traitement des cellules avec un antagoniste spécifique du cADPR, comme le 8-amino cADPR (Walseth et Lee, 1993) inhibe les réponses à des doses physiologiques de CCK (Cancela et Petersen, 1998). Cependant, l'injection de cADPR dans les cellules ne mime pas les oscillations calciques induites par la CCK, ce qui suggère l'existence d'un autre messager. L'observation des effets du glucose sur la signalisation calcique a permis d'avancer dans la compréhension des messagers impliqués. En effet, à 300 µM, le glucose stimule les réponses à l'IP₃, et inhibe celles du cADPR, sans toutefois abolir la réponse à la CCK (Cancela et al., 1998). Comme la synthèse d'IP₃ n'est pas suffisante pour expliquer les réponses à la CCK, un autre messager devait être impliqué dans l'initiation apicale des oscillations calciques induites par la CCK. Ce constat a amené à la découverte du rôle du NAADP dans les cellules de pancréas exocrine (Cancela et al., 1999).

3) Maintien de la concentration de Ca^{2+} dans le cytoplasme

Lors d'oscillations calciques induites par des agonistes, le Ca^{2+} libéré est pour une part pompé dans le RE par les SERCA, et pour une autre part expulsé vers l'extérieur de la cellule (Mogami et al., 1998; Petersen et al., 1993; Petersen, 2003) par les PMCA de la membrane apicale (Belan et al., 1996; Lee et al., 1997a; Tepikin et al., 1992; Thorn et al., 1993). Ainsi, les oscillations calciques initiées dans la partie apicale peuvent y rester confinées, sans provoquer de surcharge calcique.

La technique de la micro-goutte, qui consiste à placer les cellules dans une micro-goutte de milieu extracellulaire sans Ca^{2+} et contenant une sonde calcique a permis de montrer, que à chaque pic calcique évoqué par les agonistes CCK et ACh correspondait une rapide extrusion de Ca^{2+} par les PMCA de la membrane apicale, et que ces pompes jouaient donc un rôle important dans le retour à une concentration de Ca^{2+} intracellulaire basale entre chaque pic calcique (Tepikin et al., 1992). Cette extrusion de Ca^{2+} a lieu au niveau du pôle apical, quelle que soit l'étendue spatiale du signal calcique (Belan et al., 1997) et n'est pas due à l'exocytose des granules de zymogène, puisque la majorité de ces granules restent en place lors des stimulation par agoniste (Belan et al., 1996). De plus, l'extrusion de Ca^{2+} dans le lumen des acini est suffisante pour y élever la concentration de Ca^{2+} , ce qui pourrait faciliter l'endocytose, qui ne peut se faire en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire (Belan et al., 1997; Maruyama, 1989; Maruyama et al., 1993)

4) Un nouveau messager atypique impliqué dans la réponse à la CCK, le NAADP

La capacité du NAADP à libérer du Ca^{2+} a été pour la première fois décrite dans les oeufs d'oursin (Chini et al., 1995; Lee, 1997; Lee et Aarhus, 1995; Perez-Terzic et al., 1995), et le NAADP est maintenant considéré comme le plus puissant des seconds messagers libérant du Ca^{2+} (Bezin et al., 2006; Cancela, 2001; Cancela et al., 2003; Lee, 2001; Lee, 2003; Patel et al., 2001), car il est actif à de très faibles doses (de l'ordre du nM, contre μM pour l' IP_3 et le cADPR).

Contrairement aux cellules d'invertébré où de faibles doses de NAADP inhibent son récepteur, dans les cellules de mammifère, le NAADP présente une activité biphasique : à

faibles doses (50 nM), il induit des oscillations calciques, tandis qu'à fortes doses (μM) il ne provoque aucune activité calcique, sans pour autant affecter les réponses au cADPR ou à l' IP_3 (Cancela et al., 1999). Cette propriété d'auto-désensibilisation du récepteur au NAADP par de fortes doses de NAADP a permis de mettre en évidence son implication dans la réponse à la CCK (Cancela, 2001; Cancela et al., 1999; Cancela et al., 2000; Cancela et al., 2002), qui a depuis été confirmée par la mise en évidence d'un lien entre la stimulation des récepteurs à la CCK et la synthèse de NAADP et de cADPR (Yamasaki et al., 2005). Ces études sur le rôle du NAADP dans la signalisation calcique ont fait de la cellule de pancréas exocrine le modèle idéal pour l'étude de ce messager dans les cellules de mammifère.

Lors des réponses à la CCK, le NAADP coopérerait donc avec les récepteurs intracellulaires à d'autres messagers, comme les IP_3R et les RyR . En effet, l'inhibition pharmacologique des IP_3R ou des RyR suffit à inhiber les oscillations calciques induites par la CCK et le NAADP (Figure 4).

Le lien entre les récepteurs à l'ACh et à la CCK, et les enzymes synthétisant les messagers cADPR et NAADP est mal connu, même s'il existe des évidences de production de cADPR par l'antigène de surface CD38 dans le cas d'une stimulation par l'ACh (Fukushi et al., 2001). Plusieurs modèles d'action du NAADP ont été proposés. L'un est dit « one pool model » et propose que le NAADP libère du Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique, tout comme l' IP_3 et le cADPR (Cancela et al., 2000); l'autre, est dit « two pool model » et propose que le NAADP libère du Ca^{2+} à partir d'une réserve distincte, et que ce Ca^{2+} va ensuite agir sur le réticulum endoplasmique (Cancela et al., 2003; Yamasaki et al., 2004) (Figure 4).

Si le RE reste la principale réserve de Ca^{2+} mobilisée au cours d'une stimulation par la CCK dans ce modèle, le NAADP serait l'élément déclencheur en libérant du Ca^{2+} à partir de compartiments acides. Ce Ca^{2+} entraînerait ensuite une libération plus large via le phénomène de CICR sur les RyR et IP_3R de la membrane du RE, en synergie avec l'action du cADPR. Cependant, l'identité réelle de la réserve répondant au NAADP est encore sujet de controverse, puisque les granules de zymogène (Gerasimenko et al., 2006), et les lysosomes (Menteyne et al., 2006; Yamasaki et al., 2004) ont été décrits comme pouvant libérer du Ca^{2+} en réponse au NAADP (Figure 4).

A

	ACh	CCK	IP ₃	cADPR	NAADP
Thapsigargine	●	●	●	●	●
Héparine	●	●	●	●	●
Ryanodine	●	●	●	●	●
8 NH ₂ cADPR	○	●	○	●	●
NAADP (μM)	○	●	○	○	●

● Inhibition
○ Pas d'effet

B

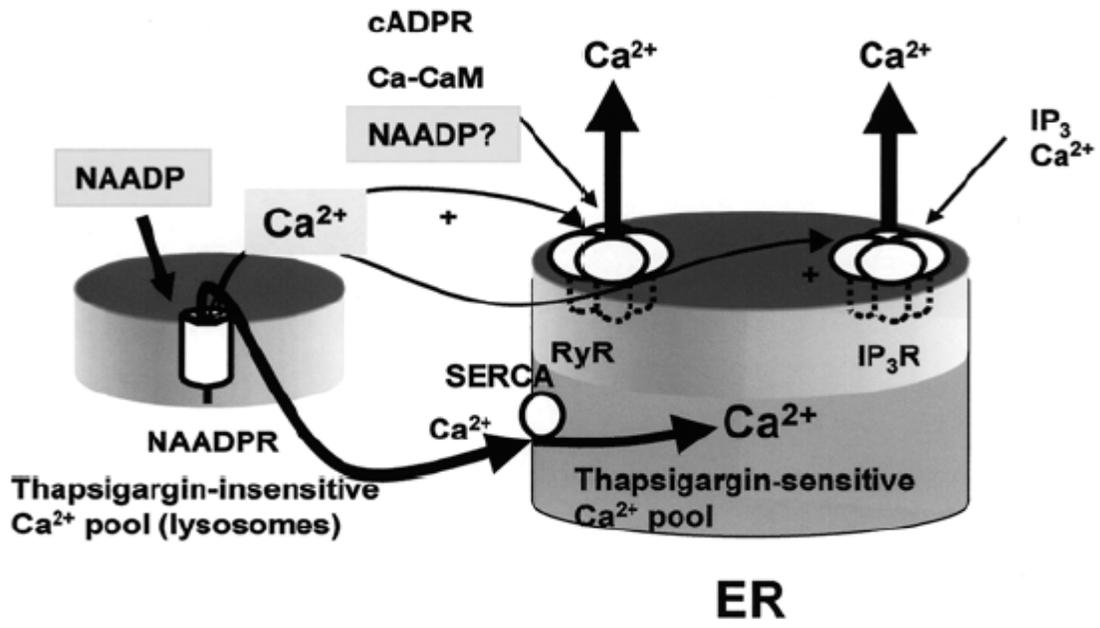


Figure 4: Pharmacologie des messagers et agonistes dans les cellules acineuses de pancréas exocrine et « two pool model »

A. Caractéristiques pharmacologiques des réponses calciques induites par les agonistes et les messagers dans les cellules de pancréas exocrine.

B. Le « two pool model » proposé pour la signalisation calcique des messagers (d'après Cancela et al., 2003).

5) Genèse des signaux calciques complexes par coopération des messagers intracellulaires dans le pancréas exocrine

L'existence de plusieurs messagers et de plusieurs réserves intracellulaires de Ca^{2+} pose la question d'une possible coopération de ces messagers, et du recrutement sélectif des différentes réserves de Ca^{2+} . La complexité et la variété des signaux calciques générés par les agonistes, à la fois sur le plan temporel et spatial ne peut être expliquée par la simple action d'un messager sur une réserve intracellulaire de Ca^{2+} . En effet, l'injection de messagers seuls ne permet de reproduire que partiellement les oscillations calciques localisées induites par les agonistes. Par contre, l'injection simultanée de plusieurs messagers permet d'obtenir des signaux calciques plus proches de ceux déclenchés par les agonistes (Cancela et al., 1999; Cancela et al., 2000; Cancela et al., 2002; Thorn et al., 1994; Thorn et al., 1993). Par exemple, il a pu être montré une potentialisation de la réponse à l'ACh par la CCK, via l'action du cADPR, ce qui suggère une coopération des messagers lors des réponses aux agonistes (Cancela et Petersen, 2002; Cancela et al., 2002; Lee, 2004). Les expériences de dosage des seconds messagers montrent que les réponses aux agonistes utilisent plusieurs messagers, avec la réponse à l'ACh qui implique la synthèse des messagers IP_3 et cADPR, et la réponse à la CCK implique la synthèse des messagers NAADP et cADPR. Tout indique qu'une coopération de ces messagers est essentielle pour produire une réponse adaptée à chaque agoniste (Bezin et al., 2006; Cancela et al., 2003; Yamasaki et al., 2005).

6) Caractéristiques des différentes réserves intracellulaires impliquées dans la signalisation

L'organisation polarisée de ces cellules joue un rôle important dans le modelage des réponses calciques en permettant des événements très localisés. La perte de la polarité cellulaire par l'inactivation du gène codant pour le facteur de transcription Mist1, impliqué dans la polarité cellulaire, provoque une perte des signatures calciques, avec des élévations de Ca^{2+} globales à la place d'oscillations localisées (Luo et al., 2005).

Les récepteurs IP_3R et RyR présentent une distribution polarisée dans le pancréas exocrine. Alors que les IP_3R sont très présents dans la partie très proche de la membrane apicale (Lee et al., 1997b; Nathanson et al., 1994), la « trigger zone » où sont initiées les réponses calciques (Cancela et al., 2000; Kasai et al., 1993; Thorn et al., 1993), les RyR, eux aussi présents sur le

RE et plus sensibles au CICR, ont une plus forte densité dans la partie basolatérale de la cellule (Fitzsimmons et al., 2000; Leite et al., 1999; Straub et al., 2000). Cette organisation permet à un signal initié dans la zone apicale, là où sont présents à la fois les IP₃R et les RyR de pouvoir envahir toute la cellule par CICR sur les RyR, une fois la barrière mitochondriale franchie (Ashby et al., 2002; Ashby et al., 2003; Cancela et al., 2000; Cancela et al., 2002; Krause et al., 2002; Leite et al., 2002; Leite et al., 1999; Straub et al., 2000).

Ainsi, la partie apicale de la cellule est à la fois la « trigger zone », c'est à dire le lieu où sont initiées les réponses calciques (Cancela et al., 2000; Kasai et al., 1993; Thorn et al., 1993), et le lieu de l'exocytose des granules de sécrétion. Les récepteurs à l'ACh et la CCK sont tous les deux en position apicale, à proximité des jonctions serrées qui relient les cellules entre elles, donc proches du lieu d'initiation des réponses calciques (Shin et al., 2001). Cette partie apicale est remplie de granules de sécrétion, aussi appelés granules de zymogène (Gerasimenko et al., 1996a), et de lysosomes (Figure 3B). Ces deux types de vésicules sont acides et ont été proposées comme pouvant libérer du Ca²⁺ (Gerasimenko et al., 1996a; Gonzalez et al., 1997; Menteyne et al., 2006; Yamasaki et al., 2004).

L'aspect spatial des réponses calciques étant très important dans les fonctions physiologiques, il est logique de s'intéresser à l'identité des réserves impliquées, qui peuvent participer à la régionalisation des réponses calciques. Ces réserves intracellulaires de Ca²⁺ sont :

a) Le réticulum endoplasmique

La principale source de Ca²⁺ intracellulaire est constituée par le RE, dont une partie très sensible à l'IP₃ est apicale, représentée par les fins prolongements, tandis que sa majeure partie, en position basolatérale est surtout équipée de RyR sensibles au Ca²⁺ et au cADPR (Figure 3B).

Les RyR et les IP₃R sont situés principalement sur le RE. Pour pouvoir franchir la barrière mitochondriale, le signal calcique initié apicalement se propage le long du RE vers la zone basolatérale. Les RyR répondant au cADPR et localisés le long du RE (Fitzsimmons et al., 2000; Leite et al., 1999; Straub et al., 2000), permettent au signal initié dans la zone apicale d'être propagé à toute la cellule par CICR sur ces RyR, qui sont sensibilisés par le cADPR (Cancela et al., 2002).

Il a aussi été proposé que le NAADP agisse sur les RyR, ce qui impliquerait une libération de Ca²⁺ à partir du réticulum endoplasmique (Gerasimenko et al., 2006; Hohenegger et al., 2002; Mojzisova et al., 2001).

Contrairement à d'autres types cellulaires où il a été suggéré que le RE présenterait des compartimentalisations (Montero et al., 1997), le RE des cellules de pancréas exocrine qui est principalement localisé dans la partie basolatérale des cellules, est en complète continuité physique avec la zone apicale, via les fins prolongements du RE basolatéral qui pénètrent la partie apicale. En effet, des expériences de mesure du Ca^{2+} intra-RE et de photolyse UV de Ca^{2+} cagé montrent que le Ca^{2+} peut circuler librement et rapidement dans le RE entre les différentes parties de la cellule, comme dans un tunnel (Mogami et al., 1997; Park et al., 2000).

La libération de Ca^{2+} à partir du RE lors d'une stimulation par des doses physiologiques d'agoniste ne provoque pas de baisse importante de la concentration de Ca^{2+} dans la lumière du RE (Park et al., 2000), et seule une stimulation à des doses pharmacologiques provoque une perte substantielle de Ca^{2+} du RE (Park et al., 2000). Or, le Ca^{2+} libéré ne peut pas être totalement re-capté par les SERCA, car il est extrudé plus rapidement par les PMCA de la membrane apicale (Lee et al., 1997a; Mogami et al., 1998). Pour ne pas que les réserves calciques intracellulaires s'épuisent, les sorties de Ca^{2+} doivent donc être compensées par des entrées. De plus, la concentration de Ca^{2+} à l'intérieur du RE doit être maintenue élevée pour permettre la synthèse des protéines (Berridge, 2002; Bootman et al., 2002b; Michalak et al., 2002; Wileman et al., 1991). Le Ca^{2+} entre donc dans la cellule dans la partie basolatérale par un phénomène de SOCE (Krause et al., 1996; Mogami et al., 1997; Parekh et Penner, 1997; Putney, 1986).

Le Ca^{2+} , après son entrée passe dans le RE basal grâce à des ATPases de type SERCA (Mogami et al., 1997; Mogami et al., 1998). Ces ATPases sont surtout situées dans la partie basolatérale, avec une distribution polarisée des différents sous types de SERCA : le sous type SERCA 2a situé dans le pôle apical, et les sous types SERCA 2b et 3 dans la partie basolatérale de la cellule. Cette distribution des différents sous types de SERCA pourrait aussi jouer un rôle dans l'initiation et la propagation des vagues calciques (Zhao et al., 2001). Une fois dans le RE, le Ca^{2+} transite jusqu'à la zone apicale grâce à la continuité du RE (Mogami et al., 1997; Park et al., 2000), et ce sans être capté par les mitochondries qui ceinturent la zone apicale (Tinel et al., 1999). Ainsi, le Ca^{2+} utilisé pour les réponses calciques dans la zone apicale est rapidement remplacé par celui provenant de la zone basolatérale.

Les mitochondries situées sous la membrane plasmique jouent aussi un rôle dans l'influx de Ca^{2+} , leur pouvoir tampon leur permettant de retarder l'inactivation des canaux de SOCE par

le Ca^{2+} entrant (Gilabert et Parekh, 2000; Hoth et al., 1997; Mogami et al., 1997; Parekh et Penner, 1997; Park et al., 2001; Thomas et al., 2006). De plus, la production d'ATP est modulée par le Ca^{2+} (Jouaville et al., 1999; Rutter et Rizzuto, 2000), ce qui suggère que les mitochondries aident au remplissage du RE (Dolman et al., 2005) en produisant l'ATP nécessaire au fonctionnement des SERCA (Glitsch et al., 2002).

b) Les réserves acides

Il a été montré que la dissipation de gradient de protons dans les réserves calciques intracellulaires des cellules de pancréas exocrine, inhibait la libération de Ca^{2+} induite par la CCK (Gonzalez et al., 1997; Menteyne et al., 2006), le NAADP (Menteyne et al., 2006; Yamasaki et al., 2004), mais aussi par l'ACh et l' IP_3 (Menteyne et al., 2006; Titievsky et al., 1996), ce qui suggère une intervention de réserves acides en plus du RE dans les réponses aux agonistes (Gerasimenko et al., 1996a). Ces réserves de type acide ont un remplissage assuré par un échangeur proton/ Ca^{2+} non identifié, et le gradient de protons serait produit par une ATPase pompe à protons de type vacuolaire (v-ATPase) (Gonzalez et al., 1997; Yamasaki et al., 2004). Contrairement au RE, ce type de réserve ne fuit pas.

Les lysosomes

Les Lysosomes situés dans la zone apicale, à proximité de la trigger zone, constituent un compartiment acide et il a été montré chez les invertébrés qu'ils constituaient une réserve calcique mobilisable par le NAADP (Churchill et al., 2002). Dans le cas du pancréas exocrine, les travaux de Yamasaki et collègues suggèrent également un rôle des lysosomes dans les réponses calciques (Yamasaki et al., 2004). L'implication des lysosomes dans la réponse au NAADP est toutefois discutée (Gerasimenko et al., 2006).

Les granules de zymogène

L'autre compartiment acide présent dans la zone apicale est le granule de zymogène (Figure 3B). Ces vésicules acides contiennent les enzymes digestives sous forme inactivée (principalement trypsinogène, chymotrypsinogène, lipase pancréatique et amylase) qui sont libérées dans le lumen par une exocytose Ca^{2+} dépendante lors d'une stimulation par les sécrétagogues.

Ces granules contiennent d'importantes quantités de Ca^{2+} (Clemente et Meldolesi, 1975; Nakagaki et al., 1984; Nicaise et al., 1992). En isolant ces organites, l'équipe de Petersen a montré que ces vésicules acides étaient insensibles à la thapsigargine, mais libéraient du Ca^{2+} en réponse à l' IP_3 et au cADPR (Gerasimenko et al., 1996a). Ces auteurs ont aussi estimé la concentration de Ca^{2+} dans les granules isolés à 50 μM . La présence de ces organites au niveau de la trigger zone et leur propriété à libérer du Ca^{2+} en réponse à l' IP_3 suggère donc un rôle dans l'initiation de la réponse calcique à l'ACh (Gerasimenko et Tepikin, 2005; Gerasimenko et al., 1996a) en plus des IP_3R des prolongements du RE. Lors des réponses aux agonistes, le cADPR pourrait activer, en plus des RyR du RE, ceux situés sur les granules de Zymogène (Gerasimenko et al., 2006; Gerasimenko et al., 1996a), même si le mode d'action du cADPR, modulateur ou agoniste direct de ces récepteurs, n'est pas clairement établi (Galione et al., 1991; Guse, 2005; Guse et al., 2001; Lee et al., 1994). De plus, l'équipe de Gerasimenko propose que les granules de zymogène (Gerasimenko et al., 2006), et non les lysosomes, soient la réserve libérant du Ca^{2+} en réponse au NAADP, et il existe donc une controverse sur l'identité réelle de la réserve calcique répondant au NAADP (Menteyne et al., 2006; Yamasaki et al., 2004).

c) L'enveloppe nucléaire

Dans la partie basolatérale des cellules se trouve un autre organite, en continuité avec le RE, et qui pourrait libérer du Ca^{2+} en réponse aux messagers, l'enveloppe nucléaire (Gerasimenko et al., 1996b). Le Ca^{2+} contenu dans l'enveloppe nucléaire peut être libéré dans le nucléoplasme en réponse aux messagers IP_3 , cADPR et NAADP, grâce à des récepteurs RyR et IP_3R situés sur sa membrane interne (Adebanjo et al., 1999; Alonso et al., 2006; Gerasimenko et al., 2003a; Gerasimenko et al., 1995; Humbert et al., 1996; Petersen et al., 1998). Le noyau est cependant très bien protégé des variations de Ca^{2+} intracellulaire par la barrière mitochondriale, qui tend à restreindre le signal calcique à la partie apicale, mais aussi grâce aux mitochondries péri-nucléaires, qui peuvent absorber du Ca^{2+} cytosolique (Johnson et al., 2002; Park et al., 2001; Tinel et al., 1999).

Generation of specific Ca²⁺ signals from Ca²⁺ stores and endocytosis by differential coupling to messengers

Menteyne, A. Burdakov, A. Charpentier, G. Petersen, O. H. Cancela, J. M.

Current Biology 2006 oct. 10;16(19):1931-7

7) Présentation de l'article et Objectifs

Les modalités du recrutement des réserves calciques intracellulaires par les messagers libérant du Ca^{2+} au cours des stimulations par des agonistes, ainsi que leurs interactions sont encore mal connues. En effet, l'existence de plusieurs messagers et de plusieurs réserves intracellulaires de Ca^{2+} pose la question d'une possible coopération de ces messagers, et du recrutement sélectif des différentes réserves de Ca^{2+} . Au cours de mon doctorat, je me suis attaché à étudier le mode d'action des messagers libérant du Ca^{2+} IP_3 , cADPR et NAADP dans les cellules acineuses de pancréas exocrine, ainsi que leur implication dans les réponses calciques aux agonistes extracellulaires ACh et CCK. Il existe de nombreuses réserves intracellulaires de calcium susceptibles d'être recrutées dans le cadre des oscillations calciques provoquées par les agonistes extracellulaires. La question se pose donc de leurs interactions possibles, du rôle de chacune dans ces oscillations (initiation, maintien, amplification), et du poids relatif de ces réserves dans les réponses aux messagers.

Pour étudier ces phénomènes, nous avons vidangé individuellement les réserves intracellulaires de Ca^{2+} à l'aide d'agents pharmacologiques spécifiques, et mesuré l'impact de cette vidange sur les réponses aux agonistes et aux messagers. Ainsi, le RE a été progressivement vidé par effet de la thapsigargine, les lysosomes par le Gly-Phe-Beta Naphtylamide (GPN), et les réserves acides dans leur ensemble par la bafilomycine.

Afin d'étudier une possible intervention du Ca^{2+} extracellulaire, les expériences sur les messagers ont été réalisées à la fois en présence et absence de Ca^{2+} extracellulaire. Les résultats de ces expériences nous ont ensuite poussés à étudier le rôle possible de l'endocytose dans la genèse des oscillations calciques. En effet, bien que le remplissage des réserves acides comme les lysosomes et les granules de sécrétion puisse se faire par endocytose, le rôle de celle ci dans la genèse des signatures calciques n'a jamais été étudié.

Dans cette étude, nous avons taché de rester le plus proche possible des conditions physiologiques, et les expériences sur les messagers secondaires IP_3 , cADPR et NAADP ont été faites par la technique du patch-clamp en configuration cellule entière, qui permet d'enregistrer les courants Cl^- , index des variations de Ca^{2+} intracellulaire, et de perfuser les

messagers dans les cellules, sans avoir à les perméabiliser, tout en conservant le caractère oscillatoire des réponses.

Les expériences sur les oscillations calciques provoquées par les agonistes extracellulaires à concentration physiologique et ne nécessitant pas de patcher les cellules ont été réalisées par la technique de l'imagerie calcique en microscopie confocale.

Nos travaux révèlent que les oscillations calciques induites par les différents agonistes nécessitent tous l'interaction de réserves calciques acides et du RE, mais dans des proportions différentes. La CCK et l'ACh recrutent du Ca^{2+} des réserves acides par des mécanismes différents: la CCK recrute les lysosomes via le NAADP et les granules de zymogène par le cADPR, tandis que l'ACh les recrute via le Ca^{2+} et l' IP_3 respectivement. Nous apportons ici des données pharmacologiques indiquant que l'endocytose est cruciale pour la genèse des oscillations calciques induites par les agonistes, ainsi que par les messagers NAADP et IP_3 . Nous montrons aussi que les oscillations induites par le cADPR sont très dépendantes du RE. Enfin, nous proposons que les différents messagers calciques commandent les signatures calciques spécifiques des agonistes en contrôlant l'équilibre entre les différentes réserves acides, l'endocytose, et le RE.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue Current Biology d'octobre 2006 dont le manuscrit est reproduit ici.

C) Matériels et méthodes I : Méthodes utilisées dans l'article Current Biology

1) Préparation des cellules acineuses de pancréas exocrine

Afin d'obtenir des cellules de pancréas exocrine isolées et utilisables en patch-clamp et imagerie, nous procédons à la séparation de celles-ci à partir du pancréas entier.

Les souris CD1 mâles de 8 à 12 semaines sont sacrifiées par dislocation cervicale, et leur pancréas prélevé et maintenu dans une solution extracellulaire froide (tampon sodium-hepes, composition en mM : 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 Glucose, 10 HEPES; pH 7,2 ajusté par NaOH). Le pancréas est alors injecté à la seringue avec 1 ml d'une solution de collagénase (type I, Sigma) à 50-200 unités/ml et incubé 8 à 10 minutes au bain-marie à 37°C. Cette digestion enzymatique permet de dégrader le collagène maintenant les cellules en acini, et est arrêtée par lavage du pancréas avec de la solution extracellulaire froide. Le tissu pancréatique est alors placé dans un tube de 14 ml avec 3 ml de solution extracellulaire et dissocié par une série d'agitations vigoureuses. Le surnageant, qui contient les cellules dissociées est collecté. Après avoir répété plusieurs fois l'opération, on collecte environ 13 ml de suspension de cellules. Cet amas de cellules acineuses exocrines est alors centrifugé 2 min à 800 g pour éliminer le surnageant, qui contient les débris cellulaires et des hématies. Le culot est alors re-suspendu dans de la solution extracellulaire, et les cellules en amas sont alors séparées par environ 100 passages successifs dans une pipette, et les déchets cellulaires à nouveau éliminés par centrifugation (Cancela et al., 2002; Thorn et al., 1993).

Les cellules re-suspendues dans 3 ml de solution extracellulaire sont alors soit mises à incuber avec une sonde calcique pour l'imagerie, soit directement utilisées pour les expériences de patch-clamp.

2) Imagerie calcique en microscopie confocale

a) Utilisation des sondes calciques

Pour étudier la signalisation calcique en réponse aux agonistes, nous utilisons des sondes fluorescentes sensibles au Ca²⁺. Cette technique permet de visualiser la propagation des

vagues calciques dans les cellules et de mesurer les variations de la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol.

Principe de fonctionnement

Lorsqu'une molécule fluorescente est illuminée par une source d'excitation dont la longueur d'onde ou la gamme de longueur d'onde se situe dans le spectre d'absorption de la sonde, celle-ci passe à un niveau excité en absorbant l'énergie apportée par les photons. Le retour à l'état d'énergie fondamentale se fait en restituant une partie de l'énergie absorbée sous forme lumineuse et le reste sous forme d'énergie vibrationnelle.

La perte d'énergie par vibration est due notamment aux changements de conformation de la sonde fluorescente, aux collisions avec d'autres molécules, et aux interactions avec le solvant qui se produisent pendant la durée de l'état excité.

Ainsi, l'énergie ré-émise par fluorescence est toujours inférieure à l'énergie absorbée, et la ré-émission lumineuse, qui constitue la fluorescence, se fait dans une gamme de longueurs d'onde plus élevée. Le décalage entre les longueurs d'onde d'absorption et d'émission (Loi de Stokes) permet de séparer les lumières d'excitation et d'émission à l'aide de filtres appropriés.

La Sonde calcique Fluo-4 AM

Les sondes calciques fluorescentes sont constituées d'un chélateur de Ca^{2+} , souvent dérivé de l'EGTA, et d'un fluorophore. Lorsque le Ca^{2+} se lie à la sonde, la sonde change de conformation et sa fluorescence augmente. Par conséquent, plus il y a du Ca^{2+} dans le cytoplasme d'une cellule, plus il se lie à la sonde, et plus la fluorescence de la sonde augmente.

Ce type de sonde doit pouvoir :

- être spécifique de l'ion Ca^{2+}
- avoir une distribution homogène dans le cytosol des cellules chargées
- ne pas avoir tendance à fuir ou à compartimentaliser
- avoir une affinité pour le Ca^{2+} compatible avec les concentrations de Ca^{2+} qu'on veut mesurer
- avoir un rendement quantique suffisant pour permettre la détection de l'énergie ré-émise et ne pas modifier l'homéostasie calcique des cellules par son pouvoir chélateur de Ca^{2+}

- Avoir une réponse linéaire en fonction de la concentration calcique
- Avoir une cinétique de réponse compatible avec les réponses étudiées
- Avoir une faible sensibilité aux variations de l'environnement cytosolique (pH, force ionique, ...)

La sonde Fluo4 est une sonde mono-excitation, mono-émission, excitable dans le visible et sa longueur d'onde d'émission est de 516 nm. Son Kd est de 345 nM. La charge des cellules se fait avec la forme estérifiée de la sonde (Acetomethyl Ester, AM). Cette forme est lipophile et elle peut donc traverser les membranes.

les cellules sont chargées 40 minutes à température ambiante dans l'obscurité avec 7 μM de Fluo-4 AM (3,5 μl de sonde à 1 mM dans 500 μl de suspension cellulaire). La sonde passe dans le cytosol des cellules, et le groupement AM qui a permis à la sonde de traverser la membrane, est scindé par les estérases cytosoliques.

A la fin de l'incubation, une centrifugation de 2 min à 800 g, suivie d'une resuspension des cellules dans 1 ml de solution extracellulaire permet de laver la sonde en excès.

La sonde est excitée à 488 nm avec un laser Ar/Kr, et la fluorescence émise est collectée à 516 nm.

La sonde calcique Mag-Fluo-4 AM

Le Mag-Fluo-4 AM est un analogue du Fluo-4 avec une faible affinité pour le Ca^{2+} (Kd= 22 μM). Sa longueur d'onde d'absorption est de 493 nm, et son émission est collectée à 517 nm.

Dans nos expériences, nous avons incubé les cellules avec 5 μM de Mag-Fluo-4 AM pendant 40 minutes pour mesurer les variations de Ca^{2+} dans le RE.

La sonde LysoTracker Red

Le LysoTracker Red est constitué d'un fluorophore liée à une base faible qui lui permet de s'accumuler dans les compartiments acides, et notamment les lysosomes. Cette sonde est perméante et existe en plusieurs versions, qui varient par leur longueur d'onde d'émission.

Afin de pouvoir suivre la destinée des lysosomes tout en mesurant les variations de Ca^{2+} intracellulaire, nous avons utilisé le LysoTracker Red. Pour marquer les lysosomes, les cellules sont mises à incuber avec 0,1 μM de sonde LysoTracker Red pendant 5 minutes, puis lavées.

La sonde LysoTracker Red est excitée à 543 nm par un laser Gre/Ne, et la fluorescence émise est collectée à 590 nm.

b) Acquisition et traitement des images

Une fois préparées, les cellules de pancréas exocrines sont chargées avec une sonde, et les enregistrements d'imagerie réalisés avec un microscope confocal inversé Leica TCS SP2 RS. Pour cela, les cellules sont déposées sur une lamelle de verre ayant subi un « coating » avec de la poly L lysine, afin d'assurer l'adhérence des cellules. Cette lamelle est collée sous une chambre d'incubation dans laquelle est perfusée la solution extracellulaire, les agonistes et les agents pharmacologiques grâce à un système de perfusion mû par gravité et par une pompe péristaltique. Les cellules sont observées sous le microscope confocal avec un objectif à immersion 63X à eau ou 40X à huile. Le microscope confocal permet de choisir les longueurs d'onde d'excitation et de collecte en fonction de la sonde utilisée. Une première acquisition d'image permet de définir des zones d'intérêt dans les cellules. Le module « physiologie » du logiciel Leica permet alors la mesure de la fluorescence des sondes dans ces zones d'intérêt et leur représentation sous la forme de graphes de fluorescence en fonction du temps. Les courbes sont ensuite normalisées en divisant la fluorescence émise par la fluorescence émise à T_0 (F/F_0). Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante.

3) Enregistrements électrophysiologiques des variations du calcium intracellulaire

La technique du patch-clamp est une technique d'électrophysiologie permettant l'enregistrement de signaux électriques à partir de cellules ou de portions de membrane (Hamill et al., 1981).

a) Principe de la technique du patch-clamp

Une microélectrode en verre est appliquée contre la membrane de la cellule et une légère succion lui permet de se coller contre celle-ci. Ce scellement très étroit correspond à la

configuration « cellule attachée », et la résistance électrique de la jonction pipette-membrane plasmique est de l'ordre du Giga-Ohm. Cette configuration permet de mesurer les courants produits par les canaux situés sous la microélectrode. Partant de cette configuration, on peut, par une succion brève, arracher la membrane située sous la microélectrode, sans perdre le scellement, et on passe ainsi en configuration « cellule entière ». La configuration cellule entière met en continuité la solution à l'intérieur de la microélectrode (appelé milieu intracellulaire ou intrapipette) avec le cytoplasme de la cellule, ce qui permet de mesurer des courants trans-membranaires globaux résultant de l'activité de l'ensemble des canaux membranaires activés.

b) Dispositif expérimental

Pour les expériences de patch clamp, les cellules sont patchées sous un microscope Leica D MIRE2 ou Zeiss Axiovert 100. Les courants enregistrés par la technique du patch clamp en configuration cellule entière sont amplifiés par un amplificateur List Medical EPC-7 dans le cas du microscope Leica, ou par un amplificateur Biologic RK-300 dans le cas du microscope Zeiss.

En plus du microscope inversé, le dispositif expérimental comprend :

- une table anti-vibrations et une cage de Faraday
- un système de perfusion pour la solution extracellulaire et les drogues ou agonistes
- une électrode de référence située dans la chambre de perfusion
- une microélectrode de patch contenant la solution intracellulaire et un fil d'argent chloruré et qui est déplacée à l'aide d'un micromanipulateur
- un amplificateur
- un convertisseur analogique/numérique (Axon instruments)
- Un ordinateur disposant du logiciel d'acquisition Clampex 9 (Axon instruments)

Les microélectrodes utilisées sont obtenues en étirant des capillaires de verre borosilicaté (Clark) avec une étireuse horizontale Sutter P87, et ont une résistance de 2-3 Méga-Ohms

c) Protocole expérimental

Une fois préparées, les cellules de pancréas exocrines sont déposées sur une lamelle de verre ayant subi un « coating » avec de la poly L lysine, afin d'assurer l'adhérence des cellules. Cette lamelle est collée sous une chambre d'incubation dans laquelle est perfusée la solution extracellulaire, les agonistes et les agents pharmacologiques grâce à un système de perfusion mû par gravité et par une pompe péristaltique.

Une fois mises en place, la microélectrode est approchée de la cellule à l'aide du micromanipulateur. Le scellement se fait toujours sur la partie basolatérale des cellules. Après être passé en configuration cellule entière, l'enregistrement des courants peut commencer.

Les cellules acineuses de pancréas exocrine possèdent sur leur membrane apicale des canaux Chlore (Cl^-) qui sont activés par le Ca^{2+} . La mesure de ces courant Cl^- peut donc être utilisée comme un index des variations cytosoliques de calcium.

La solution intra pipette est composée (en mM) de 140 KCl, 1,13 MgCl_2 , 0,1 EGTA, 10 HEPES; 2 ATP pH 7,2 ajusté par KOH. Un autre avantage de la technique du patch clamp en configuration cellule entière est qu'elle permet de diffuser des messagers secondaires directement dans le cytoplasme des cellules, via le milieu intra-pipette. Ce milieu intra-pipette a pu, selon les expériences, contenir les messagers intracellulaires IP_3 , NAADP ou cADPR, afin de les diffuser dans les cellules. L' IP_3 a été utilisé à 2-10 μM , le cADPR à 10 μM et le NAADP à 50 nM.

Lors des expériences avec les cellules acineuses de pancréas exocrine en configuration cellule entière, nous avons utilisé la méthode du potentiel imposé, qui permet de mesurer les courants Cl^- . Le potentiel des cellules est maintenu à -30 mV, potentiel transmembranaire de ces cellules, avec des sauts de potentiel à 0 mV, potentiel d'équilibre du chlore et des cations qui diffusent à travers les canaux cationiques non sélectifs Ca^{2+} -dépendants.

Au potentiel de -30 mV, les courants mesurés correspondent aux courants Cl^- dépendants du Ca^{2+} , et qui sont largement majoritaires dans ce type cellulaire. Ces courants Cl^- reflètent les variations de la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol. Cette technique permet donc de suivre les variations de Ca^{2+} cytosoliques en réponse à un agoniste extracellulaire ou un messenger.

Les sauts de potentiel en -30 mV à 0 mV permettent la mesure des courants de fuite et de contrôler l'état de la cellule en visualisant sur l'oscilloscope un courant capacitif correspondant à la charge et à la décharge de la capacité membranaire résultant du courant délivré par l'amplificateur. Toutes les expériences de patch clamp ont été réalisées à température ambiante.

Generation of Specific Ca^{2+} Signals from Ca^{2+} Stores and Endocytosis by Differential Coupling to Messengers

Alexis Menteyne,¹ Anton Burdakov,²
Gilles Charpentier,^{1,3} Ole H. Petersen,²
and Jose-Manuel Cancela^{1,*}

¹Centre National de la Recherche Scientifique
Institut de Neurobiologie Alfred Fessard—FRC2118
Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire
et Moléculaire—UPR9040
Gif sur Yvette F-91198
France

²Medical Research Council Secretary
Control Research Group
The Physiological Laboratory
University of Liverpool
P.O. Box 147
Crown Street
Liverpool L69 3BX
United Kingdom

³Laboratoire de Physiologie animale
Faculté des Sciences
Université de Picardie Jules Verne
33 rue Saint Leu
80018 Amiens Cedex
France

Summary

It remains unclear how different intracellular stores could interact and be recruited by Ca^{2+} -releasing messengers to generate agonist-specific Ca^{2+} signatures. In addition, refilling of acidic stores such as lysosomes and secretory granules occurs through endocytosis, but this has never been investigated with regard to specific Ca^{2+} signatures. In pancreatic acinar cells, acetylcholine (ACh), cholecystokinin (CCK), and the messengers cyclic ADP-ribose (cADPR), nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP), and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) evoke repetitive local Ca^{2+} spikes in the apical pole. Our work reveals that local Ca^{2+} spikes evoked by different agonists all require interaction of acid Ca^{2+} stores and the endoplasmic reticulum (ER), but in different proportions. CCK and ACh recruit Ca^{2+} from lysosomes and from zymogen granules through different mechanisms; CCK uses NAADP and cADPR, respectively, and ACh uses Ca^{2+} and IP_3 , respectively. Here, we provide pharmacological evidence demonstrating that endocytosis is crucial for the generation of repetitive local Ca^{2+} spikes evoked by the agonists and by NAADP and IP_3 . We find that cADPR-evoked repetitive local Ca^{2+} spikes are particularly dependent on the ER. We propose that multiple Ca^{2+} -releasing messengers determine specific agonist-elicited Ca^{2+} signatures by controlling the balance among different acidic Ca^{2+} stores, endocytosis, and the ER.

Results and Discussion

Role of the ER in the Generation of Ca^{2+} Spikes

Recent studies indicate that agonist-evoked specific Ca^{2+} signals are generated through interactions of several intracellular receptors and their respective Ca^{2+} -releasing messengers such as IP_3 , cADPR, and NAADP [1–7]. A two-pool acinar cell model has been proposed, suggesting that NAADP releases Ca^{2+} from lysosomes, which then sensitizes the neighboring IP_3 receptors (IP_3Rs) and ryanodine receptors (RyRs) located on the ER [8]. This led to the concept of “organelle selection” [8], in which ACh, through IP_3 and cADPR generation, would activate the IP_3Rs and the RyRs of the ER; CCK, through NAADP generation, would selectively trigger Ca^{2+} release from lysosomes; and CCK, alternatively acting through cADPR generation, would activate Ca^{2+} release from the ER [3, 8]. However, a recent report challenges that view [9]. In permeabilized acinar cells, it has been shown that NAADP, cADPR, and IP_3 release Ca^{2+} from the ER and from the zymogen granules (ZG) [9]. However, the relative importance of different acidic stores and the ER for generation of the physiologically relevant repetitive local Ca^{2+} spikes was not investigated because of the technical approach used. In our study, we explore whether different sources of Ca^{2+} could be recruited by different agonists via different messengers.

To determine the contribution of the ER and the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps (SERCA) to agonist-evoked Ca^{2+} spikes, we applied low concentrations of the specific SERCA pump inhibitor thapsigargin (Tg) to slow down the refilling of the ER during the train of local Ca^{2+} spikes evoked by the agonists. Tg at 5 nM and 50 nM failed to evoke any Ca^{2+} spikes in five control cells (Figure 1A), whereas 500 nM Tg evoked a few short-lasting Ca^{2+} spikes with a slow and progressive ER depletion in one out of three cells tested (Figure 1F). Complete store depletion could only be obtained by application of a high concentration (5 μM) of Tg ($n = 5$). Application of 5 nM Tg on top of secretagogue-evoked responses (CCK, 1 μM , $n = 8$ and ACh, 25 nM, $n = 7$) transformed the local short-lasting Ca^{2+} spikes into global transients of higher amplitude and longer duration (Figures 1B and 1C). In agreement with previous work, a high concentration of Tg (5 μM) emptied the ER of Ca^{2+} and abolished agonist-elicited Ca^{2+} signals (data not shown).

To further understand the role of the ER in the generation of local Ca^{2+} spikes, we tested the effects of various concentrations of Tg on messenger-evoked Ca^{2+} signals. Application of 5 nM Tg on top of NAADP-evoked Ca^{2+} spikes did not have any noticeable effect, but higher Tg concentrations (50 and 500 nM) were effective. Addition of Tg increased the Ca^{2+} spike frequency and produced a mixture of short-lasting and long-lasting Ca^{2+} spikes (Figure 1D, left and right panels, $n = 6$). However, the amplitude of the Ca^{2+} spikes was not changed by Tg application. Finally, complete depletion of the ER

*Correspondence: jose.cancela@nbcn.cnrs-gif.fr

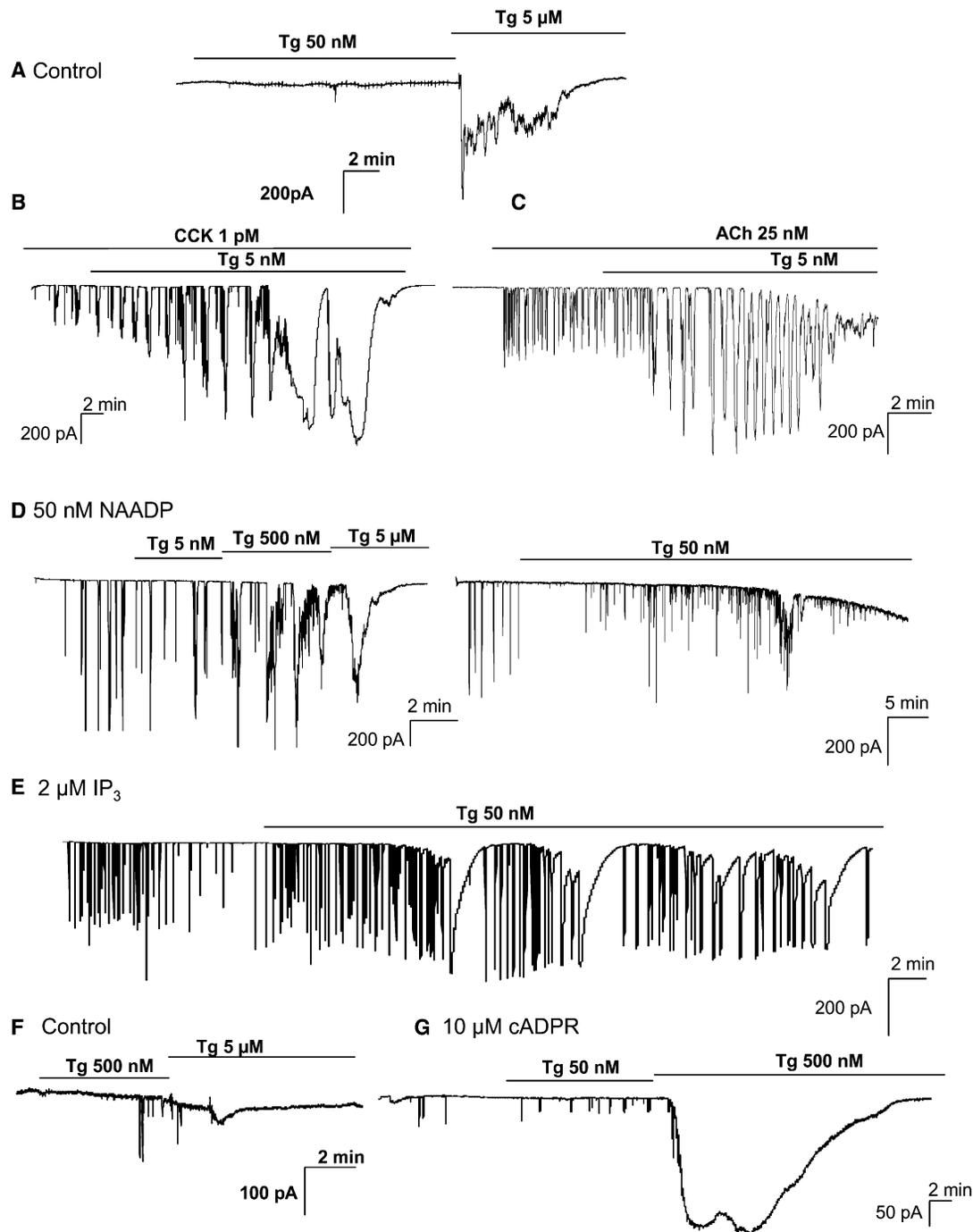


Figure 1. Effect of Low Concentrations of Tg on Secretagogue- and Messenger-Evoked Repetitive Ca²⁺ Spikes

We used the whole-cell configuration of the patch-clamp technique to record the Ca²⁺-dependent Cl⁻ current, which was used as an index of the cytosolic Ca²⁺ elevation [4]. Short-lasting Ca²⁺-dependent currents are known to correspond to local [Ca²⁺]_i elevations in the secretory pole, whereas long-lasting Ca²⁺-dependent currents (>15 s) are known to correspond to global [Ca²⁺]_i elevations.

(A) Control trace showing the effects of 50 nM and 5 μM Tg application on [Ca²⁺]_i. Application of 5 nM Tg on top of the CCK- and ACh-elicited Ca²⁺ oscillations (B and C). Application of Tg at 50 and 500 nM on top of the NAADP-elicited repetitive Ca²⁺ spikes (D), of the IP₃-elicited Ca²⁺ spikes (E), and of the cADPR-elicited Ca²⁺ spikes (G), with control trace showing the effects of 500 nM Tg application on [Ca²⁺]_i (F).

by 5 μM Tg abolished NAADP-evoked Ca²⁺ spikes (Figure 1D, left panel, n = 8).

In agreement with a previous report, application of 50 nM Tg on top of stimulation with 2 μM IP₃ increased the Ca²⁺ spike frequency and produced a mixture of short-lasting and long-lasting Ca²⁺ transients with no

change in amplitude [10] (Figure 1E, n = 7). In the case of cADPR-evoked Ca²⁺ spikes, application of 50 nM Tg increased the frequency of the short-lasting Ca²⁺ spikes without amplitude modification (Figure 1G, n = 4). Application of 500 nM Tg resulted in a very long and sustained Ca²⁺ elevation, which lasted until full depletion of the ER

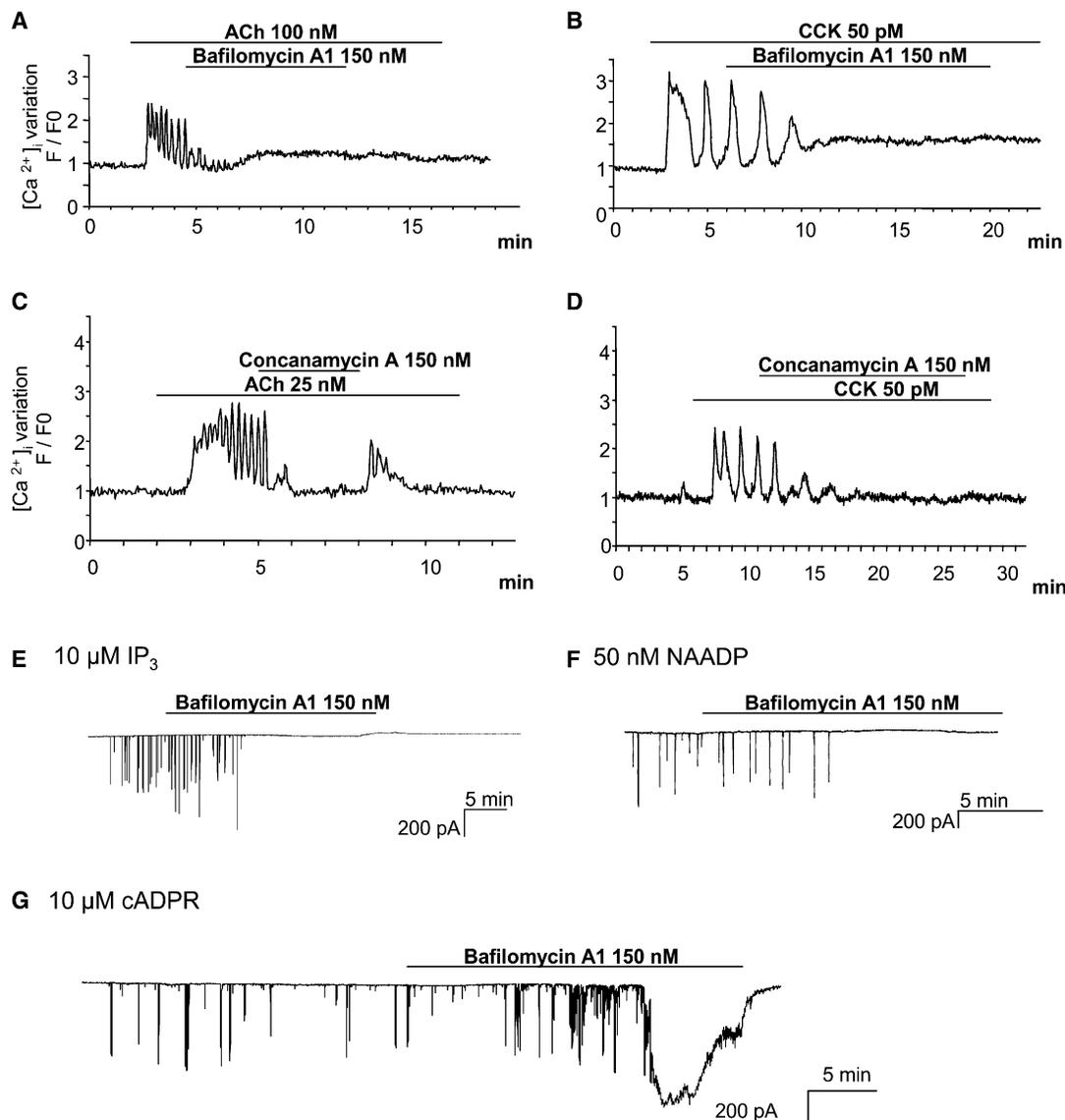


Figure 2. Inhibitory Effects of Proton Pump V-ATPase Inhibitors on Secretagogue- and Messenger-Evoked Ca²⁺ Spikes
Ca²⁺ measurements were performed on Fluo-4 AM-loaded cells with a Leica TCS SP2 RS confocal microscope. (A–D) Bafilomycin A1 and Concanamycin A at 150 nM abolished ACh- and CCK-induced Ca²⁺ spikes. (E and F) Bafilomycin A1 at 150 nM abolished IP₃- and NAADP-evoked Ca²⁺ spikes. (G) cADPR-evoked Ca²⁺ spikes were not abolished by bafilomycin A1 at 150 nM.

Ca²⁺ store (Figure 1G, n = 3). cADPR is a modulator of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and may therefore act together with Tg to trigger a massive Ca²⁺ response. Indeed, Tg increases the amplitude of the Ca²⁺ spiking evoked by ACh and CCK (Figures 1B and 1C), suggesting that they and cADPR share a common mechanism, possibly through RyR sensitization.

Role of Acidic Ca²⁺ Stores in Ca²⁺-Spike Generation

To investigate the role of acidic compartments in agonist-evoked Ca²⁺ spikes, we tested the effects of the V-ATPase inhibitors bafilomycin A1 and concanamycin A. V-ATPase inhibitors do not deplete acidic stores of Ca²⁺ because they are not leaky [11, 12] but do prevent refilling of these stores during agonist stimulation.

Short-lasting Ca²⁺ spikes evoked by 25–100 nM ACh were inhibited by both 150 nM bafilomycin A1 (Figure 2A, n = 3) and 150 nM concanamycin A (Figure 2C, n = 3). Ca²⁺ oscillations evoked by 5–50 pM CCK were also inhibited by both 150 nM bafilomycin A1 (Figure 2B, n = 3) and 150 nM concanamycin A (Figure 2D, n = 3).

We then examined whether IP₃, cADPR, or NAADP required acidic stores to generate local Ca²⁺ spikes. IP₃-induced spikes were inhibited by bafilomycin A1 (Figure 2E, n = 5). This indicates that, in addition to the ER [10], an acidic Ca²⁺ store is required for IP₃-elicited Ca²⁺ spikes. In contrast to Tg, bafilomycin A1 did not modulate the frequency or the duration of the IP₃-evoked spikes but stopped abruptly the Ca²⁺ spiking. This suggests that acidic compartments could be a trigger Ca²⁺ source, whereas the ER is more suited for fine

tuning of the spatiotemporal aspect of Ca^{2+} spiking. Similar data were obtained with NAADP-evoked Ca^{2+} spikes, which were inhibited abruptly by bafilomycin A1 (Figure 2F, $n = 4$). These results do not indicate which organelle type is involved. They are consistent not only with lysosomes being the NAADP-responsive Ca^{2+} store [8, 11, 13] but also with ZGs possibly being involved as well [9]. Surprisingly, the local Ca^{2+} spikes evoked by cADPR were not inhibited by bafilomycin A1 (Figure 2G, $n = 4$). In stark contrast to what was observed with the two other messengers, bafilomycin A1 transformed the short-lasting Ca^{2+} spikes into a massive Ca^{2+} response (Figure 2G, $n = 3/4$). Because bafilomycin A1 alters the cADPR response, an acidic store would seem to play a role somehow, but, clearly, the massive Ca^{2+} signal must come from the ER.

Role of Lysosomes in Ca^{2+} -Spike Generation

Lysosomes were stained by the dye LysoTracker Red and displayed a punctuate staining situated mainly in the apical pole of the cells [8] (Figure 3A). Lysosomes were specifically disrupted by application of Gly-Phe- β -naphthylamide (GPN) [14].

Exocytosis of lysosomes in response to cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases is a regulated mechanism [15]. We checked whether GPN could empty the ER of Ca^{2+} . After application of 200 μM GPN, subsequent addition of 3 μM Tg still evoked a normal large $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase comparable to that of control cells (Figure 3B, $n = 3$). After Tg application, further treatment of cells with GPN failed to release Ca^{2+} (Figure 3C, $n = 4$), indicating loss of lysosomes. We tested the effect of ER depletion on lysosome distribution by simultaneously recording LysoTracker Red fluorescence and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes (Figure 3D, $n = 3$). Tg (5 μM) elicited a rapid ER Ca^{2+} release, immediately followed by a decrease of LysoTracker Red fluorescence. Similar results were observed with the application of the Ca^{2+} ionophore ionomycin instead of Tg (data not shown, 10 μM ionomycin, $n = 3$).

Our data suggest that GPN at 200 μM rather than 50 μM would be best able to quickly and completely deplete the lysosomal Ca^{2+} store (see Figures S1A and S1B in the Supplemental Data available online). Application of 200 μM GPN evoked a transient $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase and abolished the effects of both 5 pM CCK (Figure 3E, $n = 9$) and 25 nM ACh (Figure 3F, $n = 6$), indicating that lysosomes are required for both CCK and ACh actions. Potentially, the cathepsins released by lysosome lysis or present in the ZGs could indirectly inhibit the agonist-elicited Ca^{2+} signals. To rule out such a possibility, we used the cathepsin inhibitor-1 (CI1), which does not inhibit the lysosomal cathepsin C required for GPN hydrolysis but blocks cathepsins B, L, and S. Treatment of cells with 200 μM GPN and CI1 still resulted in a transient $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase (Figure S1D, $n = 4$), and application of GPN and CI1 at 10 μM on top of ACh- and CCK-elicited Ca^{2+} oscillations again resulted in abolition of the agonist-elicited responses, thus confirming the specificity of the GPN effect (Figures 3G and 3H, $n = 4$).

Application of GPN in the presence or absence of external Ca^{2+} did not abolish the IP_3 -evoked Ca^{2+} spikes (Figure 4A, $n = 4$ and Figure 4B, $n = 5$), but the complete inhibition of the IP_3 response by bafilomycin A1 (Figure 2E) may indicate that IP_3 releases Ca^{2+} from another

acidic compartment without any requirement for the lysosomal Ca^{2+} store. The ZGs could be important because they are very abundant in the secretory pole [9]. However, the ACh response is blocked by GPN, and this suggests that ACh recruits the lysosomal store in an IP_3 -independent manner. The simplest explanation is that ACh, like Tg, uses Ca^{2+} to recruit lysosomal Ca^{2+} .

In the case of cADPR, lysosome disruption mostly caused large and long-lasting responses (Figure 4C, $n = 3$), indicating that the Ca^{2+} signals had become global. Because of intrapipette EGTA perfusion, GPN itself did not evoke detectable Ca^{2+} signals in the patch-clamp recordings (Figures S1G and S1H). However, the data here suggest that a small but undetectable amount of Ca^{2+} may have been released from lysosomes and thus sensitized the RyRs of the ER because the responses (Figure 4C) were very similar to those evoked by Tg during cADPR-evoked Ca^{2+} spiking (Figure 1G). Similar results were obtained in the absence of extracellular Ca^{2+} , indicating no involvement of extracellular Ca^{2+} in these observations (Figure 4D, $n = 8$). Clearly, the vast majority of Ca^{2+} comes from a nonacidic store, namely the ER.

Application of GPN on top of NAADP stimulation did not inhibit Ca^{2+} spiking but rather transformed the response into a massive $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase (Figure 4E, $n = 6/8$). Removal of extracellular Ca^{2+} during GPN application had no immediate effect on the large $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase, indicating that Ca^{2+} entry through the plasma membrane is an unlikely cause (Figure 4E, $n = 5$). We then removed Ca^{2+} prior to GPN application (Figure 4F). The NAADP-elicited Ca^{2+} release was not directly dependent on external Ca^{2+} because removal of extracellular Ca^{2+} did not prevent the initial part of the further NAADP response (Figure 4F). However, the very large subsequent Ca^{2+} rise evoked by GPN in the normal presence of external Ca^{2+} did not occur in its absence (Figure 4F, $n = 5/7$). Altogether, these data not only indicate that NAADP-evoked Ca^{2+} spikes depend on lysosomes but also reveal that Ca^{2+} entry is stimulated by NAADP. This Ca^{2+} entry is only seen when lysosomes are disrupted, suggesting that this compartment is the end receiver of the entering Ca^{2+} . Because of the requirement for preincubation in an externally Ca^{2+} -free solution, this Ca^{2+} entry is unlikely to be due to the opening of classical plasma membrane Ca^{2+} channels but could be related to endocytosis, a slower process, which is a well-known source of Ca^{2+} for lysosomes [16, 17].

Role of Endocytosis in Ca^{2+} -Spike Generation

We have therefore investigated the possible role of endocytosis in agonist-evoked Ca^{2+} spikes. We used cytochalasin D, which inhibits endocytosis by depolymerizing actin filaments without blocking capacitative Ca^{2+} entry [18–20].

The Ca^{2+} spikes evoked by both 25 nM ACh and 50 pM CCK were inhibited by 20 and 30 μM cytochalasin D (Figures 4G and 4H, $n = 3$; see also Figure S2). In a similar way, the local Ca^{2+} spikes evoked by both IP_3 and NAADP were inhibited by cytochalasin D (Figures 4I and 4J, $n = 3$). Because NAADP mobilizes Ca^{2+} from a source dependent on external Ca^{2+} for its refilling and because cytochalasin D completely blocks the

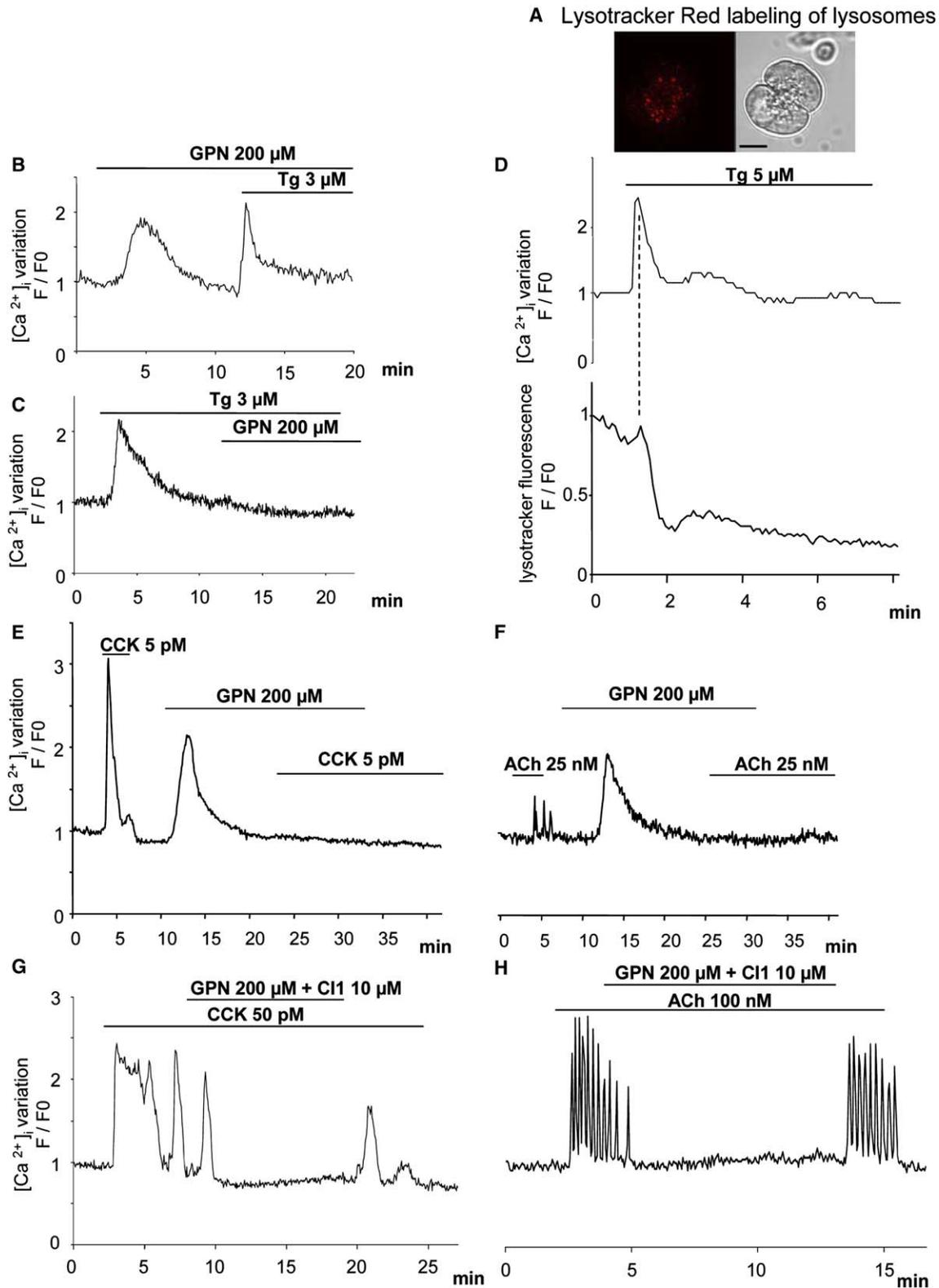


Figure 3. Effects of Lysosome Disruption by GPN and its Relation to the ER Ca²⁺ Store

(A) Confocal and transmitted light images indicating the distribution of LysoTracker Red staining in pancreatic acinar cells (the scale bar represents 10 μm).

(B) 200 μM GPN induced a transient increase of [Ca²⁺]_i, and Tg at 3 μM was applied thereafter eliciting further release.

(C) Ca²⁺ depletion of the ER by Tg prevents GPN from releasing Ca²⁺.

(D) Simultaneous recordings of [Ca²⁺]_i change (upper trace) and LysoTracker Red fluorescence (lower trace).

(E and F) GPN 200 μM abolished both the CCK- and ACh-evoked Ca²⁺ spikes.

(G and H) Application of GPN 200 μM in the presence of 10 μM cathepsin inhibitor 1 (C11) inhibited both CCK- and ACh-induced Ca²⁺ spikes.

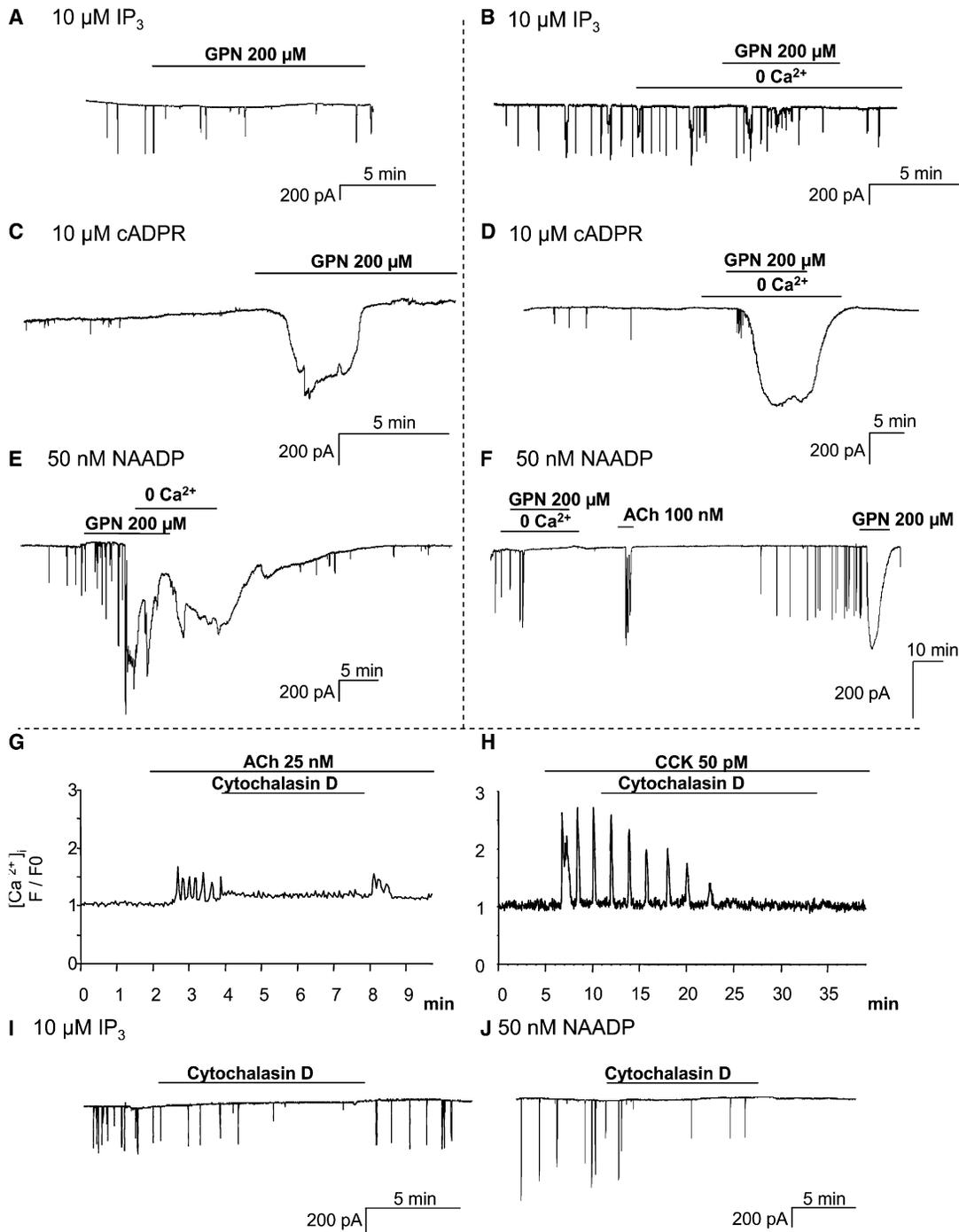


Figure 4. Selective Inhibitory Effect of GPN on NAADP-Evoked Ca^{2+} Spikes Reveals Another NAADP-Sensitive Store
 (A and B) GPN did not abolish IP_3 -evoked Ca^{2+} spikes in the presence or absence of 1 mM extracellular Ca^{2+} .
 (C and D) GPN application amplified the response to 10 μM cADPR.
 (E) In the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} , the 50 nM NAADP response was amplified by 200 μM GPN.
 (F) Prior removal of external Ca^{2+} before GPN application resulted in abolition of a major part of the NAADP response.
 (G and H) Cytochalasin D at 20–30 μM abolished ACh- and CCK-induced Ca^{2+} spikes.
 (I and J) Intracellular perfusion of IP_3 at 10 μM or NAADP at 50 nM evoked repetitive Ca^{2+} spikes that were inhibited by cytochalasin D at 30 μM .

NAADP response, this source is most likely the endosome. It is clear that the endosome-lysosome cycle provides part of the Ca^{2+} entry into the cell and depends on external Ca^{2+} and vesicle acidification [15–17]. It would therefore appear that exocytosis of lysosomes would be accompanied by the complete recycling of

the NAADP receptor. Consequently, NAADP receptors may be present on endosomes (Figure S2D).

We have no evidence for IP_3 releasing Ca^{2+} from endosomes, but in view of the spatial localization of IP_3 -evoked Ca^{2+} spikes, the acidic store involved is likely to be the ZGs [9]. Our data indicate that perturbation

of the ZG exocytosis-endocytosis cycle affects IP₃-evoked Ca²⁺ signals possibly by impairing the refilling of the acidic Ca²⁺ stores. It is unlikely that the more basally located Golgi apparatus is involved because it is insensitive to bafilomycin A1 [9, 21].

The concept emerging from our work is that multiple Ca²⁺-releasing messengers determine specific agonist-elicited Ca²⁺ signatures by controlling the balance among different acidic Ca²⁺ stores, endocytosis, and the ER. We have also found that both CCK and ACh recruit lysosomal Ca²⁺ through different mechanisms, via NAADP for CCK and most likely via Ca²⁺ for ACh. The acidic stores are recruited by different pathways, i.e., NAADP and Ca²⁺ recruit the lysosomes, whereas IP₃ and cADPR recruit the ZG. Importantly, we provide the first pharmacological evidence demonstrating that endocytosis is crucial for the generation of repetitive local Ca²⁺ spikes evoked by agonists and by NAADP and IP₃. Once initiated, the Ca²⁺ oscillations are maintained by the ER, a common oscillatory unit that tunes the frequency, amplitude, duration, and spatial spreading of the Ca²⁺ oscillations; here, cADPR plays the major role.

Supplemental Data

Supplemental Data include two figures and can be found with this article online at <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/16/19/1931/DC1/>.

Acknowledgments

This work was supported by an Action Thématique et Incitative sur Programme grant to J.-M.C. from the Centre National de la Recherche Scientifique, by the Association pour la Recherche sur le Cancer, by Fondation de la Recherche Médicale, and by the Association Française contre les Myopathies A.M. was supported by an Association Française contre les Myopathies fellowship. We thank Nathalie Cheviron for technical assistance. We thank N. Burdakova for technical support. O.H.P. is a Medical Research Council Research Professor and is supported by a Medical Research Council Programme Grant.

Received: May 18, 2006

Revised: July 11, 2006

Accepted: July 25, 2006

Published: October 9, 2006

References

1. Lee, H.C. (2004). Multiplicity of Ca²⁺ messengers and Ca²⁺ stores: A perspective from cyclic ADP-ribose and NAADP. *Curr. Mol. Med.* 4, 227–237.
2. Cancela, J.M., Churchill, G.C., and Galione, A. (1999). Coordination of agonist-induced Ca²⁺-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* 398, 74–76.
3. Yamasaki, M., Thomas, J.M., Churchill, G.C., Garnham, C., Lewis, A.M., Cancela, J.M., Patel, S., and Galione, A. (2005). Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca²⁺ spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr. Biol.* 15, 874–878.
4. Cancela, J.M., Van Coppenolle, F., Galione, A., Tepikin, A.V., and Petersen, O.H. (2002). Transformation of local Ca²⁺ spikes to global Ca²⁺ transients: The combinatorial roles of multiple Ca²⁺ releasing messengers. *EMBO J.* 21, 909–919.
5. Bootman, M.D., Berridge, M.J., and Roderick, H.L. (2002). Calcium signalling: More messengers, more channels, more complexity. *Curr. Biol.* 12, R563–R565.
6. Bezin, S., Charpentier, G., Fossier, P., and Cancela, J.M. (2006). The Ca(2+)-releasing messenger NAADP, a new player in the nervous system. *J. Physiol. Paris* 99, 111–118.
7. Galione, A., and Petersen, O.H. (2005). The NAADP receptor: New receptors or new regulation? *Mol. Interv.* 5, 73–79.
8. Yamasaki, M., Masgrau, R., Morgan, A.J., Churchill, G.C., Patel, S., Ashcroft, S.J., and Galione, A. (2004). Organelle selection determines agonist-specific Ca²⁺ signals in pancreatic acinar and beta cells. *J. Biol. Chem.* 279, 7234–7240.
9. Gerasimenko, J.V., Sherwood, M., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., and Gerasimenko, O.V. (2006). NAADP, cADPR and IP₃ all release Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J. Cell Sci.* 119, 226–238.
10. Petersen, C.C., Petersen, O.H., and Berridge, M.J. (1993). The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 268, 22262–22264.
11. Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S., and Galione, A. (2002). NAADP mobilizes Ca(2+) from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* 111, 703–708.
12. Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2006). Microdomains of intracellular Ca²⁺: Molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* 86, 369–408.
13. Billington, R.A., Bellomo, E.A., Floriddia, E.M., Erriquez, J., Distasi, C., and Genazzani, A.A. (2006). A transport mechanism for NAADP in a rat basophilic cell line. *FASEB J.* 20, 521–523.
14. Berg, T.O., Stromhaug, E., Lovdal, T., Seglen, O., and Berg, T. (1994). Use of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide, a lysosome-disrupting cathepsin C substrate, to distinguish between lysosomes and prelysosomal endocytic vacuoles. *Biochem. J.* 300, 229–236.
15. McNeil, P.L. (2002). Repairing a torn cell surface: Make way, lysosomes to the rescue. *J. Cell Sci.* 115, 873–879.
16. Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., and Gerasimenko, O.V. (1998). Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr. Biol.* 8, 1335–1338.
17. Gerasimenko, J.V., Gerasimenko, O.V., and Petersen, O.H. (2001). Membrane repair: Ca(2+)-elicited lysosomal exocytosis. *Curr. Biol.* 11, R971–R974.
18. Freedman, S.D., Katz, M.H., Parker, E.M., and Gelrud, A. (1999). Endocytosis at the apical plasma membrane of pancreatic acinar cells is regulated by tyrosine kinases. *Am. J. Physiol.* 276, C306–C311.
19. Patterson, R.L., van Rossum, D.B., and Gill, D.L. (1999). Store-operated Ca²⁺ entry: Evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 98, 487–499.
20. Parekh, A.B., and Putney, J.W., Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* 85, 757–810.
21. Dolman, N.J., Gerasimenko, J.V., Gerasimenko, O.V., Voronina, S.G., Petersen, O.H., and Tepikin, A.V. (2005). Stable Golgi-mitochondria complexes and formation of Golgi Ca(2+) gradients in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 280, 15794–15799.

D) Discussion et données supplémentaires

Notre travail montre que la coopération entre plusieurs messagers intracellulaires permet de former des signaux calciques spécifiques des agonistes en contrôlant la libération de Ca^{2+} à partir du RE et de réserves acides.

Des données biochimiques récentes appuient cette hypothèse de coopération des messagers, puisque lors de la réponse à la CCK, il y a une production rapide et transitoire de NAADP, suivie d'une augmentation plus lente et prolongée de cADPR (Yamasaki et al., 2005). A l'inverse, les réponses à l'ACh ne déclenchent pas de synthèse de NAADP, mais d'un pic de synthèse d' IP_3 , suivi d'une production lente et prolongée de cADPR (Streb et al., 1985; Yamasaki et al., 2005).

Les réserves acides seraient donc recrutées différemment par les deux agonistes pour l'initiation du signal, le lysosome étant recruté par le NAADP, et les granules de zymogène par l' IP_3 . Ces données biochimiques confirment également nos données sur le rôle du cADPR, non pas dans l'initiation, mais dans le maintien et la modulation des oscillations calciques en sensibilisant les RyR du RE. Une fois initiées, ces réponses calciques seraient maintenues par le RE, qui jouerait le rôle d'unité d'oscillation et qui modulerait la fréquence, l'amplitude, la durée et la propagation des oscillations calciques grâce au CICR des IP_3 R et RyR, sous contrôle du cADPR.

Enfin, les expériences en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire suggèrent que le NAADP recrute, en plus de la réserve calcique lysosomale, du Ca^{2+} d'origine extracellulaire en relation avec le phénomène d'endocytose.

1) Discussion des différents modèles proposés pour expliquer les signatures calciques dans les cellules acineuses de pancréas exocrine

Modèle proposé par Yamasaki (Yamasaki et al., 2004) : le NAADP recrute un organite spécifique

L'étude de Yamasaki est basée sur des techniques, d'imagerie calcique et de micro-injection de messagers cagés. Les variations de Ca^{2+} cytosolique ont été mesurées lors de stimulations par les agonistes CCK et ACh, et par les messagers cADPR, IP_3 , et NAADP. Cette étude montre que dans les cellules acineuses de pancréas exocrine, la réponse à la CCK nécessite

des réserves calciques acides, puisque les réponses à la CCK peuvent être inhibées par la Bafilomycine A1. De plus, le GPN inhibe lui aussi ces réponses, suggérant que le compartiment acide recruté est le lysosome. Le GPN et la bafilomycine inhibent également la libération de Ca^{2+} en réponse au NAADP, et ces auteurs en ont conclu que le NAADP libérait du Ca^{2+} à partir du lysosome lors des stimulations des cellules par la CCK, ce qui est en accord avec les travaux antérieurs chez les invertébrés (Churchill et al., 2002).

A partir de ces données expérimentales, Yamasaki a proposé un modèle qualifié de « minimal » dans lequel la réponse à la CCK produit des réponses calciques en recrutant les lysosomes par le NAADP, et le RE par le cADPR, tandis que l'ACh recrute le RE par l' IP_3 et le cADPR (Figure 5A).

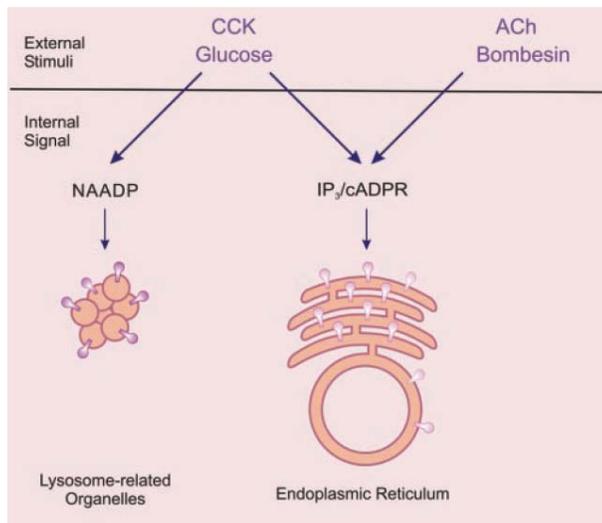
Modèle proposé par Gerasimenko (Gerasimenko et al., 2006) : les messagers ne recrutent pas d'organite spécifique

Dans leur étude, Gerasimenko et collègues ont utilisé des cellules perméabilisées par laser dans lesquelles ils ont étudié les effets des messagers sur le contenu en Ca^{2+} de différentes réserves intracellulaires. Ces auteurs ont donc proposé un modèle dans lequel les messagers IP_3 , cADPR et NAADP agissent tous les trois à la fois sur le RE et sur les granules de zymogène pour libérer du Ca^{2+} (Gerasimenko et al., 2006) (Figure 5B).

Les résultats décrits par Gerasimenko ne sont en accord ni avec nos propres résultats, ni avec ceux publiés par Yamasaki et Churchill pour ce qui est des lysosomes. Ces différences importantes peuvent en grande partie être expliquées par l'approche expérimentale utilisée, très éloignée des conditions physiologiques. Cette étude présente cependant l'avantage de souligner l'importance possible des granules de zymogène dans la signalisation calcique, et nos expériences ont confirmé un possible rôle de ces granules dans la signalisation induite, non pas par le NAADP, mais par l' IP_3 , et dans une moindre mesure le cADPR, et ont permis de la situer dans le contexte physiologique des oscillations calciques induites par les agonistes extracellulaires.

En raison des limitations de l'éditeur du journal et pour mieux répondre à ces questions, nous avons produit d'autres figures qui sont publiées sous forme de « Supplemental data online » sur le site de l'éditeur et qui sont reproduites ici (Figures 6 et 7), et nous nous référons également aux figures de l'article.

A. Modèle de Yamasaki (2004): Le NAADP recrute un organe spécifique



B. Modèle de Gerasimenko (2006): les messagers ne recrutent pas d'organe spécifique

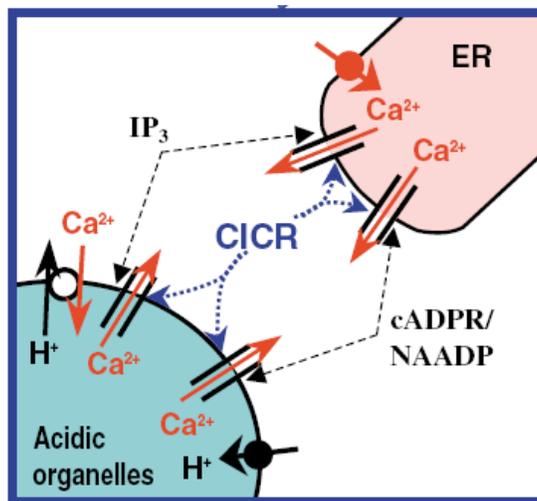


Figure 5: Modèles proposés

A Modèle proposé par Yamasaki dans lequel le NAADP recrute du Ca²⁺ lysosomal, tandis que l'IP₃ et le cADPR recrutent le Ca²⁺ du RE.

B Modèle proposé par Gerasimenko dans lequel le NAADP, l'IP₃ et le cADPR libèrent du Ca²⁺ à la fois des granules de Zymogène et du RE.

2) Effets des différentes concentrations de GPN sur la fluorescence au LysoTracker Red et réponses aux agonistes

Les auteurs ayant utilisé le GPN pour vidanger les lysosomes l'ont fait à différentes concentrations : Gerasimenko et Yamasaki ont utilisé le GPN à une concentration de 50 μM (Gerasimenko et al., 2006; Yamasaki et al., 2004), alors que les travaux sur le clivage du GPN par la cathepsine C indiquent une Ec_{50} comprise entre 100 et 200 μM (Churchill et al., 2002; Jadot et al., 1984). Cette différence de protocole pourrait expliquer les différences d'effets trouvés, et nous avons donc comparé les effets de deux doses de GPN, 50 et 200 μM , sur le signal calcique et les lysosomes dans les cellules de pancréas exocrine.

Utilisé à 200 μM , le GPN provoque une libération de Ca^{2+} dans le cytoplasme (Figure 3B de l'article et figure 6 D), indiquant une perméabilisation des lysosomes, qui n'est pas ou peu visible avec du GPN à 50 μM (Figures 6 E, et F). Nous avons voulu tester les effets du GPN sur les lysosomes, qui ont été marqués par la sonde LysoTracker Red. Le traitement par le GPN à 50 μM n'induit qu'une lente et partielle décroissance de la fluorescence du LysoTracker Red, suggérant une vidange incomplète, tandis qu'à 200 μM , la décroissance de fluorescence est très rapide et totale (Figure 6 B). La dose de 200 μM de GPN est donc la plus appropriée pour vidanger les lysosomes et étudier leur rôle dans la signalisation calcique.

Effets des différentes doses de GPN sur les réponses aux agonistes

Lorsque nous avons utilisé le GPN à 50 μM , nous avons constaté, comme Yamasaki, une inhibition des réponses à la CCK, mais pas de celles à l'ACh (Figures 6 E et F). La vidange partielle du lysosome a toutefois produit une amplification de la réponse à l'ACh par un CICR dû à la libération du Ca^{2+} lysosomal dans le cytoplasme. Cependant, lorsque le GPN est utilisé à la dose optimale de 200 μM , qui vidange complètement et bien plus rapidement les lysosomes, les réponses aux deux agonistes sont abolies (Figures 3E, 3F et 3G de l'article).

Nous retrouvons donc les résultats de Yamasaki avec 50 μM de GPN, et les différences d'effet du GPN sur la réponse à l'ACh sont donc entièrement imputables au choix de la dose utilisée. Ceci montre que bien que les deux agonistes recrutent les lysosomes, la réponse à la CCK est plus dépendante du Ca^{2+} lysosomal que la réponse à l'ACh.

Effets des agonistes sur la fluorescence au LysoTracker Red

Nos données suggèrent que la réserve calcique lysosomale est recrutée dans le cas de stimulation par les deux agonistes CCK et ACh. Afin d'apporter des évidences supplémentaires, nous avons étudié les effets des deux agonistes ACh et CCK sur la fluorescence du LysoTracker Red.

Nous avons pu constater que les deux agonistes provoquent une réduction de la fluorescence au LysoTracker Red, due à une alcalinisation du lysosome qui traduit une perte de son Ca^{2+} (Figures 6 C₁ et C₂). Cette alcalinisation est compatible avec l'utilisation du Ca^{2+} des lysosomes dans la réponse aux agonistes (figure 6 C). Ces résultats ont depuis été appuyés par une étude montrant une augmentation du pH à l'intérieur des lysosomes d'œuf d'oursin en réponse au NAADP, qui traduirait une libération de Ca^{2+} à partir de ce compartiment (Morgan et Galione, 2006).

Bien que les deux agonistes recrutent le Ca^{2+} lysosomal, les expériences avec 50 μM de GPN où les réponses à la CCK sont inhibées, mais pas celles à l'ACh, indiquent que la réponse à la CCK est plus dépendante du lysosome que celle à l'ACh (figures 6 E et F).

Nous avons aussi voulu étudier les effets possibles du GPN sur la signalisation calcique, en plus de son action sur le lysosome. Bien que le GPN soit un substrat spécifique de la cathepsine C, l'étude de Gerasimenko suggère que la lyse des lysosomes par le GPN pourrait libérer des cathepsines, qui pourraient ensuite interférer avec la signalisation calcique, et ainsi inhiber indirectement les réponses aux agonistes (Gerasimenko et al., 2006).

Bien que la spécificité du GPN ait été déjà largement démontrée (Churchill et al., 2002; Jadot et al., 1990; Jadot et al., 1984), nous avons utilisé le cathepsin inhibitor 1 (CI1), qui inhibe les cathepsines B, L et S, mais pas la C (responsable du clivage du GPN dans les lysosomes) dans certaines de nos expériences pour confirmer cette spécificité.

Lors de nos expériences en présence de CI1, le GPN à 200 μM continue à libérer du Ca^{2+} (Figure 6 D), et les réponses aux agonistes sont toujours inhibés (Figures 3G et 3H de l'article), montrant à la fois l'implication des lysosomes dans ces réponses et la spécificité de l'agent pharmacologique utilisé.

3) Rôle de l'endocytose

Au niveau de la zone apicale, l'exocytose en général s'accompagne d'endocytose, ce qui permet de recycler les éléments de membrane et d'éviter d'accroître la surface apicale. Les endosomes se forment par récupération de membrane apicale, et captent du milieu extracellulaire, et donc du Ca^{2+} lors de leur formation. L'endocytose est par ailleurs dépendante du Ca^{2+} extracellulaire (Gerasimenko et al., 1998; Maruyama, 1989; Maruyama et al., 1993). Ces endosomes sont ensuite acidifiés par l'action d'ATPases pompes à H^+ de type vacuolaire (v-ATPase). L'endocytose constitue donc une voie importante d'entrée de Ca^{2+} dans les cellules. Plus tard, les endosomes fusionnent avec les lysosomes, qui se remplissent aussi en Ca^{2+} par un échange de H^+ et de Ca^{2+} , grâce au gradient de H^+ généré par les v-ATPases.

Nous avons voulu étudier le rôle possible de cette entrée de Ca^{2+} par endocytose dans les signaux calciques. L'endocytose peut être bloquée par la cytochalasine D, et les effets de cette drogue ont déjà été étudiés dans les cellules de pancréas exocrine, où elle bloque la quasi totalité de l'endocytose apicale (Freedman et al., 1999). Il a aussi été montré que la cytochalasine D n'affectait pas le phénomène de SOCE (Parekh et Putney, 2005; Patterson et al., 1999). Nous avons donc étudié les effets de cette drogue sur la signalisation calcique dans les cellules acineuses de pancréas exocrine.

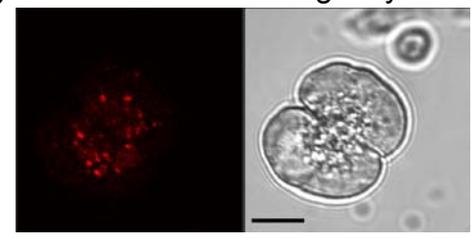
L'ajout simultané de CCK et de cytochalasine D montre que cette drogue ne bloque pas la libération initiale de Ca^{2+} , ce qui indique que la voie de transduction n'est pas altérée (Figure 7 A). Une fois la réponse démarrée, les oscillations sont finalement abolies, ce qui est en accord avec l'implication de l'endocytose dans le maintien des oscillations calciques induites par les agonistes. Il est classique d'observer dans les cellules témoin une persistance temporaire des oscillations induites par la CCK, même après lavage (cf. figure 2B). Nous avons pu observer une reprise des oscillations calciques lors du lavage de la CCK et de la cytochalasine D, indiquant que l'inhibition était réversible sur le laps de temps de l'expérience (Figure 7 A).

Les expériences de stimulation des cellules par les agonistes CCK et ACh en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire ont pour but de vider le RE et visualiser ensuite l'influx de Ca^{2+} provoqué en réponse à cette vidange lorsqu'on rajoute du Ca^{2+} extracellulaire. Ces expériences

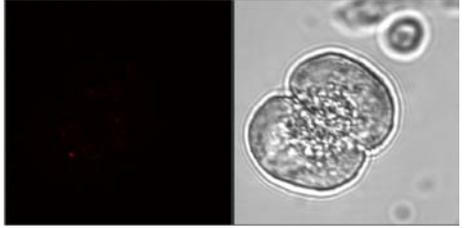
indiquent que le contenu en Ca^{2+} du RE et son mécanisme de remplissage ne sont pas affectés par cette drogue (Figures 7 B et C).

L'inhibition de l'endocytose par la cytochalasine D provoque une abolition des réponses à la CCK et à l'ACh. Cette abolition peut être expliquée par l'inhibition des réponses aux messagers impliqués dans ces réponses, le NAADP pour la CCK, et l' IP_3 pour l'ACh, elles aussi inhibées par le traitement à la cytochalasine D. L' IP_3 initie les oscillations induites par l'ACh en libérant du Ca^{2+} à partir des granules de zymogène, et recrute aussi le Ca^{2+} du RE. Comme le contenu en Ca^{2+} des granules semble reconstitué en grande partie par endocytose apicale, il n'est pas surprenant d'inhiber les réponses à l' IP_3 en bloquant l'endocytose.

A LysoTracker Red labelling of lysosomes



control 10 μm



200 μM GPN (8 min treatment)

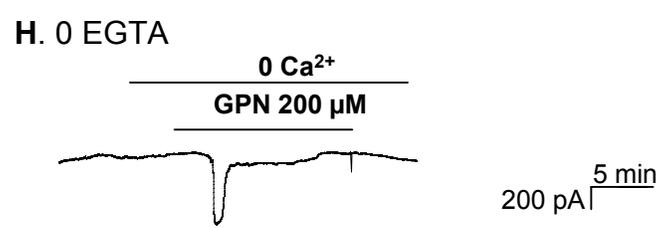
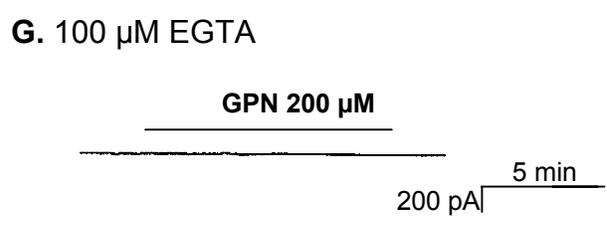
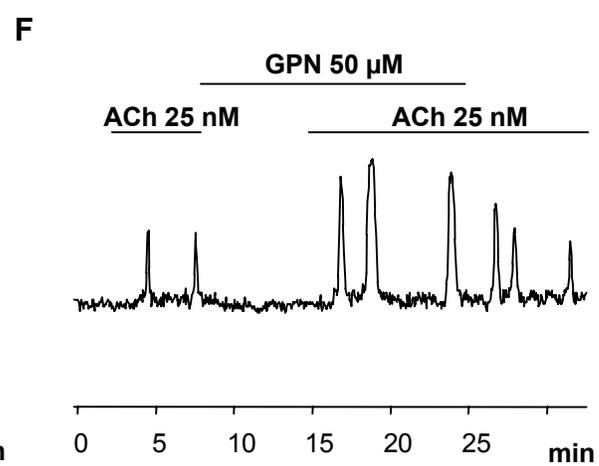
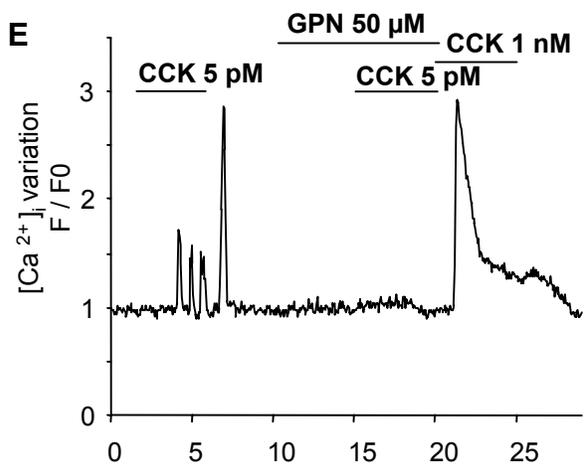
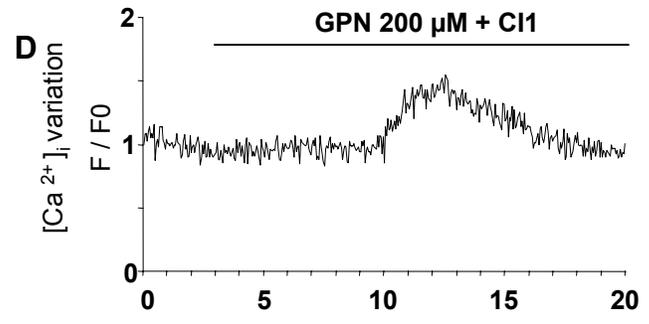
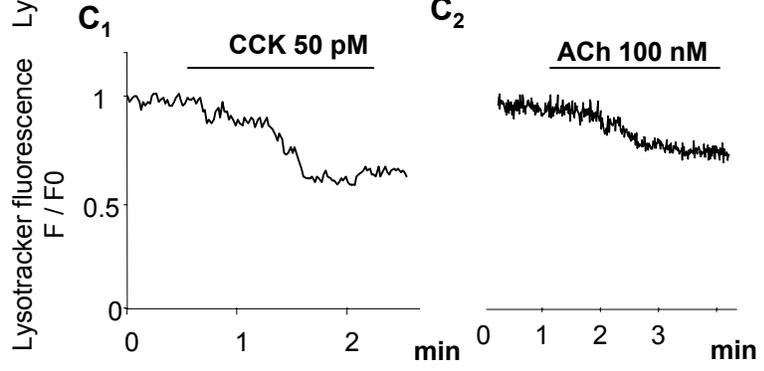
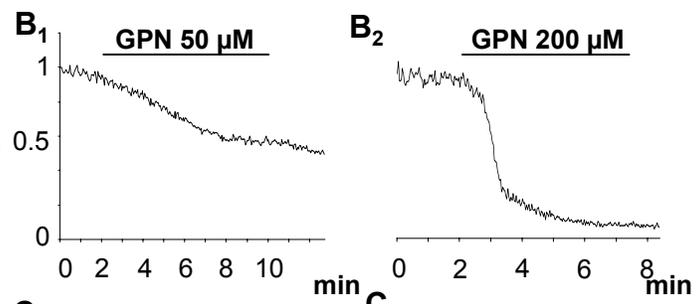


Figure 6: Supplemental data S1

Figure 6: Supplemental data S1, Effets du GPN

En microscopie confocale, la sonde LysoTracker Red présente un marquage des lysosomes dans la partie apicale des cellules (**A**). Les images en lumière transmise montrent qu'il n'y a pas d'altération majeure des cellules par le traitement avec 200 μM de GPN.

L'utilisation du GPN à 50 μM induit une décroissance de la fluorescence du LysoTracker red lente et incomplète (**B**, trace de gauche, n=7), alors qu'à 200 μM , le GPN induit une décroissance rapide et totale de la fluorescence au LysoTracker red (**B**, trace de droite, n=4).

La stimulation par les agonistes extracellulaires CCK à 50 pM (**C**, trace de gauche, n=6) et ACh à 100 nM (**C**, trace de droite, n=4) provoque une réduction du marquage au LysoTracker red. La lyse des lysosomes par l'application de 200 μM de GPN, en présence de CI1 provoque une élévation temporaire du Ca^{2+} cytosolique (**D**, n=3). Lorsqu'il est utilisé à 50 μM , le GPN abolit les oscillations calciques déclenchées par la CCK à 5 pM (**E**, n=3), mais pas celles induites par l'ACh à 25 nM (**F**, n=4).

Les oscillations calciques induites par les messagers ont été mesurées par la technique du patch clamp en mode cellule entière (whole cell). Cette technique permet à la fois de faire entrer les messagers dans la cellule, et de mesurer les courants dépendants du Ca^{2+} .

Nous avons mesuré les effets de la vidange des lysosomes par le GPN sur les réponses aux messagers.

La vidange des lysosomes par le GPN est détectable en imagerie, tout comme dans les enregistrements de patch clamp (**D**, n=3 et **H**, n=3), et l'ajout de 100 μM d'EGTA dans le milieu intra pipette nous a permis de tamponner la libération de Ca^{2+} par le lysosome, et de la rendre indétectable (**G**, n=6), sans inhiber les réponses aux messagers. Nous avons donc utilisé de l'EGTA dans le milieu intracellulaire de patch pour faciliter l'interprétation des résultats lors de l'étude des effets du GPN sur les oscillations calciques induites par les messagers.

Figure 7: Supplemental data S2, Effets de la cytochalasine D sur le RE et le SOCE

A. application simultanée de CCK et de cytochalasine D (n=3).

La cytochalasine D ne bloque pas le SOCE suivant la vidange des réserves par les agonistes CCK (**B**, n= 3), ou ACh (**C**, n= 3).

D. Modèle montrant comment les agonistes extracellulaires initient les oscillations calciques en recrutant différentes réserves acides et le RE par l'intermédiaire de leurs messagers respectifs.

Le Ca^{2+} lysosomal est recruté par le NAADP lors de la stimulation par la CCK, et vraisemblablement par le Ca^{2+} pour l'ACh.

De plus, nos données suggèrent que le NAADP libère aussi du Ca^{2+} à partir des endosomes, et que les oscillations calciques produites par l' IP_3 sont aussi dépendantes de l'endocytose.

Le Ca^{2+} des granules de zymogène est mobilisé principalement par l' IP_3 au cours de la réponse à l'ACh et dans une moindre mesure par le cADPR pour les réponses à l'ACh et à la CCK.

Finalement, le RE semble être la cible principale du cADPR, et dans une moindre mesure de l' IP_3 dans les oscillations calciques. Le RE représente un oscillateur commun nécessaire à l'amplification et à la modulation des oscillations calciques induites par les messagers et les agonistes.

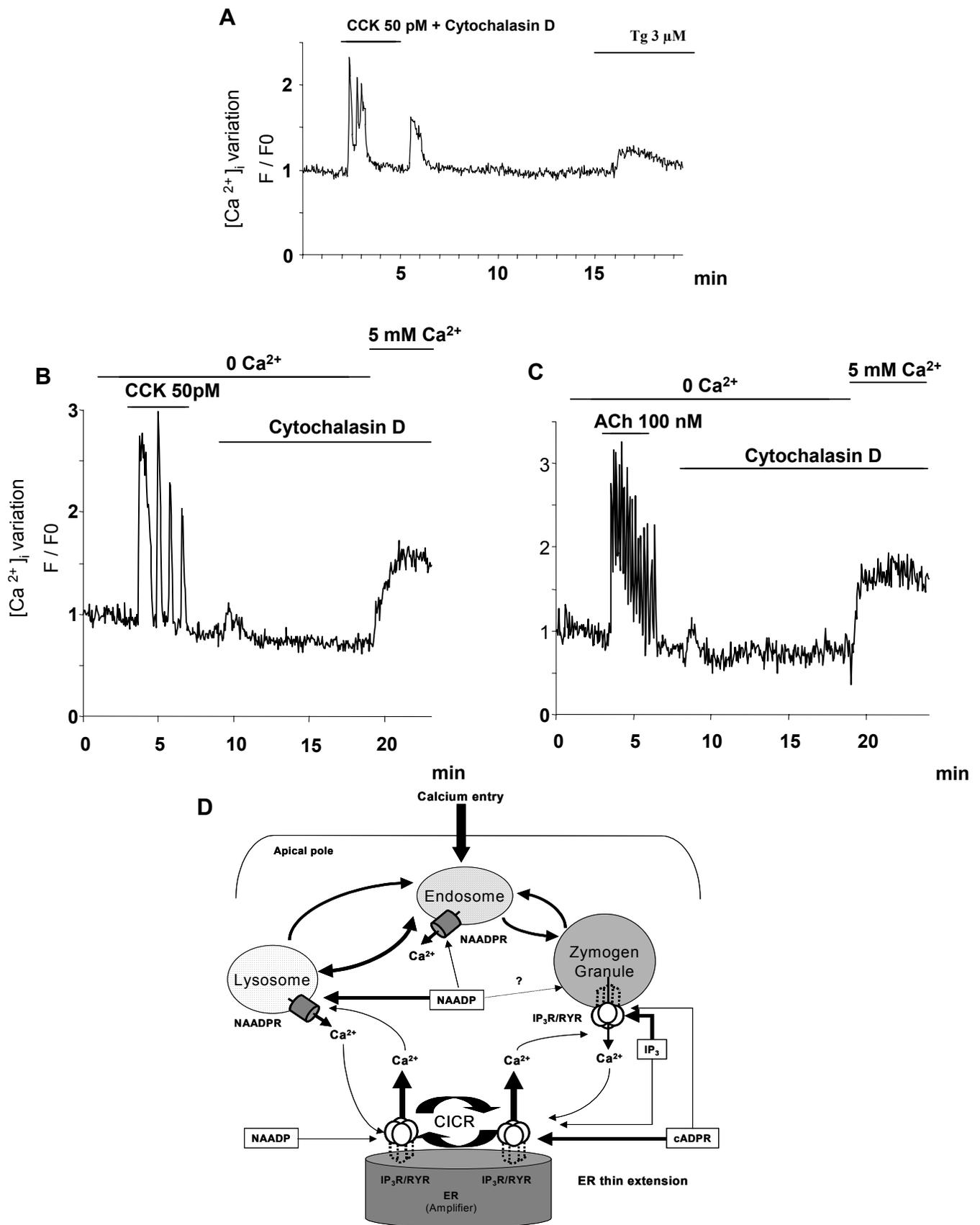


Figure 7: Supplemental data S2

E) Données préliminaires non publiées sur l'entrée de Ca²⁺, les lysosomes et l'endocytose

1) Effets du GPN sur les oscillations calciques induites par le NAADP et relation avec le Ca²⁺ extracellulaire

Pour les enregistrements en patch-clamp, nous avons utilisé l'EGTA à 100 μ M dans le milieu intrapipette. Ce tampon lent du Ca²⁺ permet de fixer le Ca²⁺ libéré par les lysosomes traités au GPN, sans inhiber les réponses aux messagers. En présence de 100 μ M d'EGTA, le GPN seul ne génère pas de signal calcique détectable (Figure 8 A, gauche et figure 6 G, n=6), alors qu'en absence d'EGTA, le GPN provoque une élévation du Ca²⁺ intracellulaire (Figure 8 A, droite, n=3). Afin de simplifier l'interprétation des résultats, nous avons enregistré les signaux en présence d'EGTA dans le milieu intrapipette, qui permet d'étudier les effets de la vidange des lysosomes, sans que le Ca²⁺ libéré n'apparaisse sur les traces.

L'application de GPN sur une réponse au NAADP provoque une très forte élévation du Ca²⁺ intracellulaire (Figure 8 B, n=6/8).

Cependant, lorsque les cellules sont placées en 0 Ca²⁺ extracellulaire avant l'application de GPN, cette élévation globale de Ca²⁺ n'apparaît pas, et les oscillations induites par le NAADP sont abolies (Figure 8 C et 4F de l'article, n=5/7). Ceci suggère que le lysosome est la principale réserve intracellulaire libérant du Ca²⁺ en réponse au NAADP. Ce résultat indique aussi une intervention du Ca²⁺ extracellulaire dans les oscillations calciques induites par le NAADP, même si la réponse au messager ne mobilise pas directement du Ca²⁺ extracellulaire, puisque son retrait n'abolit pas immédiatement les oscillations calciques (Figure 8 C et figure 4F de l'article).

Afin d'exclure l'action des SOC dans les effets du GPN, nous avons utilisé un inhibiteur des SOC lors d'expériences sur les effets du GPN sur la réponse au NAADP.

2) Traitement des cellules par un inhibiteur des SOC

Il a été rapporté dans les oocytes d'étoile de mer et dans les lymphocytes T que le NAADP pourrait provoquer une SOCE en ouvrant des canaux membranaires (Langhorst et al., 2004; Moccia et al., 2003). Le retour en conditions 0 Ca²⁺ extracellulaire au cours de la réponse massive induite par le GPN n'a pas d'effet immédiat sur la forte augmentation du Ca²⁺ cytosolique (Figure 5B de l'article), et pour mieux tester cette hypothèse d'entrée du Ca²⁺ par

un canal, nous avons aussi utilisé un bloqueur de l'entrée de Ca^{2+} par les SOC, le SKF 96365 (Merritt et al., 1990). En présence de cet agent pharmacologique, l'effet du GPN sur la réponse induite par le NAADP n'est pas modifié, avec toujours une forte élévation de Ca^{2+} intracellulaire (Figure 8 D, n=3). Ce résultat est en accord avec ceux décrits dans l'article et nous suggérons que cette entrée de Ca^{2+} se fait par endocytose, comme dans le cas des agonistes extracellulaires.

3) Traitement des cellules par un inhibiteur de l'endocytose

L'entrée de Ca^{2+} est seulement visible quand les lysosomes sont vidangés en présence de NAADP, ce qui suggère que les lysosomes sont la destination finale du Ca^{2+} entrant. Cette entrée de Ca^{2+} pourrait se faire par endocytose, un mécanisme plus lent et qui est connu pour apporter du Ca^{2+} aux lysosomes (Gerasimenko et al., 2001; Gerasimenko et al., 1998). De plus, le fait que la réponse calcique apparaisse massive alors même que le lysosome est lysé suggère que l'endosome pourrait lui même libérer du Ca^{2+} en réponse au NAADP.

L'entrée de Ca^{2+} par le cycle exocytose/endocytose est bien établi, et dépend de l'acidification des vésicules (Aniento et al., 1996; Gerasimenko et al., 2001; Gerasimenko et al., 1998; McNeil, 2002). Comme la Bafilomycine A1 bloque complètement les effets du NAADP, cela laisse penser que la source complémentaire de Ca^{2+} est une réserve acide.

Afin de valider cette hypothèse de l'endocytose, nous avons utilisé un agent pharmacologique inhibant l'endocytose, la cytochalasine D (Freedman et al., 1999).

Les oscillations calciques induites par l'ACh sont inhibées par l'ajout de cytochalasine D (Figure 4 G de l'article). L' IP_3 libérant principalement du Ca^{2+} à partir des granules de zymogène, la perturbation du cycle endocytose/exocytose doit empêcher ces derniers de se remplir en Ca^{2+} et inhibe les oscillations dues à l' IP_3 , et par conséquent les réponses à l'ACh.

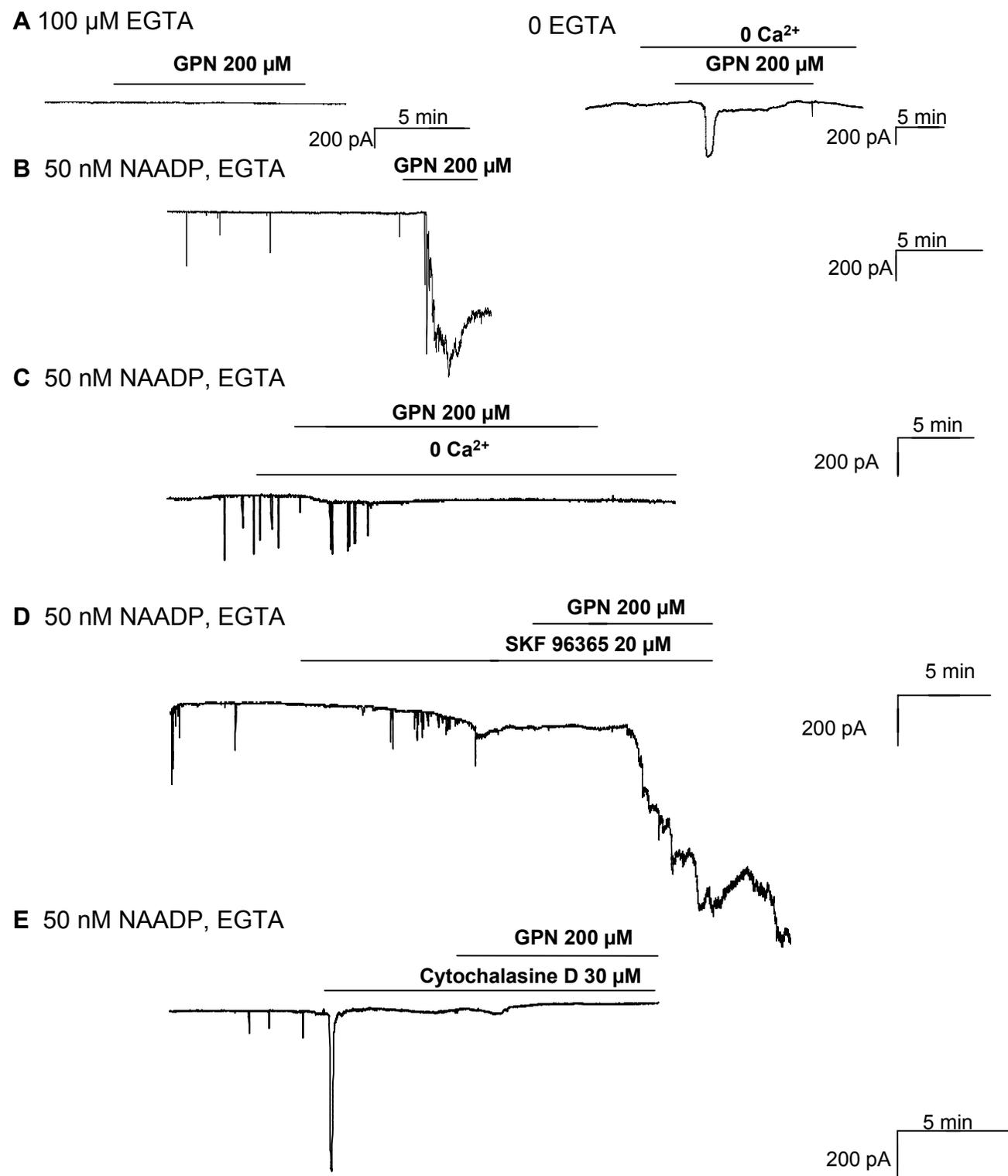


Figure 8: Rôle de l'endocytose dans les réponses au NAADP **A** En patch clamp, le GPN seul n'induit pas d'élévation de Ca^{2+} décelable grâce au pouvoir tampon de l'EGTA contenu dans la pipette de patch (gauche, $n=6$), alors qu'en absence d'EGTA, le GPN produit une élévation du Ca^{2+} cytosolique (droite, $n=3$). Nous avons donc utilisé de l'EGTA pour simplifier l'interprétation des résultats. **B** L'ajout de GPN au cours d'une réponse au NAADP provoque une forte élévation de Ca^{2+} intracellulaire ($n=6/8$). **C**. La pré-incubation des cellules en milieu extracellulaire sans Ca^{2+} prévient la forte élévation de Ca^{2+} intracellulaire précédemment observée, indiquant une origine extracellulaire de ce Ca^{2+} ($n=5/7$). **D**. Le bloqueur de SOC SKF96365 ne prévient pas l'élévation de Ca^{2+} intracellulaire provoquée par le GPN ($n=3$). **E**. L'inhibiteur de l'endocytose cytochalasine D empêche l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire due au traitement par le GPN ($n=3$).

Les oscillations calciques induites par la CCK sont également abolies par l'action de la cytochalasine D (Figure 4 H de l'article), tout comme celles induites par le NAADP (Figure 4 J de l'article), et ces expériences suggèrent donc un rôle de l'endocytose dans la signalisation calcique. Si l'endocytose est bien la voie d'entrée du Ca^{2+} impliquée dans la réponse au NAADP, on devrait pouvoir imiter les effets de la préincubation en 0 Ca^{2+} extracellulaire en inhibant l'endocytose. Nous avons donc reproduit les expériences d'application du GPN sur la réponse au NAADP non pas en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire, mais en pré-traitant les cellules avec l'inhibiteur d'endocytose cytochalasine D (Figure 8 E, n=3). L'application du bloqueur d'endocytose cytochalasine D provoque l'abolition des oscillations calciques induites par le NAADP, et l'ajout de GPN n'engendre plus d'élévation massive du Ca^{2+} intracellulaire. Comme dans le cas de la pré-incubation avec du milieu extracellulaire sans calcium, l'inhibition de l'endocytose permet d'abolir complètement la réponse au NAADP.

Dans les cellules de pancréas exocrine, l'endocytose dépend du Ca^{2+} extracellulaire (Maruyama, 1989; Maruyama et al., 1993), et ceci suggère donc que lors des expériences avec un milieu extracellulaire sans Ca^{2+} , l'endocytose était réduite ou inhibée. Après l'endocytose, le trafic intracellulaire dépend de l'acidification des endosomes, et il est donc concevable qu'en plus de leur action sur les réserves acides, les inhibiteurs de v-ATPases puissent également inhiber la réponse au NAADP par une paralysie de ce trafic.

Ces données expérimentales nous ont amené à proposer un nouveau modèle rendant mieux compte du mode d'action des messagers calciques dans les cellules acineuses de pancréas exocrine.

4) Nouveau modèle de coopération des messagers et rôle de l'endocytose dans les signaux calciques (Menteyne et al., 2006)

L'inhibition de l'acidification des réserves acides provoque l'abolition rapide et nette des oscillations calciques induites par les agonistes et les messagers, suggérant que l' IP_3 et le NAADP libèrent du Ca^{2+} à partir de réserves acides. En l'absence de Ca^{2+} extracellulaire, la vidange des lysosomes abolit les oscillations calciques induites par le NAADP, sans avoir d'effet sur celles induites par l' IP_3 . Nous en concluons que la réserve intracellulaire acide mobilisée par le NAADP est le lysosome, en accord avec les travaux d'autres groupes

(Churchill et al., 2002; Yamasaki et al., 2004), tandis que l'IP₃ libère du Ca²⁺ d'une réserve acide indépendante du lysosome. Étant donné que l'IP₃ déclenche des oscillations dans la zone apicale des cellules, cette réserve est vraisemblablement le granule de zymogène, d'autant plus que des granules isolés libèrent du Ca²⁺ en réponse à l'IP₃ (Gerasimenko et al., 1996a).

Nos expériences en présence de Ca²⁺ extracellulaire montrent qu'en plus du lysosome, le NAADP fait appel à une réserve dépendante du Ca²⁺ extracellulaire. L'inhibition de l'endocytose permet à la fois d'inhiber les réponses au NAADP et de reproduire les effets de l'absence de Ca²⁺ extracellulaire sur le résultat du traitement au GPN. Or, l'endocytose constitue une voie importante d'entrée de Ca²⁺ dans les cellules. Nous proposons donc que l'endocytose fournirait ce Ca²⁺ d'origine extracellulaire. La question se pose alors de savoir comment le Ca²⁺ contenu dans les endosomes pourrait être recruté. Au cours du cycle endocytose-exocytose, l'exocytose des lysosomes pourrait amener des récepteurs au NAADP à la membrane plasmique, qui pourraient ensuite se retrouver sur la membrane des endosomes. Nous proposons donc que la seconde réserve recrutée par le NAADP et dépendant du Ca²⁺ extracellulaire soit l'endosome (Figure 9).

Le RE participe aux réponses à tous les messagers, puisque sa vidange totale abolit toute réponse calcique. Cependant, sa vidange progressive ne parvient que difficilement à inhiber les réponses aux messagers, à l'exception notable du cADPR qui y est très sensible. Les oscillations induites par le cADPR sont également peu sensibles à la vidange des réserves acides, indiquant que le RE est la principale réserve intracellulaire recrutée par ce messager.

Nous proposons donc que les agonistes ACh et CCK initient les réponses calciques dans la zone apicale en recrutant le Ca²⁺ des réserves acides : les granules de zymogène par l'IP₃ dans le cas de l'ACh et les lysosomes et les endosomes par le NAADP dans le cas de la CCK, et que ces réponses calciques sont ensuite amplifiées et modulées par le RE sous le contrôle du cADPR (Figure 9). La coopération des messagers et le poids relatif des réserves intracellulaires de Ca²⁺ mobilisées permet ainsi de former des signaux complexes en réponse aux agonistes extracellulaires CCK et ACh.

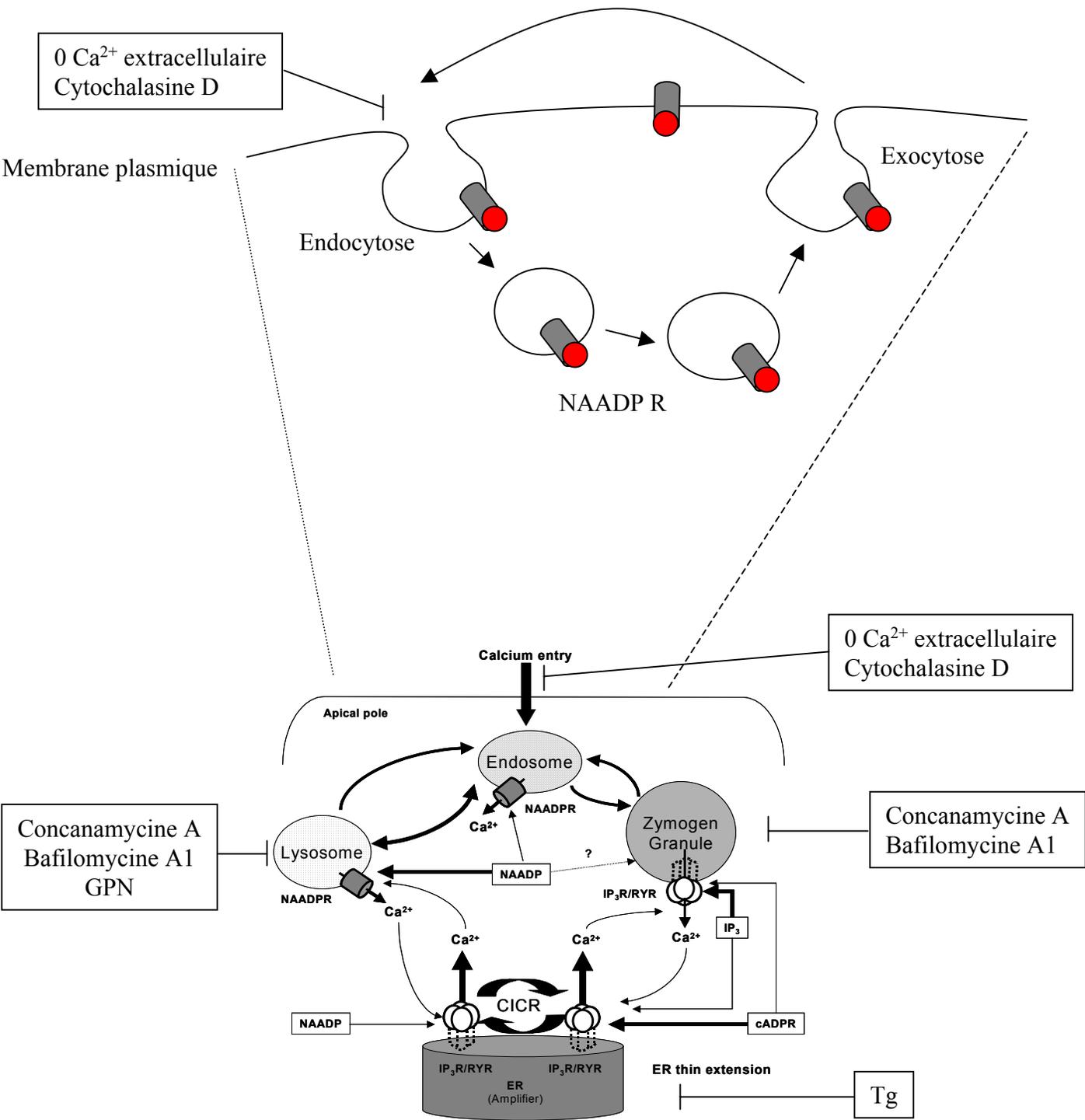


Figure 9: Modèle proposé pour expliquer comment les agonistes extracellulaires initient leurs réponses calciques en recrutant différentes réserves acides et le RE par leurs messagers respectifs.

Le Ca²⁺ lysosomal est recruté par le NAADP lors des stimulations par la CCK, et vraisemblablement par le Ca²⁺ lors des stimulations par l'ACh. De plus, nos données suggèrent que le NAADP libère aussi du Ca²⁺ des endosomes. Le Ca²⁺ des granules de zymogène est mobilisé principalement par l'IP₃ pendant la réponse à l'ACh, et dans une moindre mesure par le cADPR dans le cas des réponses à l'ACh et à la CCK.

Finalement, le RE apparaît comme la principale cible du cADPR, et dans une moindre mesure de l'IP₃ dans les oscillations calciques évoquées par les agonistes. Le RE constitue une unité d'oscillation commune nécessaire à l'amplification et à la modulation des oscillations calciques évoquées par tous les messagers et agonistes.

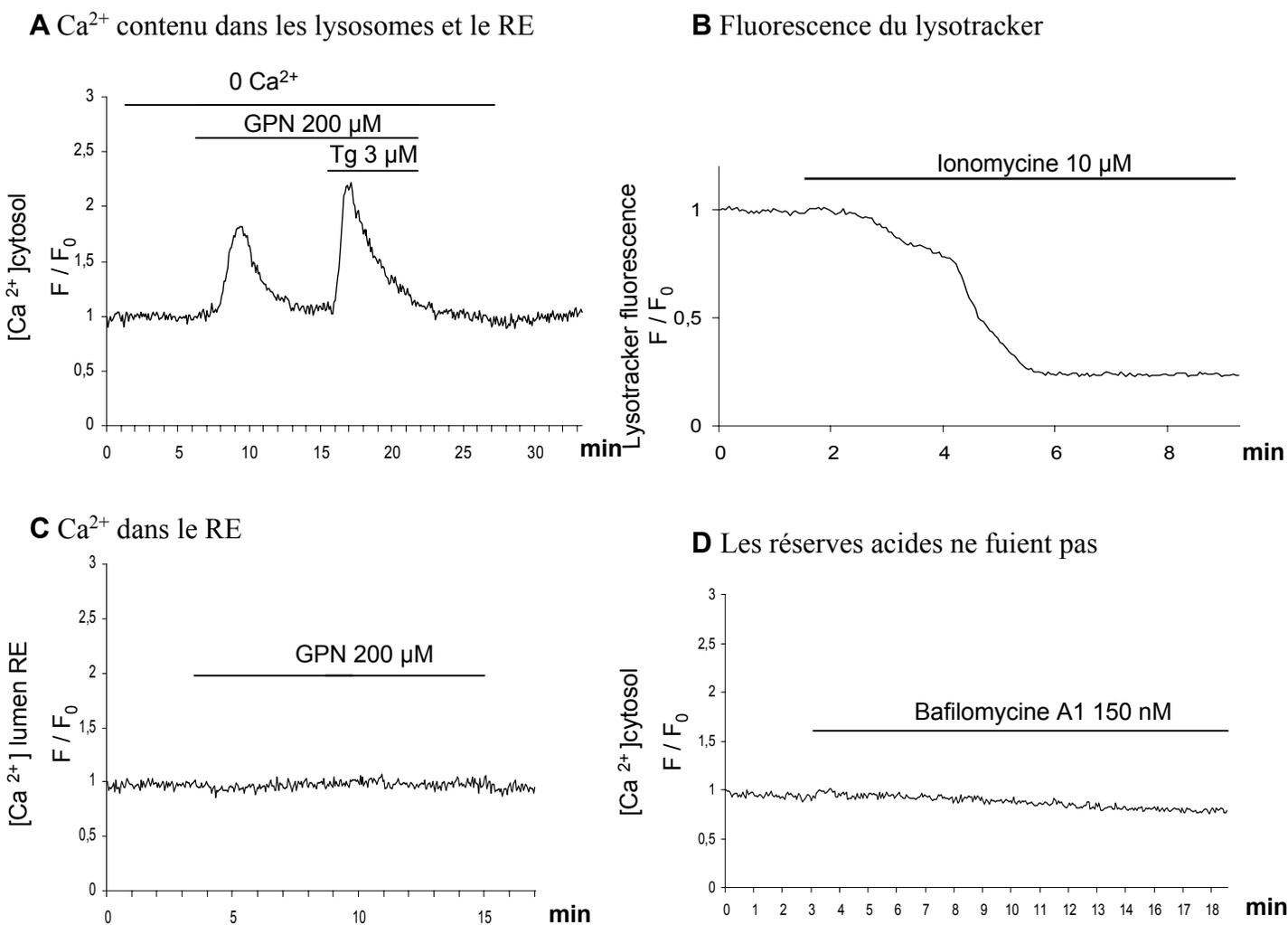


Figure 10: Expériences contrôle

La lyse osmotique des lysosomes provoque une élévation du Ca^{2+} cytosolique, et nous avons voulu vérifier l'origine intracellulaire de ce Ca^{2+} . Pour cela, les expériences avec le GPN ont été répétées en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire (figure A, $n=3$) et ont donné des résultats similaires aux expériences avec 1 mM de Ca^{2+} extracellulaire. La vidange rapide du RE par la thapsigargine provoque une disparition des lysosomes marqués par la sonde lysotracker red (fig. 3D de l'article). Nous avons attribué ce phénomène à une exocytose Ca^{2+} dépendante des lysosomes, en accord avec les données de la bibliographie (McNeil, 2002). Cependant, pour vérifier que ces effets étaient bien dus au Ca^{2+} libéré, nous avons provoqué une élévation de Ca^{2+} cytosolique par addition de ionomycine (fig B, $n=3$). Nous avons aussi testé l'hypothèse selon laquelle la lyse des lysosomes par le GPN pourrait influencer la concentration de Ca^{2+} dans le RE. La sonde calcique Mag Fluo4 AM s'accumule préférentiellement dans le lumen du RE, et le GPN ne provoque pas de variation visible du Ca^{2+} à l'intérieur du RE (fig C, $n=4$).

Lors de nos expériences, nous avons aussi utilisé les inhibiteurs d'ATPases pompes à H^+ Bafilomycine A1 et Concanamycine A. Contrairement au RE, ces compartiments acides sont supposés ne pas fuir (Churchill et al., 2002; Morgan et Galione, 2006; Rizzuto et Pozzan, 2006). L'application de ces agents pharmacologiques ne provoque pas d'élévation du Ca^{2+} cytosolique (fig D, $n=3$).

**Partie II : Etude de la synthèse du NAADP dans différents tissus
et relation à CD38**

Nous avons pu, par une approche pharmacologique, mieux comprendre le mode d'action du NAADP, et notamment quelles étaient les réserves intracellulaires de Ca^{2+} mobilisées (Menteyne et al., 2006). Un autre aspect de mon travail de doctorat a été d'étudier la synthèse de ce messager dans plusieurs tissus, afin de mieux comprendre son rôle, et d'établir un lien entre la stimulation de cellules par des agonistes, et l'activité de synthèse de NAADP.

A) Introduction bibliographique

Il a pu être montré *in vitro* que le NAADP est synthétisé, comme le cADPR, par des enzymes appelées ADPribosyl cyclases. Chez l'invertébré, la plupart des travaux sur l'activité de l'ADPribosyl cyclase ont été faits *in vitro* sur l'enzyme isolée à partir des organes reproducteurs de l'Aplysie (*Aplysia californica*), un mollusque marin (Lee et Aarhus, 1991), tandis que la plupart des travaux chez le mammifère ont été faits sur l'enzyme CD38.

1) ADP ribosyl cyclases chez les invertébrés

a) Synthèse de cADPR et NAADP chez les invertébrés

Synthèse de cADPR

Cette synthèse se produit en présence de nicotinamide adenine dinucléotide (NAD^+) et à pH neutre, par une réaction de cyclisation du NAD^+ en cADPR en libérant du nicotinamide (Lee et Aarhus, 1991) (Figure 11). La cyclase d'aplysie est une enzyme soluble de 30 kDa qui produit principalement du cADPR, mais aussi de l'ADPribose par hydrolyse du cADPR (Cakir-Kiefer et al., 2000; Ziegler, 2000).

Dans l'œuf d'oursin, deux types d'ADP ribosyl cyclases ont été décrites : l'une soluble et l'autre membranaire (Graeff et al., 1998). La cyclase soluble serait responsable de la synthèse de cADPR (Graeff et al., 1998), tandis que la cyclase membranaire serait plutôt impliquée dans la dégradation du cADPR (Graeff et al., 1998).

Une autre ADPribosyl cyclase a été décrite chez l'unicellulaire *Euglena gracilis* (Masuda et al., 1999), mais elle ne possède pas d'activité d'hydrolyse du cADPR.

Enfin, une ADPribosyl cyclase proche de celle d'Aplysie a récemment été décrite chez le plathelminthe *Schistosoma mansoni*, mais elle ne produirait pas de cADPR, mais seulement de l'ADPribose, et ne pourrait quasiment pas hydrolyser le cADPR (Goodrich et al., 2005).

Synthèse de NAADP

Après la découverte des effets du NAADP (Lee et Aarhus, 1995), il s'avère que l'ADPribosyl cyclase d'Aplysie est capable de synthétiser, en plus du cADPR, le nouveau messager libérant du Ca^{2+} NAADP (Aarhus et al., 1995). La synthèse de NAADP se fait à partir d'acide nicotinique (NA), et de nicotinamide adénine dinucleotide phosphate (NADP^+) par une réaction d'échange de bases. Cette réaction libère un nicotinamide et nécessite des conditions acides (Figure 11). La cyclase d'Aplysie s'est vite révélée être capable de synthétiser de nombreux composés en plus de ces deux messagers, dont le cADPRibose phosphate (cADPrP)(Aarhus et al., 1995). Il s'agit donc d'une enzyme multifonctionnelle capable de synthétiser toute une gamme de molécules.

Les deux ADPribosyl cyclases décrites dans l'œuf d'oursin sont aussi capables de synthétiser le NAADP par échange de bases à pH acide (Graeff et al., 1998), mais l'enzyme cytoplasmique synthétiserait plutôt du cADPR, tandis que l'autre enzyme ancrée à la membrane plasmique synthétiserait plutôt le NAADP (Wilson et Galione, 1998).

Enfin, l'ADPribosyl cyclase de *Schistosoma mansoni* est capable de synthétiser le NAADP par échange de base (Goodrich et al., 2005).

b) Régulation des ADP ribosyl cyclases chez les invertébrés

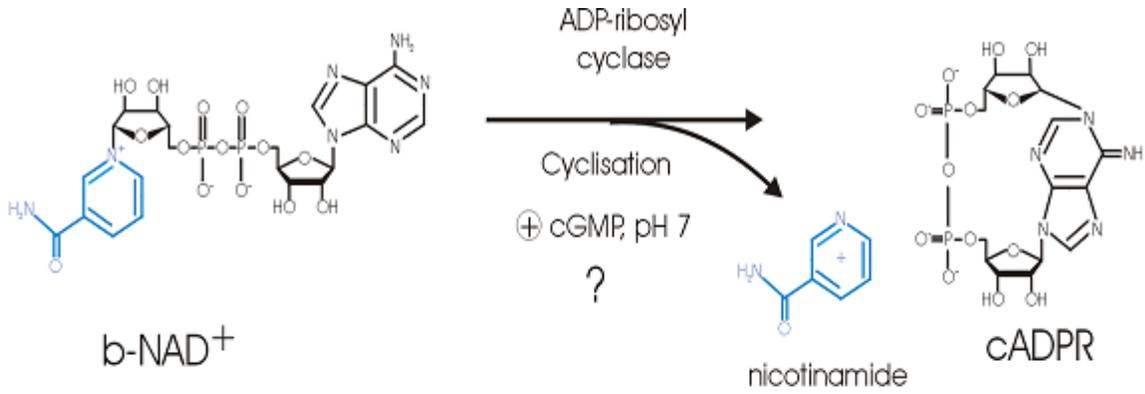
Le mode de fonctionnement de la cyclase, synthèse de NAADP ou de cADPR, dépendrait du pH acide ou neutre. Le pH optimum pour la synthèse de cADPR est neutre tandis que la synthèse optimale de NAADP se fait à pH acide (Aarhus et al., 1995; Graeff et al., 1998; Lee, 2001). Cette dépendance au pH a pu être expliquée par la structure de l'enzyme. La cyclase d'Aplysie présente une cavité qui contient le site actif. A pH acide, les groupements acides autour du site actif sont neutralisés, ce qui facilite l'accès du NA à ce site actif, et ainsi la réaction d'échange de base (Lee, 2001).

Les travaux sur la cyclase d'œuf d'oursin ont montré qu'en plus du pH, le choix de synthèse entre le cADPR et le NAADP pourrait être orientée par des messagers. Ainsi, le GMPc faciliterait la synthèse de cADPR (Graeff et al., 1998; Wilson et Galione, 1998), tandis que l'AMPc faciliterait la production de NAADP (Wilson et Galione, 1998). La cyclase soluble serait responsable de la synthèse de cADPR et serait stimulable par le GMPc (Graeff et al.,

1998), en réponse à une stimulation des œuf d'oursin par le monoxyde d'azote (NO) (Willmott et al., 1996).

Le NA, substrat de la synthèse du NAADP, permet aussi de stimuler la synthèse de NAADP: en son absence, même à pH acide, la cyclase d'Aplysie synthétise du cADPR, tandis qu'en sa présence, elle ne synthétise que du NAADP (Aarhus et al., 1995).

A



B

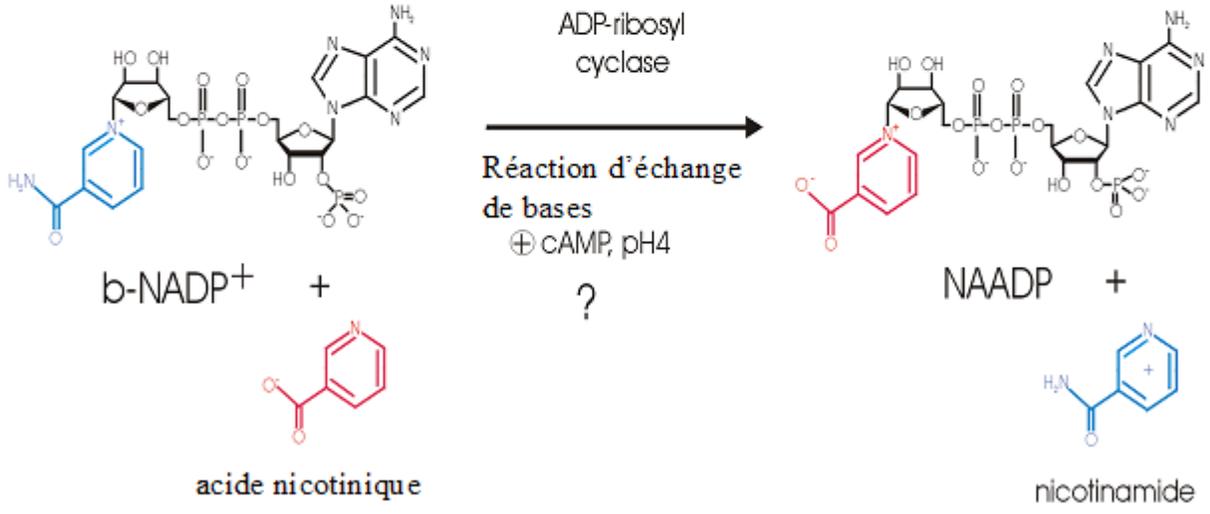


Figure 11 : Synthèse du cADPR et du NAADP par l'ADP ribosyl cyclase.

Les deux modes de fonctionnement de l'ADPribosyl cyclase:
 A pH neutre, et en présence de NAD⁺, l'ADPribosyl cyclase produit par cyclisation de l'ADPribose cyclique. Cette voie pourrait être stimulée par le GMPc (A).
 A pH acide, et en présence de NADP et d'acide nicotinique, l'ADPribosyl cyclase produit par échange de bases du NAADP (B). Cette voie pourrait être stimulée par l'AMPc.
 Les deux voies ont comme sous-produit le nicotinamide.

2) ADP ribosyl cyclases chez les mammifères

Les deux ADPribosyl cyclases purifiées jusqu'ici chez le mammifère sont l'antigène de surface leucocytaire CD38 et CD157 des cellules stromales de la moelle osseuse.

Les cyclases CD157 et CD38 partagent seulement 25 à 30% d'homologie de séquence, mais sont cependant très proches sur le plan structurel, particulièrement au niveau des sites enzymatiques actifs. Les gènes de ces deux enzymes sont portés par le chromosome 4 chez l'homme et CD157 proviendrait d'une duplication du gène de CD38 (Ferrero et Malavasi, 1997; Ferrero et al., 1999; Palade, 2007).

a) CD38

L'enzyme CD38 est une glycoprotéine transmembranaire de 45 kDa avec une courte extrémité N terminale face cytoplasmique et un long domaine C terminal extracellulaire (Jackson et Bell, 1990). Les expériences *in vitro* montrent que CD38 peut synthétiser du cADPR (Howard et al., 1993; Summerhill et al., 1993), et l'hydrolyser en ADPR (Howard et al., 1993; Zocchi et al., 1993). Cet ADPribose pourrait provoquer l'entrée de Ca^{2+} en ouvrant les TRPM2 de la membrane plasmique (Fliegert et al., 2007). CD38 produirait seulement 1 molécule de cADPR pour 100 molécules d'ADPRibose (Ceni et al., 2003a).

In vitro, CD38 est aussi capable, en présence de NA et de NADP, de synthétiser du NAADP et de l'ADPRibose Phosphate (ADPrP), et cette réaction de synthèse de NAADP se fait optimalement à pH acide (Figure 11)(Aarhus et al., 1995). En plus de ces composés, CD38 est aussi capable de synthétiser du diadenosine diphosphate et ses isomères, qui peuvent inhiber la prolifération cellulaire (Basile et al., 2005).

b) CD157

CD157 est une ecto-enzyme à ancrage GPI (Glycophosphatidyl inositol) qui est capable, comme CD38, de synthétiser le cADPR, et de l'hydrolyser en ADPR. Son pH optimum pour la synthèse de cADPR est de 4 (Hirata et al., 1994). A pH 6, CD157 produit 2 molécules de cADPR pour une molécule d'ADPRibose. On ne sait pas si CD157 est capable de synthétiser le NAADP, même si l'origine commune des deux enzymes le laisse supposer.

c) ADP ribosyl cyclases autres que CD38

L'étude des enzymes impliquées dans la synthèse du NAADP et du cADPR a été grandement facilitée par l'arrivée de modèles animaux dépourvus du gène codant pour CD38 (Cockayne et al., 1998; Kato et al., 1999). L'absence de la principale enzyme connue de synthèse du cADPR et du NAADP ne semble pas pour autant provoquer des phénotype très marqué: les souris homozygotes CD38^{-/-} sont viables, avec cependant des faiblesses spécifiques. Ces souris ont en effet une immunité humorale réduite (Cockayne et al., 1998) et sont plus sensibles aux infections (Partida-Sanchez et al., 2001; Partida-Sanchez et al., 2004). Le comportement maternel et social de ces animaux CD38^{-/-} est altéré, ce qui serait dû à une réduction de la sécrétion d'ocytocine par la neuro-hypophyse, cette libération étant elle même dépendante de CD38 (Jin et al., 2007). Les souris CD38^{-/-} sont aussi plus sujettes au diabète (Kato et al., 1999), ce qui se rapproche de certains diabètes insulino-dépendants chez l'homme déclenchés par une auto-immunité contre CD38 (Antonelli et Ferrannini, 2004; Mallone et al., 2002). Ces cas de diabète peuvent s'expliquer par le fait que la voie du cADPR et du NAADP est impliquée dans la libération d'insuline par les cellules Bêta du pancréas endocrine (Kato et al., 1999; Masgrau et al., 2003; Mitchell et al., 2003). Les souris CD38^{-/-} mâles présentent aussi une hypertrophie cardiaque, qui n'existe pas chez les femelles (Takahashi et al., 2003). Ce modèle animal a permis de décrire d'autres cyclases que CD38 dans le cerveau, les muscles et le pancréas.

Cas du Cerveau

En plus de CD38, une autre ADPribosyl cyclase a été décrites dans le cerveau (Ceni et al., 2003a). Les souris CD38^{-/-} présentent des taux réduits de cADPR dans le cerveau, et une augmentation des taux de NAD⁺ dans le cerveau (Young et al., 2006).

CD38 a longtemps été considérée comme la principale cyclase dans le cerveau, où les transcrits de CD157 sont indétectables (Itoh et al., 1994; Kaisho et al., 1994). Dans le système nerveux central, CD38 est présente dans les astrocytes et certains neurones pyramidaux. Dans ces derniers, CD38 est localisée dans le corps cellulaire, l'enveloppe nucléaire, et les dendrites, mais aussi dans les vésicules synaptiques et les densités post synaptiques, ce qui suggère un rôle de CD38 dans la transduction du signal (Adebanjo et al., 1999; Mizuguchi et

al., 1995; Yamada et al., 1997). Une augmentation de l'expression de CD38, et par conséquent de la synthèse de cADPR a été décrite dans les astrocytes stimulés par le glutamate (Bruzzone et al., 2004).

Cependant, une étude sur le cerveau de souris CD38^{-/-} a montré une activité de synthèse de cADPR associée aux membranes et indépendante de CD38, suggérant l'existence d'une autre enzyme (Ceni et al., 2003a). Cette enzyme a des propriétés distinctes de CD157, puisque son pH optimum est proche de 6. Cette enzyme produit à pH 6 une molécule de cADPR pour 9 molécules d'ADPRibose, contrairement à CD38 qui en produit une pour 100. Cette nouvelle enzyme est donc nettement plus efficace que CD38 pour la synthèse de cADPR, et n'a quasiment aucune activité d'hydrolyse du cADPR (Ceni et al., 2003a). De plus, le zinc inhibe son activité de synthèse de cADPR (Ceni et al., 2003a), contrairement à CD38 (Kukimoto et al., 1996; Zocchi et al., 1993) et CD157 où il augmente l'activité de synthèse de cADPR (Hirata et al., 1994; Hussain et al., 1998). De plus, le NGD⁺, un analogue du NAD qui est converti en un composé fluorescent, le cGDPR par CD157 et CD38, n'est pas converti par cette nouvelle enzyme (Ceni et al., 2003b).

Cas du Pancréas

Les souris CD38^{-/-} ont aussi permis de montrer dans les cellules acineuses de pancréas exocrine l'implication de la synthèse de cADPR par CD38 au cours des réponses à l'ACh (Fukushi et al., 2001). Dans les cellules de pancréas exocrine, deux ADPRibosyl cyclases seraient présentes et synthétiseraient du cADPR: l'une est CD38 et membranaire, et l'autre serait cytosolique et non CD38, et c'est cette dernière qui serait activée dans le cas de la stimulation à la CCK (Sternfeld et al., 2003).

Cas des Muscles

La première mise en évidence d'un lien entre un agoniste et l'activité ADPRibosyl cyclase a été faite dans les muscles lisses, où la CCK provoque une élévation de la production de cADPR (Kuemmerle et Makhlof, 1995). L'importance de l'activité de l'enzyme CD38 a récemment été mise en évidence dans les muscles lisses des voies respiratoire, bien que seule la synthèse du cADPR, et non du NAADP ait été étudiée par ces auteurs en réponse au TNF-alpha (Kang et al., 2005). Une autre ADP ribosyl cyclase capable de synthétiser du cADPR et

du NAADP, mais qui ne partage pas les caractéristiques de CD157 et CD38 a aussi été décrite dans des fractions de réticulum sarcoplasmique de muscle squelettique (Bacher et al., 2004). Il a été montré que les cellules du myomètre des souris CD38^{-/-} contenaient du NAADP, mais pas de cADPR, indiquant une synthèse de NAADP indépendante de CD38 dans ce tissu (Soares et al., 2007). Il a été proposé que cette synthèse de NAADP indépendante de CD38 se ferait par un mécanisme différent de l'échange de bases (Soares et al., 2007), et qui pourrait se faire par phosphorylation du NAAD, ou encore par conversion de l'amide du NADP en groupement acide.

d) Régulation des ADPribosyl cyclases de mammifère.

Définition des termes utilisés :

Du fait des différentes techniques disponibles pour doser le NAADP, les auteurs parlent **d'activité cyclase** lorsqu'il mesurent la quantité de NAADP produite par échange de bases par des extraits de tissus auxquels ils ont fourni les substrats, et de **taux endogènes** lorsqu'ils mesurent directement la concentration de NAADP présente dans des cellules et résultant d'une synthèse en conditions physiologiques sans ajout de substrat exogène ou au cours d'une stimulation.

L'étude des ADPribosyl cyclases a permis de mettre en évidence des modulateurs de leur activité enzymatique, que ce soit pour la synthèse de cADPR ou de NAADP. Le cADPR ayant été découvert avant le NAADP, il y a plus de données sur la régulation de sa synthèse.

Effets du pH sur l'activité de l'ADPribosyl cyclase

Les travaux réalisés sur l'enzyme de mammifère CD38 ont permis de mettre en évidence une relation entre le pH et la synthèse des messagers cADPR et NAADP. Comme chez les invertébrés, un pH acide favorise la synthèse de NAADP tandis que la synthèse de cADPR se fait optimalement à pH neutre (Aarhus et al., 1995; Chini et al., 2002; Lee, 2001). CD157 a cependant un pH optimal de 4 pour synthétiser le cADPR (Hirata et al., 1994).

Effets du zinc et du cuivre sur l'activité de l'ADPribose cyclase

Le cation divalent Zinc augmente l'activité de synthèse de cADPR par l'enzyme CD38 humaine (Kukimoto et al., 1996; Zocchi et al., 1993), ainsi que par BST1 chez l'homme (Hirata et al., 1994) et chez la souris (Hussain et al., 1998). A l'inverse, le Zinc réduit fortement la synthèse de cADPR par une ADPribose cyclase non-CD38 présente dans les membranes de cerveau de souris CD38^{-/-} (Ceni et al., 2003a).

Le cuivre a été rapporté comme capable de stimuler la synthèse de cADPR par CD38, et d'en inhiber la synthèse par BST1 (Hirata et al., 1994)

Effets du GMPc et de l'AMPc sur l'activité de l'ADPribose cyclase

Une augmentation du cADPR a aussi été décrite dans les cardiomyocytes en réponse à l'AMPc, et cette synthèse serait indépendante de CD38 (Xie et al., 2005).

Dans les cellules PC12, le NO stimule la synthèse de cADPR via le GMPc (Clementi et al., 1996), comme cela a été décrit chez l'œuf d'oursin (Wilson et Galione, 1998).

Il a été montré dans l'hippocampe que le phénomène de dépression synaptique LTD (Long term depression) impliquait le NO. L'élévation du Ca²⁺ dans l'élément post-synaptique activerait la synthèse de NO. Ce NO agirait sur l'élément pré-synaptique en y activant des guanylate cyclases. Le GMPc produit stimulerait alors, via la phosphorylation par une protéine kinase, une ADPribose cyclase qui produit alors du cADPR dans l'élément pré-synaptique. Le Ca²⁺ libéré en réponse à ce cADPR participerait à une réduction de la quantité de neurotransmetteur libérée. Dans les muscles lisses, le NO inhiberait la synthèse de cADPR (Yu et al., 2000), et cette inhibition serait indépendante du GMPc (White et al., 2002).

De plus, des augmentations de la synthèse de cADPR en réponse à une stimulation par l'ACh via des récepteurs muscariniques ont été décrites dans les cellules NG108-15 (Higashida et al., 1997), et dans les cellules chromaffines la synthèse de cADPR est stimulée par l'ACh via l'AMPc (Morita et al., 1997). De même, une synthèse de cADPR en réponse à la stimulation de récepteurs couplés à des protéines G a été montré, par exemple dans le cas du pancréas exocrine lors de la stimulation par la CCK (Sternfeld et al., 2003), dans le myomètre par l'ocytocine (Thompson et al., 2004), ou e dans les muscles lisses stimulés par la CCK (Kuemmerle et Makhlouf, 1995). Dans le pancréas endocrine, la libération d'insuline en réponse au glucose implique une production de cADPR par CD38 (Kato et al., 1999).

Effets de l'ATP

L'ATP a été décrit comme capable d'inhiber l'activité d'hydrolyse du cADPR par CD38 (Okamoto et al., 1997). Cette inhibition serait de type compétitive, l'ATP entrant en compétition avec le cADPR pour la fixation sur le site nucléotidique de l'enzyme (Tohgo et al., 1997). Par contre, l'ATP ne semble pas avoir d'effets sur la synthèse de cADPR par l'ADPribosyl cyclase des membranes de cerveau décrite dans les souris CD38^{-/-} (Ceni et al., 2003a).

e) Localisation des ADP ribosyl cyclases

L'enzyme CD38 a été montrée comme largement présente dans les tissus de mammifères (Cancela et al., 1999; Chini et al., 2002; Fernandez et al., 1998; Guse, 1999; Lee, 2001; Patel et al., 2001).

CD38 a une large distribution subcellulaire (Chini et al., 2002; Guse, 2000; Lee, 2001), puisqu'elle a été décrite comme présente sur la membrane plasmique, dans le cytosol, et dans des organites intracellulaires comme le noyau (Adebanjo et al., 1999), et que l'activité de synthèse de NAADP et cADPR est aussi présente dans les mitochondries (Liang et al., 1999).

Synthèse de cADPR

La situation intracellulaire ou cytosolique de CD38 doit permettre la synthèse de cADPR dans le cytoplasme, et il a été montré dans le pancréas exocrine que la synthèse de cADPR était due à une ADPribosyl cyclase cytosolique indépendante de CD38 (Sternfeld et al., 2003). De même, une activité de synthèse de cADPR indépendante de CD38 a aussi été montrée dans le cerveau (Ceni et al., 2003a), et une enzyme cytosolique a été décrite dans le cerveau de bœuf (Matsumura et Tanuma, 1998). De plus, CD38 a surtout une activité de synthèse d'ADPRibose dans le cerveau, et l'autre cyclase décrite serait plutôt portée par les membranes intracellulaires des neurones (Ceni et al., 2003a)

Cependant, la présence des enzymes CD38 et CD157 sur la membrane plasmique, avec leur site catalytique à l'extérieur de la cellule soulève des questions, puisque le cADPR qu'elles

pourraient éventuellement produire se retrouverait donc à l'extérieur de la cellule, alors que sa cible, le RyR est intracellulaire. Cette situation surprenante a été qualifiée de paradoxe topologique (De Flora et al., 2000; De Flora et al., 1997; Lund et al., 1998), et pose deux questions importantes: comment le NAD^+ intracellulaire accèderait t'il à l'enzyme, et comment le cADPR produit pourrait-il atteindre ses cibles à l'intérieur de la cellule?

Il existe aussi une fraction de CD38 incorporé dans les membranes des organites impliquées dans le trafic intracellulaire, avec le site actif du coté du lumen, et qui correspondraient à l'endocytose ou l'exocytose de l'enzyme (De Flora et al., 2000). En effet, l'endocytose de CD38 est associée à une augmentation du Ca^{2+} cytosolique qui pourrait être médiée par le cADPR (Zocchi et al., 1996). Pour expliquer ce paradoxe, il a été proposé que le NAD^+ et le cADPR pourraient être transportés à travers les membranes. Il se pourrait que la réaction de synthèse ait lieu dans la cellule, au niveau des membranes des vésicules d'endocytose : le NAD^+ entrerait dans ces vésicules par les connexines 43, y serait converti en cADPR par CD38, et le cADPR ainsi produit serait transféré dans le cytosol par des transporteurs (Zocchi et al., 1999). Pour éviter de trop fortes élévations de Ca^{2+} intracellulaire, un tel système nécessite une régulation, et un rétrocontrôle qui serait effectué par le Ca^{2+} puisque le passage à travers les connexines 43 est inhibé par de fortes concentrations de Ca^{2+} (Bruzzone et al., 2001b). Le NAD^+ pourrait aussi franchir la membrane plasmique au travers des connexines 43 et ainsi atteindre l'enzyme extracellulaire (Bruzzone et al., 2001a). Le cADPR produit pourrait alors être transporté à travers la membrane plasmique par l'enzyme CD38 elle même ou par des transporteurs de nucléosides (De Flora et al., 2004; Franco et al., 1998; Franco et al., 2001b; Guida et al., 2002). Cependant, l'hypothèse d'un transport du cADPR par CD38 est controversée, en raison de la courte existence du complexe CD38-cADPR, qui ne permet pas l'internalisation du cADPR produit (Cakir-Kiefer et al., 2001), et le cADPR est plus vraisemblablement produit par des ADPribosyl cyclases cytosoliques.

Ce paradoxe topologique de la synthèse du cADPR par CD157 ou CD38 a aussi amené à penser que le cADPR pourrait aussi avoir un rôle paracrine et autocrine (De Flora et al., 2004; Franco et al., 2001b). Un tel rôle paracrine du cADPR a été décrit dans les muscles lisses de la trachée (Franco et al., 2001a) qu'il sensibiliserait à l'ACh. Le cADPR extracellulaire pourrait aussi favoriser la prolifération des fibroblastes de la lignée 3T3 (Franco et al., 2001b), et des progéniteurs des cellules hématopoïétiques (Podesta et al., 2000). Les astrocytes d'hippocampe maintenus en culture produiraient du cADPR qui par autocrinie et paracrinie favoriserait la libération de neurotransmetteur par les astrocytes et les neurones (Verderio et al., 2001).

Synthèse de NAADP

En ce qui concerne le NAADP, sa synthèse par CD38 nécessite des conditions acides qui ne peuvent être obtenues que dans des organites intracellulaires. La synthèse de NAADP a été montrée comme optimale en conditions acides dans tous les tissus testés (Aarhus et al., 1995; Bacher et al., 2004; Cancela et al., 1999; Cheng et al., 2001; Chini et al., 2002).

Ces conditions acides suggèrent que le NAADP est synthétisé dans des compartiments acides comme les endosomes ou les lysosomes (Aarhus et al., 1995; Chini et al., 2002; Menteyne et al., 2006). Une endocytose de CD38 a été décrite dans les lymphocytes B Namalwa, ainsi que dans les cellules des lignées Jurkat, HeLa et NIH 3T3 (Zocchi et al., 1996; Zocchi et al., 1999), bien que la synthèse de NAADP n'ait pas été étudiée.

3) Synthèse de NAADP en réponse à une stimulation

Dans les cellules de pancréas exocrine, la synthèse de NAADP est stimulée par l'agoniste extracellulaire CCK, ainsi que celle de cADPR (Yamasaki et al., 2005). Dans le cas d'une stimulation par l'ACh, seule la synthèse de cADPR par CD38 (et d'IP₃) est stimulée (Fukushi et al., 2001; Yamasaki et al., 2005). A l'opposé, dans le pancréas endocrine, le glucose stimule la synthèse à la fois de cADPR et de NAADP (Masgrau et al., 2003; Okamoto, 1999). La question qui se pose alors est: est ce que la même enzyme synthétise *in vivo* à la fois le cADPR et le NAADP, selon l'agoniste, ou bien est ce que ce sont des enzymes distinctes, chacune étant liée à un des agonistes.

Une augmentation des taux endogènes de NAADP en réponse à une stimulation extracellulaire a été décrite dans le pancréas endocrine en réponse au glucose (Masgrau et al., 2003), dans le spermatozoïde d'oursin par contact avec la gangue gélatineuse de l'œuf (Billington et al., 2002; Churchill et al., 2003) et plus récemment par la CCK dans les cellules acineuses de pancréas exocrine (Yamasaki et al., 2005). Dans les cellules de pancréas exocrine, il n'a pas encore pu être déterminé comment le récepteur à la CCK stimulait l'activité de CD38 ou d'une autre ADPribosyl cyclase pour former du NAADP.

4) **Métabolisme du NAADP**

La voie de dégradation du messenger NAADP est encore très mal connue. La dégradation du NAADP par des microsomes de cerveau a été décrite (Bak et al., 1999). Le NAADP serait dégradé en NAAD dans le cerveau par une phosphatase activée par le Ca^{2+} , et ce mode d'inactivation a l'avantage de permettre un rétrocontrôle négatif du taux de NAADP par l'augmentation de Ca^{2+} cytosolique (Berridge et al., 2002a).

Plus récemment, la possibilité d'une dégradation du NAADP en ADPribose Phosphate par CD38 a été proposée (Graeff et al., 2006), et cette dégradation serait plus efficace à pH acide, tout comme la synthèse de NAADP. Ces auteurs montrent aussi que cette propriété est également présente chez la cyclase d'Aplysie.

5) **Objectifs**

L'enzyme CD38 est capable de synthétiser le NAADP *in vitro*. Nous avons voulu connaître la contribution de CD38 à la synthèse de NAADP dans les tissus de souris, en comparant l'activité de synthèse de NAADP entre les tissus de souris témoin C57Bl6 et CD38^{-/-}.

Bien que le NAADP ait été impliqué dans de nombreuses fonctions, aucun lien n'a pu être établi entre une stimulation par agoniste et sa la synthèse de NAADP par CD38 *in vivo*.

Nous avons aussi voulu tester une implication possible du NAADP dans les dystrophies musculaires en mesurant la synthèse de NAADP dans les muscles de souris mdx, un modèle de la maladie de Duchenne.

Enfin, nous avons aussi testé plusieurs agonistes et modulateurs dans différents tissus de souris C57 et CD38^{-/-}. Bien que ces résultats soient préliminaires, ces données ouvrent cependant des perspectives intéressantes d'étude sur la synthèse du messenger libérant du Ca^{2+} NAADP, et ses possibles implications dans des processus physiologiques.

6) Méthodes expérimentales

a) Méthode de dosage de l'activité de synthèse de NAADP par l'ADPribosyl cyclase

Il existe à ce jour plusieurs méthodes d'étude de la synthèse du NAADP. La première consiste à mesurer par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) la synthèse de NAADP par échange de bases à partir d'un homogénat tissulaire auquel on a ajouté les deux substrats NA et NADP⁺. Le NAADP est alors synthétisé par la ou les ADPribosyl cyclases contenues dans l'homogénat à partir de substrats exogènes. C'est la solution technique que nous avons adoptée. La méthode du dosage de l'activité de synthèse de NAADP en présence des substrats exogènes nous fournit une indication globale du NAADP synthétisé. Nous n'avons pas mesuré la dégradation du NAADP par les extraits tissulaires, et nos résultats sont donc le bilan de la synthèse et de la dégradation du NAADP.

b) Autres méthodes

En plus de l'activité de synthèse de NAADP par les tissus, il est maintenant possible de mesurer les taux endogènes de NAADP. Il existe deux méthodes de dosage des taux endogènes de NAADP, l'une étant basée sur l'amplification enzymatique des taux endogènes de NAADP (principe du « cycling assay ») (Graeff et Lee, 2002), et l'autre sur la liaison compétitive du NAADP endogène et de ³²P-NAADP avec des homogénats d'œuf d'oursin (Méthode de « binding ») (Churchill et al., 2003; Masgrau et al., 2003; Yamasaki et al., 2005).

Ces méthodes de dosage ont permis de mieux comprendre le rôle de messager du NAADP dans la stimulation des cellules par des agonistes dans des conditions plus physiologiques (Masgrau et al., 2003; Soares et al., 2007; Yamasaki et al., 2005).

B) Matériels et méthodes II : Dosage de la synthèse du NAADP par l'ADPribosyl cyclase en HPLC

L'HPLC est une technique d'analyse et de séparation de composés chimiques. Nous avons utilisé cette technique pour mettre en évidence l'activité de synthèse de NAADP par échange de base dans différents tissus.

a) Principe de la technique

La chromatographie en phase liquide sur une colonne échangeuse d'ions repose sur la fixation, puis l'élution des composés testés par une colonne échangeuse d'ions. Cette colonne contient une résine constituée de polymères, qui est traversée par un éluant. Des ions sont échangés entre la résine et l'éluant selon la force acide ou basique de la résine, le pH de l'éluant, et les pKa (en particulier le pH isoélectrique) des composés à séparer.

Les oligonucléotides peuvent donc être séparés en faisant varier le pH de l'éluant.

b) Dispositif expérimental et analyse en HPLC

Nous avons utilisé une colonne échangeuse d'anions constituée de polyéthylène imine quaternaire (Poros HQ). L'éluant est constitué d'une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique (TFA) dont on fait varier la concentration.

Les composés à étudier sont injectés dans la colonne avec de l'eau. Comme on se trouve au dessus du pH isoélectrique des dérivés nucléotidiques, ils sont chargés négativement et se fixent par échange d'anions sur la résine de la colonne. Pour décrocher les composés, on accroît la concentration de TFA dans l'éluant, jusqu'à atteindre le point isoélectrique du composé. A ce moment là, le composé change de charge et se décroche de la résine.

Une fois élués, les composés sont entraînés jusqu'à un détecteur UV qui mesure leur absorbance. Les pics d'absorbance ainsi obtenus ont une surface proportionnelle à la concentration du composé, et il est possible, à partir d'une courbe étalon, et en intégrant la surface des pics, de déterminer la concentration de chaque molécule.

Nous utilisons un appareillage HPLC Beckman système Gold, piloté par le logiciel 32Karat. Ce système se compose d'une pompe, d'un injecteur automatique, et d'un détecteur UV, le tout sous contrôle d'un ordinateur. La pompe fournit un gradient de TFA qui va pouvoir

traverser la colonne échangeuse d'ions. Les échantillons sont injectés par l'injecteur automatique, et en fin de chaîne, le détecteur UV détecte le passage des composés élués.

Le logiciel 32Karat permet de déterminer les gradients, et de tracer des chromatogrammes à partir des indications du détecteur UV.

Le gradient de TFA est produit par mélange du solvant A (eau distillée) et du solvant B (solution de 1% TFA) avec un débit constant de 2 ml/min. Le gradient à T0 est constitué de 0 % de solution B, puis la concentration de TFA est progressivement augmentée : il passe à 20 % de solvant B en 20 min, puis augmente encore à 32 % en 5 min, avant de revenir à 0 % en 3 min. Le volume d'échantillon injecté par l'injecteur automatique est de 30 µl, et le détecteur UV mesure l'absorbance à une longueur d'onde de 254 nm, avec une fréquence d'acquisition de 1 Hertz.

Ce gradient nous a permis de séparer les composés en rapport avec la synthèse de NAADP, c'est à dire le NA et le NADP⁺ (les substrats), et le NAADP et l'ADPribose Phosphate (ADPrP) (les produits). La méthode est précise, puisque les temps d'élution des différents composés sont séparés par au moins deux minutes, ce qui rend leur distinction et leur mesure simple et précise (Figure 12). Pour mesurer les produits synthétisés, nous avons utilisé des standards de concentrations connues de NAADP et ADPrP. La surface des pics, obtenue par intégration, est proportionnelle à la concentration du composé, et peut donc être déterminée à partir d'une courbe étalon.

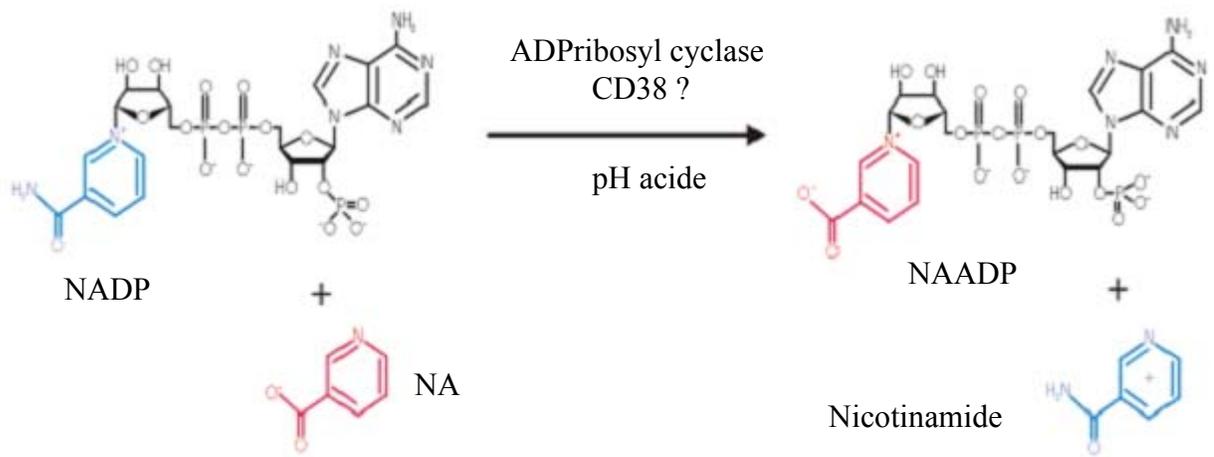
c) Prélèvement des tissus et protocole de dosage

Prélèvement de tissus

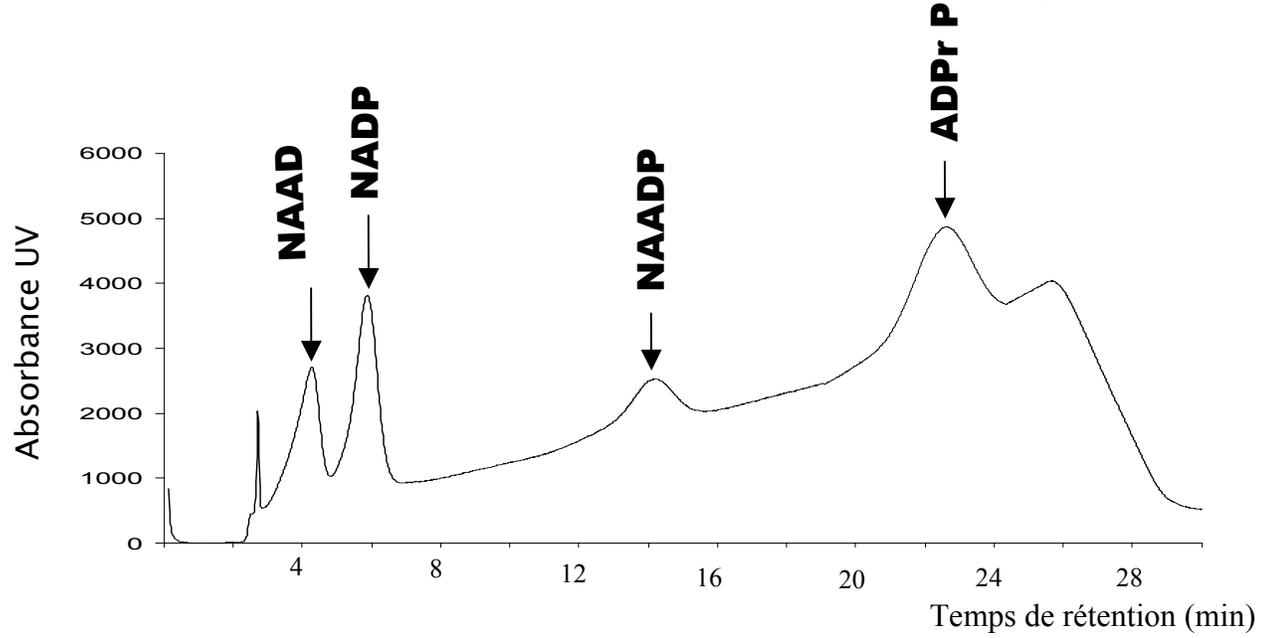
Cette méthode de dosage par HPLC nous permet de quantifier l'activité de synthèse de NAADP par échange de base. Nous l'avons utilisé sur des extraits de tissus de souris.

Après sacrifice de l'animal par dislocation cervicale, l'animal est déposé sur un lit de glace et les organes et tissus sont rapidement prélevés, puis congelés dans l'azote liquide. Ils sont ensuite maintenus à -80°C jusqu'à l'expérience de dosage.

A



B



C

Composés standard	NA	NAAD	ADPribose et cADPR	NADP	NAADP	cADPRP	ADPrP
Temps de rétention (min)	2,7	4,4	5,6	6	14,4	19	22,4

Figure 12: Méthode de dosage de l'activité de synthèse du NAADP par HPLC

A synthèse de NAADP par échange de bases: en présence de NADP et de NA, l'ADPriboseyl cyclase produit à pH acide du NAADP par élimination de nicotinamide.

B Chromatogramme montrant les temps d'éluion de certains composés standard impliqués dans l'activité de l'ADPriboseyl cyclase.

C tableau montrant les temps d'éluion des différents composés standard.

Les organes et tissus sont décongelés et sont homogénéisés en présence d'une solution « intracellulaire » de composition (en mM) 140 KCl, 1,13 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES; pH 7,2 ajusté par KOH dans un potter maintenu dans la glace.

L'homogénat ainsi obtenu subit un cycle de quatre congélations-décongelations dans de l'azote liquide.

On prélève alors un échantillon de chaque homogénat pour réaliser le dosage des protéines (cf. dosage des protéines dans les échantillons). Le reste de l'homogénat est alors mis en présence du substrat NA (7 mM), et d'HCl qui acidifie l'ensemble jusqu'à un pH de 4,5-5.

Les candidats agoniste ou modulateurs sont alors ajoutés et la réaction d'échange de base est démarrée par ajout du second substrat, le NADP (0,3 mM), et le tout est incubé au bain marie à 37°C.

A différents temps, la réaction enzymatique est arrêtée par prélèvement d'une fraction de volume réactionnel et addition d'acide perchlorique froid à 10 % (1 Volume d'acide pour 1 volume d'échantillon). Les échantillons sont alors laissés 30 minutes avec l'acide perchlorique dans de la glace pour laisser les protéines précipiter.

Les échantillons sont alors centrifugés 2 minutes à 12000 rpm et à 4°C, et le surnageant est collecté. Ce surnageant est alors neutralisé par ajout de K₂CO₃ 3,5 M (environ 18 µl pour 180 µl de surnageant). Les tubes sont à nouveau centrifugés 15 minutes à 13000 rpm pour précipiter les sels, et le surnageant collecté pour être congelé ou directement injecté dans l'HPLC.

Dosage des protéines dans les échantillons

La concentration de protéines des homogénats a été déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Pour cela, un réactif contenant 25 mg de bleu de Comassie, 12,5 ml d'éthanol 95°, 25 ml d'acide ortho-phosphorique complété à 250 ml par de l'eau distillée est mis à incuber 30 minutes avec les échantillons et une gamme de concentration connue (BSA). L'absorbance des échantillons est alors mesurée au spectromètre à une longueur d'onde de 595 nm. La comparaison des valeurs lues avec celles de la gamme permettent de déterminer la concentration de protéines de la gamme.

d) Souris CD38^{-/-}

Les souris témoins C57Bl6 ont été achetées auprès de l'élevage CER Janvier, et les souris C57Bl6-CD38^{-/-} ont été obtenues par une collaboration avec les laboratoires de F. Lund (Trudeau Institute, New York), et MJ. Moutin (Grenoble).

Ces souris CD38^{-/-} ont été produites par invalidation du gène codant pour la protéine CD38 via une élimination des exons 2 et 3 qui contiennent des séquences très conservées des ADPribosyl cyclases et importantes pour l'activité enzymatique (Cockayne et al., 1998; Munshi et al., 2000).

Les souris CD38^{-/-} étant peu fertiles, nous les avons croisées avec les souris CD38^{+/+} pour obtenir des hétérozygotes, plus fertiles. Les hétérozygotes sont ensuite croisés à leur tour, et la descendance génotypée pour séparer les hétérozygotes des homozygotes CD38^{-/-}.

Pour le génotypage des souris CD38^{-/-}, l'ADN génomique a été prélevé des queues des souris et testé en utilisant le kit Nucleospin tissue kit (Macherey Nagel). L'exon 2 a été amplifié par PCR et les résultats analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

C) Résultats

1) Ubiquité de l'activité de synthèse de NAADP à travers les tissus

Nous avons mesuré l'activité de synthèse de NAADP dans différents tissus, afin de pouvoir comparer les synthèses dans des conditions standardisées et de valider la méthode.

Nous avons ainsi testé la capacité de synthèse du NAADP en présence de substrats exogènes dans le muscle squelettique, la rate (organe riche en CD38), le pancréas, le cœur, les poumons, la moelle épinière, le cerveau et la prostate de souris C57 (Figure 13 B). Un exemple de chromatogramme montre la consommation de NADP et la formation de NAADP et d'ADPrP par des extraits de rate (Figure 13 A). Ces expériences ont été directement réalisées à partir des homogénats d'organes, incubés 30 minutes avec 7 mM de NA et 0,3 mM de NADP. Cette étude ne correspond pas à une étude cinétique avec des concentrations de protéines standardisées pour tous les tissus, mais permet une comparaison qualitative. Afin de normaliser ces données, la synthèse mesurée dans les homogénats a été ramenée à une valeur par milligramme de protéines.

Ces tests montrent que les huit tissus testés sont capables de synthétiser le NAADP par échange de base, et avec les travaux de Chini et al., soulignent l'ubiquité de la synthèse de NAADP (Chini et al., 2002), avec une forte production de NAADP dans la moelle épinière.

Nous décrivons ici pour la première fois la synthèse de NAADP dans des tissus comme la moelle épinière et la prostate .

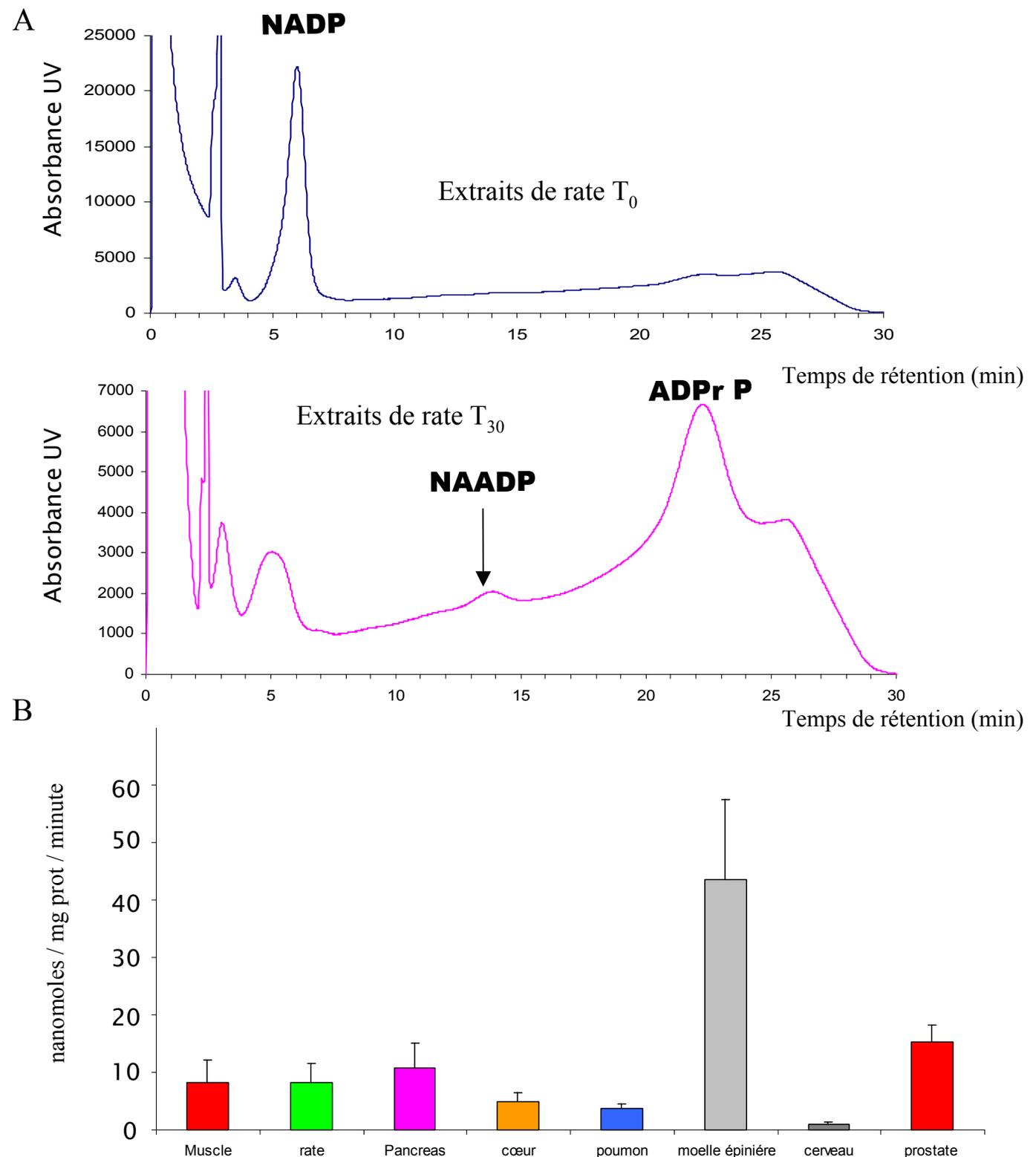


Figure 13: Activité de synthèse ubiquitaire du NAADP

A) Chromatogrammes montrant que l'incubation d'extraits de rate, un tissu riche en CD38, avec du NA (7 mM) et du NADP (0,3 mM) à pH acide et à 37°C montre une consommation du NADP, et l'apparition de NAADP et d'ADPrP dans la préparation.

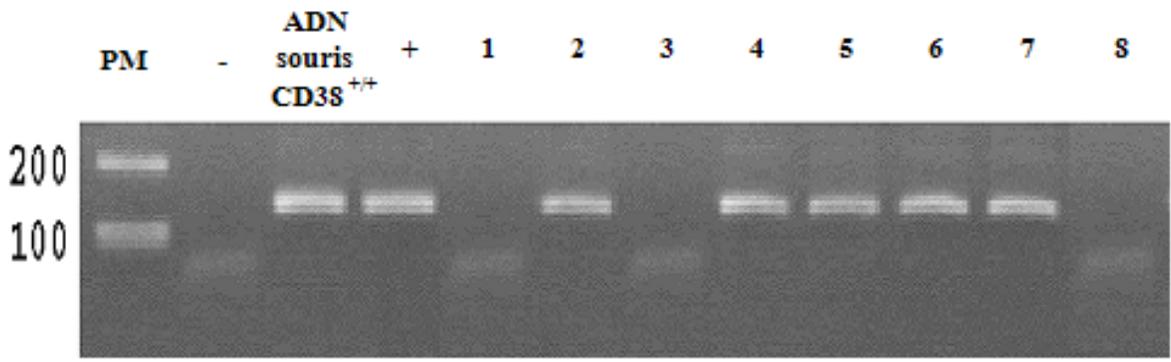
B) Synthèse de NAADP par échange de bases dans les différents tissus testés. Les valeurs sont exprimées en nanomoles de NAADP formées par milligramme de protéines par minute, ± écart type (n= 3).

2) L'enzyme CD38 est la principale enzyme de synthèse du NAADP (cas particulier du cerveau)

Pour étudier le rôle de CD38 dans la synthèse de NAADP par échange de base, nous avons utilisé des souris CD38^{-/-}. Les mêmes expériences de mesure d'activité de synthèse de NAADP ont été réalisées en parallèle sur des tissus extraits de souris C57 (contrôle) et CD38^{-/-} (Figure 14). Les résultats montrent que plus aucune synthèse de NAADP n'est détectable dans les tissus d'animaux CD38^{-/-}, à l'exception notable du cerveau. Ceci indique que CD38 est la principale enzyme responsable de l'activité de synthèse de NAADP dans les tissus testés, et qu'il existe dans le cerveau une autre ADPribosyl cyclase que CD38 capable de synthétiser du NAADP par échange de bases. Cependant, le fait qu'on ne mesure aucune activité de synthèse en présence de substrats exogènes ne signifie pas pour autant qu'il ne subsiste pas de faibles taux de NAADP endogènes, comme cela a été décrit récemment dans le myomètre de souris CD38^{-/-} où une synthèse endogène de NAADP subsiste (Soares et al., 2007).

L'équipe de M.J. Moutin a déjà décrit dans le cerveau de souris CD38^{-/-} une synthèse de cADPR par une ADPribosyl cyclase non CD38 qui serait associée aux membranes (Ceni et al., 2003a). La mesure de l'activité de synthèse de NAADP dans les synaptosomes montre que si la synthèse de NAADP est détectable dans les synaptosomes de souris C57, aucune synthèse de NAADP n'a pu être détectée dans les synaptosomes de souris CD38^{-/-} obtenus par une collaboration avec M.J. Moutin (Figure 15). L'étude de Ceni et al., montrait une synthèse de cADPR à la fois dans les synaptosomes des souris C57 et CD38^{-/-}, et nos résultats suggèrent donc que la cyclase non CD38 qui synthétise le cADPR et celle qui synthétise le NAADP sont deux enzymes bien distinctes, et peut être de localisation cellulaire différente. Il est aussi intéressant de constater que cette synthèse indépendante de CD38 ne se retrouve pas dans la moelle épinière, alors que la synthèse de NAADP dans la moelle épinière des souris C57 est très importante.

A



B

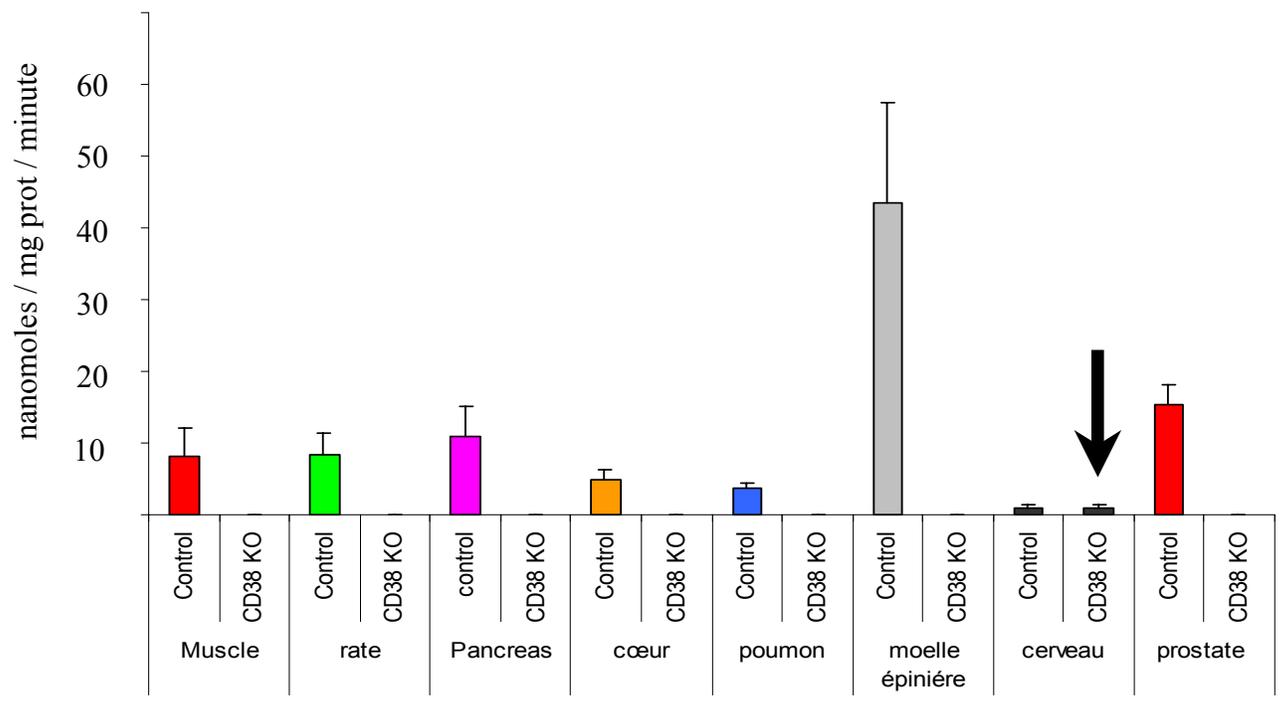


Figure 14: importance de CD38 dans l'activité de synthèse du NAADP

A. Gènotypage de souris transgèniques par PCR.

B. Comparaison de l'activité de l'ADPribosyl Cyclase des souris contrôles C57 et CD38^{-/-} mesurée dans différents tissus incubés 30 minutes en présence des substrats à 37°C. Les valeurs sont exprimées en nanomoles de NAADP formées par milligramme de protéines par minute, ± écart type (n=3).

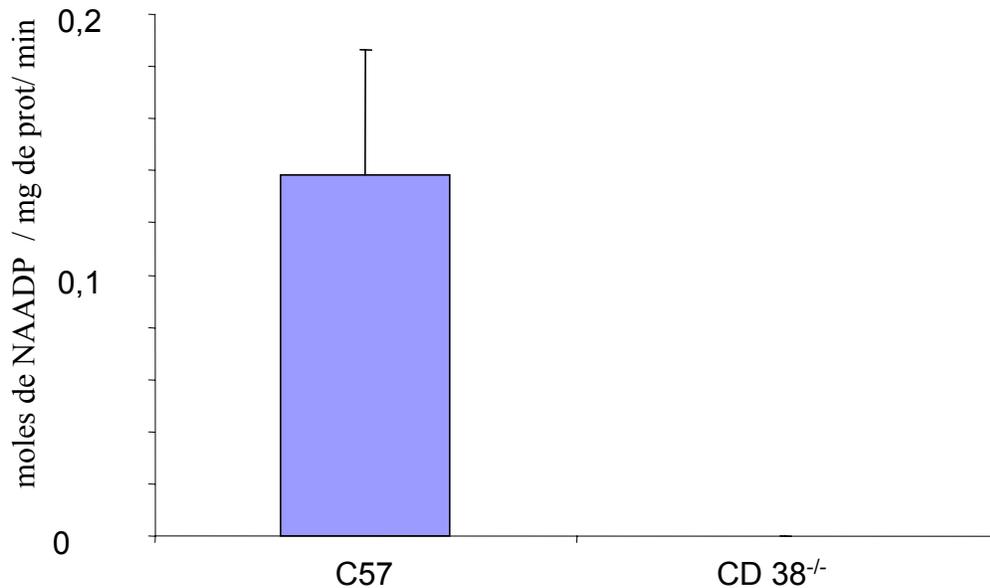


Figure 15: absence d'activité de synthèse de NAADP dans les synaptosomes de souris CD38^{-/-}

Alors que les synaptosomes de cerveau de souris CD38^{-/-} sont capables de synthétiser du cADPR grâce à une cyclase indépendante de CD38 (Ceni et al., 2003), ils ne semblent pas capables de synthétiser du NAADP, contrairement aux synaptosomes contrôle C57 (n= 3) Les valeurs sont exprimées en moles de NAADP formées par milligramme de protéines par minute, ± écart type.

3) Rôle possible du Ca²⁺ dans la modulation de l'enzyme de synthèse CD38

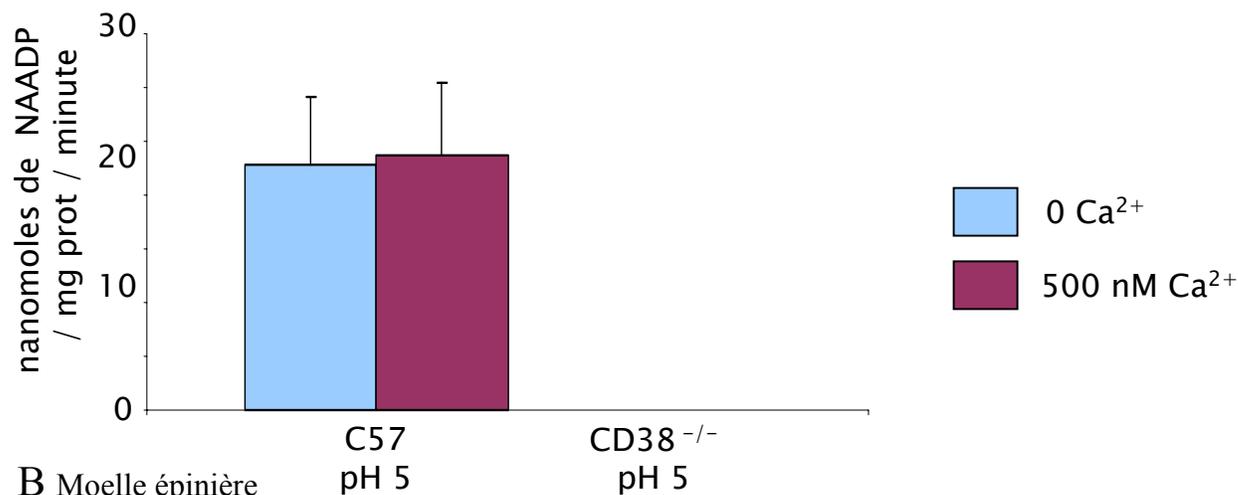
Parmi les modulateurs potentiels des ADPribosyl cyclases dont CD38, il y a le Ca²⁺ lui même. En effet, comme CD38 participe à l'homéostasie calcique, il est possible que le Ca²⁺ lui même module l'activité de CD38 par un rétrocontrôle négatif ou positif.

Nous avons testé cette hypothèse d'une modulation de la synthèse de NAADP par le Ca²⁺ dans les muscles squelettiques et la moelle épinière en mesurant sa synthèse en présence ou absence de Ca²⁺. Ces expériences ont été réalisées dans les tissus de souris C57 et CD38^{-/-}, pour tester l'hypothèse selon laquelle une synthèse de NAADP non dépendante de l'enzyme CD38 pourrait être stimulée par le Ca²⁺. Les résultats des mesures dans le muscle squelettique et la moelle épinière ne présentent pas de différence dans la synthèse de NAADP en présence ou absence de 500 nM de Ca²⁺ à pH acide (Figure 16 A et B). Aucune synthèse n'a pu être détectée dans les tissus de souris CD38^{-/-}. Le Ca²⁺ ne semble donc pas moduler directement la synthèse de NAADP par l'ADPribosyl cyclase en conditions acides.

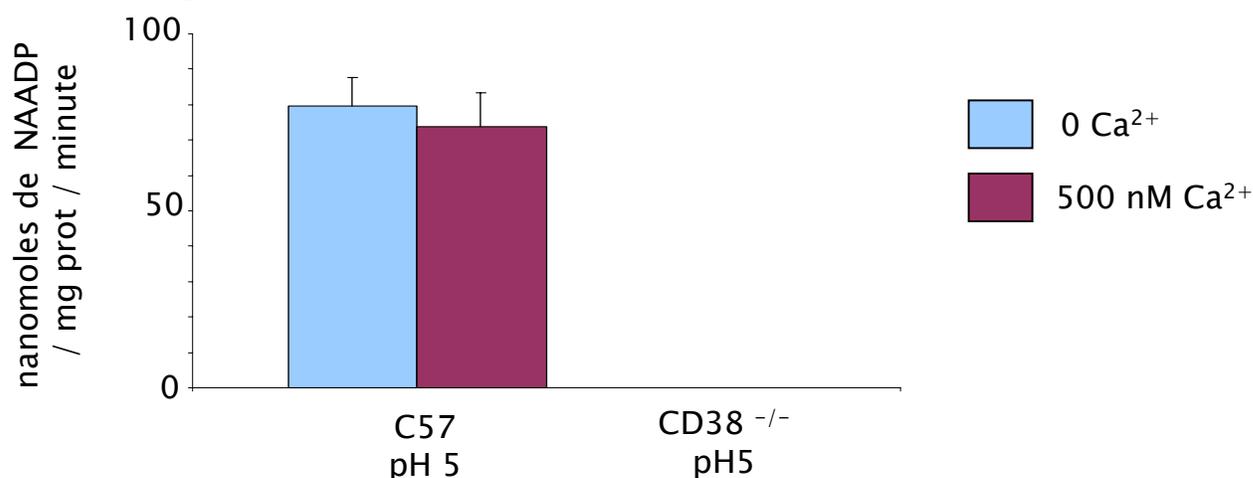
Afin de tester l'hypothèse selon laquelle le Ca²⁺ pourrait stimuler la synthèse de NAADP à pH neutre, nous avons mesuré l'activité de synthèse de NAADP par les muscles squelettiques et la moelle épinière à pH neutre. Aucune synthèse de NAADP n'a pu être détectée dans les conditions contrôle (Figure 16 C). Par contre, en présence de 500 nM de Ca²⁺, une synthèse très faible, à peine détectable de NAADP est présente. Il se pourrait donc qu'une synthèse de NAADP à pH neutre soit activable par le Ca²⁺, ce qui pourrait constituer un phénomène d'autoamplification. Ce résultat pourrait aussi être du à une réduction de la dégradation du NAADP par CD38, qui est optimale à pH acide (Graeff et al., 2006).

D'autres expériences avec des concentrations de Ca²⁺ plus importantes et/ou des méthodes de mesure plus sensibles seront nécessaires pour clarifier ce point.

A Muscles squelettiques



B Moelle épinière



C Synthèse de NAADP à pH neutre

	control	500 nM Ca ²⁺
muscle squelettique C57 (pH 7)	n.d.	Est. 2.6
Moelle épinière C57 (pH 7)	n.d.	Est. 16

Figure 16: Expériences sur la modulation possible de la synthèse de NAADP par le Ca²⁺ dans les muscles squelettiques et la moelle épinière

Le traitement par 500 nM de Ca²⁺ ne modifie pas significativement la synthèse de NAADP dans les muscles squelettiques (A) de souris C57 (n=7), et CD38^{-/-} (n=3) à pH 5. (B). De même, le traitement par 500 nM de Ca²⁺ ne modifie pas la synthèse de NAADP dans la moelle épinière de souris C57 (n=2) et CD38^{-/-} (n=2) à pH 5. Les muscles squelettiques et la moelle épinière des souris CD38^{-/-} ne synthétisent jamais de NAADP par échange de base, que ce soit en présence ou absence de Ca²⁺ (A,B).

A pH neutre, aucune synthèse de NAADP n'a pu être détectée dans les expériences contrôle, alors qu'en présence de Ca²⁺, une très faible synthèse de NAADP est détectée, indiquant qu'une synthèse dépendant de CD38 pourrait être modulée par le Ca²⁺ (C). Les valeurs indiquées en C sont des estimations, car la synthèse est faible et proche du seuil de détection. Les valeurs sont exprimées en nanomoles de NAADP formées par milligramme de protéines par minute, ± écart type.

4) Modulation de la synthèse de NAADP par la L-Arginine dans les muscles squelettiques

Le NO est une molécule impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, et a notamment été proposée comme un activateur de la synthèse de cADPR (Reyes-Harde et al., 1999). Il est donc possible que le NO ait aussi une influence sur la synthèse de NAADP par l'ADPribosyl cyclase.

Pour étudier les effets du NO sur la production de NAADP par les muscles squelettiques, nous avons utilisé la L-Arginine, qui est un substrat de la NO synthase (NOS), et qui permet de produire du NO.

Lorsque des homogénats de muscle squelettiques sont incubés, en présence des substrats, et de L-Arginine, on observe une inhibition dose-dépendante de la synthèse de NAADP par la L-Arginine dans les muscles de souris (figure 17). Une telle inhibition est aussi visible en présence de Niomel, un donneur de NO (données non montrées).

Le mode d'action de la L-Arginine n'est pas établi, mais dans les muscles lisses, le NO est connu pour stimuler la guanylate cyclase (Moncada et al., 1991), et il a été proposé dans l'œuf d'oursin que le GMPC pourrait contrôler l'ADPribosyl cyclase en favorisant la synthèse de cADPR (Wilson et Galione, 1998). Cependant, il n'existe pas de preuves de l'existence d'un tel mécanisme pour CD38. Le NO semble donc capable, en plus d'une activation de la synthèse de cADPR, d'inhiber la synthèse de NAADP, ce qui pourrait lui donner un rôle très important dans la modulation de la synthèse des messagers secondaires libérant du Ca^{2+} .

Au vu des effets du NO médiés par le GMPC dans d'autres types cellulaires, il faudra tester à l'avenir l'intervention de ce messenger secondaire dans les effets du NO sur la synthèse de NAADP par les muscles squelettiques.

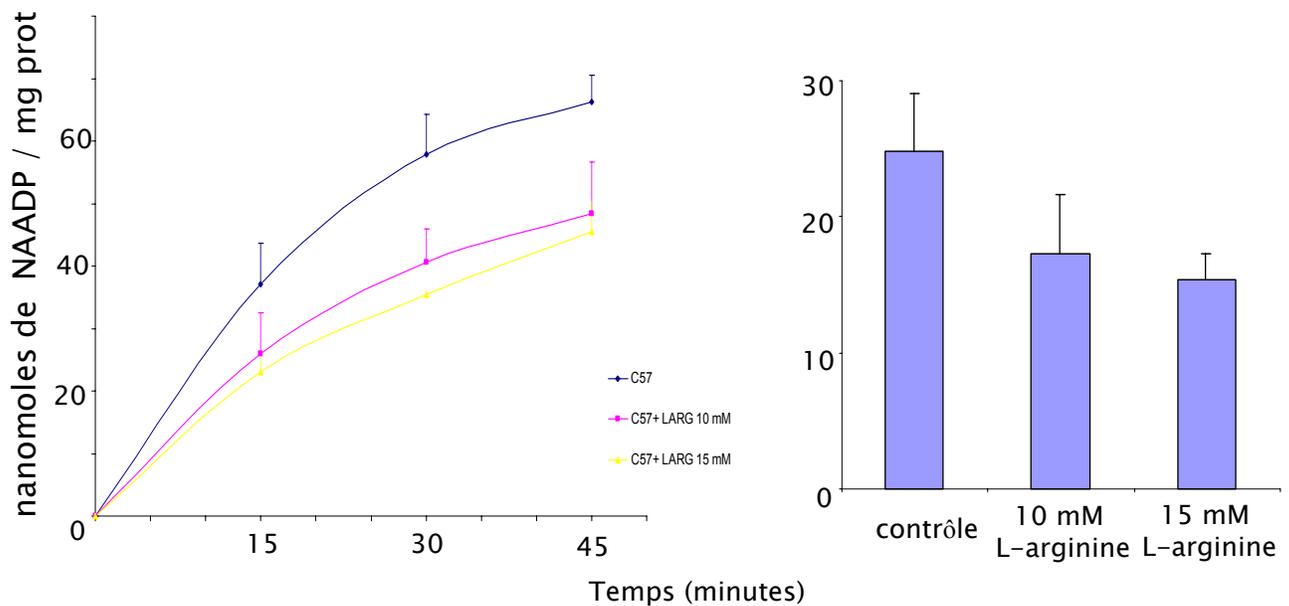


Figure 17: Modulation de l'activité de synthèse de NAADP par la L-Arginine

Exemple d'une cinétique de la synthèse de NAADP, et de sa modulation par la L-Arginine dans les muscles squelettiques (à gauche).

Les extraits tissulaires ont été incubés en présence de NA (7mM) et de NADP (0,3mM) à 37°C, et la réaction d'échange de bases arrêtée à différents temps.

Les effets de la L-Arginine ont été testés à deux concentrations: 10 et 15 mM.

Les valeurs sont exprimées en nanomoles de NAADP formées par milligramme de protéines ± écart type (n=3, sauf 15 mM L-Arginine, n=2).

Le traitement par la L-Arginine inhibe la synthèse de NAADP de façon dose-dépendante dans les muscles squelettiques (à droite, T= 15 minutes).

5) Cyclases et Pathologies

a) Muscle et souris *mdx*

Un des objectifs du travail sur la synthèse de NAADP était de pouvoir étudier un possible rôle du NAADP dans les muscles squelettiques et la moelle épinière, en raison des pathologies dans lesquelles des anomalies de l'homéostasie calcique sont impliquées.

Il a été rapporté que les muscles squelettiques peuvent synthétiser le NAADP, et que le NAADP était capable de libérer du Ca^{2+} des microsomes de muscles, et d'organites acides provenant de muscles lisses, suggérant un rôle du NAADP dans les cellules musculaires (Hohenegger et al., 2002; Kinnear et al., 2004; Zhang et al., 2006)(Menteyne et al., données non publiées). En effet, le NAADP a été proposé comme un possible modulateur des RyR de type I qui sont fortement exprimés dans les muscles squelettiques (Hohenegger et al., 2002), mais également des RyR de type II du myocarde (Mojzisoava et al., 2001). Ainsi, le fait que le NAADP pourrait moduler les RyR de type I est important pour les maladies des muscles comme le « central core disease » ou l'hyperthermie maligne où une mutation des RyR de type I est présente (Rossi et al., 2007; Zhang et al., 1993), et provoque une libération excessive de Ca^{2+} du RE en réponse au cADPR (Tong et al., 1999).

*Souris *mdx**

Pour étudier l'implication possible de la voie de synthèse du NAADP dans les myopathies, nous avons utilisé, en collaboration avec Sabine de La Porte, chercheur au laboratoire (NBCM, Gif sur Yvette), des souris *mdx*. Les souris *mdx* constituent un modèle d'étude de la dystrophie musculaire de Duchenne, une maladie héréditaire. Dans ces souris *mdx*, une mutation du gène de la dystrophine, déficient dans la maladie de Duchenne, entraîne une nécrose et une dégénérescence des fibres musculaires (Deconinck et Dan, 2007). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la dégénérescence des muscles, dont l'une est une altération de l'homéostasie calcique. Cette altération résulterait d'une entrée anormale de Ca^{2+} extracellulaire par les canaux mécanosensibles de la membrane plasmique dépourvue de dystrophine, et par des microlésions (Deconinck et Dan, 2007). Il est possible que les réserves intracellulaires de Ca^{2+} participent aussi, et nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle l'activité de synthèse de NAADP pourrait être modifiée dans les souris *mdx*. Pour cela, nous avons mesuré l'activité de synthèse de NAADP dans les muscle gastrocnémiens de souris

contrôle et *mdx* de deux âges, 9 et 30 semaines (figure 18). En effet, si le phénotype dystrophique des souris *mdx* est important pour des âges jeunes, il y a ensuite compensation au cours du temps et le phénotype s'atténue.

Nos données préliminaires suggèrent que l'activité de synthèse de NAADP n'est pas différente dans les muscles de souris *mdx* (Figure 18).

Un traitement proposé dans le traitement de la dystrophie de Duchenne est l'administration de L-Arginine, qui provoque une ré-expression de l'utrophine, forme embryonnaire de la dystrophine défaillante, bien que le mécanisme d'action ne soit pas connu (Chaubourt et al., 2000). Nous avons pu mettre en évidence une inhibition de l'activité de synthèse du NAADP par la L-Arginine dans les muscles squelettiques de souris C57 (Figure 17). Ainsi, les effets de la L-Arginine sur les souris *mdx* pourraient passer par une modulation de l'activité de CD38. Ceci est important car le NO a été montré comme pouvant orienter l'ADPribosyl cyclase vers la synthèse de cADPR.

Il serait donc intéressant de tester les effets de la L-Arginine à la fois sur la synthèse de NAADP et de cADPR dans les muscles de souris *mdx*, pour comprendre le rôle éventuel de ces messagers dans la ré-expression de l'utrophine induite par la L-Arginine. Ces expériences permettraient de tester l'hypothèse selon laquelle le NO, peut être par l'intermédiaire du GMPc, pourrait stimuler la synthèse de cADPR et inhiber celle de NAADP.

Effets de l'ACh

Récemment, il a été rapporté que dans les myocytes de souris *mdx*, l'ACh stimulait la synthèse d'IP₃ (Basset et al., 2004). Nous avons voulu savoir si l'ACh pouvait également stimuler l'activité de synthèse de NAADP. Nous avons donc mesuré l'activité de synthèse de NAADP dans les muscles de souris contrôle C57 et *mdx* âgées de 9 semaines, avec ou sans stimulation par 20 µM d'ACh (figure 19). L'activité de synthèse de NAADP dans les muscles *mdx* n'est pas différente de celle des souris C57. Le traitement par l'ACh ne semble pas modifier l'activité de synthèse de NAADP dans les muscles contrôle et *mdx*. Cependant, il est possible que l'ACh utilisée ait été dégradée par les estérases, et ces expériences devront être répétées avec un agoniste non hydrolysable comme le carbachol.

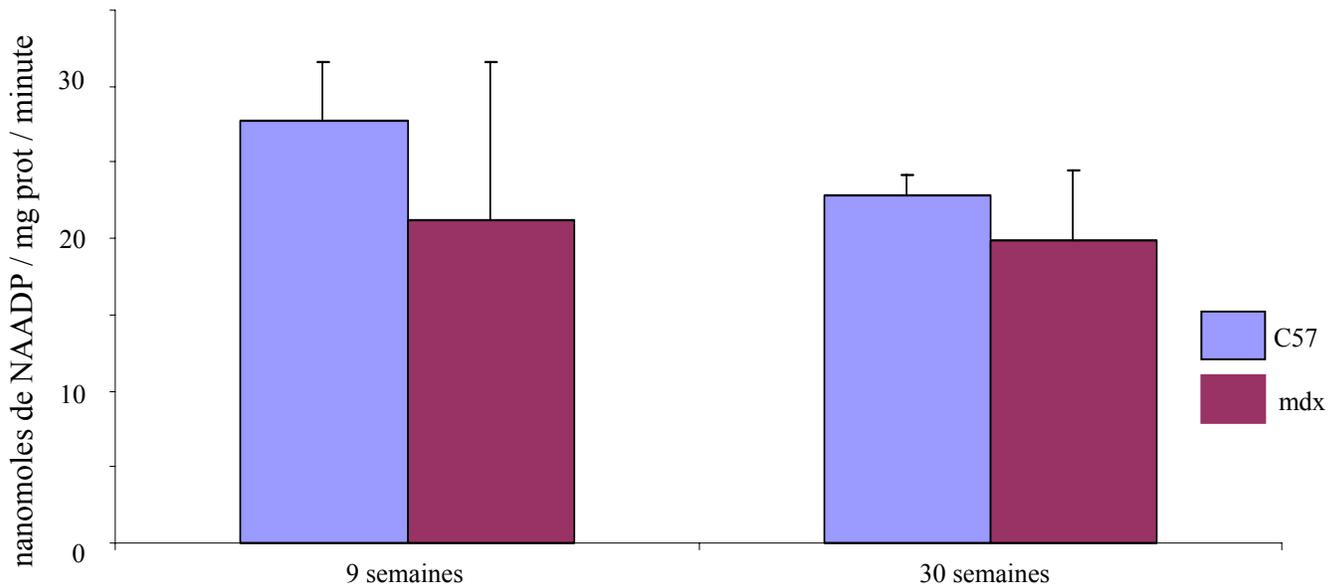


Figure 18: synthèse de NAADP dans les muscles contrôle C57 et mdx

Activité de l'ADPribosyl Cyclase dans les muscles gastrocnémiens de souris C57 et mdx à deux âges différents: 9 et 30 semaines. Les valeurs sont exprimées en nanomoles de NAADP formées par milligramme de protéines et par minute, \pm écart type (n=4).

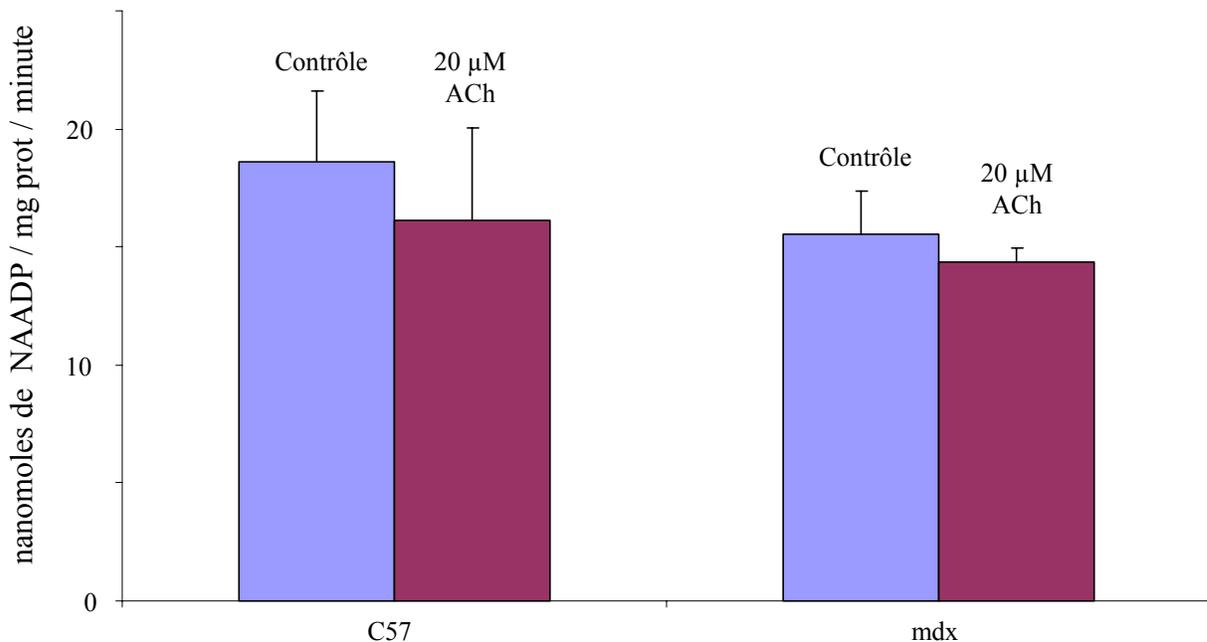


Figure 19: traitement des muscles C57 et mdx par l'ACh

La synthèse de NAADP a été mesurée dans des muscles squelettiques de souris contrôle C57 et mdx âgées de 9 semaines. Le traitement par 20 μ M d'ACh provoque une baisse non significative de la synthèse de NAADP dans les deux souches.

Les valeurs sont exprimées en nanomoles de NAADP formées par milligramme de protéines et par minute, \pm écart type (n=3).

b) Cancer et ADP ribosyl cyclases

Nous avons voulu tester la possibilité d'une relation entre l'activité des ADP ribosyl cyclases et la cancérisation. Pour cela, nous disposons au laboratoire d'une lignée de cellules cancéreuses issues de cellules acineuses de pancréas exocrine de rat, les AR42J.

En collaboration avec Fabien Van Coppenolle (Lille), nous avons également testé l'activité de synthèse de NAADP de prostates saines et cancéreuses de rat. Les rats de la souche Lobund-Wistar développent spontanément des cancers de la prostate, et le phénomène est accéléré par des injections de N-Méthyl-Nitrosurée.

Pour étudier cette possible relation entre cancer et NAADP, nous avons mesuré l'activité de synthèse du NAADP dans les différents lobes sains de la prostate, et dans un échantillon de prostate cancéreuse, et dans les cellules de la lignée AR42J, en collaboration avec F. Cosker (Figure 20). La prostate se compose de deux lobes ventraux, deux lobes latéraux, et d'un lobe dorsal. Les cellules cancéreuses de prostate montrent une activité de synthèse très élevée par rapport aux lobes de prostate saine.

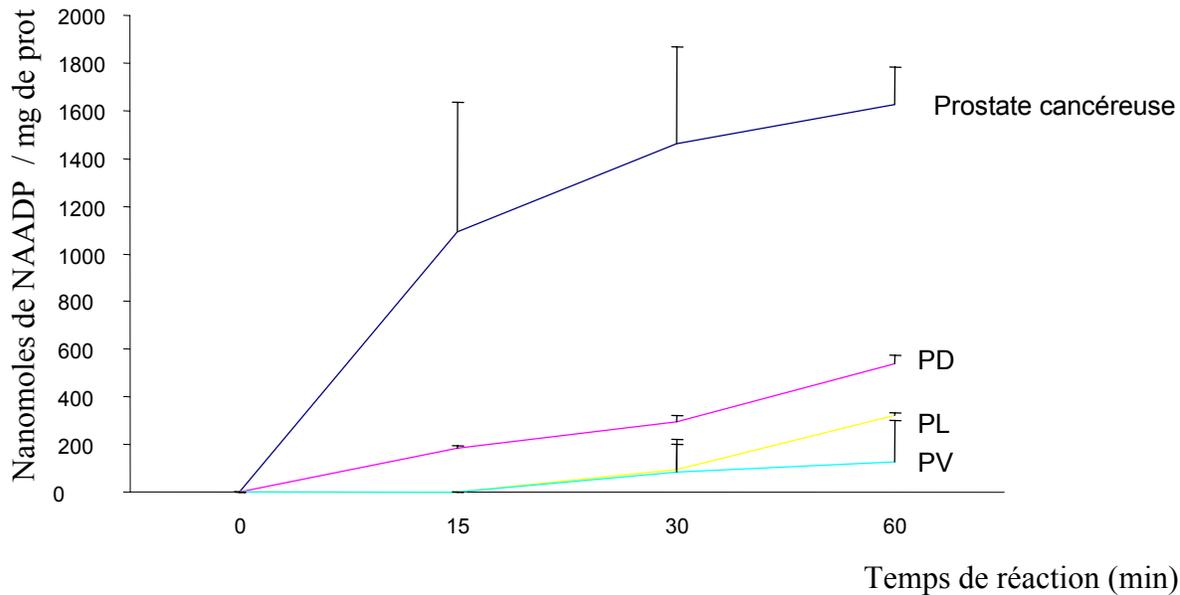
Dans le cas du pancréas exocrine, nous n'avons pu mesurer aucune activité de synthèse de NAADP dans les cellules AR42J.

Il n'est pas possible, à priori, de déterminer si l'augmentation ou la perte de l'activité cyclase est une cause ou une conséquence de la cancérisation. Ces résultats suggèrent que les cellules cancéreuses ne se comportent pas de la même manière vis à vis de la synthèse de NAADP.

Quoi qu'il en soit, cela représente un point d'étude intéressant qui pourrait éventuellement permettre selon le cas d'obtenir soit une éventuelle cible thérapeutique, soit un marqueur de la maladie.

Cinétique de synthèse

A



B

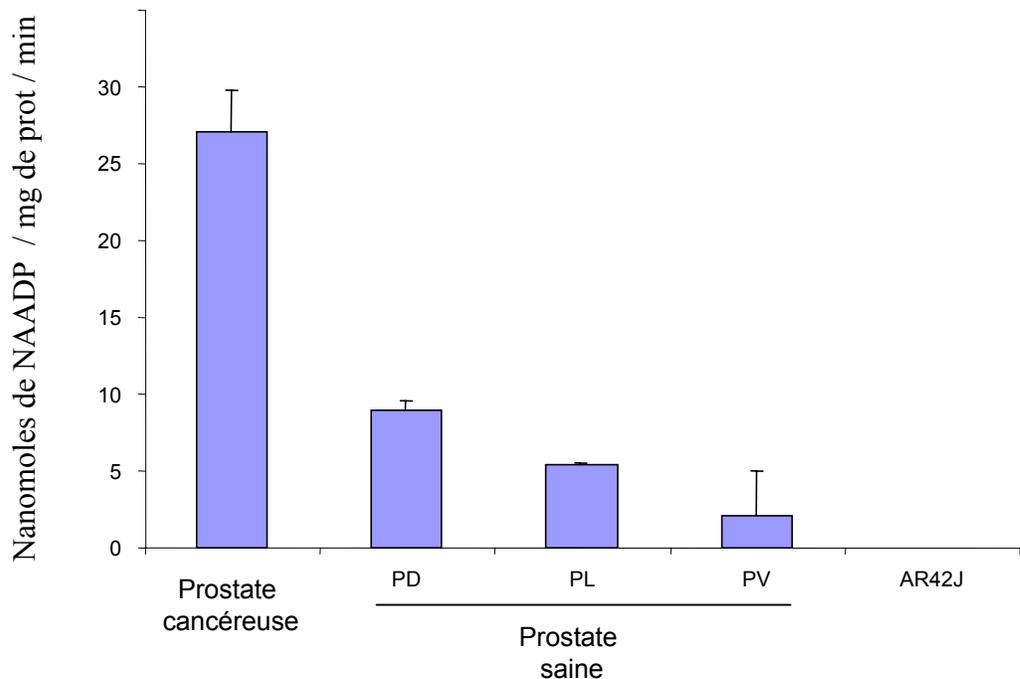


Figure 20: Activité de synthèse de NAADP et cancer

A. Comparaison de la synthèse de NAADP dans les cellules issues de prostates saines (PD dorsale , PL latérale et PV ventrale), et cancéreuses.

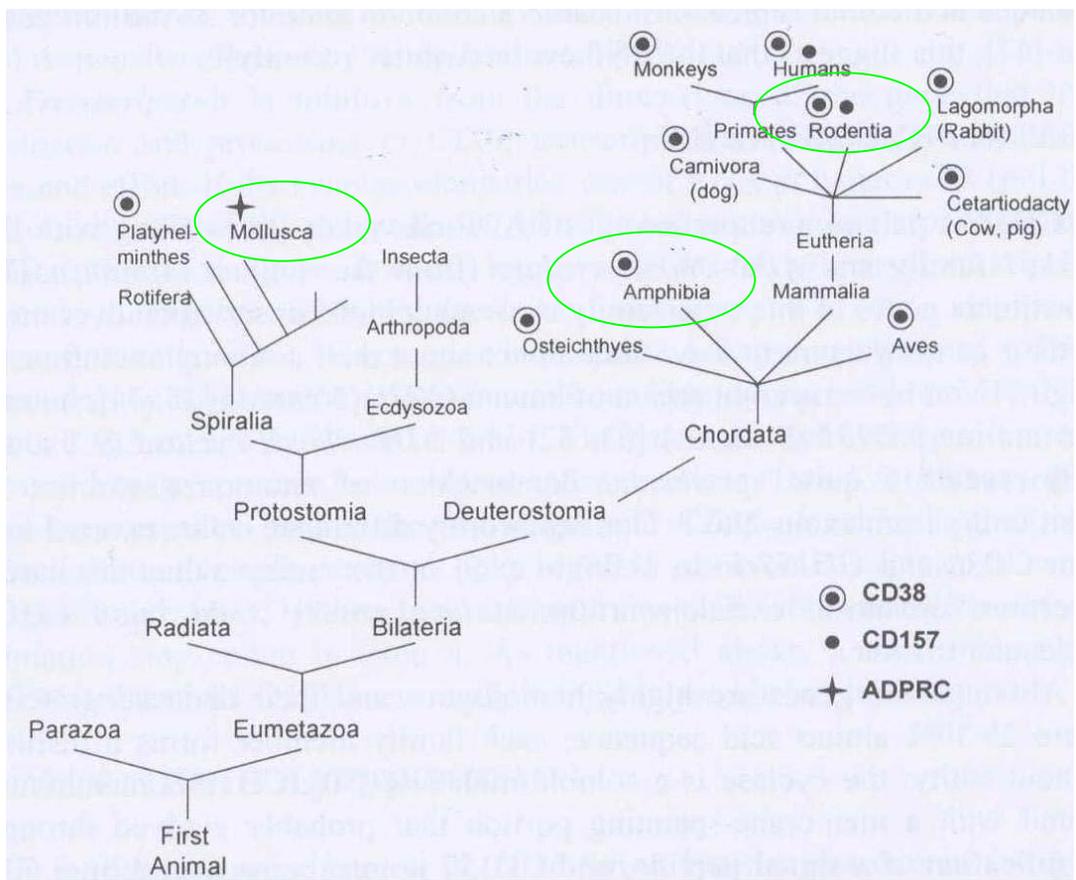
B. Contrairement aux cellules cancéreuses de prostate, qui synthétisent plus de NAADP que leurs homologues saines, les cellules cancéreuses de pancréas exocrine de la lignée AR42J ne présentent pas d'activité de synthèse de NAADP détectable. Les valeurs sont exprimées en nanomoles de NAADP formées par milligramme de protéines et par minute, \pm écart type pour un temps de réaction de 60 minutes (n=2 pour les prostates, n=3 pour les AR42J).

c) Synthèse de NAADP dans d'autres espèces animales

Au cours de collaborations internes au laboratoire, et à l'équipe, j'ai été amené à mesurer l'activité de synthèse de NAADP dans différents modèles. L'Aplysie représente depuis longtemps un modèle d'étude du système nerveux grâce à la grande taille de ses neurones. En collaboration avec S. Bezin, qui étudie les réponses de l'enveloppe nucléaire de neurones d'Aplysie aux messagers, nous avons pu mettre en évidence une faible activité de synthèse de NAADP par les ganglions nerveux d'Aplysie de 2,4 nmoles/mg de protéines/min (Figure 21). J'ai aussi mesuré, en collaboration avec X. Castell, qui étudiait le rôle du NAADP dans les neurones spinaux de *Xenope*, une activité de synthèse de NAADP dans des extraits de moelle épinière de *Xenope* (Figure 21). Cette synthèse est de 28 nmoles/mg de protéines/min, plus faible que celle mesurée dans la moelle épinière de souris (43 nmoles/mg de protéines/min). Cette différence est peut être due aux différences de températures : les expériences sur les tissus de souris ont été réalisées à 37°C, tandis que celles sur le *Xenope* ont été faites à température ambiante.

Nous avons recherché un modèle simple et génétiquement manipulable pour étudier les enzymes de synthèse du NAADP. Le ver *Caenorhabditis elegans* est un modèle d'étude de la fonction des gènes qui est disponible au laboratoire. J'ai donc testé, en collaboration avec F. Meunier une éventuelle activité de synthèse de NAADP par ces vers. Aucune synthèse n'a pu être détectée dans ces animaux (Figure 21). Bien que l'activité ADPribosyl cyclase soit apparue très tôt dans l'évolution, avant la séparation entre les plantes et les animaux (Lee, 1997), il semble qu'elle ne soit pas présente dans le *C. elegans*. Il est toutefois possible que notre méthode de détection ne soit pas assez sensible, et une analyse des taux endogènes par la technique du « binding » permettra de répondre à cette question.

A



B

Espèce	Activité de synthèse de NAADP
<i>C. elegans</i> (Animal entier)	Non détectable
<i>Aplysia Californica</i> (Ganglions nerveux)	2,4 nanomoles/ mg de protéines/ minute
<i>Xenopus laevis</i> (Moelle épinière)	28,0 nanomoles/ mg de protéines/ minute

Figure 21: Activité de synthèse de NAADP dans d'autres espèces

A arbre phylogénétique des ADP ribosyl cyclases (D'après Ferrero et Malavasi 2002).

B Tableau des espèces autres que la souris dans lesquelles nous avons mesuré l'activité de synthèse du NAADP.

D) Discussion des données biochimiques

Notre travail souligne l'ubiquité de l'activité de synthèse de NAADP par échange de bases dans les différents tissus de souris. Cette synthèse est principalement due à l'ADPribose cyclase CD38.

Dans le système nerveux, le NAADP a été montré comme étant impliqué dans des fonctions physiologiques, comme par exemple dans la neurotransmission chez l'Aplysie (Chameau et al., 2001), et plus récemment, dans la modulation de la libération de neurotransmetteur à la jonction neuromusculaire (Brailoiu et al., 2001), et dans la croissance des neurites dans les neurones néocorticaux (Brailoiu et al., 2005).

La mise en évidence d'une synthèse de NAADP indépendante de CD38 dans le cerveau soulève des questions, puisque nous ne savons pas si l'existence de cette deuxième enzyme correspond à un mécanisme de compensation, ou si une autre enzyme de synthèse est plus importante que CD38 dans ce tissu. Cependant, le fait que la synthèse soit comparable entre les tissus de souris témoin et CD38^{-/-} sur le laps de temps étudié suggère un mécanisme de compensation.

L'expression de CD38 augmente au cours du développement tandis que l'expression de la nouvelle ADPribose cyclase décrite par Ceni et al., décroît, tout comme les taux endogènes de cADPR (Ceni et al., 2006). L'absence de CD38 chez les souris CD38^{-/-} pourrait provoquer par compensation le maintien de la forme embryonnaire d'ADPribose cyclase. Cependant, le fait que les synaptosomes de souris CD38^{-/-} soient capables de synthétiser le cADPR, mais pas le NAADP, tandis que les extraits de cerveau entier de souris CD38^{-/-} peuvent synthétiser le NAADP, suggère que l'ADPribose cyclase décrite par Ceni et al., est différente de l'enzyme qui synthétise le NAADP.

Cette activité de synthèse du NAADP supplémentaire doit être très importante dans le cerveau, car une telle compensation n'a pas été constatée dans les autres tissus, y compris dans la moelle épinière, où la synthèse de NAADP était pourtant importante.

L'effet du Ca²⁺ sur la synthèse de NAADP à pH neutre soulève des questions intéressantes sur un éventuel rétrocontrôle de la synthèse du messenger: si le Ca²⁺ accentue sa synthèse, comment la cellule met-elle fin à celle-ci? Ces données sur une possible synthèse sont cependant très préliminaires, et une confirmation est nécessaire, puisqu'il a été suggéré que la dégradation du NAADP était également activée par le Ca²⁺.

Nous avons pu montrer que la L-Arginine, un substrat de la NOS pouvait réduire la synthèse de NAADP dans les muscles squelettiques.

La L-Arginine a été proposée comme un agent thérapeutique potentiel de la maladie de Duchenne (Chaubourt et al., 2000), et ses effets sur les muscles sains suggèrent un effet sur l'homéostasie calcique des muscles. Pour savoir si les effets de la L-Arginine sont dus à une réduction de la synthèse de NAADP ou à une modulation de la synthèse de cADPR, ces expériences devront aussi être répétées dans les muscles de souris *mdx*. La modulation de la synthèse de NAADP par la L-Arginine soulève aussi des questions intéressantes, car les effets de ce substrat de la NO synthase pourraient ne pas être limités aux myocytes. L'influence du NO sur le cADPR dans le cerveau suggère que le NO pourrait permettre d'orienter les ADPribosyl cyclases vers la synthèse de cADPR (Reyes-Harde et al., 1999) plutôt que de NAADP. Cette hypothèse sera à tester par un dosage simultané du NAADP et du cADPR en présence et absence de L-Arginine ou d'un donneur de NO. La mesure de l'activité de synthèse de NAADP par les muscles contrôle et *mdx* ne montre pas de différence significative. Ce résultat n'exclut pas pour autant que les effets positifs du traitement par la L-Arginine chez les souris *mdx* ne soient pas dus à une réduction de la synthèse de NAADP. Une autre possibilité pour tester l'implication possible de la synthèse de NAADP dans ces dystrophies est l'obtention de souris *mdx-CD38^{-/-}* par croisement de celles-ci. Ces croisements sont actuellement en cours au laboratoire.

Les profils de synthèse de NAADP par les cellules cancéreuses de la prostate posent des questions importantes. Les processus de cancérisation impliquent entre autres des altérations de la signalisation calcique (Homma et al., 1994; Mengubas et al., 1994). Nos expériences suggèrent que dans les prostatites saines, CD38 est la principale enzyme de synthèse de NAADP. Cependant, une perte d'expression de CD38 a été décrite dans les prostatites cancéreuses (Kramer et al., 1995), et les cellules AR42J ne semblent pas capables de synthétiser de NAADP. Cela impliquerait que la forte synthèse de NAADP constatée dans les prostatites cancéreuses pourrait être due à une autre enzyme que CD38. Quoi qu'il en soit, il serait intéressant d'identifier l'enzyme responsable et d'étudier les effets d'une inhibition de la synthèse de NAADP sur le phénotype cancéreux de ces cellules.

Nos expériences, bien que préliminaires ouvrent de nouvelles perspectives d'études. La méthode que nous avons utilisé a cependant des limites. En effet, la mesure de l'activité de synthèse par échange de bases nécessite l'ajout de fortes concentrations de substrats exogènes

NA (7 mM) et NADP (0,3 mM), qui n'ont jamais pu être mesurées et semblent difficiles à atteindre dans les cellules (Graeff et al., 1998; Ziegler, 2000). De plus, nous n'avons testé que la quantité finale de NAADP synthétisée, qui représente la quantité synthétisée moins l'activité de dégradation du NAADP. La dégradation du NAADP par des phosphatases ou les ADPribosyl cyclases reste mal connue, (Graeff et al., 2006), et mérite d'être étudiée en détail. De plus, les tissus sont broyés et la possibilité de voir une synthèse de NAADP stimulée par un agoniste est faible par rapport à des cellules entières. Ces biais sont inévitables par cette approche expérimentale. Fort heureusement, des améliorations techniques sont maintenant disponibles comme la mesure des taux endogène de NAADP par la méthode du « Binding ». Cette nouvelle technique, beaucoup plus sensible, permet de mesurer les taux endogènes de NAADP et les effets des agonistes directement sur les cellules entières et permettront une étude plus fine des relations entre les récepteurs aux agonistes extracellulaires et la synthèse de NAADP.

Conclusions, perspectives

Nous avons étudié la question d'une coopération des messagers libérant du Ca^{2+} , et du recrutement sélectif des différentes réserves de Ca^{2+} par ces messagers. Nous avons ainsi pu identifier le lysosome comme une réserve intracellulaire mobilisée par les principaux agonistes dans les cellules acineuses de pancréas exocrine: la CCK via le messenger NAADP, et l'ACh via le Ca^{2+} . Ces données montrent aussi que l'endocytose est importante pour les réponses calciques induites par les deux agonistes la CCK et l'ACh, et aux messagers NAADP et IP_3 . Le rôle de l'endocytose et du trafic endosomal dans les signaux calciques n'est pas connu et constitue donc un nouvel axe d'étude.

Dans les cellules de pancréas exocrine, l'apport de membrane vésiculaire à la membrane apicale au cours du phénomène d'exocytose est compensée par une récupération d'une partie de la membrane apicale (Maruyama et Petersen, 1994), et ce cycle exocytose-endocytose dépend du Ca^{2+} , et participe aux influx et efflux de Ca^{2+} des cellules (Beutner et al., 2001; Gerasimenko et al., 1998; Maruyama et al., 1993).

Dans les cellules de pancréas exocrine, des études montrent que lors de la stimulation par la CCK, les granules de zymogène fusionnent avec la membrane apicale et entre eux de façon séquentielle, à la manière d'un collier de perles, ce qui évite de devoir déplacer les granules éloignés de la membrane apicale (Nemoto et al., 2001). Les lysosomes peuvent eux aussi subir une exocytose Ca^{2+} dépendante (Gerasimenko et al., 2001; Rao et al., 2004) et produire des structures tubulaires comparables dans les cellules dendritiques (Chow et al., 2002) et dans la partie basolatérale des cellules acineuses (Beaudoin et al., 1984). Ces phénomènes sont à étudier plus en détail dans la perspective de la signalisation calcique. Ainsi, le phénomène d'endocytose pourrait être visualisé par des sondes membranaires fluorescentes, comme le FM1-43, et le trafic lysosomal visualisé dans d'autres types cellulaires avec des protéines lysosomales marquées à la GFP (Green fluorescent Protein), comme LAMP2 ou la mucopolipine. La fusion entre les endosomes et les lysosomes au cours du trafic intracellulaire pourraient être inhibés par d'autres moyens que la pharmacologie, comme des si-RNA dirigés contre la mucopolipine 1 (LaPlante et al., 2004). Cette implication de l'endocytose dans la signalisation calcique devra aussi être étudiée dans des cellules non sécrétrices.

Tant que le récepteur au NAADP ne sera pas cloné, on devra se limiter à une approche pharmacologique pour ce qui est de l'étude des réserves impliquées. Au vu de la complexité du trafic intracellulaire au niveau de la zone apicale, nous arrivons ici à une limite. Cependant, des expériences d'autoradiographie avec du NAADP³² ou l'utilisation d'un analogue fluorescent comme l'éthéno-NAADP (Lee et Aarhus, 1998) pourraient permettre de suivre le récepteur au NAADP entre les différentes positions où il pourrait se trouver: membrane lysosomale, membrane apicale et membrane de l'endosome.

Mieux comprendre ce trafic membranaire permettrait aussi de faire le lien avec la synthèse du NAADP. En effet, l'endocytose est importante comme source de Ca²⁺ pour les réponses aux agonistes et messagers, mais il se pourrait aussi qu'elle joue un rôle dans la synthèse du NAADP, dont la synthèse par échange de bases nécessite des conditions acides. A l'appui de cette hypothèse, une endocytose de CD38 a été décrite (Zocchi et al., 1996; Zocchi et al., 1999). L'utilisation de mutants de CD38 marqués à la GFP et permettant une expression membranaire ou cytosolique (Adebanjo et al., 2000), et l'étude de leur position au repos et lors de stimulation par agoniste devrait permettre de mieux comprendre ces mécanismes.

La synthèse de NAADP se ferait dans des compartiments acides, en relation avec l'endocytose, et le site d'action du NAADP pourrait se trouver sur la face luminale ou cytosolique, puisque le NAADP semble agir à la fois s'il est appliqué à l'extérieur des cellules (Billington et al., 2006), ou à l'intérieur (Cancela et al., 2000). L'utilisation d'un analogue fluorescent ou radioactif du NAADP, et la localisation précise de son enzyme de synthèse permettront de déterminer si le lieu de la synthèse et d'activation du récepteur sont co-localisés.

Sur le plan de la synthèse du NAADP, beaucoup reste à faire dans l'étude des liens entre la stimulation extracellulaire et l'activité des ADPribosyl cyclases.

Des souris CD157^{-/-} existent, et permettront d'étudier un éventuel rôle de CD157 dans la synthèse du NAADP. Enfin, l'obtention de double homozygotes CD157^{-/-} CD38^{-/-} (Ortolan et al., 2002) nous permettra de comprendre, en particulier dans le cerveau, quelle est la nature de l'enzyme identifiée dans les souris CD38^{-/-}. Pour éviter une éventuelle compensation dans les souris CD38^{-/-}, des « Knock out » (KO) conditionnels de CD38 devraient permettre d'inhiber l'expression de CD38 à l'âge adulte et apporter des résultats intéressants sur le rôle de CD38.

Les liens entre synthèse de NAADP et stimulation par agoniste pourront être étudiés par des expériences de dosage des taux endogènes de NAADP par la méthode du « binding » au repos et en réponse à un agoniste, et en présence d'agents pharmacologiques qui interfèrent avec les

protéines de la voie de signalisation, comme l'adénylate cyclase, la guanylate cyclase, et les protéines G.

Finalement, nos résultats sur le cerveau de souris CD38^{-/-} suggèrent l'existence d'une nouvelle cyclase, différente de celle décrite par l'équipe de MJ. Moutin (Ceni et al., 2003a). Cette nouvelle enzyme devra être purifiée et caractérisée pour mieux appréhender le rôle du NAADP dans le système nerveux central.

Enfin, si la connaissance de la voie de synthèse du NAADP, et des réserves intracellulaires mobilisées a progressé ces dernières années, la cible moléculaire du messenger reste encore mystérieuse. Des progrès en la matière permettront sans doute des avancées spectaculaires.

Bibliographie citée

- Aarhus, R., D.M. Dickey, R.M. Graeff, K.R. Gee, T.F. Walseth, and H.C. Lee. 1996. Activation and inactivation of Ca²⁺ release by NAADP⁺. *J Biol Chem.* 271:8513-6.
- Aarhus, R., R.M. Graeff, D.M. Dickey, T.F. Walseth, and H.C. Lee. 1995. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem.* 270:30327-33.
- Adebanjo, O.A., H.K. Anandatheerthavarada, A.P. Koval, B.S. Moonga, G. Biswas, L. Sun, B.R. Sodam, P.J. Bevis, C.L. Huang, S. Epstein, F.A. Lai, N.G. Avadhani, and M. Zaidi. 1999. A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca²⁺ homeostasis. *Nat Cell Biol.* 1:409-14.
- Adebanjo, O.A., A. Koval, B.S. Moonga, X.B. Wu, S. Yao, P.J. Bevis, M. Kumegawa, M. Zaidi, and L. Sun. 2000. Molecular cloning, expression, and functional characterization of a novel member of the CD38 family of ADP-ribosyl cyclases. *Biochem Biophys Res Commun.* 273:884-9.
- Adkins, C.E., and C.W. Taylor. 1999. Lateral inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cytosolic Ca(2+). *Curr Biol.* 9:1115-8.
- Alonso, M.T., C. Villalobos, P. Chamero, J. Alvarez, and J. Garcia-Sancho. 2006. Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium.* 40:513-25.
- Ambudkar, I.S., B.C. Bandyopadhyay, X. Liu, T.P. Lockwich, B. Paria, and H.L. Ong. 2006. Functional organization of TRPC-Ca²⁺ channels and regulation of calcium microdomains. *Cell Calcium.* 40:495-504.
- Aniento, F., F. Gu, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 1996. An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol.* 133:29-41.
- Antonelli, A., and E. Ferrannini. 2004. CD38 autoimmunity: recent advances and relevance to human diabetes. *J Endocrinol Invest.* 27:695-707.
- Ashby, M.C., M. Craske, M.K. Park, O.V. Gerasimenko, R.D. Burgoyne, O.H. Petersen, and A.V. Tepikin. 2002. Localized Ca²⁺ uncaging reveals polarized distribution of Ca²⁺-sensitive Ca²⁺ release sites: mechanism of unidirectional Ca²⁺ waves. *J Cell Biol.* 158:283-92.
- Ashby, M.C., O.H. Petersen, and A.V. Tepikin. 2003. Spatial characterisation of ryanodine-induced calcium release in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J.* 369:441-5.
- Bacher, I., A. Zidar, M. Kratzel, and M. Hohenegger. 2004. Channelling of substrate promiscuity of the skeletal-muscle ADP-ribosyl cyclase isoform. *Biochem J.* 381:147-54.
- Bak, J., R.A. Billington, G. Timar, A.C. Dutton, and A.A. Genazzani. 2001. NAADP receptors are present and functional in the heart. *Curr Biol.* 11:987-90.
- Bak, J., P. White, G. Timar, L. Missiaen, A.A. Genazzani, and A. Galione. 1999. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate triggers Ca²⁺ release from brain microsomes. *Curr Biol.* 9:751-4.
- Basile, G., O. Tagliatalata-Scafati, G. Damonte, A. Armirotti, S. Bruzzone, L. Guida, L. Franco, C. Usai, E. Fattorusso, A. De Flora, and E. Zocchi. 2005. ADP-ribosyl cyclases generate two unusual adenine homodinucleotides with cytotoxic activity on mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:14509-14.

- Basset, O., F.X. Boittin, O.M. Dorchies, J.Y. Chatton, C. van Breemen, and U.T. Ruegg. 2004. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate in nicotinic calcium responses in dystrophic myotubes assessed by near-plasma membrane calcium measurement. *J Biol Chem.* 279:47092-100.
- Beaudoin, A.R., G. Grondin, and A. Lord. 1984. Ultrastructural localization of nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase (NADPase) activity in the exocrine pancreas of rat: identification of a novel structure. *Eur J Cell Biol.* 33:275-80.
- Belan, P., O. Gerasimenko, O.H. Petersen, and A.V. Tepikin. 1997. Distribution of Ca²⁺ extrusion sites on the mouse pancreatic acinar cell surface. *Cell Calcium.* 22:5-10.
- Belan, P.V., O.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 1996. Localization of Ca²⁺ extrusion sites in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* 271:7615-9.
- Berg, I., B.V. Potter, G.W. Mayr, and A.H. Guse. 2000. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP(+)) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca(2+)-signaling. *J Cell Biol.* 150:581-8.
- Berridge, G., R. Cramer, A. Galione, and S. Patel. 2002a. Metabolism of the novel Ca²⁺-mobilizing messenger nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate via a 2'-specific Ca²⁺-dependent phosphatase. *Biochem J.* 365:295-301.
- Berridge, G., G. Dickinson, J. Parrington, A. Galione, and S. Patel. 2002b. Solubilization of receptors for the novel Ca²⁺-mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem.* 277:43717-23.
- Berridge, M. 2004. Conformational coupling: a physiological calcium entry mechanism. *Sci STKE.* 2004:pe33.
- Berridge, M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361:315-25.
- Berridge, M.J. 1994. Relationship between latency and period for 5-hydroxytryptamine-induced membrane responses in the Calliphora salivary gland. *Biochem J.* 302 (Pt 2):545-50.
- Berridge, M.J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol.* 499 (Pt 2):291-306.
- Berridge, M.J. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 32:235-49.
- Berridge, M.J. 2005. Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol.* 67:1-21.
- Berridge, M.J. 2006. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium.* 40:405-12.
- Berridge, M.J., M.D. Bootman, and P. Lipp. 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature.* 395:645-8.
- Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:517-29.
- Berridge, M.J., and A. Galione. 1988. Cytosolic calcium oscillators. *Faseb J.* 2:3074-82.
- Beutner, D., T. Voets, E. Neher, and T. Moser. 2001. Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron.* 29:681-90.
- Bezin, S., G. Charpentier, P. Fossier, and J.M. Cancela. 2006. The Ca(2+)-releasing messenger NAADP, a new player in the nervous system. *J Physiol Paris.*
- Billington, R.A., E.A. Bellomo, E.M. Floriddia, J. Erriquez, C. Distasi, and A.A. Genazzani. 2006. A transport mechanism for NAADP in a rat basophilic cell line. *Faseb J.* 20:521-3.
- Billington, R.A., A. Ho, and A.A. Genazzani. 2002. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) is present at micromolar concentrations in sea urchin spermatozoa. *J Physiol.* 544:107-12.

- Boittin, F.X., F. Coussin, N. Macrez, C. Mironneau, and J. Mironneau. 1998. Inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channel-dependent Ca²⁺ signalling in rat portal vein myocytes. *Cell Calcium*. 23:303-11.
- Bolotina, V.M., and P. Csutora. 2005. CIF and other mysteries of the store-operated Ca²⁺-entry pathway. *Trends Biochem Sci*. 30:378-87.
- Bootman, M.D., M.J. Berridge, and H.L. Roderick. 2002a. Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7320-2.
- Bootman, M.D., M.J. Berridge, and H.L. Roderick. 2002b. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol*. 12:R563-5.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.
- Brailoiu, E., D. Churamani, V. Pandey, G.C. Brailoiu, F. Tuluc, S. Patel, and N.J. Dun. 2006. Messenger-specific role for nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate in neuronal differentiation. *J Biol Chem*. 281:15923-8.
- Brailoiu, E., J.L. Hoard, C.M. Filipeanu, G.C. Brailoiu, S.L. Dun, S. Patel, and N.J. Dun. 2005. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate potentiates neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 280:5646-50.
- Brailoiu, E., M.D. Miyamoto, and N.J. Dun. 2001. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate enhances quantal neurosecretion at the frog neuromuscular junction: possible action on synaptic vesicles in the releasable pool. *Mol Pharmacol*. 60:718-24.
- Bruzzone, S., L. Franco, L. Guida, E. Zocchi, P. Contini, A. Bisso, C. Usai, and A. De Flora. 2001a. A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD⁺ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*. 276:48300-8.
- Bruzzone, S., L. Guida, E. Zocchi, L. Franco, and A. De Flora. 2001b. Connexin 43 hemichannels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *Faseb J*. 15:10-12.
- Bruzzone, S., C. Verderio, U. Schenk, E. Fedele, E. Zocchi, M. Matteoli, and A. De Flora. 2004. Glutamate-mediated overexpression of CD38 in astrocytes cultured with neurones. *J Neurochem*. 89:264-72.
- Burdakov, D., O.H. Petersen, and A. Verkhratsky. 2005. Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. *Cell Calcium*. 38:303-10.
- Cakir-Kiefer, C., H. Muller-Steffner, N. Oppenheimer, and F. Schuber. 2001. Kinetic competence of the cADP-ribose-CD38 complex as an intermediate in the CD38/NAD⁺ glycohydrolase-catalysed reactions: implication for CD38 signalling. *Biochem J*. 358:399-406.
- Cakir-Kiefer, C., H. Muller-Steffner, and F. Schuber. 2000. Unifying mechanism for Aplysia ADP-ribosyl cyclase and CD38/NAD(+) glycohydrolases. *Biochem J*. 349:203-10.
- Cancela, J.M. 2001. Specific Ca²⁺ signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP3. *Annu Rev Physiol*. 63:99-117.
- Cancela, J.M., G. Charpentier, and O.H. Petersen. 2003. Co-ordination of Ca(2+) signalling in mammalian cells by the new Ca(2+)-releasing messenger NAADP. *Pflugers Arch*. 446:322-7.
- Cancela, J.M., G.C. Churchill, and A. Galione. 1999. Coordination of agonist-induced Ca²⁺-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature*. 398:74-6.
- Cancela, J.M., O.V. Gerasimenko, J.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 2000. Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca(2+) release: the

- roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *Embo J.* 19:2549-57.
- Cancela, J.M., H. Mogami, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 1998. Intracellular glucose switches between cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate triggering of cytosolic Ca²⁺ spiking. *Curr Biol.* 8:865-8.
- Cancela, J.M., and O.H. Petersen. 1998. The cyclic ADP ribose antagonist 8-NH₂-cADP-ribose blocks cholecystinin-evoked cytosolic Ca²⁺ spiking in pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* 435:746-8.
- Cancela, J.M., and O.H. Petersen. 2002. Regulation of intracellular Ca²⁺ stores by multiple Ca²⁺-releasing messengers. *Diabetes.* 51 Suppl 3:S349-57.
- Cancela, J.M., F. Van Coppenolle, A. Galione, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 2002. Transformation of local Ca²⁺ spikes to global Ca²⁺ transients: the combinatorial roles of multiple Ca²⁺ releasing messengers. *Embo J.* 21:909-19.
- Cannell, M.B., and C. Soeller. 1999. Mechanisms underlying calcium sparks in cardiac muscle. *J Gen Physiol.* 113:373-6.
- Ceni, C., H. Muller-Steffner, F. Lund, N. Pochon, A. Schweitzer, M. De Waard, F. Schuber, M. Villaz, and M.J. Moutin. 2003a. Evidence for an intracellular ADP-ribosyl cyclase/NAD⁺-glycohydrolase in brain from CD38-deficient mice. *J Biol Chem.* 278:40670-8.
- Ceni, C., N. Pochon, V. Brun, H. Muller-Steffner, A. Andrieux, D. Grunwald, F. Schuber, M. De Waard, F. Lund, M. Villaz, and M.J. Moutin. 2003b. CD38-dependent ADP-ribosyl cyclase activity in developing and adult mouse brain. *Biochem J.* 370:175-83.
- Ceni, C., N. Pochon, M. Villaz, H. Muller-Steffner, F. Schuber, J. Baratier, M. De Waard, M. Ronjat, and M.J. Moutin. 2006. The CD38-independent ADP-ribosyl cyclase from mouse brain synaptosomes: a comparative study of neonate and adult brain. *Biochem J.* 395:417-26.
- Chameau, P., Y. Van de Vrede, P. Fossier, and G. Baux. 2001. Ryanodine-, IP₃- and NAADP-dependent calcium stores control acetylcholine release. *Pflugers Arch.* 443:289-96.
- Chaubourt, E., V. Voisin, P. Fossier, G. Baux, M. Israel, and S. de La Porte. 2000. The NO way to increase muscular utrophin expression? *C R Acad Sci III.* 323:735-40.
- Cheng, H., W.J. Lederer, and M.B. Cannell. 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* 262:740-4.
- Cheng, J., A.N. Yusufi, M.A. Thompson, E.N. Chini, and J.P. Grande. 2001. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate: a new Ca²⁺ releasing agent in kidney. *J Am Soc Nephrol.* 12:54-60.
- Chini, E.N., K.W. Beers, and T.P. Dousa. 1995. Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *J Biol Chem.* 270:3216-23.
- Chini, E.N., C.C. Chini, I. Kato, S. Takasawa, and H. Okamoto. 2002. CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. *Biochem J.* 362:125-30.
- Chini, E.N., and T.P. Dousa. 1996. Nicotinate-adenine dinucleotide phosphate-induced Ca(2+)-release does not behave as a Ca(2+)-induced Ca(2+)-release system. *Biochem J.* 316 (Pt 3):709-11.
- Choe, C.U., and B.E. Ehrlich. 2006. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci STKE.* 2006:re15.
- Chow, A., D. Toomre, W. Garrett, and I. Mellman. 2002. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature.* 418:988-94.

- Churamani, D., G.D. Dickinson, M. Ziegler, and S. Patel. 2006. Time sensing by NAADP receptors. *Biochem J.* 397:313-20.
- Churchill, G.C., and A. Galione. 2001. Prolonged inactivation of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-induced Ca²⁺ release mediates a spatiotemporal Ca²⁺ memory. *J Biol Chem.* 276:11223-5.
- Churchill, G.C., J.S. O'Neill, R. Masgrau, S. Patel, J.M. Thomas, A.A. Genazzani, and A. Galione. 2003. Sperm deliver a new second messenger: NAADP. *Curr Biol.* 13:125-8.
- Churchill, G.C., Y. Okada, J.M. Thomas, A.A. Genazzani, S. Patel, and A. Galione. 2002. NAADP mobilizes Ca(2+) from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell.* 111:703-8.
- Clapham, D.E. 1995. Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature.* 375:634-5.
- Clapham, D.E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 426:517-24.
- Clemente, F., and J. Meldolesi. 1975. Calcium and pancreatic secretion. I. Subcellular distribution of calcium and magnesium in the exocrine pancreas of the guinea pig. *J Cell Biol.* 65:88-102.
- Clementi, E., M. Riccio, C. Sciorati, G. Nistico, and J. Meldolesi. 1996. The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. Role of the nitric oxide/cGMP pathway. *J Biol Chem.* 271:17739-45.
- Clerc, P., C. Saillan-Barreau, C. Desbois, L. Pradayrol, D. Fourmy, and M. Dufresne. 2002. Transgenic mice expressing cholecystokinin 2 receptors in the pancreas. *Pharmacol Toxicol.* 91:321-6.
- Cockayne, D.A., T. Muchamuel, J.C. Grimaldi, H. Muller-Steffner, T.D. Randall, F.E. Lund, R. Murray, F. Schuber, and M.C. Howard. 1998. Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood.* 92:1324-33.
- Dammermann, W., and A.H. Guse. 2005. Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local Ca²⁺ signaling in T-lymphocytes. *J Biol Chem.* 280:21394-9.
- Daulhac, L., A. Kowalski-Chauvel, L. Pradayrol, N. Vaysse, and C. Seva. 1999. Src-family tyrosine kinases in activation of ERK-1 and p85/p110-phosphatidylinositol 3-kinase by G/CCKB receptors. *J Biol Chem.* 274:20657-63.
- De Flora, A., L. Franco, L. Guida, S. Bruzzone, C. Usai, and E. Zocchi. 2000. Topology of CD38. *Chem Immunol.* 75:79-98.
- De Flora, A., L. Guida, L. Franco, and E. Zocchi. 1997. The CD38/cyclic ADP-ribose system: a topological paradox. *Int J Biochem Cell Biol.* 29:1149-66.
- De Flora, A., E. Zocchi, L. Guida, L. Franco, and S. Bruzzone. 2004. Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD⁺/cyclic ADP-ribose system. *Ann N Y Acad Sci.* 1028:176-91.
- Deconinck, N., and B. Dan. 2007. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol.* 36:1-7.
- Demaurex, N., and M. Frieden. 2003. Measurements of the free luminal ER Ca(2+) concentration with targeted "cameleon" fluorescent proteins. *Cell Calcium.* 34:109-19.
- Dolman, N.J., J.V. Gerasimenko, O.V. Gerasimenko, S.G. Voronina, O.H. Petersen, and A.V. Tepikin. 2005. Stable Golgi-mitochondria complexes and formation of Golgi Ca(2+) gradients in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* 280:15794-9.
- Dolmetsch, R.E., K. Xu, and R.S. Lewis. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature.* 392:933-6.
- Ehrlich, B.E., E. Kaftan, S. Bezprozvannaya, and I. Bezprozvanny. 1994. The pharmacology of intracellular Ca(2+)-release channels. *Trends Pharmacol Sci.* 15:145-9.

- Fernandez, J.E., S. Deaglio, D. Donati, I.S. Beusan, F. Corno, A. Aranega, M. Forni, B. Falini, and F. Malavasi. 1998. Analysis of the distribution of human CD38 and of its ligand CD31 in normal tissues. *J Biol Regul Homeost Agents*. 12:81-91.
- Ferrero, E., and F. Malavasi. 1997. Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase. *J Immunol*. 159:3858-65.
- Ferrero, E., F. Saccucci, and F. Malavasi. 1999. The human CD38 gene: polymorphism, CpG island, and linkage to the CD157 (BST-1) gene. *Immunogenetics*. 49:597-604.
- Finch, E.A., T.J. Turner, and S.M. Goldin. 1991. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science*. 252:443-6.
- Fischer, L., A.S. Gukovskaya, S.H. Young, I. Gukovsky, A. Lugea, P. Buechler, J.M. Penninger, H. Friess, and S.J. Pandol. 2004. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Ca²⁺ signaling in pancreatic acinar cells through inhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 287:G1200-12.
- Fitzsimmons, T.J., I. Gukovsky, J.A. McRoberts, E. Rodriguez, F.A. Lai, and S.J. Pandol. 2000. Multiple isoforms of the ryanodine receptor are expressed in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J*. 351:265-71.
- Fliegert, R., A. Gasser, and A.H. Guse. 2007. Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem Soc Trans*. 35:109-14.
- Flourakis, M., F. Van Coppenolle, V. Lehen'kyi, B. Beck, R. Skryma, and N. Prevarskaya. 2006. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA₂-pathway regulated store operated channels activation. *Faseb J*. 20:1215-7.
- Foletti, D., D. Guerini, and E. Carafoli. 1995. Subcellular targeting of the endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca²⁺ pumps: a study using recombinant chimeras. *Faseb J*. 9:670-80.
- Franco, L., S. Bruzzone, P. Song, L. Guida, E. Zocchi, T.F. Walseth, E. Crimi, C. Usai, A. De Flora, and V. Brusasco. 2001a. Extracellular cyclic ADP-ribose potentiates ACh-induced contraction in bovine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 280:L98-L106.
- Franco, L., L. Guida, S. Bruzzone, E. Zocchi, C. Usai, and A. De Flora. 1998. The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *Faseb J*. 12:1507-20.
- Franco, L., E. Zocchi, C. Usai, L. Guida, S. Bruzzone, A. Costa, and A. De Flora. 2001b. Paracrine roles of NAD⁺ and cyclic ADP-ribose in increasing intracellular calcium and enhancing cell proliferation of 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*. 276:21642-8.
- Freedman, S.D., M.H. Katz, E.M. Parker, and A. Gelrud. 1999. Endocytosis at the apical plasma membrane of pancreatic acinar cells is regulated by tyrosine kinases. *Am J Physiol*. 276:C306-11.
- Fukushi, Y., I. Kato, S. Takasawa, T. Sasaki, B.H. Ong, M. Sato, A. Ohsaga, K. Sato, K. Shirato, H. Okamoto, and Y. Maruyama. 2001. Identification of cyclic ADP-ribose-dependent mechanisms in pancreatic muscarinic Ca(2+) signaling using CD38 knockout mice. *J Biol Chem*. 276:649-55.
- Galione, A., and G.C. Churchill. 2002. Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium*. 32:343-54.
- Galione, A., H.C. Lee, and W.B. Busa. 1991. Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*. 253:1143-6.

- Galione, A., and O.H. Petersen. 2005. The NAADP Receptor: New Receptors or New Regulation? *Mol Interv.* 5:73-9.
- Garcia, A.G., A.M. Garcia-De-Diego, L. Gandia, R. Borges, and J. Garcia-Sancho. 2006. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev.* 86:1093-131.
- Genazzani, A.A., and A. Galione. 1996. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin-insensitive pool. *Biochem J.* 315 (Pt 3):721-5.
- Gerasimenko, J., Y. Maruyama, A. Tepikin, O.H. Petersen, and O. Gerasimenko. 2003a. Calcium signalling in and around the nuclear envelope. *Biochem Soc Trans.* 31:76-8.
- Gerasimenko, J.V., O.V. Gerasimenko, and O.H. Petersen. 2001. Membrane repair: Ca(2+)-elicited lysosomal exocytosis. *Curr Biol.* 11:R971-4.
- Gerasimenko, J.V., Y. Maruyama, K. Yano, N.J. Dolman, A.V. Tepikin, O.H. Petersen, and O.V. Gerasimenko. 2003b. NAADP mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol.* 163:271-82.
- Gerasimenko, J.V., M. Sherwood, A.V. Tepikin, O.H. Petersen, and O.V. Gerasimenko. 2006. NAADP, cADPR and IP3 all release Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci.* 119:226-38.
- Gerasimenko, J.V., A.V. Tepikin, O.H. Petersen, and O.V. Gerasimenko. 1998. Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr Biol.* 8:1335-8.
- Gerasimenko, O., and A. Tepikin. 2005. How to measure Ca²⁺ in cellular organelles? *Cell Calcium.* 38:201-11.
- Gerasimenko, O.V., J.V. Gerasimenko, P.V. Belan, and O.H. Petersen. 1996a. Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell.* 84:473-80.
- Gerasimenko, O.V., J.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 1995. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope. *Cell.* 80:439-44.
- Gerasimenko, O.V., J.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 1996b. Calcium transport pathways in the nucleus. *Pflugers Arch.* 432:1-6.
- Gilabert, J.A., and A.B. Parekh. 2000. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC). *Embo J.* 19:6401-7.
- Gill, D.L., R.T. Waldron, K.E. Rys-Sikora, C.A. Ufret-Vincenty, M.N. Graber, C.J. Favre, and A. Alfonso. 1996. Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Biosci Rep.* 16:139-57.
- Giovannucci, D.R., D.I. Yule, and E.L. Stuenkel. 1998. Optical measurement of stimulus-evoked membrane dynamics in single pancreatic acinar cells. *Am J Physiol.* 275:C732-9.
- Glitsch, M.D., D. Bakowski, and A.B. Parekh. 2002. Store-operated Ca²⁺ entry depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake. *Embo J.* 21:6744-54.
- Gonzalez, A., J.A. Pariente, G.M. Salido, and P.J. Camello. 1997. Intracellular pH and calcium signalling in rat pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* 434:609-14.
- Goodrich, S.P., H. Muller-Steffner, A. Osman, M.J. Moutin, K. Kusser, A. Roberts, D.L. Woodland, T.D. Randall, E. Kellenberger, P.T. LoVerde, F. Schuber, and F.E. Lund. 2005. Production of calcium-mobilizing metabolites by a novel member of the ADP-ribosyl cyclase family expressed in *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry.* 44:11082-97.
- Graeff, R., and H.C. Lee. 2002. A novel cycling assay for nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate with nanomolar sensitivity. *Biochem J.* 367:163-8.

- Graeff, R., Q. Liu, I.A. Kriksunov, Q. Hao, and H.C. Lee. 2006. Acidic residues at the active sites of CD38 and ADP-ribosyl cyclase determine nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthesis and hydrolysis activities. *J Biol Chem.* 281:28951-7.
- Graeff, R.M., L. Franco, A. De Flora, and H.C. Lee. 1998. Cyclic GMP-dependent and -independent effects on the synthesis of the calcium messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem.* 273:118-25.
- Guida, L., S. Bruzzone, L. Sturla, L. Franco, E. Zocchi, and A. De Flora. 2002. Equilibrative and concentrative nucleoside transporters mediate influx of extracellular cyclic ADP-ribose into 3T3 murine fibroblasts. *J Biol Chem.* 277:47097-105.
- Guse, A.H. 1999. Cyclic ADP-ribose: a novel Ca²⁺-mobilising second messenger. *Cell Signal.* 11:309-16.
- Guse, A.H. 2000. Cyclic ADP-ribose. *J Mol Med.* 78:26-35.
- Guse, A.H. 2005. Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Febs J.* 272:4590-7.
- Guse, A.H., C.P. da Silva, I. Berg, A.L. Skapenko, K. Weber, P. Heyer, M. Hohenegger, G.A. Ashamu, H. Schulze-Koops, B.V. Potter, and G.W. Mayr. 1999. Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature.* 398:70-3.
- Guse, A.H., A.Y. Tsygankov, K. Weber, and G.W. Mayr. 2001. Transient tyrosine phosphorylation of human ryanodine receptor upon T cell stimulation. *J Biol Chem.* 276:34722-7.
- Gyorke, S. 1999. Ca²⁺ spark termination: inactivation and adaptation may be manifestations of the same mechanism. *J Gen Physiol.* 114:163-6.
- Gyorke, S., and P. Palade. 1994. Ca(2+)-dependent negative control mechanism for Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in crayfish muscle. *J Physiol.* 476:315-22.
- Hajnoczky, G., L.D. Robb-Gaspers, M.B. Seitz, and A.P. Thomas. 1995. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell.* 82:415-24.
- Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.
- Harootunian, A.T., J.P. Kao, S. Paranjape, and R.Y. Tsien. 1991. Generation of calcium oscillations in fibroblasts by positive feedback between calcium and IP₃. *Science.* 251:75-8.
- Heidemann, A.C., C.G. Schipke, and H. Kettenmann. 2005. Extracellular application of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate induces Ca²⁺ signaling in astrocytes in situ. *J Biol Chem.* 280:35630-40.
- Henzi, V., and A.B. MacDermott. 1992. Characteristics and function of Ca(2+)- and inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable stores of Ca²⁺ in neurons. *Neuroscience.* 46:251-73.
- Higashida, H., S. Yokoyama, M. Hashii, M. Taketo, M. Higashida, T. Takayasu, T. Ohshima, S. Takasawa, H. Okamoto, and M. Noda. 1997. Muscarinic receptor-mediated dual regulation of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15 neuronal cell membranes. *J Biol Chem.* 272:31272-7.
- Hirata, Y., N. Kimura, K. Sato, Y. Ohsugi, S. Takasawa, H. Okamoto, J. Ishikawa, T. Kaisho, K. Ishihara, and T. Hirano. 1994. ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1. *FEBS Lett.* 356:244-8.
- Hohenegger, M., J. Suko, R. Gscheidlinger, H. Drobny, and A. Zidar. 2002. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem J.* 367:423-31.

- Homma, M.K., Y. Homma, M. Namba, and Y. Yuasa. 1994. Enhanced phosphoinositide metabolism in colorectal carcinoma cells derived from familial adenomatous polyposis patients. *J Cell Biochem.* 55:477-85.
- Hoth, M., C.M. Fanger, and R.S. Lewis. 1997. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol.* 137:633-48.
- Howard, M., J.C. Grimaldi, J.F. Bazan, F.E. Lund, L. Santos-Argumedo, R.M. Parkhouse, T.F. Walseth, and H.C. Lee. 1993. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science.* 262:1056-9.
- Humbert, J.P., N. Matter, J.C. Artault, P. Koppler, and A.N. Malviya. 1996. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J Biol Chem.* 271:478-85.
- Huser, J., J.R. Holda, J. Kockskamper, and L.A. Blatter. 1999. Focal agonist stimulation results in spatially restricted Ca²⁺ release and capacitative Ca²⁺ entry in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol.* 514 (Pt 1):101-9.
- Hussain, A.M., H.C. Lee, and C.F. Chang. 1998. Functional expression of secreted mouse BST-1 in yeast. *Protein Expr Purif.* 12:133-7.
- Irvine, R.F. 1990. 'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett.* 263:5-9.
- Itoh, M., K. Ishihara, H. Tomizawa, H. Tanaka, Y. Kobune, J. Ishikawa, T. Kaisho, and T. Hirano. 1994. Molecular cloning of murine BST-1 having homology with CD38 and Aplysia ADP-ribosyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 203:1309-17.
- Jackson, D.G., and J.I. Bell. 1990. Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J Immunol.* 144:2811-5.
- Jadot, M., V. Bielande, V. Beauloye, S. Wattiaux-De Coninck, and R. Wattiaux. 1990. Cytotoxicity and effect of glycyl-D-phenylalanine-2-naphthylamide on lysosomes. *Biochim Biophys Acta.* 1027:205-9.
- Jadot, M., C. Colmant, S. Wattiaux-De Coninck, and R. Wattiaux. 1984. Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide. *Biochem J.* 219:965-70.
- Jaggard, J.H., V.A. Porter, W.J. Lederer, and M.T. Nelson. 2000. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 278:C235-56.
- Jin, D., H.X. Liu, H. Hirai, T. Torashima, T. Nagai, O. Lopatina, N.A. Shnayder, K. Yamada, M. Noda, T. Seike, K. Fujita, S. Takasawa, S. Yokoyama, K. Koizumi, Y. Shiraishi, S. Tanaka, M. Hashii, T. Yoshihara, K. Higashida, M.S. Islam, N. Yamada, K. Hayashi, N. Noguchi, I. Kato, H. Okamoto, A. Matsushima, A. Salmina, T. Munesue, N. Shimizu, S. Mochida, M. Asano, and H. Higashida. 2007. CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. *Nature.* 446:41-5.
- Johnson, J.D., and S. Mislser. 2002. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate-sensitive calcium stores initiate insulin signaling in human beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14566-71.
- Johnson, P.R., A.V. Tepikin, and G. Erdemli. 2002. Role of mitochondria in Ca(2+) homeostasis of mouse pancreatic acinar cells. *Cell Calcium.* 32:59-69.
- Jouaville, L.S., F. Ichas, E.L. Holmuhamedov, P. Camacho, and J.D. Lechleiter. 1995. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature.* 377:438-41.
- Jouaville, L.S., P. Pinton, C. Bastianutto, G.A. Rutter, and R. Rizzuto. 1999. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13807-12.

- Kaisho, T., J. Ishikawa, K. Oritani, J. Inazawa, H. Tomizawa, O. Muraoka, T. Ochi, and T. Hirano. 1994. BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:5325-9.
- Kang, B.N., D.A. Deshpande, K.G. Tirumurugan, R.A. Panettieri, T.F. Walseth, and M.S. Kannan. 2005. Adenoviral mediated anti-sense CD38 attenuates TNF-alpha-induced changes in calcium homeostasis of human airway smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 83:799-804.
- Kasai, H., and G.J. Augustine. 1990. Cytosolic Ca²⁺ gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. *Nature*. 348:735-8.
- Kasai, H., Y.X. Li, and Y. Miyashita. 1993. Subcellular distribution of Ca²⁺ release channels underlying Ca²⁺ waves and oscillations in exocrine pancreas. *Cell*. 74:669-77.
- Kasri, N.N., K. Torok, A. Galione, C. Garnham, G. Callewaert, L. Missiaen, J.B. Parys, and H. De Smedt. 2006. Endogenously bound calmodulin is essential for the function of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*. 281:8332-8.
- Kato, I., Y. Yamamoto, M. Fujimura, N. Noguchi, S. Takasawa, and H. Okamoto. 1999. CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, [Ca²⁺]_i, and insulin secretion. *J Biol Chem*. 274:1869-72.
- Kinnear, N.P., F.X. Boittin, J.M. Thomas, A. Galione, and A.M. Evans. 2004. Lysosome-sarcoplasmic reticulum junctions. A trigger zone for calcium signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and endothelin-1. *J Biol Chem*. 279:54319-26.
- Kolisek, M., A. Beck, A. Fleig, and R. Penner. 2005. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell*. 18:61-9.
- Konturek, S.J., R. Zabielski, J.W. Konturek, and J. Czarnecki. 2003. Neuroendocrinology of the pancreas; role of brain-gut axis in pancreatic secretion. *Eur J Pharmacol*. 481:1-14.
- Kramer, G., G. Steiner, D. Fodinger, E. Fiebiger, C. Rappersberger, S. Binder, J. Hofbauer, and M. Marberger. 1995. High expression of a CD38-like molecule in normal prostatic epithelium and its differential loss in benign and malignant disease. *J Urol*. 154:1636-41.
- Krause, E., A. Gobel, and I. Schulz. 2002. Cell side-specific sensitivities of intracellular Ca²⁺ stores for inositol 1,4,5-trisphosphate, cyclic ADP-ribose, and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate in permeabilized pancreatic acinar cells from mouse. *J Biol Chem*. 277:11696-702.
- Krause, E., F. Pfeiffer, A. Schmid, and I. Schulz. 1996. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*. 271:32523-8.
- Kuemmerle, J.F., and G.M. Makhlof. 1995. Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. Endogenous modulator of Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in intestinal longitudinal muscle. *J Biol Chem*. 270:25488-94.
- Kukimoto, I., S. Hoshino, K. Kontani, K. Inageda, H. Nishina, K. Takahashi, and T. Katada. 1996. Stimulation of ADP-ribosyl cyclase activity of the cell surface antigen CD38 by zinc ions resulting from inhibition of its NAD⁺ glycohydrolase activity. *Eur J Biochem*. 239:177-82.
- Lai, F.A., M. Misra, L. Xu, H.A. Smith, and G. Meissner. 1989. The ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for a cooperatively coupled, negatively charged homotetramer. *J Biol Chem*. 264:16776-85.
- Langhorst, M.F., N. Schwarzmann, and A.H. Guse. 2004. Ca²⁺ release via ryanodine receptors and Ca²⁺ entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca²⁺ signaling in T-lymphocytes. *Cell Signal*. 16:1283-9.

- LaPlante, J.M., C.P. Ye, S.J. Quinn, E. Goldin, E.M. Brown, S.A. Slaugenhaupt, and P.M. Vassilev. 2004. Functional links between mucolipin-1 and Ca²⁺-dependent membrane trafficking in mucopolysaccharidosis IV. *Biochem Biophys Res Commun.* 322:1384-91.
- Lechleiter, J., S. Girard, D. Clapham, and E. Peralta. 1991. Subcellular patterns of calcium release determined by G protein-specific residues of muscarinic receptors. *Nature.* 350:505-8.
- Lechleiter, J.D., L.M. John, and P. Camacho. 1998. Ca²⁺ wave dispersion and spiral wave entrainment in *Xenopus laevis* oocytes overexpressing Ca²⁺ ATPases. *Biophys Chem.* 72:123-9.
- Lee, H.C. 1997. Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev.* 77:1133-64.
- Lee, H.C. 2000. NAADP: An emerging calcium signaling molecule. *J Membr Biol.* 173:1-8.
- Lee, H.C. 2001. Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:317-45.
- Lee, H.C. 2003. Calcium signaling: NAADP ascends as a new messenger. *Curr Biol.* 13:R186-8.
- Lee, H.C. 2004. Multiplicity of Ca²⁺ messengers and Ca²⁺ stores: a perspective from cyclic ADP-ribose and NAADP. *Curr Mol Med.* 4:227-37.
- Lee, H.C., and R. Aarhus. 1991. ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD⁺ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul.* 2:203-9.
- Lee, H.C., and R. Aarhus. 1995. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem.* 270:2152-7.
- Lee, H.C., and R. Aarhus. 1998. Fluorescent analogs of NAADP with calcium mobilizing activity. *Biochim Biophys Acta.* 1425:263-71.
- Lee, H.C., and R. Aarhus. 2000. Functional visualization of the separate but interacting calcium stores sensitive to NAADP and cyclic ADP-ribose. *J Cell Sci.* 113 Pt 24:4413-20.
- Lee, H.C., A. Galione, and T.F. Walseth. 1994. Cyclic ADP-ribose: metabolism and calcium mobilizing function. *Vitam Horm.* 48:199-257.
- Lee, H.C., T.F. Walseth, G.T. Bratt, R.N. Hayes, and D.L. Clapper. 1989. Structural determination of a cyclic metabolite of NAD⁺ with intracellular Ca²⁺-mobilizing activity. *J Biol Chem.* 264:1608-15.
- Lee, M.G., X. Xu, W. Zeng, J. Diaz, T.H. Kuo, F. Wuytack, L. Racymaekers, and S. Muallem. 1997a. Polarized expression of Ca²⁺ pumps in pancreatic and salivary gland cells. Role in initiation and propagation of [Ca²⁺]_i waves. *J Biol Chem.* 272:15771-6.
- Lee, M.G., X. Xu, W. Zeng, J. Diaz, R.J. Wojcikiewicz, T.H. Kuo, F. Wuytack, L. Racymaekers, and S. Muallem. 1997b. Polarized expression of Ca²⁺ channels in pancreatic and salivary gland cells. Correlation with initiation and propagation of [Ca²⁺]_i waves. *J Biol Chem.* 272:15765-70.
- Leite, M.F., A.D. Burgstahler, and M.H. Nathanson. 2002. Ca²⁺ waves require sequential activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors in pancreatic acini. *Gastroenterology.* 122:415-27.
- Leite, M.F., J.A. Dranoff, L. Gao, and M.H. Nathanson. 1999. Expression and subcellular localization of the ryanodine receptor in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J.* 337 (Pt 2):305-9.
- Liang, M., E.N. Chini, J. Cheng, and T.P. Dousa. 1999. Synthesis of NAADP and cADPR in mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 371:317-25.
- Liddle, R.A. 1997. Cholecystokinin cells. *Annu Rev Physiol.* 59:221-42.
- Lomax, R.B., C. Camello, F. Van Coppenolle, O.H. Petersen, and A.V. Tepikin. 2002. Basal and physiological Ca(2+) leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar

- cells. Second messenger-activated channels and translocons. *J Biol Chem.* 277:26479-85.
- Lund, F.E., D.A. Cockayne, T.D. Randall, N. Solvason, F. Schuber, and M.C. Howard. 1998. CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol Rev.* 161:79-93.
- Luo, X., W. Ahn, S. Muallem, and W. Zeng. 2004. Analyses of RGS protein control of agonist-evoked Ca²⁺ signaling. *Methods Enzymol.* 389:119-30.
- Luo, X., D.M. Shin, X. Wang, S.F. Konieczny, and S. Muallem. 2005. Aberrant localization of intracellular organelles, Ca²⁺ signaling, and exocytosis in Mist1 null mice. *J Biol Chem.* 280:12668-75.
- Luo, X., W. Zeng, X. Xu, S. Popov, I. Davignon, T.M. Wilkie, S.M. Mumby, and S. Muallem. 1999. Alternate coupling of receptors to G_s and G_i in pancreatic and submandibular gland cells. *J Biol Chem.* 274:17684-90.
- Lytton, J., M. Westlin, and M.R. Hanley. 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem.* 266:17067-71.
- Ma, J., S.M. Hayek, and M.B. Bhat. 2004. Membrane topology and membrane retention of the ryanodine receptor calcium release channel. *Cell Biochem Biophys.* 40:207-24.
- MacLennan, D.H., T. Toyofuku, and J. Lytton. 1992. Structure-function relationships in sarcoplasmic or endoplasmic reticulum type Ca²⁺ pumps. *Ann N Y Acad Sci.* 671:1-10.
- Mallone, R., E. Ortolan, S. Pinach, M. Volante, M.M. Zanone, G. Bruno, G. Baj, T. Lohmann, P. Cavallo-Perin, and F. Malavasi. 2002. Anti-CD38 autoantibodies: characterisation in new-onset type I diabetes and latent autoimmune diabetes of the adult (LADA) and comparison with other islet autoantibodies. *Diabetologia.* 45:1667-77.
- Malviya, A.N., and C. Klein. 2006. Mechanism regulating nuclear calcium signaling. *Can J Physiol Pharmacol.* 84:403-22.
- Malviya, A.N., P. Rogue, and G. Vincendon. 1990. Stereospecific inositol 1,4,5-[³²P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:9270-4.
- Mandi, M., B. Toth, G. Timar, and J. Bak. 2006. Ca²⁺ release triggered by NAADP in hepatocyte microsomes. *Biochem J.* 395:233-8.
- Maruyama, Y. 1989. Effects of external calcium on acetylcholine-evoked increases in membrane capacitance in rat pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* 413:438-40.
- Maruyama, Y., G. Inooka, Y.X. Li, Y. Miyashita, and H. Kasai. 1993. Agonist-induced localized Ca²⁺ spikes directly triggering exocytotic secretion in exocrine pancreas. *Embo J.* 12:3017-22.
- Maruyama, Y., and O.H. Petersen. 1994. Delay in granular fusion evoked by repetitive cytosolic Ca²⁺ spikes in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Calcium.* 16:419-30.
- Masgrau, R., G.C. Churchill, A.J. Morgan, S.J. Ashcroft, and A. Galione. 2003. NAADP: a new second messenger for glucose-induced Ca²⁺ responses in clonal pancreatic beta cells. *Curr Biol.* 13:247-51.
- Masuda, W., S. Takenaka, S. Tsuyama, H. Inui, K. Miyatake, and Y. Nakano. 1999. Purification and characterization of ADP-ribosyl cyclase from *Euglena gracilis*. *J Biochem (Tokyo).* 125:449-53.
- Matozaki, T., B. Goke, Y. Tsunoda, M. Rodriguez, J. Martinez, and J.A. Williams. 1990. Two functionally distinct cholecystokinin receptors show different modes of action on

- Ca²⁺ mobilization and phospholipid hydrolysis in isolated rat pancreatic acini. Studies using a new cholecystinin analog, JMV-180. *J Biol Chem.* 265:6247-54.
- Matsumura, N., and S. Tanuma. 1998. Involvement of cytosolic NAD⁺ glycohydrolase in cyclic ADP-ribose metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 253:246-52.
- McNeil, P.L. 2002. Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. *J Cell Sci.* 115:873-9.
- Mengubas, K., S.A. Jabbar, K.E. Nye, S. Wilkes, A.V. Hoffbrand, and R.G. Wickremasinghe. 1994. Inactivation of calcium ion-regulating inositol polyphosphate second messengers is impaired in subpopulations of human leukemia cells. *Leukemia.* 8:1718-25.
- Menteyne, A., A. Burdakov, G. Charpentier, O.H. Petersen, and J.M. Cancela. 2006. Generation of specific Ca(2+) signals from Ca(2+) stores and endocytosis by differential coupling to messengers. *Curr Biol.* 16:1931-7.
- Merritt, J.E., W.P. Armstrong, C.D. Benham, T.J. Hallam, R. Jacob, A. Jaxa-Chamiec, B.K. Leigh, S.A. McCarthy, K.E. Moores, and T.J. Rink. 1990. SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J.* 271:515-22.
- Meszaros, L.G., J. Bak, and A. Chu. 1993. Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Nature.* 364:76-9.
- Michalak, M., J.M. Robert Parker, and M. Opas. 2002. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 32:269-78.
- Mignen, O., J.L. Thompson, D.I. Yule, and T.J. Shuttleworth. 2005. Agonist activation of arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels in murine parotid and pancreatic acinar cells. *J Physiol.* 564:791-801.
- Missiaen, L., H. De Smedt, G. Droogmans, and R. Casteels. 1992a. Ca²⁺ release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca²⁺ in permeabilized cells. *Nature.* 357:599-602.
- Missiaen, L., C.W. Taylor, and M.J. Berridge. 1991. Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature.* 352:241-4.
- Missiaen, L., C.W. Taylor, and M.J. Berridge. 1992b. Luminal Ca²⁺ promoting spontaneous Ca²⁺ release from inositol trisphosphate-sensitive stores in rat hepatocytes. *J Physiol.* 455:623-40.
- Missiaen, L., K. Van Acker, K. Van Baelen, L. Raeymaekers, F. Wuytack, J.B. Parys, H. De Smedt, J. Vanoevelen, L. Dode, R. Rizzuto, and G. Callewaert. 2004. Calcium release from the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments. *Cell Calcium.* 36:479-87.
- Mitchell, K.J., F.A. Lai, and G.A. Rutter. 2003. Ryanodine receptor type I and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate receptors mediate Ca²⁺ release from insulin-containing vesicles in living pancreatic beta-cells (MIN6). *J Biol Chem.* 278:11057-64.
- Mizuguchi, M., N. Otsuka, M. Sato, Y. Ishii, S. Kon, M. Yamada, H. Nishina, T. Katada, and K. Ikeda. 1995. Neuronal localization of CD38 antigen in the human brain. *Brain Res.* 697:235-40.
- Moccia, F., D. Lim, G.A. Nusco, E. Ercolano, and L. Santella. 2003. NAADP activates a Ca²⁺ current that is dependent on F-actin cytoskeleton. *Faseb J.* 17:1907-9.
- Mogami, H., K. Nakano, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 1997. Ca²⁺ flow via tunnels in polarized cells: recharging of apical Ca²⁺ stores by focal Ca²⁺ entry through basal membrane patch. *Cell.* 88:49-55.
- Mogami, H., A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 1998. Termination of cytosolic Ca²⁺ signals: Ca²⁺ reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca²⁺ concentration in the store lumen. *Embo J.* 17:435-42.

- Mojzisova, A., O. Krizanova, L. Zacikova, V. Kominkova, and K. Ondrias. 2001. Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart. *Pflugers Arch.* 441:674-7.
- Moncada, S., D.D. Rees, R. Schulz, and R.M. Palmer. 1991. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:2166-70.
- Montero, M., J. Alvarez, W.J. Scheenen, R. Rizzuto, J. Meldolesi, and T. Pozzan. 1997. Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum: coexistence of high and low [Ca²⁺] subcompartments in intact HeLa cells. *J Cell Biol.* 139:601-11.
- Morgan, A.J., and A. Galione. 2006. NAADP induces pH changes in the lumen of acidic Ca²⁺ stores. *Biochem J.*
- Morgan, A.J., and R. Jacob. 1998. Differential modulation of the phases of a Ca²⁺ spike by the store Ca²⁺-ATPase in human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol.* 513 (Pt 1):83-101.
- Morita, K., S. Kitayama, and T. Dohi. 1997. Stimulation of cyclic ADP-ribose synthesis by acetylcholine and its role in catecholamine release in bovine adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem.* 272:21002-9.
- Muallem, S., K. Kwiatkowska, X. Xu, and H.L. Yin. 1995. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol.* 128:589-98.
- Muallem, S., and T.M. Wilkie. 1999. G protein-dependent Ca²⁺ signaling complexes in polarized cells. *Cell Calcium.* 26:173-80.
- Munshi, C., R. Aarhus, R. Graeff, T.F. Walseth, D. Levitt, and H.C. Lee. 2000. Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 275:21566-71.
- Nakagaki, I., S. Sasaki, M. Shiguma, and Y. Imai. 1984. Distribution of elements in the pancreatic exocrine cells determined by electron probe X-ray microanalysis. *Pflugers Arch.* 401:340-5.
- Nathanson, M.H., M.B. Fallon, P.J. Padfield, and A.R. Maranto. 1994. Localization of the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the Ca²⁺ wave trigger zone of pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* 269:4693-6.
- Nemoto, T., R. Kimura, K. Ito, A. Tachikawa, Y. Miyashita, M. Iino, and H. Kasai. 2001. Sequential-replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini. *Nat Cell Biol.* 3:253-8.
- Nicaise, G., K. Maggio, S. Thirion, M. Horoyan, and E. Keicher. 1992. The calcium loading of secretory granules. A possible key event in stimulus-secretion coupling. *Biol Cell.* 75:89-99.
- Nilius, B. 2004. Store-operated Ca²⁺ entry channels: still elusive! *Sci STKE.* 2004:pe36.
- Okamoto, H. 1999. The CD38-cyclic ADP-ribose signaling system in insulin secretion. *Mol Cell Biochem.* 193:115-8.
- Okamoto, H., S. Takasawa, A. Tohgo, K. Nata, I. Kato, and N. Noguchi. 1997. Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38: inhibition of hydrolysis by ATP and physiological significance. *Methods Enzymol.* 280:306-18.
- Ortolan, E., P. Vacca, A. Capobianco, E. Armando, F. Crivellin, A. Horenstein, and F. Malavasi. 2002. CD157, the Janus of CD38 but with a unique personality. *Cell Biochem Funct.* 20:309-22.
- Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.* 189:347-58.
- Palade, P. 2007. The hunt for an alternate way to generate NAADP. Focus on "NAADP as a second messenger: neither CD38 nor base-exchange reaction are necessary for in vivo generation of NAADP in myometrial cells". *Am J Physiol Cell Physiol.* 292:C4-7.

- Parekh, A.B. 2006. On the activation mechanism of store-operated calcium channels. *Pflugers Arch.* 453:303-11.
- Parekh, A.B., and R. Penner. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 77:901-30.
- Parekh, A.B., and J.W. Putney, Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 85:757-810.
- Park, M.K., M.C. Ashby, G. Erdemli, O.H. Petersen, and A.V. Tepikin. 2001. Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *Embo J.* 20:1863-74.
- Park, M.K., O.H. Petersen, and A.V. Tepikin. 2000. The endoplasmic reticulum as one continuous Ca(2+) pool: visualization of rapid Ca(2+) movements and equilibration. *Embo J.* 19:5729-39.
- Parker, I., J. Choi, and Y. Yao. 1996. Elementary events of InsP3-induced Ca2+ liberation in *Xenopus* oocytes: hot spots, puffs and blips. *Cell Calcium.* 20:105-21.
- Partida-Sanchez, S., D.A. Cockayne, S. Monard, E.L. Jacobson, N. Oppenheimer, B. Garvy, K. Kusser, S. Goodrich, M. Howard, A. Harmsen, T.D. Randall, and F.E. Lund. 2001. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med.* 7:1209-16.
- Partida-Sanchez, S., S. Goodrich, K. Kusser, N. Oppenheimer, T.D. Randall, and F.E. Lund. 2004. Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity.* 20:279-91.
- Patel, S., G.C. Churchill, and A. Galione. 2001. Coordination of Ca2+ signalling by NAADP. *Trends Biochem Sci.* 26:482-9.
- Patel, S., G.C. Churchill, T. Sharp, and A. Galione. 2000. Widespread distribution of binding sites for the novel Ca2+-mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, in the brain. *J Biol Chem.* 275:36495-7.
- Patel, S., S.A. Morris, C.E. Adkins, G. O'Beirne, and C.W. Taylor. 1997. Ca2+-independent inhibition of inositol trisphosphate receptors by calmodulin: redistribution of calmodulin as a possible means of regulating Ca2+ mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:11627-32.
- Patterson, R.L., D.B. van Rossum, and D.L. Gill. 1999. Store-operated Ca2+ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell.* 98:487-99.
- Perez-Terzic, C.M., E.N. Chini, S.S. Shen, T.P. Dousa, and D.E. Clapham. 1995. Ca2+ release triggered by nicotinate adenine dinucleotide phosphate in intact sea urchin eggs. *Biochem J.* 312 (Pt 3):955-9.
- Pessah, I.N., A.L. Waterhouse, and J.E. Casida. 1985. The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 128:449-56.
- Petersen, C.C., O.H. Petersen, and M.J. Berridge. 1993. The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* 268:22262-4.
- Petersen, C.C., E.C. Toescu, and O.H. Petersen. 1991a. Different patterns of receptor-activated cytoplasmic Ca2+ oscillations in single pancreatic acinar cells: dependence on receptor type, agonist concentration and intracellular Ca2+ buffering. *Embo J.* 10:527-33.
- Petersen, O.H. 2003. Localization and regulation of Ca2+ entry and exit pathways in exocrine gland cells. *Cell Calcium.* 33:337-44.
- Petersen, O.H. 2005. Ca2+ signalling and Ca2+-activated ion channels in exocrine acinar cells. *Cell Calcium.* 38:171-200.

- Petersen, O.H., and J.M. Cancela. 2000. Attraction or repulsion by local Ca²⁺ signals. *Curr Biol*. 10:R311-4.
- Petersen, O.H., D.V. Gallacher, M. Wakui, D.I. Yule, C.C. Petersen, and E.C. Toescu. 1991b. Receptor-activated cytoplasmic Ca²⁺ oscillations in pancreatic acinar cells: generation and spreading of Ca²⁺ signals. *Cell Calcium*. 12:135-44.
- Petersen, O.H., O.V. Gerasimenko, J.V. Gerasimenko, H. Mogami, and A.V. Tepikin. 1998. The calcium store in the nuclear envelope. *Cell Calcium*. 23:87-90.
- Petersen, O.H., M. Michalak, and A. Verkhratsky. 2005. Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium*. 38:161-9.
- Petersen, O.H., C.C. Petersen, and H. Kasai. 1994. Calcium and hormone action. *Annu Rev Physiol*. 56:297-319.
- Pinton, P., T. Pozzan, and R. Rizzuto. 1998. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *Embo J*. 17:5298-308.
- Podesta, M., E. Zocchi, A. Pitto, C. Usai, L. Franco, S. Bruzzone, L. Guida, A. Bacigalupo, D.T. Scadden, T.F. Walseth, A. De Flora, and A. Daga. 2000. Extracellular cyclic ADP-ribose increases intracellular free calcium concentration and stimulates proliferation of human hemopoietic progenitors. *Faseb J*. 14:680-90.
- Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe, and J. Meldolesi. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev*. 74:595-636.
- Putney, J.W., Jr. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. 7:1-12.
- Quesada, I., W.C. Chin, J. Steed, P. Campos-Bedolla, and P. Verdugo. 2001. Mouse mast cell secretory granules can function as intracellular ionic oscillators. *Biophys J*. 80:2133-9.
- Rao, S.K., C. Huynh, V. Proux-Gillardeaux, T. Galli, and N.W. Andrews. 2004. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem*. 279:20471-9.
- Reber, B.F., and B. Schindelholz. 1996. Detection of a trigger zone of bradykinin-induced fast calcium waves in PC12 neurites. *Pflugers Arch*. 432:893-903.
- Reyes-Harde, M., B.V. Potter, A. Galione, and P.K. Stanton. 1999. Induction of hippocampal LTD requires nitric-oxide-stimulated PKG activity and Ca²⁺ release from cyclic ADP-ribose-sensitive stores. *J Neurophysiol*. 82:1569-76.
- Rinderknecht, H., I.G. Renner, and H.H. Koyama. 1979. Lysosomal enzymes in pure pancreatic juice from normal healthy volunteers and chronic alcoholics. *Dig Dis Sci*. 24:180-6.
- Rizzuto, R., and T. Pozzan. 2006. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*. 86:369-408.
- Ross, C.A., S.K. Danoff, M.J. Schell, S.H. Snyder, and A. Ullrich. 1992. Three additional inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: molecular cloning and differential localization in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:4265-9.
- Rossi, D., P. De Smet, A. Lyfenko, L. Galli, S. Lorenzini, D. Franci, F. Petrioli, A. Orrico, C. Angelini, V. Tegazzin, R. Dirksen, and V. Sorrentino. 2007. A truncation in the RYR1 gene associated with central core lesions in skeletal muscle fibres. *J Med Genet*. 44:e67.
- Rutter, G.A., and R. Rizzuto. 2000. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection. *Trends Biochem Sci*. 25:215-21.
- Saillan-Barreau, C., P. Clerc, M. Adato, C. Escricut, N. Vaysse, D. Fourmy, and M. Dufresne. 1998. Transgenic CCK-B/gastrin receptor mediates murine exocrine pancreatic secretion. *Gastroenterology*. 115:988-96.
- Santella, L., and E. Carafoli. 1997. Calcium signaling in the cell nucleus. *Faseb J*. 11:1091-109.

- Schulz, I., E. Krause, A. Gonzalez, A. Gobel, L. Sternfeld, and A. Schmid. 1999. Agonist-stimulated pathways of calcium signaling in pancreatic acinar cells. *Biol Chem.* 380:903-8.
- Shin, D.M., X. Luo, T.M. Wilkie, L.J. Miller, A.B. Peck, M.G. Humphreys-Beher, and S. Muallem. 2001. Polarized expression of G protein-coupled receptors and an all-or-none discharge of Ca²⁺ pools at initiation sites of [Ca²⁺]_i waves in polarized exocrine cells. *J Biol Chem.* 276:44146-56.
- Shuttleworth, T.J., J.L. Thompson, and O. Mignen. 2004. ARC channels: a novel pathway for receptor-activated calcium entry. *Physiology (Bethesda).* 19:355-61.
- Singaravelu, K., and J.W. Deitmer. 2006. Calcium mobilization by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) in rat astrocytes. *Cell Calcium.* 39:143-53.
- Sneyd, J., K. Tsaneva-Atanasova, V. Reznikov, Y. Bai, M.J. Sanderson, and D.I. Yule. 2006. A method for determining the dependence of calcium oscillations on inositol trisphosphate oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:1675-80.
- Soares, S., M. Thompson, T. White, A. Isbell, M. Yamasaki, Y. Prakash, F.E. Lund, A. Galione, and E.N. Chini. 2007. NAADP as a second messenger: neither CD38 nor base-exchange reaction are necessary for in vivo generation of NAADP in myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292:C227-39.
- Solovyova, N., and A. Verkhratsky. 2003. Neuronal endoplasmic reticulum acts as a single functional Ca²⁺ store shared by ryanodine and inositol-1,4,5-trisphosphate receptors as revealed by intra-ER [Ca²⁺] recordings in single rat sensory neurones. *Pflugers Arch.* 446:447-54.
- Sonnleitner, A., A. Conti, F. Bertocchini, H. Schindler, and V. Sorrentino. 1998. Functional properties of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) Ca²⁺ release channel. *Embo J.* 17:2790-8.
- Spitzer, N.C., L.N. Borodinsky, and C.M. Root. 2005. Homeostatic activity-dependent paradigm for neurotransmitter specification. *Cell Calcium.* 37:417-23.
- Srinivas, S.P., A. Ong, L. Goon, L. Goon, and J.A. Bonanno. 2002. Lysosomal Ca(2+) stores in bovine corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:2341-50.
- Sternfeld, L., E. Krause, A.H. Guse, and I. Schulz. 2003. Hormonal control of ADP-ribosyl cyclase activity in pancreatic acinar cells from rats. *J Biol Chem.* 278:33629-36.
- Straub, S.V., D.R. Giovannucci, and D.I. Yule. 2000. Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *J Gen Physiol.* 116:547-60.
- Streb, H., E. Bayerdorffer, W. Haase, R.F. Irvine, and I. Schulz. 1984. Effect of inositol-1,4,5-trisphosphate on isolated subcellular fractions of rat pancreas. *J Membr Biol.* 81:241-53.
- Streb, H., J.P. Heslop, R.F. Irvine, I. Schulz, and M.J. Berridge. 1985. Relationship between secretagogue-induced Ca²⁺ release and inositol polyphosphate production in permeabilized pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* 260:7309-15.
- Summerhill, R.J., D.G. Jackson, and A. Galione. 1993. Human lymphocyte antigen CD38 catalyzes the production of cyclic ADP-ribose. *FEBS Lett.* 335:231-3.
- Takahashi, J., Y. Kagaya, I. Kato, J. Ohta, S. Isoyama, M. Miura, Y. Sugai, M. Hirose, Y. Wakayama, M. Ninomiya, J. Watanabe, S. Takasawa, H. Okamoto, and K. Shirato. 2003. Deficit of CD38/cyclic ADP-ribose is differentially compensated in hearts by gender. *Biochem Biophys Res Commun.* 312:434-40.
- Tanimura, A., and R.J. Turner. 1996. Calcium release in HSY cells conforms to a steady-state mechanism involving regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca²⁺ channel by luminal [Ca²⁺]. *J Cell Biol.* 132:607-16.

- Tapia, J.A., H.A. Ferris, R.T. Jensen, and L.J. Garcia. 1999. Cholecystokinin activates PYK2/CAKbeta by a phospholipase C-dependent mechanism and its association with the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* 274:31261-71.
- Taylor, C.W., P.C. da Fonseca, and E.P. Morris. 2004. IP(3) receptors: the search for structure. *Trends Biochem Sci.* 29:210-9.
- Taylor, C.W., and A.J. Laude. 2002. IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium.* 32:321-34.
- Tepikin, A.V., S.G. Voronina, D.V. Gallacher, and O.H. Petersen. 1992. Pulsatile Ca²⁺ extrusion from single pancreatic acinar cells during receptor-activated cytosolic Ca²⁺ spiking. *J Biol Chem.* 267:14073-6.
- Thastrup, O. 1990. Role of Ca²⁺(+)-ATPases in regulation of cellular Ca²⁺ signalling, as studied with the selective microsomal Ca²⁺(+)-ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions.* 29:8-15.
- Thomas, A.P., G.S. Bird, G. Hajnoczky, L.D. Robb-Gaspers, and J.W. Putney, Jr. 1996. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *Faseb J.* 10:1505-17.
- Thomas, P., T. Bagrij, M. Campos-Toimil, and J.M. Edwardson. 2006. Mitochondria play a critical role in shaping the exocytotic response of rat pancreatic acinar cells. *Cell Calcium.* 39:57-63.
- Thompson, M., H. Barata da Silva, W. Zielinska, T.A. White, J.P. Bailey, F.E. Lund, G.C. Sieck, and E.N. Chini. 2004. Role of CD38 in myometrial Ca²⁺ transients: modulation by progesterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287:E1142-8.
- Thorn, P. 1996. Spatial domains of Ca²⁺ signaling in secretory epithelial cells. *Cell Calcium.* 20:203-14.
- Thorn, P., O. Gerasimenko, and O.H. Petersen. 1994. Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca²⁺ oscillations in pancreatic acinar cells. *Embo J.* 13:2038-43.
- Thorn, P., A.M. Lawrie, P.M. Smith, D.V. Gallacher, and O.H. Petersen. 1993. Local and global cytosolic Ca²⁺ oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. *Cell.* 74:661-8.
- Tinel, H., J.M. Cancela, H. Mogami, J.V. Gerasimenko, O.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 1999. Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals. *Embo J.* 18:4999-5008.
- Titievsky, A.V., T. Takeo, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 1996. Decrease of acidity inside zymogen granules inhibits acetylcholine- or inositol trisphosphate-evoked cytosolic Ca²⁺ spiking in pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* 432:938-40.
- Togashi, K., Y. Hara, T. Tominaga, T. Higashi, Y. Konishi, Y. Mori, and M. Tominaga. 2006. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *Embo J.* 25:1804-15.
- Tohgo, A., H. Munakata, S. Takasawa, K. Nata, T. Akiyama, N. Hayashi, and H. Okamoto. 1997. Lysine 129 of CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) participates in the binding of ATP to inhibit the cyclic ADP-ribose hydrolase. *J Biol Chem.* 272:3879-82.
- Tong, J., T.V. McCarthy, and D.H. MacLennan. 1999. Measurement of resting cytosolic Ca²⁺ concentrations and Ca²⁺ store size in HEK-293 cells transfected with malignant hyperthermia or central core disease mutant Ca²⁺ release channels. *J Biol Chem.* 274:693-702.

- Tregear, R.T., A.P. Dawson, and R.F. Irvine. 1991. Quantal release of Ca²⁺ from intracellular stores by InsP₃: tests of the concept of control of Ca²⁺ release by intraluminal Ca²⁺. *Proc Biol Sci.* 243:263-8.
- Treves, S., C. Franzini-Armstrong, L. Moccagatta, C. Arnoult, C. Grasso, A. Schrum, S. Ducreux, M.X. Zhu, K. Mikoshiba, T. Girard, S. Smida-Rezgui, M. Ronjat, and F. Zorzato. 2004. Junctional is a key element in calcium entry induced by activation of InsP₃ receptors and/or calcium store depletion. *J Cell Biol.* 166:537-48.
- Tsien, R.W., and R.Y. Tsien. 1990. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol.* 6:715-60.
- Turvey, M.R., and P. Thorn. 2004. Lysine-fixable dye tracing of exocytosis shows F-actin coating is a step that follows granule fusion in pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* 448:552-5.
- Valentijn, K.M., F.D. Gumkowski, and J.D. Jamieson. 1999. The subapical actin cytoskeleton regulates secretion and membrane retrieval in pancreatic acinar cells. *J Cell Sci.* 112 (Pt 1):81-96.
- Van Coppenolle, F., F. Vanden Abeele, C. Slomianny, M. Flourakis, J. Hesketh, E. Dewailly, and N. Prevarskaya. 2004. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci.* 117:4135-42.
- Vanden Abeele, F., L. Lemonnier, S. Thebault, G. Lepage, J.B. Parys, Y. Shuba, R. Skryma, and N. Prevarskaya. 2004. Two types of store-operated Ca²⁺ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem.* 279:30326-37.
- Verderio, C., S. Bruzzone, E. Zocchi, E. Fedele, U. Schenk, A. De Flora, and M. Matteoli. 2001. Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signalling and neurotransmitter release in cultured astrocytes. *J Neurochem.* 78:646-57.
- Walseth, T.F., and H.C. Lee. 1993. Synthesis and characterization of antagonists of cyclic-ADP-ribose-induced Ca²⁺ release. *Biochim Biophys Acta.* 1178:235-42.
- Wedel, B.J., G. Vazquez, R.R. McKay, J.B.G. St, and J.W. Putney, Jr. 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.* 278:25758-65.
- White, T.A., T.F. Walseth, and M.S. Kannan. 2002. Nitric oxide inhibits ADP-ribosyl cyclase through a cGMP-independent pathway in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283:L1065-71.
- Wileman, T., L.P. Kane, G.R. Carson, and C. Terhorst. 1991. Depletion of cellular calcium accelerates protein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 266:4500-7.
- Williams, C.L., V.Y. Hayes, A.M. Hummel, J.E. Tarara, and T.J. Halsey. 1993. Regulation of E-cadherin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors in small cell lung carcinoma. *J Cell Biol.* 121:643-54.
- Willmott, N., J.K. Sethi, T.F. Walseth, H.C. Lee, A.M. White, and A. Galione. 1996. Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J Biol Chem.* 271:3699-705.
- Wilson, H.L., and A. Galione. 1998. Differential regulation of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate and cADP-ribose production by cAMP and cGMP. *Biochem J.* 331 (Pt 3):837-43.
- Woodard, G.E., S.O. Sage, and J.A. Rosado. 2007. Transient receptor potential channels and intracellular signaling. *Int Rev Cytol.* 256:35-67.

- Xie, G.H., S.Y. Rah, S.J. Kim, T.S. Nam, K.C. Ha, S.W. Chae, M.J. Im, and U.H. Kim. 2005. ADP-ribosyl cyclase couples to cyclic AMP signaling in the cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 330:1290-8.
- Xu, X., J.T. Croy, W. Zeng, L. Zhao, I. Davignon, S. Popov, K. Yu, H. Jiang, S. Offermanns, S. Muallem, and T.M. Wilkie. 1998. Promiscuous coupling of receptors to Gq class alpha subunits and effector proteins in pancreatic and submandibular gland cells. *J Biol Chem.* 273:27275-9.
- Xu, X., W. Zeng, S. Popov, D.M. Berman, I. Davignon, K. Yu, D. Yowe, S. Offermanns, S. Muallem, and T.M. Wilkie. 1999. RGS proteins determine signaling specificity of Gq-coupled receptors. *J Biol Chem.* 274:3549-56.
- Yamada, M., M. Mizuguchi, N. Otsuka, K. Ikeda, and H. Takahashi. 1997. Ultrastructural localization of CD38 immunoreactivity in rat brain. *Brain Res.* 756:52-60.
- Yamamoto, M., D.M. Jia, K. Fukumitsu, and M. Otsuki. 2003. Treatment for hyperglycemia promotes pancreatic regeneration in rats without CCK-1 receptor gene expression. *Pancreas.* 26:368-74.
- Yamasaki, M., R. Masgrau, A.J. Morgan, G.C. Churchill, S. Patel, S.J. Ashcroft, and A. Galione. 2004. Organelle selection determines agonist-specific Ca²⁺ signals in pancreatic acinar and beta cells. *J Biol Chem.* 279:7234-40.
- Yamasaki, M., J.M. Thomas, G.C. Churchill, C. Garnham, A.M. Lewis, J.M. Cancela, S. Patel, and A. Galione. 2005. Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca²⁺ spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr Biol.* 15:874-8.
- Yang, J., S. McBride, D.O. Mak, N. Vardi, K. Palczewski, F. Haeseleer, and J.K. Foskett. 2002. Identification of a family of calcium sensors as protein ligands of inositol trisphosphate receptor Ca(2+) release channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7711-6.
- Yao, Y., J. Choi, and I. Parker. 1995. Quantal puffs of intracellular Ca²⁺ evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 482 (Pt 3):533-53.
- Young, G.S., E. Choleris, F.E. Lund, and J.B. Kirkland. 2006. Decreased cADPR and increased NAD⁺ in the Cd38^{-/-} mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 346:188-92.
- Yu, J.Z., D.X. Zhang, A.P. Zou, W.B. Campbell, and P.L. Li. 2000. Nitric oxide inhibits Ca(2+) mobilization through cADP-ribose signaling in coronary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279:H873-81.
- Yule, D.I., A.M. Lawrie, and D.V. Gallacher. 1991. Acetylcholine and cholecystokinin induce different patterns of oscillating calcium signals in pancreatic acinar cells. *Cell Calcium.* 12:145-51.
- Yusufi, A.N., J. Cheng, M.A. Thompson, E.N. Chini, and J.P. Grande. 2001. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) elicits specific microsomal Ca²⁺ release from mammalian cells. *Biochem J.* 353:531-6.
- Zahradnik, I., S. Gyorke, and A. Zahradnikova. 2005. Calcium activation of ryanodine receptor channels--reconciling RyR gating models with tetrameric channel structure. *J Gen Physiol.* 126:515-27.
- Zhang, F., G. Zhang, A.Y. Zhang, M.J. Koeberl, E. Wallander, and P.L. Li. 2006. Production of NAADP and its role in Ca²⁺ mobilization associated with lysosomes in coronary arterial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291:H274-82.
- Zhang, Y., H.S. Chen, V.K. Khanna, S. De Leon, M.S. Phillips, K. Schappert, B.A. Britt, A.K. Browell, and D.H. MacLennan. 1993. A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with central core disease. *Nat Genet.* 5:46-50.
- Zhao, X.S., D.M. Shin, L.H. Liu, G.E. Shull, and S. Muallem. 2001. Plasticity and adaptation of Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-dependent exocytosis in SERCA2(+/-) mice. *Embo J.* 20:2680-9.

- Zheng, J.Q. 2000. Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions. *Nature*. 403:89-93.
- Ziegler, M. 2000. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem*. 267:1550-64.
- Zocchi, E., L. Franco, L. Guida, U. Benatti, A. Bargellesi, F. Malavasi, H.C. Lee, and A. De Flora. 1993. A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺ glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 196:1459-65.
- Zocchi, E., L. Franco, L. Guida, D. Piccini, C. Tacchetti, and A. De Flora. 1996. NAD⁺-dependent internalization of the transmembrane glycoprotein CD38 in human Namalwa B cells. *FEBS Lett*. 396:327-32.
- Zocchi, E., C. Usai, L. Guida, L. Franco, S. Bruzzone, M. Passalacqua, and A. De Flora. 1999. Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca²⁺ mobilization: role of NAD⁺ transport across cell membranes. *Faseb J*. 13:273-83.

LE NAADP, UN MESSAGER LIBERANT DU CALCIUM: ETUDE DE L'IMPLICATION DES RESERVES ACIDES ET ROLE DE CD38 DANS LA VOIE DE SYNTHESE

Dans les cellules acineuses du pancréas exocrine, les agonistes acétylcholine (ACh) et Cholécystokinine (CCK) déclenchent des oscillations calciques via les messagers libérant du calcium IP₃ et cADPR pour l'ACh, et NAADP et cADPR pour la CCK. L'existence de plusieurs messagers et de plusieurs réserves intracellulaires de Ca²⁺ pose la question d'une possible coopération de ces messagers, et du recrutement sélectif des différentes réserves de Ca²⁺.

Notre travail montre que lors de l'initiation des oscillations calciques induites par la CCK, le NAADP recrute le Ca²⁺ du lysosome et de l'endosome, tandis que dans le cas de l'ACh, l'IP₃ recrute le Ca²⁺ des granules de zymogène. Cette réponse calcique est ensuite maintenue et amplifiée par le réticulum endoplasmique (RE) sous contrôle du cADPR.

Nous proposons que les messagers déterminent les signatures calciques des agonistes en contrôlant la contribution de chaque réserve acide et du RE.

Notre travail montre que la principale enzyme de synthèse de NAADP chez la souris est l'antigène de surface CD38, bien qu'une autre enzyme de synthèse existe dans le cerveau. Nos résultats montrent aussi pour la première fois que dans les muscles squelettiques, le monoxyde d'azote inhibe la synthèse de NAADP.

Mots clés : calcium, pancréas, acétylcholine, cholécystokinine, NAADP, IP₃, cADPR, réticulum endoplasmique, lysosome, granule de zymogène, endocytose, CD38.

THE CALCIUM RELEASING MESSENGER NAADP : STUDY OF THE ACIDIC STORES INVOLVED AND ROLE OF CD38 IN ITS SYNTHESIS

In pancreatic acinar cells, the secretagogues Acetylcholine (ACh) and cholecystokinin (CCK) trigger Ca²⁺ oscillations via the Ca²⁺ releasing second messengers IP₃ and cADPR for ACh, and NAADP and cADPR for CCK. The existence of multiple messengers and multiple intracellular Ca²⁺ stores suggests a possible cooperation of these messengers and a selective recruitment of different Ca²⁺ stores.

Our work reveals that these Ca²⁺ oscillations evoked by CCK are initiated by Ca²⁺ release from the lysosome and endosome by NAADP. In the case of ACh stimulation, Ca²⁺ oscillations are initiated by Ca²⁺ release from the zymogen granule by IP₃. The Ca²⁺ signals are then maintained and amplified by Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum (ER) under control of the cADPR.

We propose that the different Ca²⁺ releasing second messengers determine agonist-specific Ca²⁺ signatures by controlling the contribution of each acidic store and the ER.

Our data on NAADP synthesis show that the surface antigen CD38 is the main NAADP synthesizing enzyme in mice, as well as an other NAADP synthesizing enzyme that exists in brain. We also report first evidence that nitric oxide is capable of inhibiting NAADP synthesis in skeletal muscle.

Keywords: Calcium, pancreas, Acetylcholine, cholecystokinin, NAADP, IP₃, cADPR, endoplasmic reticulum, lysosome, zymogen granule, endocytosis, CD38.

Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire NBCM-CNRS UPR9040.

1 Avenue de la Terrasse (Bat 32/33) 91198 Gif-sur-Yvette Cedex