

2m11.2623.8

Université de Montréal

Les stocks calciques intracellulaires sont-ils impliqués dans l'augmentation de la concentration calcique du cytoplasme des cellules somatotropes, en réponse à une stimulation par la somatocrine?

Par

Audrey Petit  
Département de sciences biologiques  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M. Sc.)  
en sciences biologiques

(Février 1998)

© Audrey Petit, 1998



PH  
302  
U54  
1998  
V.008

L'Université de Sherbrooke

Les services de la bibliothèque de l'Université de Sherbrooke ont le plaisir de vous offrir ce document en format électronique. Ce document est la propriété de l'Université de Sherbrooke et est protégé par la Loi sur l'accès à l'information.

Université de Sherbrooke  
Bibliothèque de l'Université de Sherbrooke  
300, Avenue de la Bibliothèque  
Sherbrooke, Québec J1K 2R1



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire de maîtrise intitulé :  
Les stocks calciques intracellulaires sont-ils impliqués dans l'augmentation de la  
concentration calcique du cytoplasme des cellules somatotropes, en réponse à une  
stimulation par la somatocrinine?

Présenté par :  
Audrey Petit

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Thérèse Cabana  
(Président-rapporteur)

Dr. Benoît Lussier  
(Directeur de recherche)

Dr. David Morse  
(Membre du jury)

Mémoire accepté le : 8 juin 1998

## SOMMAIRE

Les cellules somatotropes de l'adénohypophyse sécrètent l'hormone de croissance (GH) en réponse à une stimulation par une hormone hypothalamique, la somatocrinine (GHRH), ainsi que par une augmentation du calcium cytoplasmique ( $[Ca^{2+}]_i$ ) libre. Cette augmentation en calcium cytoplasmique découle d'un influx de calcium extracellulaire par des canaux calciques voltage-dépendants qui s'ouvrent suite à une dépolarisation membranaire induite par la liaison de la GHRH à son récepteur. Le calcium cytoplasmique agit comme second messenger et est indispensable à la sécrétion de l'hormone de croissance. Les cellules somatotropes ont des compartiments calciques intracellulaires sensibles à l'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) mais la GHRH ne produit pas d' $IP_3$  lorsqu'elle se lie à son récepteur, donc elle ne mobilise pas leur contenu calcique. Un autre type de compartiment calcique intracellulaire pourrait être présent dans la cellule somatotrope: le stock CICR (calcium-induced calcium-release). Ce compartiment possède un canal ryanodine qui est non seulement sensible à la ryanodine mais aussi à la caféine et au calcium. Le canal ryanodine permet la libération du calcium contenu dans le compartiment CICR vers le cytoplasme, en réponse à une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , ce qui résulte en une amplification du signal calcique.

Les objectifs de ce projet de recherche sont de déterminer si les compartiments calciques intracellulaires de type CICR sont présents dans les cellules somatotropes normales de rat et si cela est vérifié, jouent-ils un rôle dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à une stimulation par la GHRH?

Avant de tenter de répondre à nos deux questions, nous avons vérifié avec des ionophores calciques, soit le 4-bromo A23187 et l'ionomycine, que la cellule somatotrope a bel et bien du calcium intracellulaire. En effet, la majorité des cellules ont libéré du  $Ca^{2+}$  malgré une absence de  $Ca^{2+}$  extracellulaire.

Pour identifier les stocks CICR nous avons mesuré des variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  sur des cellules uniques en utilisant une sonde fluorescente calcium sensible, l'indo-1, tout en manipulant le  $Ca^{2+}$  extracellulaire et en agissant sur le contenu calcique des stocks CICR avec des agents pharmacologiques. La caféine ouvre le canal ryanodine, ce qui permet la libération du  $Ca^{2+}$  contenu dans le stock: 65 % des cellules ont répondu à la caféine par une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . La ryanodine utilisée à une concentration de 10  $\mu$ M a la propriété de fermer le canal ryanodine, empêchant toute libération de  $Ca^{2+}$  par la caféine. La thapsigargine bloque le fonctionnement des SERCAs (sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPases) ce qui vide les stocks intracellulaires et donc empêche également toute augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  par la caféine. La sensibilité de la cellule somatotrope à la caféine et à la ryanodine confirme la présence des stocks de type CICR.

Pour déterminer si les compartiments calciques CICR sont impliqués dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à une stimulation par la GHRH, nous avons manipulé le contenu calcique du stock tout en observant les effets produits sur cette augmentation. Une cellule répond à deux stimulations subséquentes à la GHRH mais la seconde augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  est de 38 % inférieure à la première. L'application de ryanodine entre la première et la deuxième stimulation à la GHRH annule la diminution observée pour la seconde augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Quant à elle, la thapsigargine, appliquée entre les deux stimulations de GHRH, augmente de 67% cette diminution de la seconde réponse et produit un délai de cette réponse. L'effet de la ryanodine pourrait être causé par une modification de la conductance des canaux potassiques de la membrane plasmique. L'amplification, par la thapsigargine, de la diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  pour la seconde stimulation à la GHRH indique une implication d'un type de compartiments intracellulaires dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à la GHRH. L'absence de production d' $IP_3$  suite à la liaison de GHRH à son récepteur membranaire laisse croire que le compartiment impliqué est de type CICR. Le délai observé suggère un mécanisme de communication entre un compartiment intracellulaire et la membrane plasmique.

En conclusion, la cellule somatotrope normale de rat possède des stocks de type CICR et ils sont impliqués dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  suite à une stimulation de GHRH.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>viii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>ix</b>
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 HISTORIQUE .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 RÔLES PHYSIOLOGIQUES DE L'HORMONE DE CROISSANCE .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 STRUCTURES ENDOCRINES .....</b>	<b>7</b>
2.3.1 L'HYPOTHALAMUS.....	7
2.3.2 L'HYPOPHYSE .....	8
2.3.3 LA CELLULE SOMATOTROPE .....	9
<b>2.4 RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION DE L'HORMONE DE CROISSANCE</b>	<b>10</b>
2.4.1 SÉCRÉTION DE L'HORMONE DE CROISSANCE.....	10
2.4.2 DEUX HORMONES ANTAGONISTES.....	12
2.4.3 PATRON DE SÉCRÉTION .....	13
2.4.4 BOUCLES DE RÉTROACTION NÉGATIVE.....	14
2.4.5 L'EFFET DE LA GHRH .....	15
<b>2.5 CALCIUM INTRACELLULAIRE ET SIGNALISATION .....</b>	<b>16</b>
2.5.1 Ca <sup>2+</sup> COMME SECOND MESSAGER .....	16
2.5.2 MODE DE SIGNALISATION CALCIQUE .....	17
2.5.3 CANAUX CALCIFIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE .....	19
2.5.4 SOURCES INTRACELLULAIRES DE CALCIUM .....	19
2.5.4.1 STOCKS CALCIFIQUES IP <sub>3</sub> SENSIBLES .....	22
2.5.4.2 STOCKS CALCIFIQUES DE TYPE CICR .....	25
2.5.5 RÉGULATEURS DE CALCIUM .....	28
2.5.5.1 POMPES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE.....	28
2.5.5.2 PROTÉINES CHÉLATRICES DE CALCIUM.....	29
2.5.5.3 POMPES CALCIFIQUES DES COMPARTIMENTS INTRACELLULAIRES.....	29
2.5.6 SIGNALISATION CALCIQUE: TROIS SCÉNARIOS .....	33
2.5.6.1 LA CELLULE CARDIAQUE .....	33
2.5.6.2 LA CELLULE GONADOTROPE.....	33
2.5.6.3 LA TERMINAISON SYNAPTIQUE.....	34
<b>2.6 LA GHRH ACTIVE UN MÉCANISME DE SIGNALISATION MÉDIÉ PAR LE CALCIUM .....</b>	<b>34</b>
<b>2.7 LE PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>37</b>

<b>CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE</b> .....	<b>40</b>
<b>CHAPITRE 4 ARTICLE</b>	
<i>Intracellular calcium stores are involved in growth hormone-releasing hormone signal transduction in rat somatotrophs</i> .....	<b>46</b>
<b>CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION</b> .....	<b>94</b>
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>x</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>xviii</b>

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<b>Figure 2.1: Coupe longitudinale médiane du cerveau de rat.....</b>	<b>9</b>
<b>Figure 2.2: La cellule somatotrope.....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 2.3: Cellule somatotrope et vésicules de sécrétion.....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 2.4: Récepteur IP<sub>3</sub> du compartiment intracellulaire.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 2.5: Canal ryanodine du stock CICR. ....</b>	<b>26</b>
<b>Figure 2.6: Pompe calcique des compartiments intracellulaires (SERCA).....</b>	<b>31</b>
<b>Figure 2.7: Modèle cellulaire et questions du projet de recherche. ....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 3.1: La fluorescence émise à deux longueurs d'onde et la concentration calcique intracellulaire lors de l'éjection de caféine.....</b>	<b>41</b>
<b>Figure 3.2: Méthode de correction.....</b>	<b>43</b>
<b>Figure 3.3: Validation de la méthode de correction. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figure 3.4: La fluorescence émise à deux longueurs d'onde et la concentration calcique intracellulaire lors de l'éjection de caféine après correction.....</b>	<b>45</b>
<b>Fig. 1. Ionophore-induced release of intracellularly stored Ca<sup>2+</sup>. ....</b>	<b>77</b>
<b>Fig. 2. Caffeine-induced release of intracellularly stored Ca<sup>2+</sup>.....</b>	<b>79</b>
<b>Fig. 3. The amplitude of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response to 40 mM caffeine.....</b>	<b>81</b>
<b>Fig. 4. The effects of ryanodine and thapsigargin on caffeine-induced release of intracellularly stored Ca<sup>2+</sup>. ....</b>	<b>83</b>
<b>Fig. 5. The effect of GHRH in caffeine responsive somatotrophs. ....</b>	<b>85</b>
<b>Fig. 6. The effects of ryanodine and thapsigargin on GHRH-induced increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. ....</b>	<b>87</b>
<b>Fig. 7. Effect of ryanodine and thapsigargin on the reduction of the average [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.....</b>	<b>89</b>
<b>Figure 5.1: La thapsigargine produit un délai dans la réponse calcique induite par la GHRH.....</b>	<b>98</b>
<b>Figure 5.2: Modèle cellulaire. ....</b>	<b>106</b>
<b>Table 1: Proportion of cells that raise cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in response to ionophores.....</b>	<b>92</b>
<b>Table 2: Caffeine-dependant peak cytosolic calcium concentration in the presence or absence of extracellular calcium.....</b>	<b>93</b>

## ABRÉVIATIONS

<b>AMPC:</b>	adénosine monophosphate cyclique
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>:</b>	Concentration du calcium intracellulaire
<b>cADPr:</b>	adénosine diphosphate ribose cyclique
<b>CICR:</b>	calcium-induced calcium-release
<b>CIF:</b>	calcium influx factor
<b>CRAC:</b>	calcium-release activated calcium
<b>DAG:</b>	diacylglycérol
<b>GH:</b>	Growth hormone (Hormone de croissance ou somatotropine)
<b>GHRH:</b>	Growth hormone releasing-hormone ou somatocrine
<b>GnRH:</b>	gonadotropines releasing hormone
<b>IGF-I:</b>	insulin-like growth factor
<b>IP<sub>3</sub>:</b>	Inositol triphosphate
<b>LH:</b>	hormone lutéinisante
<b>PKC:</b>	protéine kinase C
<b>PLC:</b>	phospholipase C
<b>PMCA:</b>	pompe calcique ATPase de la membrane plasmique
<b>pS:</b>	pico siemens
<b>SERCA:</b>	sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase
<b>SOC:</b>	stock-operated channel
<b>SRIF:</b>	Somatocrinin release-inhibiting factor (Somatostatine)

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

La sécrétion de l'hormone de croissance (GH) est sous le contrôle de deux éléments principaux. En effet, les cellules somatotropes de l'adénohypophyse sécrètent l'hormone de croissance sous l'influence d'hormones hypothalamiques et en fonction de leur concentration en calcium cytoplasmique ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (13, 20, 29, 44). Deux hormones à effet antagoniste agissent sur la sécrétion de l'hormone de croissance par la cellule somatotrope: la somatostatine (SRIF) inhibe toniquement la sécrétion de GH, alors que la somatocrinine (GHRH) stimule la libération hormonale (21). La GHRH agit par une augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique provenant de l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants grâce à la dépolarisation membranaire. Deux éléments suggèrent fortement que l'augmentation de la concentration calcique du cytoplasme en réponse à une stimulation par la GHRH vient d'une entrée de  $Ca^{2+}$  provenant de l'extérieur de la cellule. Tout d'abord, il a été démontré que la présence de bloqueurs des canaux calciques voltage-dépendants supprime l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  et par conséquent la sécrétion de GH stimulée par la GHRH (28, 40). De plus, l'absence de calcium dans le milieu extracellulaire inhibe totalement la sécrétion de la GH induite en réponse à une stimulation de GHRH (28, 40). Bien que les observations corroborent l'origine extracellulaire de la source du calcium

permettant la sécrétion de GH, une question demeure: les compartiments calciques intracellulaires dans les cellules somatotropes, dont la présence a été suggérée par certains auteurs, pourraient-ils intervenir dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  (29, 44)?

Ces compartiments calciques intracellulaires pourraient-être de deux types: un stock calcique sensible à l'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) ou un stock calcique de type CICR (calcium-induced calcium-release). Les cellules somatotropes auraient des compartiments de type  $IP_3$  sensibles, qui ne sont toutefois pas mobilisés par la GHRH (10, 20, 28, 49). La présence du compartiment calcique de type CICR n'a pas été confirmée dans les cellules somatotropes normales de rat, mais s'il s'avérait être présent il pourrait amplifier l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  due à l'influx de  $Ca^{2+}$  extracellulaire induit par la GHRH.

Les objectifs du présent projet de recherche sont donc de confirmer la présence de compartiments calciques intracellulaires de type CICR dans les cellules somatotropes de rat ainsi que de déterminer leur implication dans l'augmentation de la concentration en calcium libre du cytoplasme en réponse à une stimulation par la GHRH. À l'aide d'une sonde fluorescente calcium sensible à double-émission, l'indo-1, nous avons mesuré des variations de la concentration calcique intracellulaire sur des cellules uniques, tout en manipulant le calcium extracellulaire et en agissant sur le contenu calcique des stocks intracellulaires par l'action d'agents pharmacologiques tels la caféine, la ryanodine et la thapsigargine.

## CHAPITRE 2

### REVUE DE LA LITTÉRATURE

#### *2.1 HISTORIQUE*

Jusqu'à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, la vision qui a prévalu quant au rôle de la glande pituitaire ou hypophyse fut celle de deux anatomistes prestigieux, Galien (131-201) et Vésale (1514-1564): cet organe vestigial n'a de fonction que la sécrétion de mucus dans le nez. L'observation des dérèglements de cette glande l'ont davantage mis sur la sellette. Une des formes de dérèglements les plus remarquables est sans aucun doute l'acromégalie qui se traduit par plusieurs anomalies morphologiques telle l'hypertrophie des os des extrémités: mains, pieds, mâchoire inférieure et arcades sourcilières (25). Les premières descriptions de l'acromégalie, comme maladie relevant de la médecine clinique et non plus seulement comme aberration monstrueuse de la nature, sont dues à Pierre Marie vers 1886. Minkowski, quant à lui, fut le premier à faire le lien entre un trouble de la croissance et un changement dans la conformation de la glande pituitaire. Ce dernier rapporta la dure réalité d'un jeune musicien souffrant d'acromégalie et présentant un élargissement de la fosse pituitaire. Violoniste de formation, un grossissement des doigts le contraignit à se convertir à la flûte, laquelle dut également être abandonnée à cause de l'épaississement de ses lèvres. Finalement, sa vue se détériora à tel point qu'il ne put plus lire la musique. En 1890, Pierre

Marie rassembla plusieurs cas d'acromégalie et en déduisit une observation généralisée: tous les gens souffrant d'acromégalie ont une hypertrophie de la glande pituitaire et une importante dilatation de la selle turcique. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, une certaine confusion régna lorsque le cas d'un jeune garçon de 15 ans fut rapporté. En effet, ce jeune patient souffrait d'une immaturité sexuelle, présentant un modèle typiquement féminin de distribution des graisses et avait une tumeur pituitaire. Comment des atteintes de la glande pituitaire à première vue similaires pouvaient-elles avoir des conséquences aussi variées et contradictoires? C'est alors qu'on émit l'idée que la glande pituitaire pouvait contenir un centre de contrôle de la croissance de tout le corps. On suggéra également qu'une même cellule pouvait, selon qu'elle est hyper ou hypoactive, produire des effets aussi opposés que l'acromégalie, l'infantilisme sexuel ou le nanisme. Ce n'est que vers 1920, que le rôle de la glande pituitaire dans le métabolisme du glucose fut mis à jour.

En 1921, Herbert Evans et Joseph Long injectent à des rats des extraits de lobe antérieur provenant de glande pituitaire de boeuf, ce qui provoqua une croissance remarquable de ces rats. Ils démontrèrent alors que la glande pituitaire possède un facteur qui promeut la croissance. Quelques hypophysectomies et plusieurs débats passèrent avant les premières purifications hormonales qui permirent en 1954 l'isolation de l'hormone de croissance (GH) bovine. Nombre de tentatives pour traiter l'humain à partir d'hormone de croissance d'autres espèces furent toutes vouées à l'échec. La conclusion s'imposa donc d'elle même:

l'hormone de croissance a des propriétés propres à l'espèce. En 1956, la première purification d'hormone de croissance humaine fut réalisée. À partir de 1960, les chercheurs s'intéressèrent à l'hypothalamus comme étant potentiellement impliquée dans la régulation de la synthèse et de la sécrétion de l'hormone de croissance. Suite à des lésions opérées chez le rat dans la région ventromédiale de l'hypothalamus, on observa une diminution de la production d'hormone de croissance. Par la suite, on montra que la stimulation électrique de la même région hypothalamique ainsi que des noyaux arqués produit une augmentation de la sécrétion de l'hormone de croissance.

L'hormone de croissance purifiée remporta de vifs succès dans les essais cliniques pour traiter les patients atteints de troubles de la croissance et ce jusqu'en 1984 alors que surviennent de grandes déceptions dues à la contamination de la préparation d'hormone. En effet, une dizaine de décès de patients ayant reçu des suppléments d'hormone de croissance furent rapportés et tous avaient présenté des symptômes caractéristiques d'une maladie neurologique dégénérative. De toute évidence certaines des glandes provenaient de donateurs ayant succombé des suites de la maladie de Creutzfeldt-Jacob. Depuis 1985, l'hormone de croissance pour fins thérapeutiques est produite par la technique de l'ADN recombinant (21,79).

L'hormone de croissance, la GH, est une hormone protéinique de 191 acides aminés et d'un poids moléculaire d'environ 22 000 Da. Elle est produite par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse. Le système nerveux central

contrôle la sécrétion de l'hormone de croissance par l'intermédiaire de deux hormones hypothalamiques ayant chacune un effet antagoniste, mais non-compétitif, sur la cellule somatotrope: la somatostatine inhibe toniquement la sécrétion de la GH, alors que la somatocrine la stimule (21, 44, 45, 46).

## ***2.2 RÔLES PHYSIOLOGIQUES DE L'HORMONE DE CROISSANCE***

L'hormone de croissance agit sur une grande quantité de tissus cibles. Elle est associée tout particulièrement à la croissance longitudinale des os longs chez les juvéniles et au développement de la majorité des tissus de l'organisme. La GH stimule la production par le foie et le pancréas de la somatomédine qui, à son tour, entraîne la croissance des muscles et des os par la différenciation des cellules adipeuses, musculaires et cartilagineuses (1). Sous l'influence de la GH, l'organisme utilisera comme source énergétique les acides gras, désormais plus nombreux dans la circulation, et ce, au détriment des hydrates de carbone et des protéines. Cette hormone joue aussi un rôle important dans le contrôle de la glycémie (25).

Les rôles physiologiques de la GH sont clairement illustrés par les pathologies provoquées par son déséquilibre. Le déficit dans la production de l'hormone de croissance provoque le nanisme infantile qui peut être corrigé par la prise de GH avant que les cartilages de conjugaison se soudent. Quant à l'hypersécrétion de GH, elle a comme conséquence le gigantisme et cause un accroissement excessif de la taille si elle survient avant la fin de la croissance. Si

l'hypersécrétion de la GH survient après que les cartilages de conjugaison se soient soudés, la pathologie qui en résulte est l'acromégalie. Les sujets affectés affichent les caractéristiques suivantes: hypertrophie des extrémités, hypertension artérielle et divers déséquilibres métaboliques. D'autres débalancements découlent de cette pathologie: hyperglycémie et problèmes cardio-vasculaires (25).

## ***2.3 STRUCTURES ENDOCRINES***

### ***2.3.1 L'HYPOTHALAMUS***

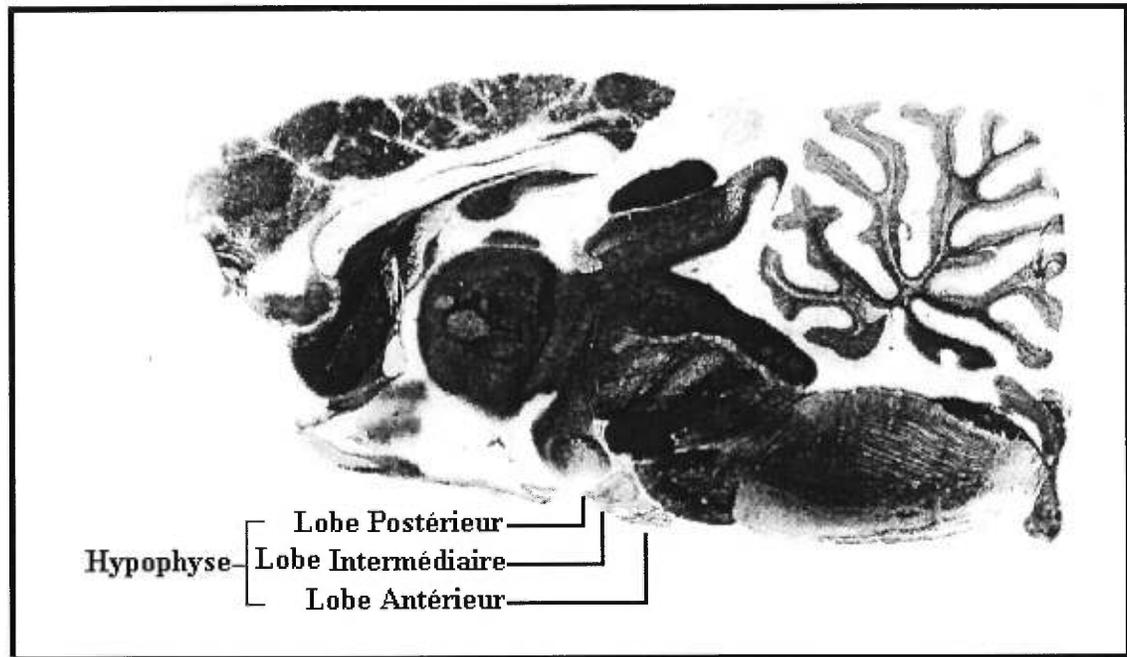
Chez les vertébrés, l'hypothalamus sert de lien physique, par la tige hypophysaire, et fonctionnel, par des cellules neuroendocriniennes, entre le système nerveux et le système endocrinien. Les cellules neuroendocriniennes de l'hypothalamus reçoivent des stimuli des neurones d'autres noyaux et répondent par la sécrétion d'hormones dans le réseau de capillaires primaire du système porte hypothalamo-hypophysaire au niveau de l'émence médiane. L'hypothalamus est composé d'un ensemble de noyaux, dont certains des neurones sont responsables de la synthèse des hormones entreposées dans la neurohypophyse. L'hypothalamus sert de régulateur dans plusieurs systèmes endocriniens par sécrétion de plusieurs hormones qui stimulent ou inhibent la sécrétion d'hormones par l'hypophyse et celles-ci agissent sur la sécrétion hormonale d'une troisième glande. Deux hormones hypothalamiques jouent un rôle particulier pour la sécrétion de la GH: la somatocrinine et la somatostatine (1, 21).

### 2.3.2 L'HYPOPHYSE

L'hypophyse ou glande pituitaire se loge dans une dépression du plancher de la boîte crânienne, la selle turcique, et est reliée à l'hypothalamus par la tige hypophysaire (fig. 2.1). Elle fait approximativement 1 cm de diamètre et a un poids qui varie entre 0.5 et 1 g chez l'humain. Elle est formée de trois lobes: le lobe antérieur ou adénohypophyse, le lobe intermédiaire et le lobe postérieur ou neurohypophyse. L'adénohypophyse est formée de cinq types cellulaires: les cellules lactotropes sécrétrices de prolactine, les cellules corticotropes sécrétrices de corticotropine, les cellules gonadotropes sécrétrices de gonadotropine, les cellules thyrotropes sécrétrices de thyrotropine et les cellules somatotropes sécrétrices de somatotropine (GH). Le lobe intermédiaire est très réduit et fonctionnellement limité chez l'humain. Il est principalement responsable de la sécrétion de la mélanotropine et des opiacés endogènes soit les enképhalines et les endorphines. Quant à la neurohypophyse, elle est principalement constituée de pituicytes qui sont des cellules de soutien des terminaisons nerveuses des neurones dont les corps cellulaires, producteurs d'hormones, se trouvent dans les noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus. Le lobe postérieur sert de site d'entreposage et d'expédition à deux hormones produites par l'hypothalamus: la vasopressine et l'ocytocine (76).

L'embryogénèse de l'hypophyse permet de comprendre sa dichotomie fonctionnelle. Le développement de l'adénohypophyse se fait par une excroissance épithéliale d'une région spécifique du pharynx, la poche de Rathke. Quant à la

neurohypophyse, elle se forme à partir d'une excroissance de l'hypothalamus (23, 76).

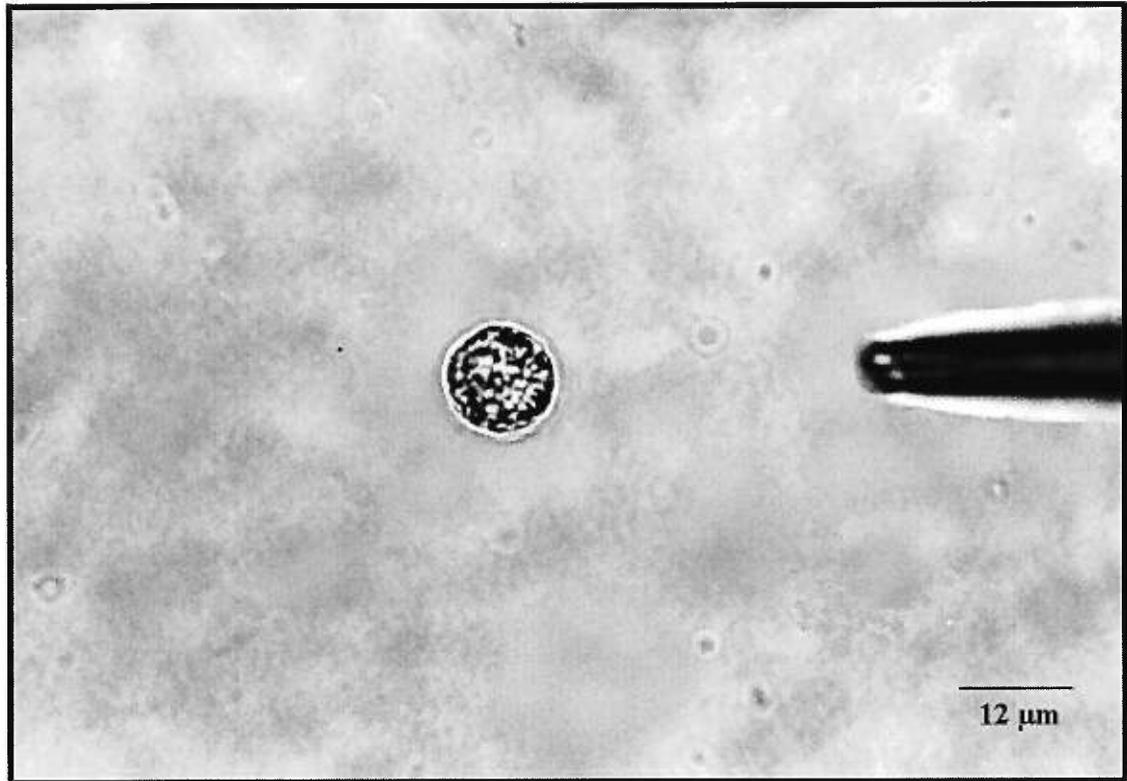


**Figure 2.1: Coupe saggitale du cerveau de rat.** L'hypophyse est visible avec ses trois lobes: le lobe postérieur ou neurohypophyse, le lobe intermédiaire et le lobe antérieur ou adénohypophyse (60).

### 2.3.3 LA CELLULE SOMATOTROPE

Les cellules somatotropes ont la particularité d'avoir une activité spontanée dont l'un des indices observables est la présence de transitoires calciques qui résulte en la sécrétion spontanée de GH (29). Ces transitoires calciques correspondent à des potentiels d'actions calciques (46). La cellule somatotrope de rat est très granuleuse et de taille moyenne en comparaison avec d'autres cellules hypophysaires. En culture elle a un diamètre d'environ 12  $\mu\text{m}$  (fig. 2.2) et elle se reconnaît facilement à la forme très circulaire de ses granules de sécrétion qui font

environ 300-400 nm de diamètre au microscope électronique. Ces cellules sont, de loin, le type cellulaire le plus nombreux de l'adénohypophyse (61).



**Figure 2.2: La cellule somatotrope.** Photo prise lors d'expérimentations à partir de cellules en culture. Cette cellule présente les caractères propres à la cellule somatotrope: diamètre d'environ 12  $\mu\text{m}$ , granulation importante et forme très arrondie. À droite de la figure on peut voir une pipette d'éjection qui sert à mettre la cellule en présence d'un agent pharmacologique dont on veut connaître l'effet sur la cellule.

## ***2.4 RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION DE L'HORMONE DE CROISSANCE***

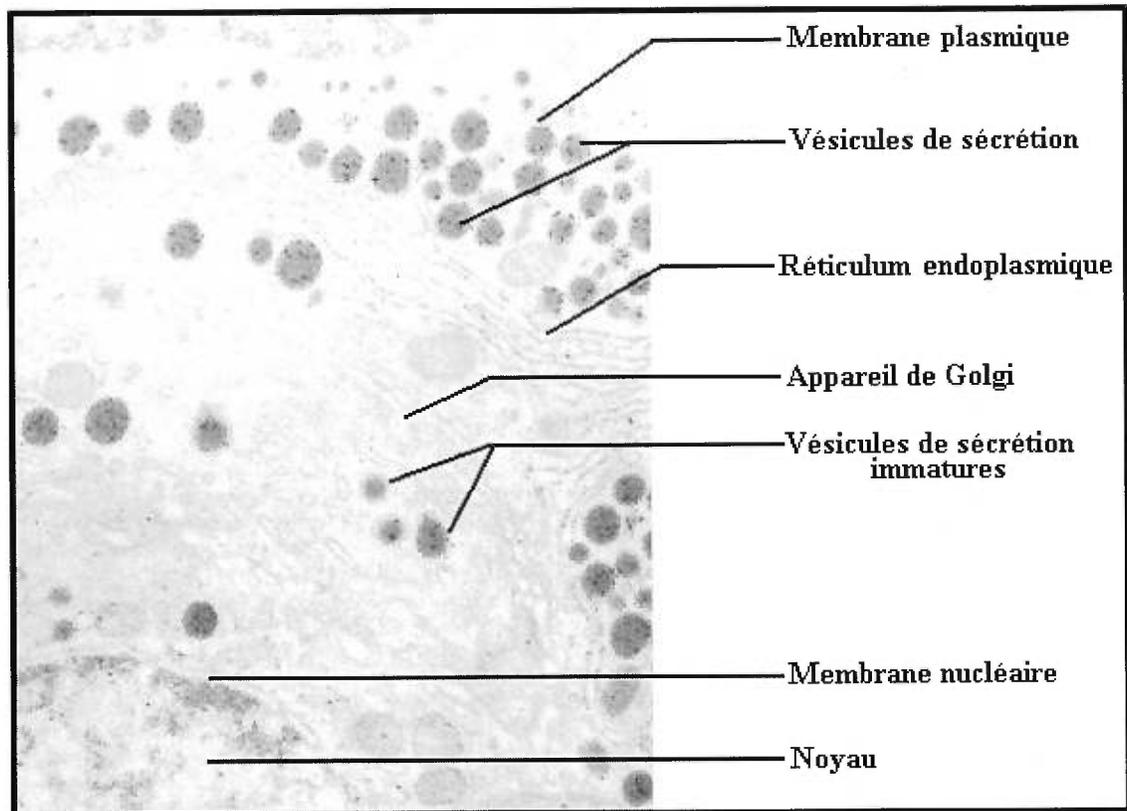
### ***2.4.1 SÉCRÉTION DE L'HORMONE DE CROISSANCE***

L'hormone de croissance, comme toute protéine sécrétée, est produite par les ribosomes au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. Une fois la synthèse de l'hormone terminée, celle-ci est transportée vers l'appareil de Golgi selon des

modalités imprécises. À cet endroit seront formés des granules ou vésicules de sécrétion la contenant. Les vésicules de sécrétion passent d'un stade d'imaturité à un stade de maturité entre le moment de leur formation dans l'appareil de Golgi jusqu'à leur fusion avec la membrane plasmique. Des images prises en microscopie électronique montrent bien les différences entre ces deux états de maturation (fig. 2.3). Tout d'abord, les vésicules immatures se situent à proximité de l'appareil de Golgi alors que les vésicules matures se trouvent à proximité de la membrane plasmique. On peut également constater que dans les vésicules immatures il y a un espace considérablement plus grand entre la membrane et le coeur de la vésicule que dans les vésicules matures. Finalement, des résultats immunocytochimiques montrent moins de réactivité dans les vésicules immatures que dans les vésicules matures, indiquant une quantité accrue d'hormone de croissance active dans ces dernières. L'exocytose de la GH se fait suite à la fusion du granule de sécrétion avec la membrane plasmique, qui provoque une ouverture et permet le passage du contenu du granule vers le milieu extracellulaire. La membrane de la vésicule est incorporée à la membrane plasmique et ultérieurement elle sera réintroduite dans le cytoplasme par endocytose (61) (fig. 2.3).

La sécrétion d'hormones par la cellule nécessite la présence de calcium (29,74). Cependant, le rôle précis du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le mécanisme de sécrétion n'est pas clairement établi. Douglas (74) suggère dans son modèle de couplage stimulus-sécrétion que le  $\text{Ca}^{2+}$  stimule la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane

plasmique, ce qui en fait un lien essentiel entre la stimulation induite par le ligand et la sécrétion de l'hormone.



**Figure 2.3: Portion de cellule somatotrope et vésicules de sécrétion.** Photo prise en microscopie électronique à transmission, à un grossissement de 23 000 X. La cellule a été traitée par immunocytochimie en post-enrobage avec un anticorps dirigé contre l'hormone de croissance et les sites de réactivité son marqués par des grains d'or (61).

#### 2.4.2 DEUX HORMONES ANTAGONISTES

La somatocrinine ou GHRH, isolée en 1982, est une hormone peptidique de 40 à 44 acides aminés qui stimule la libération de la GH (24, 69). Elle est produite par les noyaux arqués hypothalamiques et est acheminée à l'adénohypophyse via la circulation sanguine du système porte hypothalamo-hypophysaire. La somatostatine ou SRIF est une hormone peptidique inhibitrice de

la sécrétion de GH, la forme courte (14 acides aminés) fut isolée en 1973 (9) et la forme longue (28 acides aminés) fut isolée en 1980 (72). Elle est produite par les noyaux périventriculaires hypothalamiques et est acheminée à l'adénohypophyse via la circulation sanguine du système porte hypothalamo-hypophysaire (1, 21).

#### *2.4.3 PATRON DE SÉCRÉTION*

La sécrétion de l'hormone de croissance chez le rat est régulée par une interaction phasique entre la SRIF et la GHRH. La somatostatine et la somatocrinine sont sécrétées toniquement, mais superposées à cet état de pseudo-stabilité, il y a des libérations de chacune de ces hormones, sous forme de bouffées. Cette libération pulsatile se fait selon une périodicité de 3 à 4 heures, mais déphasée l'une de l'autre. Lorsque le taux de sécrétion de SRIF est à son plus bas, il y a une augmentation pulsatile de GHRH libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, ce qui induit la libération pulsatile de GH. La sécrétion pulsatile de la GH est un phénomène répandu chez plusieurs espèces. À la lumière de ces observations, il est clair qu'il y a communication entre les neurones qui libèrent la GHRH et ceux qui libèrent la SRIF. De plus, la GH aurait une certaine aptitude à l'autorégulation; un mécanisme de rétroaction négative (« feedback ») ferait en sorte qu'une fois libérée la GH stimule la sécrétion de la SRIF (64, 71, 78).

La sécrétion de la GH chez le rat montre un important dimorphisme sexuel: la glande hypophysaire du mâle a une plus grande proportion de cellules

somatotropes, un contenu et un taux de production de la GH supérieur à celui de la femelle. Le dimorphisme sexuel chez le rat ne s'observe pas seulement au niveau quantitatif, mais également au niveau qualitatif. En effet, le patron de sécrétion présenté précédemment ne suit pas la même tendance pour les mâles et pour les femelles. Cette différenciation dans la sécrétion de la GH devient apparente à la puberté. Les mâles sécrètent des bouffées de GH à des intervalles d'environ 3 heures, alors que le niveau moyen de GH sécrété augmente durant la nuit; le patron de sécrétion du mâle suit donc un cycle ultradien superposé à un cycle circadien. Quant aux femelles, elles sécrètent la GH de façon continue sous forme de légères bouffées qui n'ont pas une amplitude très différente du niveau moyen de GH qui est plus élevé que chez le mâle (71, 78).

#### *2.4.4 BOUCLES DE RÉTROACTION NÉGATIVE*

L'action étendue de la GH explique bien les nombreux mécanismes de régulation de la cellule somatotrope. La GH induit la sécrétion d'IGF-I (insulin-like growth factor-I ou somatomédine-C) par des tissus périphériques, lequel stimulerait la sécrétion de la SRIF par l'hypothalamus alors qu'au niveau hypophysaire, l'IGF agirait sur l'expression des gènes responsables de la production de GH, qui se traduirait par une diminution de la sécrétion de GH (71).

Chez le rat, une diminution du taux de triiodothyronine ( $T_3$ ) diminuerait le taux de GH, et une augmentation du niveau de glucocorticoïde produirait le même effet. Le niveau de glucose agirait également sur les neurones de l'hypothalamus

en stimulant la sécrétion de SRIF. Les acides gras libres en forte concentration dans le sang inhibent la sécrétion de la GH et agissent principalement au niveau de l'hypophyse (71).

La GH exerce aussi une boucle de rétroaction négative en inhibant la sécrétion de GHRH par l'hypothalamus (71).

#### *2.4.5 L'EFFET DE LA GHRH*

La sécrétion de l'hormone de croissance en réponse à une stimulation par la GHRH est calcium dépendante. Lorsque la GHRH se lie à son récepteur membranaire, la chaîne métabolique de l'adénosine monophosphate cyclique ( $AMP_c$ ) est enclenchée et provoque une dépolarisation membranaire supposément  $AMP_c$  dépendante (37, 56) qui permet l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. La présence de calcium à l'extérieur de la cellule est un prérequis essentiel à l'augmentation de la concentration en calcium libre cytoplasmique qui précède l'exocytose de la GH (13, 20, 29, 40, 44).

## ***2.5 CALCIUM INTRACELLULAIRE ET SIGNALISATION***

La majorité des hormones protéiques sont des molécules hydrosolubles et la GHRH ne fait pas exception. Le caractère hydrophile de ces protéines les empêche de traverser directement la double couche lipidique de la membrane plasmique, elles ne peuvent que se fixer à un récepteur membranaire situé en surface de la cellule cible. Le seul moyen pour que l'information portée par l'hormone passe dans le cytoplasme est la formation d'un second messenger qui lui se trouve à l'intérieur de la cellule (1).

### *2.5.1 $Ca^{2+}$ COMME SECOND MESSAGER*

La transduction d'un signal extracellulaire en information intracellulaire et finalement en réponse cellulaire nécessite la formation d'un second messenger. La liaison d'une molécule, ou ligand, à son récepteur membranaire induit un changement conformationnel de ce dernier, enclenchant une suite d'événements qui vont agir sur la production d'une ou de plusieurs molécules informatives, les messagers intracellulaires. Ces messagers agissent sur des protéines cibles à l'intérieur du cytoplasme, ce qui modifie le comportement de la cellule, en d'autres termes le second messenger est un porteur intracellulaire d'information (1). Les messagers peuvent être secondaires ou tertiaires. Ces molécules sont très diversifiées mais les plus répandues sont sans aucun doute le  $Ca^{2+}$ , l'IP<sub>3</sub> (inositol triphosphate) et l'AMPc. Plus particulièrement le  $Ca^{2+}$  joue un rôle d'importance dans la réalisation de plusieurs phénomènes physiologiques importants tels la

fertilisation des oeufs, la transmission synaptique, le couplage excitation-contraction dans les cellules musculaires, le couplage excitation-excrétion des cellules endocrines (43).

La GHRH utilise deux seconds messagers pour produire la sécrétion de la GH: l'AMPC et le  $\text{Ca}^{2+}$  (29, 35, 74). Pour que le  $\text{Ca}^{2+}$  soit désigné comme second messenger, certains critères devaient être vérifiés. Tout d'abord, tout agent pharmacologique qui produit une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  produit également une augmentation de la sécrétion de la GH. Deuxièmement, une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  doit précéder ou coïncider avec la sécrétion de la GH suite à une stimulation par la GHRH. Finalement, tout agent pharmacologique qui empêche l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  doit également empêcher toute augmentation de la sécrétion de la GH induite par la GHRH (44).

### *2.5.2 MODE DE SIGNALISATION CALCIQUE*

L'information véhiculée par un messenger secondaire ou tertiaire peut être modulée dans l'espace par la distribution cytoplasmique du messenger et dans le temps par la fréquence des augmentations de la concentration du messenger. La signalisation calcique suit des modèles d'organisation spatiale et temporelle très diversifiés et complexes (4, 15, 82).

L'augmentation de la concentration calcique dans le cytoplasme peut se faire de façon diffuse et augmenter uniformément ou de façon localisée et se

propager sous forme de vague au reste du cytoplasme à partir d'un point initial. L'augmentation uniforme survient lorsque des canaux calciques voltage-dépendants s'ouvrent, alors que les vagues de  $\text{Ca}^{2+}$  se produisent lorsque le calcium augmente dans une région pour ensuite activer la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans un store de type CICR (calcium-induced calcium-release) et ainsi de suite (4, 5, 15, 43, 82).

Les variations de la concentration calcique dans le temps sont de deux types: les transitoires calciques ou les oscillations calciques. Un transitoire calcique dépend d'un influx calcique et se caractérise par une augmentation transitoire de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  qui débute au niveau basal de calcium pour ensuite y revenir rapidement. La fréquence à laquelle survient chaque transitoire peut varier mais est généralement inférieure à 1 Hz. L'oscillation calcique dépend d'une mobilisation de calcium intracellulaire, elle est constituée d'une suite de transitoires de fréquence rapide ( $> 1$  Hz) mais dont le niveau de calcium interpic ne revient jamais au niveau calcique de base précédant le début de l'oscillation (4, 5, 15, 43, 82).

La modulation dans le temps et dans l'espace fait du calcium cytoplasmique libre un second messenger efficace qui a de l'importance dans la régulation cellulaire et dans tout mécanisme de sécrétion. Ce calcium peut provenir de l'extérieur de la cellule via des canaux membranaires ou de l'intérieur de la cellule par la mobilisation de calcium emmagasiné.

### 2.5.3 CANAUX CALCIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

L'influx de calcium par des canaux membranaires peut générer un changement important de la  $[Ca^{2+}]_i$ , qui sera le signal en lui-même, ou il peut soutenir le signal qui découle de la mobilisation du  $Ca^{2+}$  contenu dans les stocks intracellulaires. Dans les cellules somatotropes, l'entrée de  $Ca^{2+}$  via la membrane plasmique nécessite une dépolarisation membranaire. Une conductance sodique doit être activée de laquelle découlera une dépolarisation qui permet l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et un influx de  $Ca^{2+}$ . Les canaux calciques activés par des variations de voltage sont de type-L et sensibles à la dihydropyridine (DHRP). Ce canal a une conductance de 20 à 27 pS qui peut être modulée par des antagonistes et des agonistes, les dihydropyridines, par une phosphorylation AMPc dépendante ou  $Ca^{2+}$ -calmoduline dépendante. Les canaux calciques ont une sélectivité mille fois plus importante pour le  $Ca^{2+}$  que pour les autres ions. Leur chaîne polypeptidique est constituée de quatre régions identiques composées chacune de six régions transmembranaires et dont les régions C et N-terminales se situent du côté cytoplasmique (1, 36, 56, 37).

### 2.5.4 SOURCES INTRACELLULAIRES DE CALCIUM

Avant 1980, l'existence de compartiments calciques intracellulaires et leur participation dans la réponse cellulaire étaient considérées pour des cellules non-musculaires. Maintenant, tous s'entendent sur l'existence de stocks calciques

intracellulaires dans toutes les cellules eucaryotes et de leur participation à l'équilibre calcique (7, 49, 65).

L'existence de différents types de compartiments calciques intracellulaires, se distinguant par leur structure et par leur fonction, doit avoir un certain avantage évolutif ou, plutôt, un avantage évolutif certain. La présence seule de canaux calciques dans la membrane plasmique suffit à approvisionner la cellule en calcium, mais le calcium est un second messenger qui voyage relativement lentement à cause des protéines chélatrices de calcium présentes dans le cytoplasme. Par conséquent, la présence de compartiments calciques intracellulaires permet la diffusion rapide d'un signal calcique aux confins du cytoplasme ou encore permet des augmentations localisées de la  $[Ca^{2+}]_i$ . D'un point de vue purement évolutif cela permet à la cellule de supporter une certaine expansion de sa taille étant donné que le calcium, s'il était un facteur limitant pour une cellule de grande taille sans compartiment intracellulaire, ne l'est plus désormais. Sans contredit le calcium est un élément primordial qui participe à plusieurs fonctions cytologiques. Toutefois, de trop fortes concentrations peuvent nuire à une cellule, d'où l'avantage de posséder des organites intracellulaires qui contribuent au maintien d'un équilibre calcique viable par l'emmagasiner de surplus de calcium. Les compartiments calciques intracellulaires sont d'autant plus efficaces qu'ils ont une superficie membranaire excédant celle de la membrane plasmique (65).

Les compartiments intracellulaires dans lesquels peut être emmagasiné le calcium sont de plusieurs types: mitochondries, granules de sécrétions, réticulum endoplasmique (26, 48, 63, 65).

Les mitochondries ont un pouvoir tampon de grande capacité mais de faible affinité pour le calcium cytoplasmique. Certaines études indiquent qu'elles agissent seulement lors de situations critiques pour la cellule et non pour répondre à une stimulation physiologique. Toutefois, il est possible que le  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans les mitochondries soit libéré selon un cycle lent; le contenu calcique des mitochondries serait alors indispensable pour le maintien des oscillations  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; ainsi que pour l'activation des enzymes. Dans un tel cas, les mitochondries joueraient un rôle dans le métabolisme cellulaire calcique (26).

Certaines cellules pourraient mobiliser du calcium contenu à l'intérieur des granules de sécrétion et contribueraient donc au signal calcique du cytoplasme qui entraîne la sécrétion hormonale. L'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et l'ADP ribose cyclique (cADPr) seraient les responsables potentiels de cette libération de calcium (48, 63).

Le réticulum endoplasmique (RE) intervient dans la biosynthèse cellulaire; les constituants membranaires telles les protéines membranaires, les lipides et les protéines destinées à être sécrétées sont synthétisés dans le RE. Le réticulum endoplasmique est un système continu de membranes cytoplasmiques présent dans

toutes les cellules eucaryotes. Bien que continu, ce système de membranes se divise en sous-compartiments spécialisés dans la libération du  $\text{Ca}^{2+}$ ; certaines régions sont sensibles à l'inositol triphosphate alors que d'autres le sont au calcium cytoplasmique (calcium-induced calcium-release) (1). Il plane toujours un certain doute quant à l'identité exacte des compartiments calciques intracellulaires. Ces organelles sont-elles complètement séparées du réticulum endoplasmique proprement dit? Certains suggèrent l'existence de calciosomes: organites spécialisés dans le stockage du calcium (4, 86).

Le calcium entré et stocké doit pouvoir retourner au besoin dans le cytoplasme. Deux classes de canaux calciques sont associées à la libération du calcium stocké dans des compartiments intracellulaires: le récepteur canal sensible à l' $\text{IP}_3$  et le récepteur canal ryanodine et calcium sensible (18). Plusieurs types cellulaires possèdent ces deux compartiments calciques intracellulaires qui fonctionnent fréquemment ensemble pour produire les oscillations calciques (4, 15, 70).

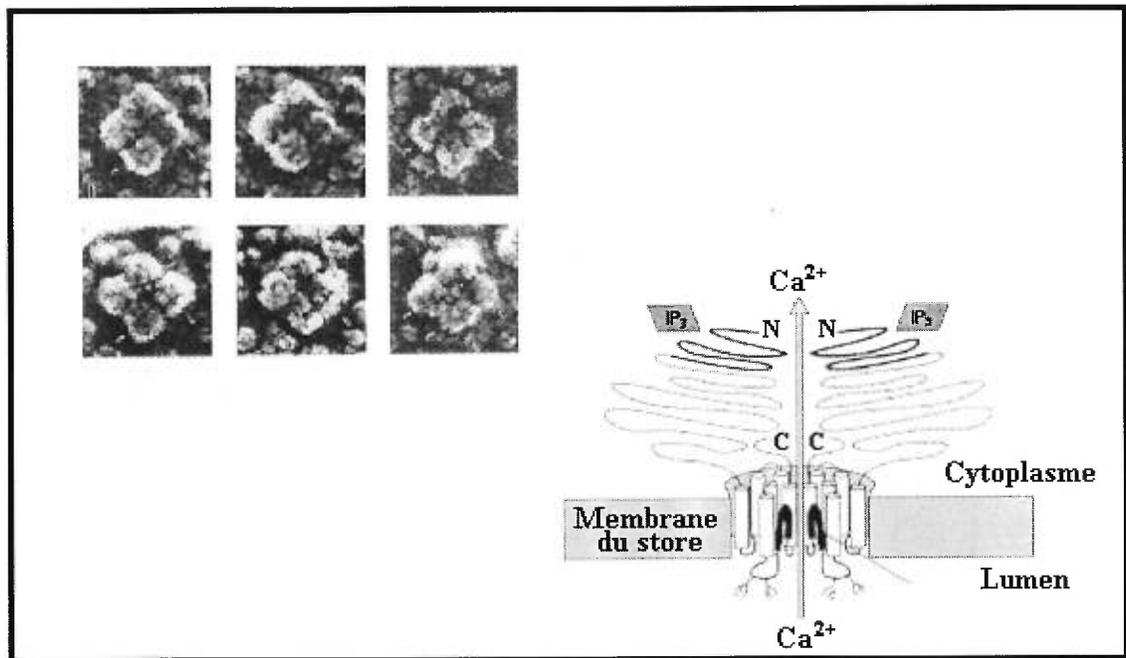
#### 2.5.4.1 STOCKS CALCIQUES $\text{IP}_3$ SENSIBLES

Le stock  $\text{IP}_3$  possède un récepteur ionotrope (canal) qui est activé par l'inositol triphosphate (fig. 2.4), lequel a un effet réversible (4, 5, 18, 34, 70). Cette protéine transmembranaire est un homotétramère de 20 X 10 nm et dont les sous-unités ont un poids de 300 kDa et possèdent six régions transmembranaires (65).

Le site de liaison de l'IP<sub>3</sub> se situe sur la partie N-terminale de la protéine qui se trouve dans le cytoplasme et forme la tête globuleuse, alors que le canal est formé par la région C-terminale qui se termine également du côté cytoplasmique. Plusieurs gènes codent pour cette protéine canal et contribue avec l'épissage alternatif à produire plusieurs variantes de ce canal. À ce jour, trois isoformes ont été identifiées: IP<sub>3</sub>R1, IP<sub>3</sub>R2 et IP<sub>3</sub>R3 (54). Bien que le Ca<sup>2+</sup> et l'ATP ne soient pas suffisants à l'ouverture du canal ils peuvent, en absence de l'IP<sub>3</sub> augmenter son activité (18, 19). Le Ca<sup>2+</sup> peut également avoir un tout autre effet: une concentration du calcium libre cytoplasmique excédant 300 nM, diminue la liaison de l'IP<sub>3</sub> à son récepteur, et inhibe la libération de Ca<sup>2+</sup>. En plus du Ca<sup>2+</sup> qui joue un rôle d'inhibiteur physiologique, il y a l'héparine, un agent pharmacologique, qui remplit ce rôle. La conductance de ce canal varie entre 8 et 26 pS (18, 65).

La libération de Ca<sup>2+</sup> du stock IP<sub>3</sub>-sensible nécessite une augmentation de la concentration en IP<sub>3</sub> cytoplasmique. Pour qu'il y ait formation d'IP<sub>3</sub>, un ligand doit se lier à son récepteur membranaire et ainsi activer la chaîne des phosphoinositides. Le récepteur peut être de deux types: un récepteur lié à une tyrosine kinase ou un récepteur lié à une protéine G. Ces deux mécanismes requièrent du GTP ou de l'ATP pour activer une phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidyle inositol 4,5-biphosphate en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> ira se lier au récepteur du compartiment IP<sub>3</sub> sensible pour mobiliser le Ca<sup>2+</sup> alors que le DAG activera une protéine kinase C (PKC) qui agira sur diverses activités cellulaires (5).

Certaines études ont montré la présence du compartiment calcique  $IP_3$  sensible dans la cellule somatotrope normale de rat. Ces stocks calciques sont mobilisés et induisent la sécrétion de GH lorsque les cellules sont mises en contact avec le GHRP (14). Ce dernier est un hexapeptide de synthèse qui agit sur la



**Figure 2.4: Récepteur  $IP_3$  du compartiment intracellulaire.** Photo de droite prise en microscopie électronique à un grossissement de 500 000 X et elle montre des canaux calciques sensibles à l' $IP_3$ . On observe bien la structure tétramérique de la protéine. Le schéma de droite est un modèle du canal  $IP_3$  dans la membrane du stock intracellulaire (38).

sécrétion de la cellule via un récepteur autre que celui à la GHRH. Il semble donc que le GHRP enclenche la chaîne métabolique conduisant à l' $IP_3$  et n'interfère toutefois pas dans la chaîne métabolique enclenchée suite à la liaison de la GHRH à son récepteur. La GHRH liée à son récepteur membranaire n'active pas la voie de l' $IP_3$ /PKC (2, 10, 20, 22, 28, 49). Les stores  $IP_3$  sont présents dans les cellules

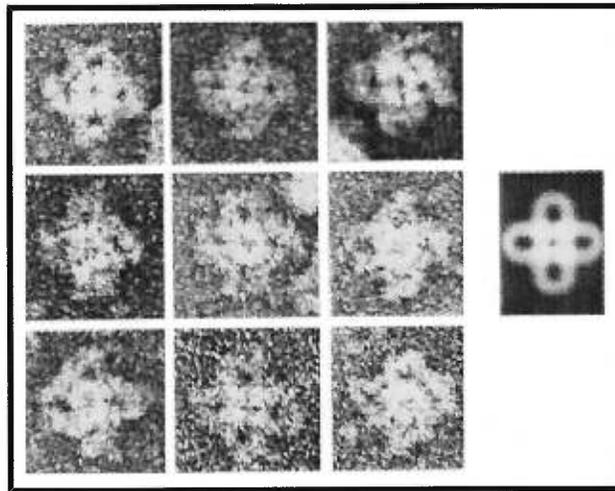
somatotropes mais le ligand naturel qui conduit à la formation du précieux messenger est toujours inconnu.

#### 2.5.4.2 STOCKS CALCIQUES DE TYPE CICR

Le stock calcique de type CICR possède un récepteur ionotrope de la famille des récepteurs sensibles à la ryanodine (fig. 2.5) (41, 47). Cette protéine transmembranaire est un homotétramère de 20 X 18 nm dont les sous-unités ont un poids de 565 kDa et possèdent quatre régions transmembranaires. La partie C-terminale de chaque sous-unité contribue à la formation du canal calcique, alors que la région N-terminale se trouve dans le cytoplasme et forme la partie globuleuse. Ce canal a une conductance de 100 pS. Trois types de récepteur à la ryanodine ont été identifiés jusqu'à maintenant: RyR1 identifié initialement dans le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique, RyR2 décrit dans le muscle cardiaque et finalement RyR3 identifié dans le cerveau (41, 52, 65).

Ce récepteur-canal est sensible au calcium cytoplasmique; lors d'une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  à une concentration physiologique de l'ordre du micromolaire le canal est activé mais lors d'une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  excédant le millimolaire, la probabilité d'ouverture du canal serait diminuée de façon significative (51, 52, 53, 62, 70). La présence de  $Mg^{2+}$  en forte concentration (mM) peut également avoir un effet inhibiteur sur l'ouverture du canal, car il compétitionnerait avec le  $Ca^{2+}$  pour le site de liaison situé sur la face cytoplasmique de la membrane (18, 26). La ryanodine, est un alcaloïde neutre

extrait de la tige et de la racine de la plante *Ryania speciosa*. En premier lieu elle fut utilisée comme insecticide et rapidement il fut démontré qu'elle produisait d'importants effets sur les muscles des vertébrés et invertébrés. L'effet le plus marqué est sans nul doute la contraction irréversible du muscle (33).



**Figure 2.5: Canal ryanodine du stock CICR.** Photos (gauche) present en microscopie électronique à un grossissement de 500 000 X. On observe la structure caractéristique du canal ryanodine en forme de trèfle à quatre feuilles qui est schématisée dans l'image de droite (41).

La ryanodine présente un intérêt particulier pour notre étude. Cet agent pharmacologique est capable d'activer le récepteur-canal ryanodine et calcium sensible lorsqu'utilisé en faibles concentrations ( $< 1 \mu\text{M}$ ) et permet la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  séquestré. Utilisé à une concentration de  $10 \mu\text{M}$ , il maintient le canal fermé et modifie la cinétique d'ouverture et de fermeture du canal, empêchant ainsi la libération de  $\text{Ca}^{2+}$ . La ryanodine se lie au récepteur ryanodine et calcium sensible lorsque le canal est dans une conformation d'ouverture (18, 39, 47, 53, 62, 77). L'effet différentiel de la ryanodine selon sa concentration, serait dû à la présence de deux sites de liaison: un site de haute affinité ( $K_d$  de l'ordre du nanomolaire) et

un site de plus basse affinité ( $K_d$  de l'ordre du micromolaire) (30, 42, 53, 77). À l'heure actuelle le mode d'action de la ryanodine sur la conductance du canal n'est pas clairement établi. Est-ce que la ryanodine aurait un effet allostérique sur la protéine et stabiliserait une conformation appropriée du canal pour un état précis de conductance? Est-ce que la ryanodine pourrait interférer directement sur le flux d'ions calciques qui traversent le pore du canal? Des études récentes semblent favoriser la première explication. L'utilisation de sondes fluorescentes attachées en plusieurs régions du récepteur montre un changement de l'intensité de la fluorescence lorsque le canal passe d'un état ouvert à un état fermé, ce qui laisse croire à un changement de conformation du canal (88). La liaison de la ryanodine semble nécessiter une condition bien précise, soit que les quatre monomères doivent être assemblés. Cela suggère que le site de liaison est formé par la juxtaposition d'au moins deux sous-unités ou encore que chaque monomère possède un site de liaison qui acquiert la conformation permettant la liaison seulement lorsque la molécule est sous forme de tétramère (52, 77).

La caféine, un alcaloïde végétal, lorsqu'utilisé à une concentration de l'ordre du millimolaire, stimule le récepteur ryanodine sensible en augmentant l'affinité du récepteur pour le calcium, ce qui induit la libération de calcium produisant une augmentation transitoire de la  $[Ca^{2+}]$  cytoplasmique sans une augmentation préalable de la  $[Ca^{2+}]_i$  (3, 47). Le rouge de ruthénium est un autre agent qui inhibe le récepteur à la ryanodine alors que l'héparine le stimule. Certaines études suggèrent que le cADPr serait un ligand potentiel pour le

récepteur ryanodine sensible (16, 18). Le store calcique de type CICR n'a pas été identifié dans les cellules somatotropes.

### *2.5.5 RÉGULATEURS DE CALCIUM*

Lors d'une importante arrivée de calcium dans le cytoplasme, la cellule se doit d'éliminer le surplus calcique. Les connaissances acquises jusqu'à maintenant sur la biologie cellulaire permettent de comprendre les stratégies utilisées par les cellules pour contrôler la concentration du calcium libre cytoplasmique. Les acteurs principaux ainsi que leurs rôles spécifiques dans la régulation calcique sont présentés dans la section qui suit.

#### *2.5.5.1 POMPES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE*

La pompe calcique ATPase se situe dans la membrane plasmique (PMCA) de toutes les cellules animales ou végétales et elle constitue le seul système de transport à haute affinité calcique de la membrane ( $K_m$  de 10-20  $\mu\text{M}$ ). La protéine est le produit de quatre gènes situés sur des chromosomes différents et l'épissage alternatif des transcrits entraîne une diversité d'isoformes possibles mais seulement deux isoformes de la protéine sont documentées. Elle possède dix régions transmembranaires et les régions N et C-terminales se situent du côté cytoplasmique. Plusieurs protéines cytoplasmiques peuvent opérer une régulation de la pompe PMCA: des protéines kinases et la calmoduline. La calmoduline a la propriété d'augmenter le  $V_{\max}$  de l'enzyme alors que la PKA augmente le  $V_{\max}$  et

l'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ATPase réalise sa fonction de pompage en échangeant 1  $\text{Ca}^{2+}$  pour 2  $\text{H}^+$  (11).

Un second système existe pour le pompage du calcium hors du cytoplasme, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Contrairement à la PMCA, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  a une très faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Son fonctionnement repose donc sur la proximité d'une forte concentration de calcium (11).

#### 2.5.5.2 PROTÉINES CHÉLATRICES DE CALCIUM

Une autre stratégie utilisée est le captage du  $\text{Ca}^{2+}$  par une protéine cytoplasmique de liaison du calcium: la calmoduline (57). Le calcium qui peut également être emmagasiné à l'intérieur du réticulum endoplasmique sera aussi capté par des protéines chélatrices de calcium, dont les deux familles principales sont les calséquestrines et les calréticulines. Celles-ci ont une grande capacité de stockage qui se situe entre 25 et 50 ions/molécule et une faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , soit une  $K_d$  de l'ordre du millimolaire (65).

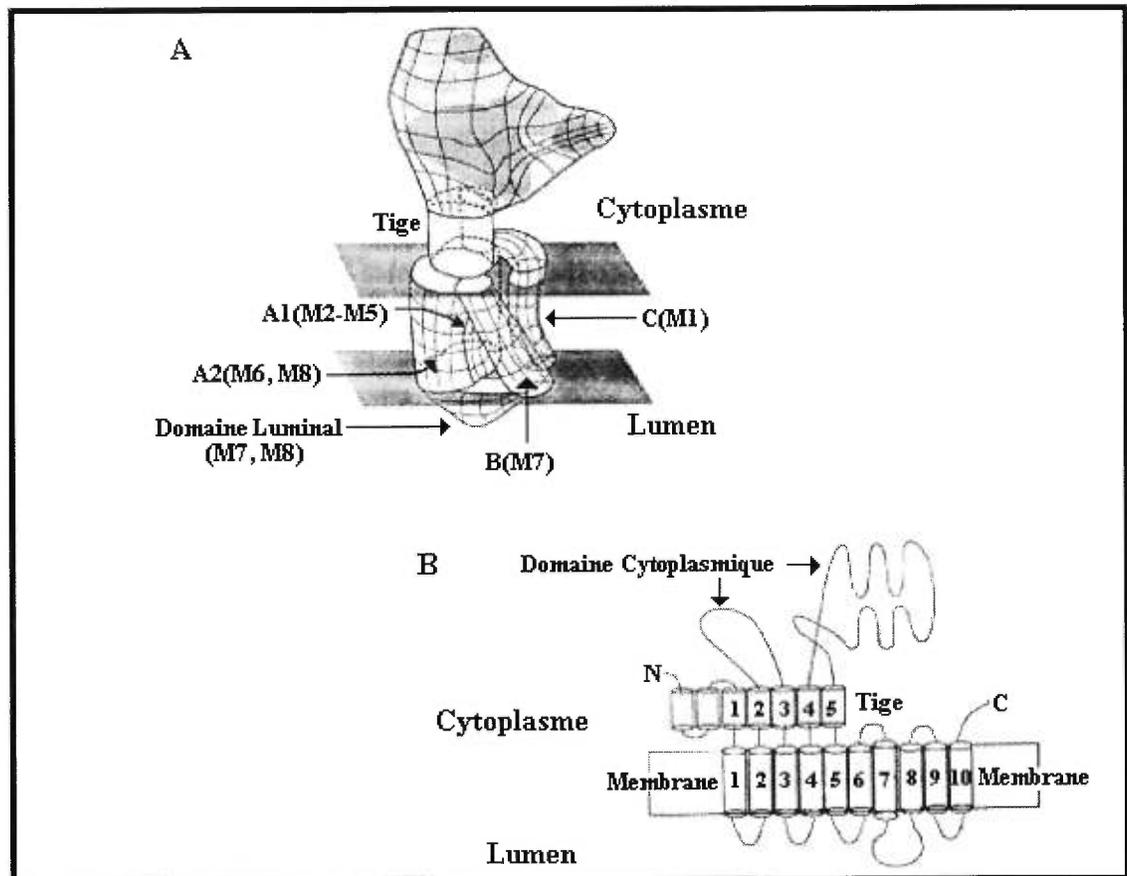
#### 2.5.5.3 POMPES CALCIQUES DES COMPARTIMENTS INTRACELLULAIRES

Dès lors que la présence de compartiments calciques intracellulaires est acceptée, il faut proposer un mode de pénétration du calcium cytoplasmique dans les compartiments intracellulaires. Au cours de la dernière décennie, une protéine possédant les caractéristiques fonctionnelles et structurelles de l'ATPase calcique

du réticulum sarcoplasmique a été identifiée dans le réticulum endoplasmique de cellules non-musculaires. Cette protéine permet au calcium de traverser les membranes d'organites intracellulaires à l'encontre de son gradient de concentration grâce à l'hydrolyse de l'ATP comme source énergétique. Ces pompes font partie de la famille des SERCAs (sarcoplasmic endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases) (65).

Cette ATPase calcique est une protéine transmembranaire asymétrique d'environ 110 kDa. La portion la plus imposante comprenant les parties N et C-terminales se trouve dans le cytosol, la partie transmembranaire serait composée de 10 hélices et finalement, une petite portion de la protéine ferait une insertion dans la lumière du réticulum endoplasmique (fig.2.6 (32, 65)).

Le passage du calcium du cytoplasme vers la lumière du réticulum se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, la SERCA est dans une conformation de haute affinité ( $E_1$ ) pour le calcium; deux molécules de calcium se lient à la protéine. Par la suite, l'hydrolyse de l'ATP permet la phosphorylation d'un résidu aspartique de la pompe ( $E_1P$ ). L'enzyme passe d'une conformation de haute énergie vers une de basse énergie ( $E_1P \rightarrow E_2P$ ), exposant ainsi le calcium à l'intérieur du compartiment. Cette dernière conformation de l'enzyme a une affinité pour le calcium inférieure à celle de la conformation  $E_1P$ , d'où la libération du calcium. Le clivage du lien phosphate replace la SERCA dans sa conformation  $E_1$ (32, 65).



**Figure 2.6: Pompe calcique des compartiments intracellulaires (SERCA).** En A on représente la structure tridimensionnelle de l'ATPase; la région transmembranaire a trois segments (A, B et C) et la partie luminale est reliée aux segments A et B. En B on observe la structure schématisée avec 10 hélices transmembranaires (M1-M10) alors que la tige a 5 hélices (65).

La thapsigargine est un sesquiterpène lactone isolé de la plante *Thapsia garganica*. Cet agent active nombre de cellules du système immunitaire qui interviennent lors d'une inflammation. La thapsigargine est également un promoteur tumoral. En ce qui concerne ce travail, cette substance a un attrait par sa propriété d'agir sur l'activité des pompes calciques ATP dépendantes. En effet, elle se lie de façon stoechiométrique aux SERCAs, causant ainsi une inhibition irréversible de l'activité enzymatique. Une molécule de thapsigargine agit en bloquant la pompe dans une conformation de basse énergie selon laquelle l'affinité

pour le calcium est très faible (65, 81). Le site de liaison, sur lequel agit la thapsigargine n'est pas encore clairement identifié mais la sensibilité de la protéine pour cette substance serait limitée à la portion N-terminale (83).

L'utilisation de la thapsigargine, lors de mesures de variations de la concentration calcique intracellulaire, provoque habituellement une augmentation marquée et transitoire de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En bloquant la pompe, le compartiment intracellulaire n'est plus alimenté en calcium, sans expliquer toutefois l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]$  cytoplasmique. En effet, un canal de fuite dans la membrane des compartiments intracellulaires permettrait la sortie continue de calcium vers le cytoplasme. Il semble donc exister un état d'équilibre entre l'entrée de calcium par les pompes et la sortie ininterrompue vers le cytoplasme (80).

La thapsigargine a une forte affinité pour la pompe SERCA et s'emploie à des concentrations de 20 nM à 1  $\mu$  M. Elle a également une grande spécificité; elle n'agit que sur les SERCAs sans interagir sur les pompes calciques ATP dépendantes de la membrane plasmique (80).

## 2.5.6 SIGNALISATION CALCIQUE: TROIS SCÉNARIOS

### 2.5.6.1 LA CELLULE CARDIAQUE

Les cellules cardiaques utilisent la stratégie du CICR enclenchée par une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans leur mécanisme excitation-contraction. Un faible influx calcique traverse le sarcolemme par des canaux calciques voltage-dépendants et par l'inversion de l'échangeur  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ . Cet arrivage de calcium dans le cytoplasme est l'élément déclencheur de la libération du calcium entreposé dans le compartiment CICR; il y a amplification du signal calcique intracellulaire (43, 75).

### 2.5.6.2 LA CELLULE GONADOTROPE

La cellule gonadotrope est l'un des types cellulaires de l'adénohypophyse. Lorsque le GnRH (gonadotropine releasing hormone) se lie à son récepteur membranaire, une protéine G est activée qui à son tour active la phospholipase C et provoque le clivage du phosphatidylinositol biphosphate en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ). Le DAG activera une kinase C alors que l' $\text{IP}_3$  permettra l'ouverture du récepteur canal du stock  $\text{IP}_3$  sensible et produira donc une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . De cette augmentation résulte un pic de libération de l'hormone lutéinisante (LH).

Pour ce type cellulaire, la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est la condition nécessaire à l'activation d'un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire qui maintient le plateau de sécrétion de la LH (12). Le modèle capacitif est le modèle le plus

souvent utilisé pour expliquer la communication entre le stock intracellulaire et les canaux calciques de la membrane. Selon ce modèle, la libération du calcium contenu dans les stocks intracellulaires serait reliée à l'entrée de calcium du milieu extracellulaire vers le cytoplasme. Deux modèles tentent d'expliquer le mécanisme de communication entre le compartiment intracellulaire et la membrane: la libération d'un messenger lorsque le store est vide ou une interaction entre des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> et des canaux Ca<sup>2+</sup> de la membrane plasmique (7, 66, 67).

### 2.5.6.3 LA TERMINAISON SYNAPTIQUE

Une des particularités de la membrane présynaptique d'un neurone est la grande concentration de canaux calciques voltage-dépendants en comparaison avec les autres régions du neurone. Le potentiel d'action qui arrive par l'axone dépolarise la terminaison synaptique qui induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et permet un influx calcique important. L'augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> est nécessaire à la libération du ou des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (1).

## ***2.6 LA GHRH ACTIVE UN MÉCANISME DE SIGNALISATION MÉDIÉ PAR LE CALCIUM***

Par analogie avec les scénarios présentés précédemment, nous pourrions exclure le mécanisme de signalisation calcique employé par la cellule gonadotrope pour qualifier le type de signalisation calcique induit par la GHRH de la cellule somatotrope. En revanche, les connaissances actuelles concernant l'effet dépolarisant et l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants produit par la

GHRH permet de croire que le mode de signalisation calcique enclenché par la GHRH est similaire à celui élaboré dans la terminaison nerveuse. Cependant, certains indices supplémentaires suggèrent que la cellule somatotrope pourrait avoir un mécanisme de signalisation se rapprochant de celui de la cellule cardiaque, soit un influx de calcium amplifié par l'action d'un stock de type CICR. Les mécanismes généraux de la signalisation calcique étant maintenant exposés, voici les mécanismes de signalisation par lesquels la GHRH et la SRIF agissent sur la sécrétion de la GH.

La SRIF et la GHRH agissent sur la sécrétion de GH par l'intermédiaire du calcium libre intracellulaire, second messenger nécessaire pour l'exocytose régulé (29, 45). Le récepteur de la GHRH est couplé à une protéine  $G_s$ , il a sept régions transmembranaires et l'extrémité C-terminale de la chaîne d'acides aminés se trouve du côté cytoplasmique alors que la partie N-terminale se trouve à l'extérieur de la cellule (50). Il est généralement admis que la liaison de la GHRH à son récepteur membranaire induit, par l'entremise d'une augmentation de la production de l'AMPC, une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation entraîne l'ouverture d'un canal calcique voltage dépendant de type L qui a pour conséquence une entrée massive de calcium extracellulaire qui se traduit par une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  indispensable à l'exocytose de GH (13, 20, 29, 44). L'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  produite par une stimulation par la GHRH peut suivre trois patrons: la GHRH produit une augmentation soutenue de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la GHRH augmente la fréquence et l'amplitude des transitoires calciques ou il agit seulement

sur la fréquence des transitoires (28, 46). Lorsque la cellule somatotrope est dépolarisée dans un milieu dépourvu de calcium, il n'en résulte aucune augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  et par conséquent pas de GH sécrétée (29, 40). Toutefois, un indice laisse supposer une présence calcique intracellulaire qui pourrait potentiellement agir sur le signal calcique initié par une entrée de calcium extracellulaire. En effet, l'ajout d'un ionophore calcique dans le milieu dépourvu de calcium de la cellule somatotrope produit une augmentation du calcium cytoplasmique (29, 44).

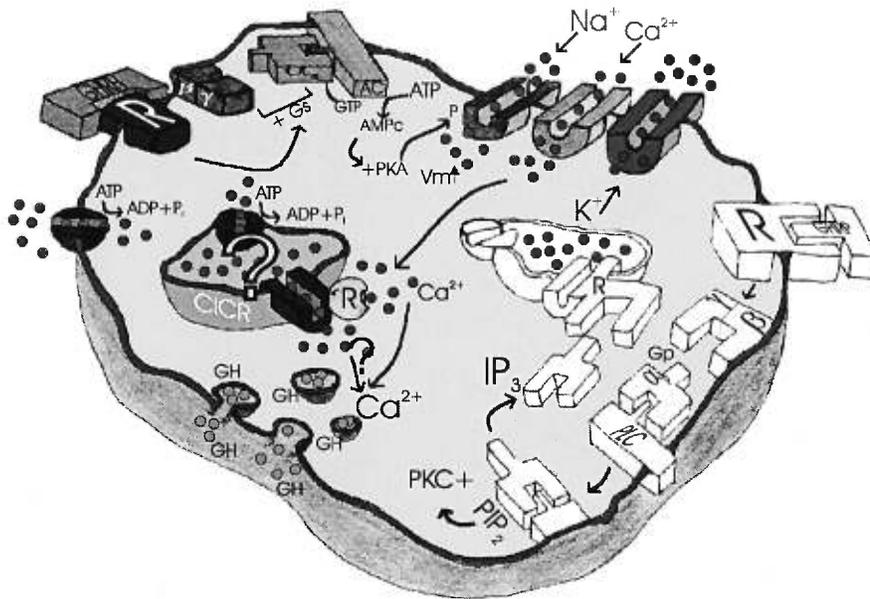
La SRIF aurait l'effet inverse sur la génération d'AMPC car elle inhiberait partiellement la synthèse de cette molécule et entraînerait une diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  (8). De plus, l'activité spontanée des cellules somatotropes serait totalement inhibée en présence de SRIF (29). Certaines observations laissent supposer trois mécanismes inhibiteurs pour la SRIF. Tout d'abord, la SRIF diminue la  $[AMP_c]_i$ . Deuxièmement, suite à la liaison avec son récepteur membranaire, la SRIF activerait une conductance  $K^+$  rectifiante entrante qui hyperpolariserait la cellule. Finalement, lorsqu'elle se lie à son récepteur membranaire, la SRIF activerait une protéine  $G_o$  sensible à la toxine pertussis, laquelle activerait une phosphatase qui déphosphorylerait le canal calcique voltage-dépendant de type-L. En agissant ainsi, la SRIF empêche la dépolarisation membranaire, donc l'ouverture du canal calcique de type-L ou encore module sa conductance qui se traduit par une diminution du courant calcique (35, 65).

L'utilisation du calcium extracellulaire comme source de  $\text{Ca}^{2+}$  pour augmenter la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  permettant la sécrétion de GH est un fait indéniable. Cependant, la présence du compartiment calcique intracellulaire de type  $\text{IP}_3$  sensible soulève un questionnement quant à la présence du compartiment de type CICR. Est-ce que la cellule somatotrope possède des compartiments calciques intracellulaires de type CICR? Et ceux-ci pourraient-ils participer à la réponse calcique induite par la GHRH?

## ***2.7 LE PROJET DE RECHERCHE***

Bien que l'on maîtrise les généralités concernant le mode de fonctionnement de cette cellule, plusieurs questions demeurent entières. Deux questions ont capté notre attention (fig. 2.7). Y a-t-il des compartiments calciques de type CICR dans la cellule somatotrope? Ce calcium intracellulaire joue-t-il un rôle dans la libération de la GH suite à une stimulation par la GHRH?

Le projet de recherche ici présenté tente d'apporter des éléments de réponse à ces questions. Pour ce faire, nous avons procédé à des mesures de variation du calcium intracellulaire sur des cellules uniques. Ces mesures ont été faites à l'aide d'une sonde fluorescente calcium-sensible à double-émission. Le modèle cellulaire étudié dans notre laboratoire est la cellule somatotrope de rat mâle. La dissociation de la glande se fait par un traitement enzymatique et mécanique, suivi d'une purification cellulaire réalisée sur gradients de Percoll discontinus.



**Figure 2.7: Modèle cellulaire et questions du projet de recherche.** Le stock de type  $IP_3$  est présent dans la cellule somatotrope mais l' $IP_3$  n'est pas produite lorsque la GHRH se lie à son récepteur. Quant à elle, la cascade de l' $AMP_c$  est enclenchée lors de la liaison de la GHRH, par la suite il y a une dépolarisation membranaire qui ouvre les canaux calciques voltage-dépendants. Un influx de  $Ca^{2+}$  extracellulaire augmente  $[Ca^{2+}]_i$ , ce qui permet l'exocytose de la GH. La présence des stocks de type CICR et leur participation dans le signal calcique font l'objet de cette recherche. GTP: guanosine-triphosphate, ATP: adénosine triphosphate,  $AMP_c$ : adénosine-monophosphate cyclique, DAG: diacylglycérol,  $IP_3$ : inositol triphosphate, PLC: phospholipase C, PKC: protéine kinase C, PKA: protéine kinase A,  $G_s$ : protéine G stimulatrice,  $G_p$ : protéine G spécifique,  $\alpha \beta \gamma$ : sous-unités de la protéine G, AC: adényl cyclase,  $V_m$ : dépolarisation membranaire, GH: hormone de croissance, R: récepteur,  $Ca^{2+}$ : calcium, P: phosphate, GHRH: somatocrine, GHRP: hexapeptide de synthèse,  $Na^{2+}$ : sodium,  $K^+$ : potassium, +: activation, ATPase: pompe calcique.

La première partie de cette recherche consiste à mettre en évidence l'existence du stock CICR par des mesures de variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  en présence d'agents pharmacologiques tels la ryanodine, la caféine et la thapsigargine, ayant la

capacité d'agir sur certaines propriétés du stock et en manipulant le contenu en calcium du milieu extracellulaire. Par microperfusion, les agents pharmacologiques entrent en contact avec les cellules; ils sont éjectés dans le milieu qui baigne la cellule dont on enregistre la  $[Ca^{2+}]_i$ . La perfusion continue du bain dans lequel se trouve les cellules, permet un retour rapide à un milieu d'incubation adéquat et ce dès que la microperfusion d'un agent pharmacologique est terminée. La ryanodine est utilisée à une concentration de 10  $\mu$ M dans le but de fermer le canal ryanodine et calcium sensible, et ainsi empêche toute augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . La caféine est utilisée à plusieurs concentrations entre 5 et 50 mM afin d'augmenter la sensibilité du récepteur ryanodine et calcium sensible pour le  $Ca^{2+}$  et produire une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Quant à la thapsigargine, elle est utilisée dans le but de bloquer le fonctionnement des SERCAs pour ainsi vider les compartiments calciques intracellulaires et plus particulièrement les compartiments de type CICR.

La seconde partie de la recherche tente de déterminer si le stock de type CICR a une implication dans la réponse calcique induite par la GHRH et nous le démontrons par des mesures de variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  suite à une stimulation par la GHRH, alors que le contenu du stock CICR a été manipulé à l'aide de la ryanodine à forte concentration et de la thapsigargine.

## CHAPITRE 3

### MÉTHODOLOGIE

#### MESURES DE LA $[Ca^{2+}]_i$ AVEC L'INDO-1 EN PRÉSENCE DE CAFÉINE

Les mesures de la concentration calcique cytoplasmique se font à l'aide d'une sonde fluorescente calcium sensible à double-émission: l'indo-1. Le principe de fonctionnement découle de l'excitation de la sonde par une source d'ultraviolets, ce qui produit une émission de fluorescence à deux longueurs d'ondes différentes, 405 nm et 480 nm, selon que le calcium soit lié ou non à la sonde (17, 89). La concentration calcique est une fonction du rapport des fluorescences à ces deux longueurs d'onde d'émission ( $R=F405/F480$ ). Cette fonction est décrite par l'équation de Grynkiewicz (69) qui tient compte de plusieurs constantes de calibration:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd\beta \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}$$

Kd: constante de dissociation de l'indo-1

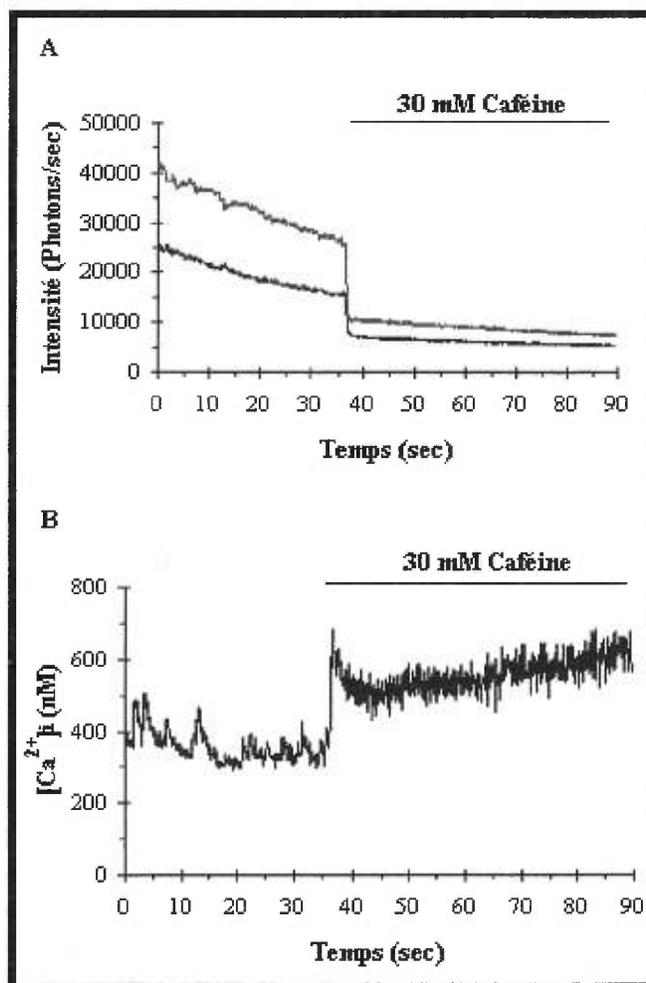
$\beta$ : rapport du signal fluorescent à 480 nm en absence de  $Ca^{2+}$  et à saturation

R: F405/F480 mesuré après correction de l'autofluorescence

$R_{max}$ : rapport maximum F405/F480 quand l'indo-1 lie le  $Ca^{2+}$

$R_{min}$ : rapport minimum F405/F480 quand l'indo-1 est libre de  $Ca^{2+}$

L'étude des effets de la caféine sur la  $[Ca^{2+}]_i$ , quand on mesure celle-ci avec la sonde fluorescente indo-1, a nécessité la mise au point d'une méthode de correction.



**Figure 3.1: Fluorescence émise à deux longueurs d'onde et concentration calcique intracellulaire lors de l'éjection de caféine.** Le panneau **A** montre l'intensité des deux longueurs d'onde d'émission, soit le F405 (mauve) et le F480 (vert) obtenues lors de l'éjection de 30 mM caféine en absence de  $Ca^{2+}$  extracellulaire avant l'application de la correction. Le panneau **B** montre la concentration apparente du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique avant l'application de la méthode de correction.

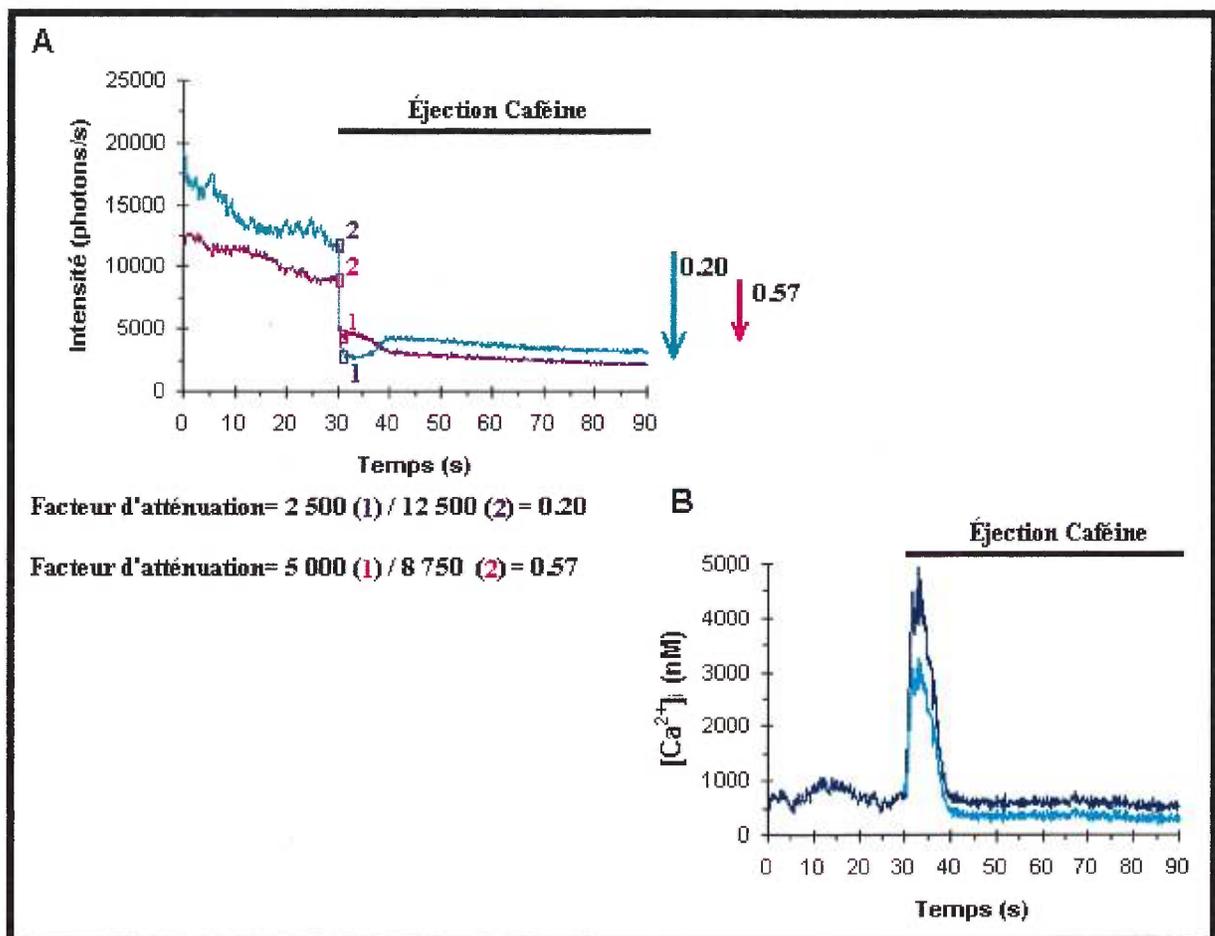
En effet, la caféine modifie les caractéristiques fluorescentes de l'indo-1 (31, 60) et par le fait même elle change significativement le rapport des longueurs d'onde d'émission. Ces effets se traduisent par des variations apparentes de la concentration en calcium qui ne sont pas toujours réelles. La figure 3.1A présente

les tracés de la fluorescence avant correction, et on peut y observer une atténuation brusque et non-proportionnelle de la fluorescence aux deux longueurs d'onde d'émission lors de l'éjection de la caféine. La correction de cette atténuation est nécessaire afin de mettre en évidence des changements de concentration calcique dus à l'action de la caféine sur le stock CICR et non pas sur l'indo-1.

La correction consiste dans un premier temps à mesurer un facteur d'atténuation relative de la fluorescence à chacune des longueurs d'onde en se basant sur l'intensité juste avant l'exposition à la caféine et celle suivant la baisse rapide d'intensité (fig. 3.2). Dans un deuxième temps, pendant l'exposition à la caféine l'intensité de la fluorescence à chacune des longueurs d'onde est divisée par son facteur d'atténuation (fig. 3.1A et 3.4A). Un facteur d'atténuation est mesuré pour chaque exposition à la caféine et ne sert qu'à la correction du rapport F405/F480 de l'exposition qui a servi à l'évaluer.

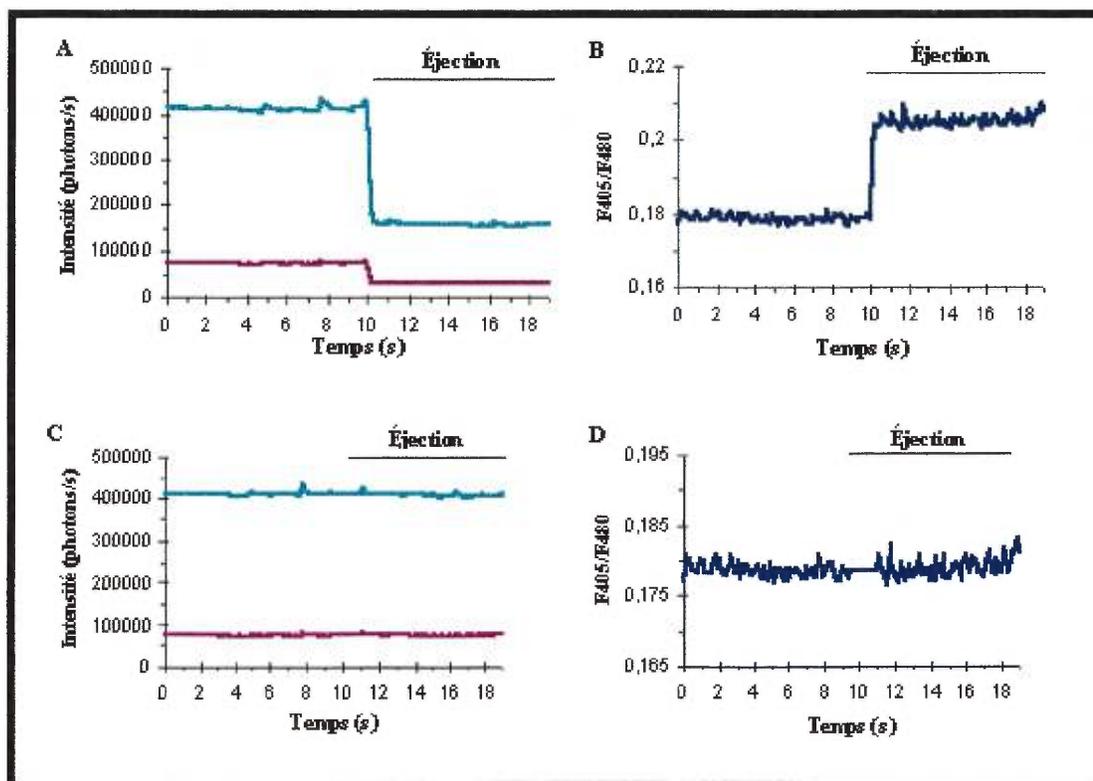
Pour valider la méthode de correction nous avons éjecté un mélange de calcium, de caféine et d'indo-1 aux concentrations respectives de 180 nM, 30 mM et 100  $\mu$ M, dans un milieu contenant la même concentration de calcium et d'indo-1. Lors de l'éjection il n'y a aucune augmentation de la  $[Ca^{2+}]$  dans le milieu et nous avons observé une variation des longueurs d'onde d'émission (fig. 3.3A et B) qui se traduit par une augmentation du rapport de fluorescence (F405/F480). En appliquant la technique de correction les fluorescences restent stables pendant l'éjection de caféine, donc le rapport F405/F480 reste constant (fig.

3.3C et D). À première vue cette atténuation peut sembler être un inconvénient majeur à l'utilisation de la caféine, mais elle indique clairement la pénétration de la caféine dans le cytoplasme. De plus, elle démontre aussi la rapidité avec laquelle la caféine entre dans la cellule et interagit avec la sonde.



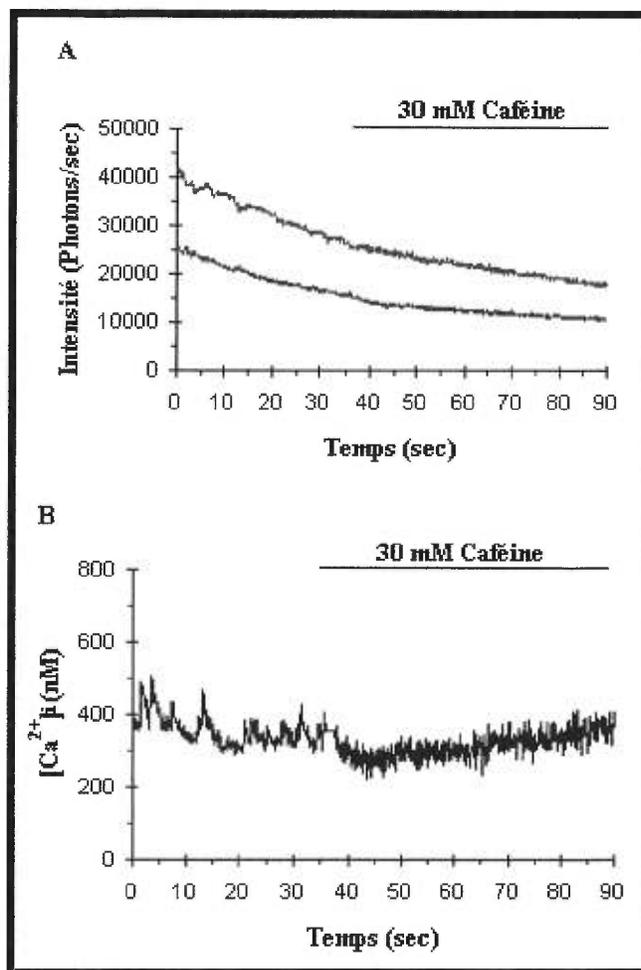
**Figure 3.2: Méthode de correction** Le panneau A montre la fluorescence émise au deux longueurs d'onde d'émission, soit le F405 (mauve) et le F480 (vert), obtenues lors de l'éjection de caféine, est corrigée grâce au facteur d'atténuation. Le facteur est calculé avec la valeur de la fluorescence du point précédent l'éjection et la première valeur suite à l'atténuation de la fluorescence. Les valeurs de fluorescence qui sont enregistrées durant l'éjection de caféine sont divisées par ce facteur, ce qui donne les traces corrigées et des augmentations réelles de Ca<sup>2+</sup> (B).

Avant correction, l'interprétation du tracé présenté à la figure 3.1B serait qu'une importante augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  résulte de la mobilisation du  $Ca^{2+}$  contenu dans le stock en réponse à l'application de caféine. Suite à la correction (fig. 3.4B), l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à la caféine n'a pas lieu, donc on conclut que cette cellule est insensible à la caféine. De plus, on constate que la  $[Ca^{2+}]_i$  diminue, ce qui est en accord avec une application d'un milieu extracellulaire dépourvu de  $Ca^{2+}$ .



**Figure 3.3: Validation de la méthode de correction.** Validation obtenue par l'éjection d'un mélange de  $Ca^{2+}$  (180 nM) et de caféine (30 mM) dans un milieu avec une concentration identique de  $Ca^{2+}$  (180 nM) et 100  $\mu$ M indo-1. Les panneaux A et C représentent les tracés de la fluorescence aux deux longueurs d'onde, soit le F405 (mauve) et le F480 (vert) avant et après correction, respectivement. Les panneaux B et D représentent le rapport de F405/F480, avant et après correction, respectivement.

Nous avons systématiquement utilisé cette méthode de correction lors des expériences impliquant la caféine.



**Figure 3.4: Fluorescence émise à deux longueurs d'onde et concentration calcique intracellulaire lors de l'éjection de caféine après correction.** Le panneau **A** montre l'intensité des deux longueurs d'onde d'émission, soit le F405 (mauve) et le F480 (vert) obtenues lors de l'éjection de 30 mM caféine en absence de  $Ca^{2+}$  extracellulaire présenté après l'application de la correction. Le panneau **B** montre la concentration du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique après l'application de la correction. Les tracés présentés ici sont ceux de la figure 3.1 suite à la correction.

**CHAPITRE 4**

**ARTICLE**

**TITRE: Intracellular calcium stores are involved in growth hormone-releasing hormone signal transduction in rat somatotrophs.**

Soumis à la revue **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.**

**Intracellular calcium stores are involved in growth hormone-releasing hormone signal transduction in rat somatotrophs.**

By Audrey Petit, Catherine Bleicher and Benoît T. Lussier

Département de sciences biologiques,  
Université de Montréal  
P.O. Box 6128 station Centre-Ville  
Montréal, Québec  
Canada, H3C 3J7

Category: Physiology/nutrition

Author responsible for correspondence:

Benoît T. Lussier  
Département de sciences biologiques  
Université de Montréal  
P.O. Box 6128 station Centre-Ville  
Montréal, Québec  
CANADA, H3C 3J7

Tel: (514) 343-6084

Fax: (514) 343-2293

E-mail: [lussierb@ere.umontreal.ca](mailto:lussierb@ere.umontreal.ca)

### Abbreviations

BAPTA, 1,2-bis-(2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid;  $[Ca^{2+}]_i$ , cytosolic free  $Ca^{2+}$  concentration; CICR, calcium-induced calcium release; CRAC, calcium-release-activated calcium; DMSO, dimethylsulfoxide; EGTA, ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; ER, endoplasmic reticulum; GH, growth hormone; GHRH, growth hormone-releasing hormone; GHRP-6, growth hormone-releasing hexapeptide; HBSS, modified Hanks' balanced salt solution; HEPES, N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid;  $I_{crac}$ , calcium-release-activated calcium current; Indo-1/AM, pentaacetoxymethyl ester of Indo-1;  $InsP_3$ , inositol 1,4,5-trisphosphate; SEM, standard error of the mean; SERCA, sarcoplasmic endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase

## Summary

In rat pituitary somatotrophs, the stimulation of growth hormone secretion by growth hormone-releasing hormone (GHRH) is a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent event involving  $\text{Ca}^{2+}$  influx. The presence of calcium-induced calcium release (CICR)  $\text{Ca}^{2+}$  stores has been suggested in these cells. The aim of our study was to demonstrate the presence of CICR stores in rat somatotrophs and to determine their function in GHRH  $\text{Ca}^{2+}$  signalling.

To this end we measured cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) using indo-1 in purified rat somatotrophs in primary culture, while altering intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. We found that 10  $\mu\text{M}$  ionomycin or 10  $\mu\text{M}$  4-bromo-A23187 raised  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Caffeine (5 mM to 50 mM) transiently raised  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in 65% of cells tested. The cells that did not respond had a significantly higher basal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  than those that did. The response to 40 mM caffeine was abolished in cells treated with 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin or 10  $\mu\text{M}$  ryanodine. All cells that responded to 40 mM caffeine responded to 10 nM GHRH. The  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  response to 10 nM GRF was reversible and repeatable. However, the second response was 38% smaller than the first. Ryanodine treatment abolished the expected reduction in the second  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  response. When thapsigargin was used to empty  $\text{Ca}^{2+}$  stores the reduction in the second was increased by 67%.

We conclude that rat somatotrophs possess CICR  $\text{Ca}^{2+}$  stores and that they are involved in the generation of the GHRH-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signal. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation accounts for at least 33% of the GHRH-induced increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Finally we propose that  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion is involved in somatotroph desensitisation to GHRH.

## Introduction

*In vivo*, the hypothalamic peptide growth hormone-releasing hormone (GHRH) stimulates the secretion of growth hormone (GH) from somatotrophs of the anterior pituitary (Frohman et al. 1992). Stimulated release of GH is calcium dependent. GHRH raises cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (Holl et al. 1988; Lussier et al. 1991; Kato et al. 1992). The removal of  $\text{Ca}^{2+}$  from the extracellular medium as well as  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers inhibit GHRH-induced increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , and GH release (Schöfl et al. 1987; Bilezikjian and Vale, 1983; Holl et al. 1988; Lussier et al. 1991; Kato et al. 1992). These results have led to the generally accepted conclusion that intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores are not involved in GHRH signal transduction in somatotrophs. However, several authors have reported the presence of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in rat somatotrophs (Holl et al. 1989; Lussier et al. 1991; Bresson-Bépoldin and Dufy-Barbe, 1994; Herrington and Hille, 1994). Therefore, the question of the type and function of these stores arises.

The synthetic growth hormone-releasing hexapeptide (GHRP-6) raises  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by mobilising intracellularly stored  $\text{Ca}^{2+}$  in rat somatotrophs (Herrington and Hille, 1994; Bresson-Bépoldin and Dufy-Barbe, 1994). Furthermore, the GHRP-6  $\text{Ca}^{2+}$  signal is altered by ryanodine (Herrington and Hille, 1994) and by the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) inhibitor, thapsigargin (Bresson-Bépoldin and Dufy-Barbe, 1994). It is well established that GHRP-6 uses the inositol phosphate/protein kinase C signalling pathway (Mau et al. 1995). Therefore, the presence of inositol trisphosphate- ( $\text{InsP}_3$ ) sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores are

highly probable in rat somatotrophs. GHRH does not use the same membrane receptor as GHRP-6 (Blake and Smith, 1991), nor does it raise  $\text{InsP}_3$  production in rat somatotrophs (French et al. 1989). Therefore, it is most unlikely that  $\text{InsP}_3$ -sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores would be involved in GHRH signal transduction. The sensitivity of the GHRP-6-dependent intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation to ryanodine suggests that  $\text{InsP}_3$ -sensitive stores have calcium-induced calcium release (CICR) channels. If somatotrophs have functional CICR stores, then it is possible that the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  due to GHRH-induced calcium influx is amplified by  $\text{Ca}^{2+}$  release from these stores.

The aim of the current study was to confirm the existence of CICR  $\text{Ca}^{2+}$  stores in rat somatotrophs, and to determine whether it is involved in GHRH signal transduction. Using primary cultures of purified rat somatotrophs, and indo-1  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  measurements, we show that CICR  $\text{Ca}^{2+}$  stores are indeed present in rat somatotrophs, and that they play a role in GHRH signal transduction.

## Materials and methods

### Somatotroph purification

Adult male Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada; CD(SD)BR), weighing 200-225 g on arrival were housed in group cages for two weeks in a temperature controlled (25.5°C) room with a light-dark cycle of 12:12. The animals had access to food and water *ad libitum*. Five rats were decapitated between 0700-0900 h. The nervosa intermedias were discarded, and the partes distales were removed. The dissociation of the glands was carried out under sterile conditions in a laminar flow hood. The partes distales were minced into 25 fragments, and enzymatically dissociated at 37°C for 1.75-2 h in a spinner flask containing 10 ml of 0.1% trypsin (0152-13-1; 1:250; Difco Laboratories, Detroit, MI), in Minimum Essential Medium (Eagle's; 11400-066; Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 20 mM HEPES, brought to pH 7.35-7.4 with NaOH at 37°C. The dispersed cells ( $2 \times 10^6$ - $4 \times 10^6$ /rat) were centrifuged and resuspended in medium 199 (400-1200; Gibco, Grand Island, NY) containing 0.1% BSA, and 20 mM HEPES titrated to pH 7.35-7.40 with NaOH at room temperature. The somatotroph purification was accomplished by a two-stage discontinuous Percoll density gradient centrifugation procedure, as previously described (Lussier et al. 1991). The cells were 93-96% viable when evaluated by the trypan blue exclusion test. The final number of cells corresponded to 15-20% of the total initial yield.

The purified cells were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (31600-034; Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% new-born calf serum

(16010-035; Gibco, Grand Island, NY), 50 U/ml penicillin G, 50 $\mu$ g/ml streptomycin, 10 nM dexamethasone (D-8893; Sigma chemical co., St-Louis, MO) and 30 pM l-triiodothyronine (T-5516; Sigma chemical co., St-Louis, MO), at a density of 1.25x10<sup>5</sup> cells/ml. Two milliliters of cell suspension were deposited onto poly-L-ornithine (P-3655; Sigma chemical co., St-Louis, MO) treated round glass coverslips, and cultured at 37°C in humidified 95% air- 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was changed every 2 days. Cells were used for photometry on the same day or after 3 days in culture.

#### **Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration measurements**

We used the ratiometric fluorescent calcium dye, indo-1, to measure [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Grynkiewicz et al. 1985). Cells attached to coverslips were rinsed with modified Hanks' balanced salt solution (HBSS; 135 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 5 mM dextrose, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM HEPES titrated to pH 7.37 with NaOH at 37°C). The cells were incubated for 30 min in the dark at room temperature in 1 ml of HBSS containing 0.02% pluronic F-127 (P-1572; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) and 10  $\mu$ M indo-1/AM (pentaacetoxymethyl ester of indo-1; I-1203, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) and 2 % dimethylsulfoxide (DMSO) as solvent. At the end of the incubation period, the dye-containing solution was replaced with fresh HBSS, and the coverslip was placed in a temperature controlled superfusion chamber. The HBSS in the chamber was continuously renewed and maintained at 37°C.

Fluorescence measurements of indo-1 loaded cells were carried out with a CRS-400 microfluorimeter (Bio-Rad Microscience Ltd, Hemel Hempstead, UK). The excitation wavelength was 355 nm, and the emission wavelengths were 405 nm and 480 nm. Background fluorescence was subtracted from the 405 nm and 480 nm signals (F405 and F480 respectively) before calculating the F405/F480 ratio (R) on line. The ratios were converted to calcium concentrations using the Grynkiewicz equation (Grynkiewicz et al. 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \beta x \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}$$

$K_d\beta$ ,  $R_{\min}$  and  $R_{\max}$  were evaluated as previously described (Mollard et al. 1989; Willams, 1995).

Caffeine is reported to quench indo-1 fluorescence (O'Neill et al. 1990). In our system, caffeine quenched the F405 and F480 signals in a disproportional fashion. This led to a  $Ca^{2+}$  independent increase in the F405/F480 ratio. For this reason, fluorescence signals in experiments using caffeine have been corrected to compensate for disproportional quench.

### **Pharmacological agents**

Caffeine solutions (5 mM to 50 mM) were prepared by dissolving caffeine in HBSS and reducing the  $Na^+$  concentration to maintain an osmolality of 290 mOsm/kg. A 0.1 mM stock solution of rat GHRH (8068; Peninsula Laboratories, inc., Belmont, CA) was prepared in a diluent containing 0.1% BSA, 1 mM ascorbic acid and 0.01 N acetic acid. Aliquots of the stock solution were stored at  $-20^\circ C$  and were thawed, and diluted in HBSS immediately before use. Frozen aliquots of

10 mM ryanodine (559276; Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA) in water were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and were thawed and diluted in appropriate media immediately before use. A stock solution of 1.5 mM thapsigargin (T-9033; Sigma chemical co., St-Louis, MO) in DMSO was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and aliquots were diluted in appropriate media immediately before use. Aliquots of 5 mM 4-bromo-A23187 (Br-A23187) and 5 mM ionomycin (100107; 407950; Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA), in DMSO were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and were diluted in immediately before use.

### **Statistical analysis**

Each experimental protocol was carried out on at least two different cell preparations. We considered that a cell responded to a pharmacological agent if one of two conditions was met. Either the average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  after the application of the agent was outside the 95% confidence interval of the average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  before the application or the peak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  after the application was greater than twice the standard deviation of the average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  before the application. In most cases both conditions were met. To quantify the effects of pharmacological agents on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  we used 4 parameters: the basal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , the average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , the peak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , and the amplitude of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  response. The data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for each parameter. Error bars in figures represent standard error of the mean. Comparisons of two means were carried out using the paired or un-aired *t*-tests. Comparisons of more than two means were carried out using single

factor analyses of variance, followed by Dunnett's test for multiple comparisons.

When  $P < 0.05$ , differences were considered to be statistically significant.

## Results

### **Presence of intracellular calcium stores in 3-day cultured rat somatotrophs.**

To confirm the presence of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in three-day cultured rat somatotrophs, we exposed cells to  $\text{Ca}^{2+}$  ionophores in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . A continued exposure to either 10  $\mu\text{M}$  ionomycin or 10  $\mu\text{M}$  Br-A23187 transiently raised the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fig. 1). We found that 74% of cells tested (17 out of 23) released intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  when treated with ionomycin, and 92% (24 out of 26) responded to Br-A23187 (Table 1). As shown in figure 1,  $\text{Ca}^{2+}$  release may be substantial resulting in increase in average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  of  $440 \pm 90$  nM and  $380 \pm 60$  nM for ionomycin and Br-A23187, respectively. The peak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  were  $1345 \pm 170$  nM and  $1390 \pm 190$  nM.

### **Effects of caffeine on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .**

To determine whether the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was sequestered in calcium-induced calcium release (CICR) stores, we challenged somatotrophs with varying concentrations of caffeine, in the presence or absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . With the concentration varying between 5 mM and 50 mM, 65% of cells tested (194 out of 299) responded to caffeine by raising their  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fig. 2). In the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  response, expressed as the peak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , saturated at 5 mM caffeine. The proportion of responsive cells tended to increase and the variability of the response to decrease at the higher concentrations (Table 2). The basal calcium level in caffeine-sensitive cells ( $410 \pm 30$  nM) was significantly lower

than in unresponsive cells ( $765 \pm 90$  nM). In the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  response saturated at 15 mM caffeine. At higher concentrations, the proportion of responding cells tended to increase, and the variability of the peak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tended to decrease (Table 2). The caffeine-sensitive cells had a basal calcium level ( $340 \pm 20$  nM) significantly lower than for the unresponsive cells ( $640 \pm 40$  nM). As shown in Fig. 2, 40 mM caffeine produced a significant, rapid, and transient increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . In normal  $\text{Ca}^{2+}$ -containing medium, the increase in the average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and the maximum amplitude of the response were  $770 \pm 110$  nM and  $1140 \pm 290$  nM, respectively ( $n=21$ ). In  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium the increase in the average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and maximum amplitude were  $360 \pm 50$  nM and  $710 \pm 200$  nM ( $n=19$ ). The mean amplitude of the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was greater for cells incubated in medium containing 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3). This difference could be attributable to the depolarizing effect of caffeine, and a subsequent influx of  $\text{Ca}^{2+}$  (Barros et al. 1996). For this reason we chose to use 40 mM caffeine in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium as our standard treatment.

#### **Effects of thapsigargin and ryanodine treatments on the caffeine response.**

To confirm that caffeine-induced increases in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  were due to release of intracellularly stored  $\text{Ca}^{2+}$ , we treated rat somatotrophs with thapsigargin and with ryanodine.

As a first control we determined that the caffeine-induced release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was reversible and repeatable (Fig. 4A). We challenged cells a first time with a 15 s exposure to 40 mM caffeine in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium. Indo-1

excitation was then turned off to avoid excessive photobleaching of indo-1, and the cells were allowed to recover for 5 min. The cells were then challenged a second time with caffeine. The second exposure released  $\text{Ca}^{2+}$  in 89% of the initially caffeine-sensitive cells (17 out of 19). However, the increase in the average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and the peak concentration of the second response were  $35 \pm 10\%$  and  $55 \pm 5\%$  lower than that of the first response, respectively.

Rat somatotrophs were treated with thapsigargin to empty all intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. Following an initial standard caffeine treatment, individual cells were exposed for 1 min to 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium. At this concentration the inhibitor is reported to block irreversibly SERCAs (Bian et al. 1991; Thastrup et al. 1990; Willams, 1995). The cells were allowed to recover, without indo-1 excitation, for 9 min before being exposed to thapsigargin. Following this treatment, caffeine-induced release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was significantly reduced, and 85% of cells tested (11 out of 13) no longer responded to caffeine (Fig. 4B). To confirm that the thapsigargin treatment emptied intracellular stores, we treated the cells with ionophores. The cells were exposed to 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin for 1 min, in the presence or absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . They were allowed to recover for 4 min, and then exposed to either 10  $\mu\text{M}$  ionomycin or 10  $\mu\text{M}$  Br-A23187 in  $\text{Ca}^{2+}$  free medium. In all cases ( $n=20$ ) the ionophores failed to raise  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Table 1), thus confirming that the stores were empty.

We used ryanodine to prevent the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from CICR stores. Since ryanodine binds to its open receptor (Barry and Cheek, 1994) we exposed the cells to ryanodine while opening the channel with caffeine and calcium. We challenged the

cells with caffeine and let them recover without indo-1 excitation. We treated the cells with the 10  $\mu$ M ryanodine and 40 mM caffeine in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium for 2.5 min after an initial 2.5 min recovery. We let the cells recover for another 5 min before resuming indo-1 excitation. Under these conditions a second caffeine treatment failed to raise  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in all caffeine-sensitive cells tested ( $n=15$ ) (Fig. 4C). This result confirmed the presence of functional caffeine- and ryanodine-sensitive CICR  $\text{Ca}^{2+}$  stores in somatotrophs.

#### **Effect of GHRH on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .**

Stimulation with 10 nM GHRH for 5 s raised  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in 93% of tested rat somatotrophs (141 out of 152) (Fig. 5A). More than half of the responsive cells (81 out of 141; 57%) spontaneously generated  $\text{Ca}^{2+}$  transients. The average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increased from the pre-GRF value of  $600 \pm 20$  nM to the post-GRF value of  $1470 \pm 80$  nM and the peak concentration was  $2175 \pm 180$  nM. To determine whether somatotrophs that possess CICR stores also respond to GHRH, we stimulated caffeine-sensitive somatotrophs with 10 nM GHRH for 5 s (Fig. 5B). All the cells tested ( $n=15$ ) raised their  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in response to GHRH. The average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increased by  $390 \pm 70$  nM and the peak concentration was  $835 \pm 120$  nM.

#### **Effects of ryanodine and thapsigargin on GHRH-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .**

To determine if calcium stores are involved in the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  response to GHRH, we inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  release from the stores with ryanodine or thapsigargin.

As a control, we determined that the  $[Ca^{2+}]_i$  response to 10 nM GHRH was reversible and repeatable (Fig. 6A). We exposed cells to 10 nM GHRH for 5 s, then let them recover for 10 min with the indo-1 excitation turn off, and finally stimulated them a second time with GHRH. The second exposure to GHRH increased  $[Ca^{2+}]_i$  in 86% of initially responsive cells (59 out of 69). During the first response, the average  $[Ca^{2+}]_i$  increased by  $958 \pm 132$  nM, while it only increased by  $598 \pm 72$  nM following the second GHRH exposure. The increase in average  $[Ca^{2+}]_i$  of the second response was  $330 \pm 105$  nM smaller than the first response a 38% reduction (Fig 7).

With the aim of determining if  $Ca^{2+}$  release from CICR stores contributes significantly to the GHRH  $[Ca^{2+}]_i$  response, we compared the reduction in the second GHRH response after ryanodine treatment with that of the control situation. We exposed the cells to 10 nM GHRH for 5 s, and recorded the response for at least 1 min. After the first response was observed the indo-1 excitation was turn off and the cells were allowed to recover for 2.5 min. They were then treated with 10  $\mu$ M ryanodine and 40 mM caffeine in  $Ca^{2+}$ -free medium for 2.5 min. The somatotrophs were allowed to recover for a further 5 min before they were stimulated a second time with GHRH (Fig. 6B). A second increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was produced in 80% of initially GHRH-responsive somatotrophs (28 out of 35). Surprisingly, the increase in the average  $[Ca^{2+}]_i$  of the second GHRH response was no different from the first (Fig. 7)

To determine if intracellular  $Ca^{2+}$  stores other than the CICR stores contribute significantly to the GHRH-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$ , we treated cells with thapsigargin. We exposed the cells to 10 nM GHRH for 5 s, and recorded the

response for at least 1 min. After the first response was observed, the indo-1 excitation was turned off and the cells were allowed to recover for 9 min. They were then treated with 1  $\mu$ M thapsigargin in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium for 1 min. The somatotrophs were then stimulated a second time with GHRH (Fig. 6C). The second GHRH exposure produced a second  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  response in 71% of initially responsive somatotrophs (36 out of 51). The increase in the average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  of the second response ( $399 \pm 70$  nM) was smaller than the first ( $1002 \pm 138$  nM) by  $600 \pm 130$  nM, a 60% reduction (Fig. 7). The reduction in the second GHRH response following the thapsigargin treatment was 68% greater than the reduction observed following the second GHRH challenge in the control situation.

## Discussion

The purpose of this study was to demonstrate the presence of CICR  $\text{Ca}^{2+}$  stores in GHRH-responsive somatotrophs and to determine their function in GHRH-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  signalling.

### **CICR $\text{Ca}^{2+}$ pools in rat somatotrophs.**

It has been clearly established that the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  produced by GHRH is dependent on a voltage-dependent and dihydropyridine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  influx (Holl et al. 1988; Lussier et al. 1991; Kato et al. 1992). On the other hand, the use of ionophores revealed the presence of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in rat somatotrophs (Holl et al. 1989; Lussier et al. 1991). The existence of these stores was confirmed by the observations that thapsigargin and ryanodine transiently raised  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  when cells were incubated in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium (Bresson-Bépoldin and Dufy-Barbe, 1994; Herrington and Hille, 1994). The use of ionophores for the study of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores is based on the presumption that they partition in organelle membranes as well as in the plasma membrane. If the extracellular medium is devoid of  $\text{Ca}^{2+}$  any increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  can only be attributable to the release of intracellularly sequestered  $\text{Ca}^{2+}$  through the ionophore channel. Not only did ionophores transiently raise  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in our study, the increase was suppressed when putative  $\text{Ca}^{2+}$  stores were emptied by thapsigargin. Thus our results confirm that the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  produced by ionophores is due to the release of stored  $\text{Ca}^{2+}$  in rat somatotrophs.

Herrington and Hille (1994) reported that ryanodine raised  $[Ca^{2+}]_i$  in rat somatotrophs, suggesting that a CICR  $Ca^{2+}$  pool was present in these cells. In the current study, a transient increase in  $[Ca^{2+}]_i$  produced by caffeine and its inhibition by both thapsigargin and ryanodine confirm the presence of CICR stores are indeed present.

Only 65% of the cells tested responded to caffeine. This raises the question of whether all somatotrophs have CICR  $Ca^{2+}$  pools. The cell preparation is made up of 94% somatotrophs (Lussier et al. 1991), and in this study 93% of all cells tested responded to GHRH. Therefore, at least 30% of the somatotrophs were insensitive to caffeine. The basal  $[Ca^{2+}]_i$  before the caffeine treatment was higher in cells that did not respond than in cells that did. It is probable that in our non-responding cells the  $[Ca^{2+}]_i$  was sufficiently high to maintain a large proportion of ryanodine receptors in the open state before the caffeine challenge (Sutko et al. 1997). Consequently the CICR stores were empty in these cells.

When somatotrophs were exposed to two 40 mM caffeine challenges, the second response was 35% smaller than the first. An obvious explanation would be that the 5 min recovery period between exposures was not long enough to allow the CICR pool to refill completely. A portion of the released  $Ca^{2+}$  would have been extruded from the cell by plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase and  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchangers, and therefore not resealed.

Thapsigargin prevented the expected transient increase in  $[Ca^{2+}]_i$  when somatotrophs were exposed to caffeine. Clearly, thapsigargin treatment resulted in the complete emptying of intracellular  $Ca^{2+}$  stores. This conclusion is reinforced by

the observation that neither ionomycin nor Br-A23187 produced a typical  $[Ca^{2+}]_i$  response in thapsigargin pre-treated cells incubated in  $Ca^{2+}$ -free medium. Therefore, caffeine-dependent increase in  $[Ca^{2+}]_i$  is due to the mobilisation of intracellularly stored  $Ca^{2+}$ .

That a 10  $\mu$ M ryanodine treatment prevented caffeine induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in all cases strongly suggests that caffeine acts at the ryanodine receptor. We considered the ryanodine concentration that we chose to be high, consequently we assumed that the ryanodine receptor would be closed by its ligand (Meissner, 1986). It then follows that caffeine would not be able to release  $Ca^{2+}$  from the CICR stores.

### **CICR $Ca^{2+}$ pools and the GHRH-induced calcium signal**

Before investigating the role of CICR pools in the GHRH-induced calcium signal, it was necessary to demonstrate that CICR and GHRH-dependent calcium signalling could occur in the same cell. This is clearly the case since cells that responded to caffeine also raised their  $[Ca^{2+}]_i$  when stimulated with GHRH. The strategy that we adopted to determine the involvement of CICR in the generation of the GHRH-dependent  $Ca^{2+}$  signal consisted in quantifying the difference between a first and a second GHRH response in individual cells. We then compared this difference with that observed in cells that were treated with either ryanodine or thapsigargin before the second GHRH stimulation.

We found that the increase in average  $[Ca^{2+}]_i$  for the second response to GHRH was 38% lower than the first. If CICR is involved in the production of a GHRH  $Ca^{2+}$  signal, we would expect a greater reduction in the second GHRH  $[Ca^{2+}]_i$

response when CICR was inhibited by either ryanodine or thapsigargin. Surprisingly, not only did the ryanodine treatment not lead to a further reduction in the second GHRH  $[Ca^{2+}]_i$  response, but it abolished the reduction altogether. Thapsigargin, on the other hand did further reduce the second response.

The lack of decrease in the  $[Ca^{2+}]_i$  of the second response to GHRH in cells treated with 10  $\mu$ M ryanodine could be due to an increased  $Ca^{2+}$  influx. Ryanodine has been reported to alter the selectivity of  $K^+$  channels of locust and mouse muscle (Vais et al. 1996).  $Ca^{2+}$ -activated- $K^+$  (BK) channels become permeable to  $Na^+$ , as indicated by a positive shift in the single channel reversal potential. Rat somatotrophs also have  $Ca^{2+}$ -activated- $K^+$  channels (Sims et al. 1991). GHRH is thought to depolarise somatotrophs in a cAMP-dependent fashion. The depolarisation activates voltage-sensitive L-type  $Ca^{2+}$  channels that results in an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (Kato et al. 1992). The latter leads to the activation of BK channels, repolarisation of the membrane, and finally the deactivation of  $Ca^{2+}$  channels. If BK channels become permeable to  $Na^+$ , then the opening of the channel would not be as repolarising as if it were permeable only to  $K^+$ . Consequently the  $Ca^{2+}$  channels would stay activated longer and  $Ca^{2+}$  influx would be greater. This greater  $Ca^{2+}$  influx could more than compensate for the ryanodine-dependent inhibition of  $Ca^{2+}$  mobilisation from the CICR pool during GHRH stimulation.

As expected, thapsigargin treatment further reduced the second GHRH response. The reduction was 67% greater than in the control condition. This means that at least 33% of the  $[Ca^{2+}]_i$  response was due to the mobilisation of stored  $Ca^{2+}$ . It is clear that thapsigargin totally empties CICR and  $IP_3$ -sensitive stores. Since the

effect of ryanodine on the putative GHRH-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation is masked by a putative depolarisation-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx, we cannot conclude that  $\text{Ca}^{2+}$  is mobilised from CICR pools exclusively. However, GHRH does not stimulate  $\text{IP}_3$  production (French et al. 1990), thus the involvement of  $\text{IP}_3$ -sensitive pools is unlikely. Furthermore thapsigargin does suppress  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation from CICR stores. The results presented here strongly suggest, though not unequivocally, that CICR stores are involved in the generation of the GHRH-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signal.

### **Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ stores and somatotroph desensitisation**

Let us consider what might be happening from the point of view of  $\text{Ca}^{2+}$  stores during repeated GHRH exposures. GHRH raises  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by activating a voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx (Lussier et al. 1991). The resulting increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  would lead to the opening of ryanodine receptors and the release of stored  $\text{Ca}^{2+}$ . In response to the elevated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  the activity of both SERCA and plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases would increase (Carafoli, 1994; Inesi et al. 1992). Not all the released  $\text{Ca}^{2+}$  would be resequestered during the recovery period, thus the luminal  $\text{Ca}^{2+}$  concentration would be lower than before the GHRH treatment. This would result in a greater SERCA transport rate for a given  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  since luminal  $\text{Ca}^{2+}$  inhibits SERCA (Inesi et al. 1992). At the time of the second GHRH stimulation, the amount of releasable  $\text{Ca}^{2+}$  would be less and SERCAs would remove  $\text{Ca}^{2+}$  from the cytosol more efficiently. Both these phenomena could account for the reduction in average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in response to the second GHRH.

It is well known that repeated exposures to GHRH stimulate somatotrophs to release GH repeatedly, however, the amount of hormone released decreases after each stimulation (Kraicer et al. 1988). The decrease in GH secretion, or somatotroph desensitisation, has been attributed to down-regulation of GHRH receptors, or depletion of the readily releasable pool of GH. The smaller increase in average  $[Ca^{2+}]_i$  following the second GHRH could also be due to down-regulation. However, it is noteworthy that a second exposure to 40 mM caffeine also produced a second response that was 35% smaller than the first. Since this cannot be attributed to GHRH desensitisation, we now see that the apparent decrease in GHRH responsiveness could also be due to a decreased  $Ca^{2+}$  signal.

In summary, we have shown that rat somatotrophs do indeed possess CICR  $Ca^{2+}$  stores. We find that intracellular  $Ca^{2+}$  stores are responsible for 33% of the increase in average  $[Ca^{2+}]_i$  following 10 nM GHRH stimulation in somatotrophs. Ryanodine is an inappropriate tool for quantifying the contribution of CICR to the generation of  $Ca^{2+}$  signals. Finally we propose that the progressive depletion of  $Ca^{2+}$  pools during repeated GHRH stimulation contributes to an apparent somatotroph desensitisation.

## **Acknowledgments**

This work was funded by grant OGP0138138 from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and grant NC-1189 from the "Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche" (FCAR) of the Province of Quebec.

## References

- Barros, F., del Camino, D., Pardo, L.A. and de la Peña, P. 1996. Caffeine enhancement of electrical activity through direct blockade of inward rectifying  $K^+$  currents in GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *Pflügers Arch.* **431**: 443-451.
- Barry, V.A. and Cheek, T.R. 1994. A caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular  $Ca^{2+}$  store can act as a  $Ca^{2+}$  source and a  $Ca^{2+}$  sink in PC12 cells. *Biochem. J.* **300**: 589-597.
- Bian, J., Ghosh, T.K., Wang, J.-C. and Gill, D. 1991. Identification of intracellular calcium pools. Selective modification by thapsigargin. *J. Biol. Chem.* **266**: 8801-8806.
- Bilezikjian, L.M. and Vale, W.W. 1983. Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* **113**: 1726-1731.
- Blake, A.D. and Smith, R.G. 1991. Desensitization studies using perfused rat pituitary cells show that growth hormone-releasing hormone and

His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> stimulate growth hormone release through distinct receptor sites. *J. Endocrinol.* **129**: 11-19.

Bresson-Béopoldin, L. and Dufy-Barbe, L. 1994. GHRP-6 induces a biphasic calcium response in rat pituitary somatotrophs. *Cell Calcium* **15**: 247-258.

Carafoli, E. 1994. Biogenesis: Plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J.* **8**: 993-1002.

French, M.B., Lussier, B.T., Moor, B.C. and Kraicer, J. 1989. Effect of growth hormone-releasing factor (GRF) on phospholipase C activity in purified rat somatotrophs. *Physiology Canada* **20**: 103. (Abstract)

French, M.B., Lussier, B.T., Moor, B.C. and Kraicer, J. 1990. Effect of growth hormone-releasing factor on phosphoinositide hydrolysis in somatotrophs. *Mol. Cell. Endocrinol.* **72**: 213-220.

Frohman, L.A., Downs, T.R. and Chomczvnski, P. 1992. Regulation of growth hormone secretion. *Front. Neuroendocrinol.* **13**: 344-405.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450.

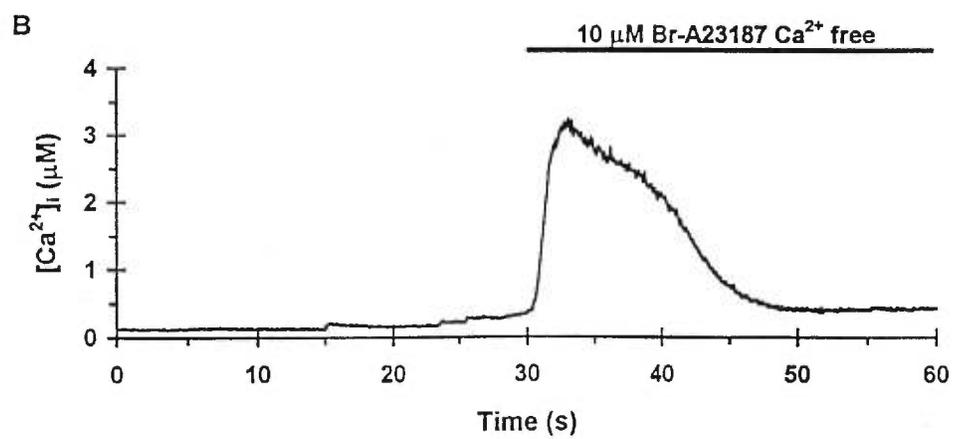
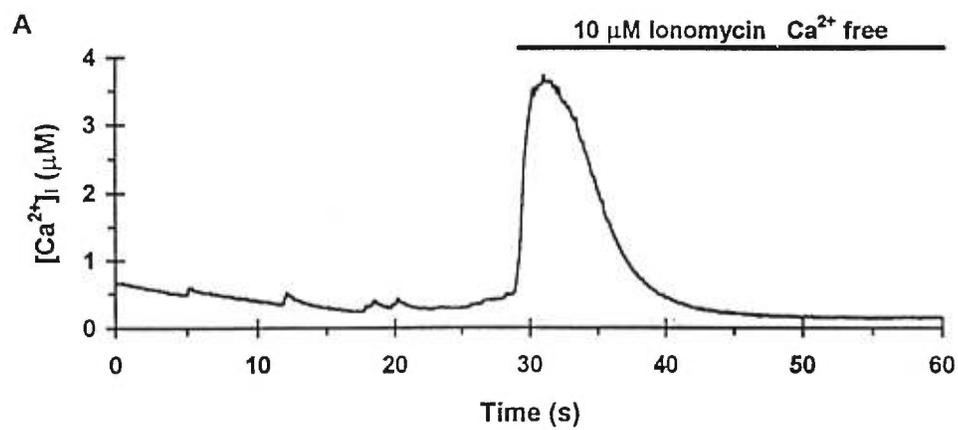
- Herrington, J. and Hille, B. 1994. Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms. *Endocrinology* **135**: 1100-1108.
- Holl, R.W., Thorner, M.O. and Leong, D.A. 1988. Intracellular calcium concentration and growth hormone secretion in individual somatotropes: effects of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* **122**: 2927-2932.
- Holl, R.W., Thorner, M.O., Zysk, J.R. and Leong, D.A. 1989. Ionophore bromo-A23187 reveals cellular calcium stores in single pituitary somatotropes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **64**: 105-110.
- Inesi, G., Cantilina, T., Yu, X., Nikic, D., Sagara, Y. and Kirtley, M.E. 1992. Long-range intramolecular linked functions in activation and inhibition of SERCA ATPases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **671**: 32-47.
- Kato, M., Hoyland, J., Sikdar, S.K. and Mason, W.T. 1992. Imaging of intracellular calcium in rat anterior pituitary cells in response to growth hormone releasing factor. *J. Physiol. (Lond.)* **447**: 171-189.

- Kraicer, J., Lussier, B., Moor, B.C. and Cowan, J.S. 1988. Failure of growth hormone (GH) to feed back at the level of the pituitary to alter the response of the somatotrophs to GH-releasing factor. *Endocrinology* **122**: 1511-1514.
- Lussier, B.T., French, M.B., Moor, B.C. and Kraicer, J. 1991. Free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-Releasing factor-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx raises  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . *Endocrinology* **128**: 570-581.
- Mau, S.E., Witt, M.R., Bjerrum, O.J., Saermark, T. and Vilhardt, H. 1995. Growth hormone releasing hexapeptide (GHRP-6) activates the inositol (1,4,5)-trisphosphate/diacylglycerol pathway in rat anterior pituitary cells. *J. Recep. Sign. Transduc. Res.* **15**: 311-323.
- Meissner, G. 1986. Ryanodine activation and inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **261**: 6300-6306.
- Mollard, P., Guerineau, N., Audin, J. and Dufy, B. 1989. Measurement of  $\text{Ca}^{2+}$  transients using simultaneous dual-emission microspectrofluorimetry and electrophysiology in individual pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 1045-1052.

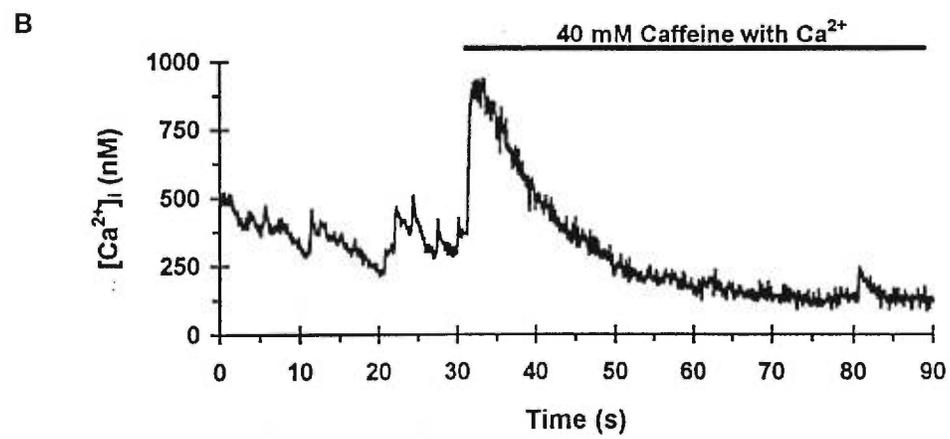
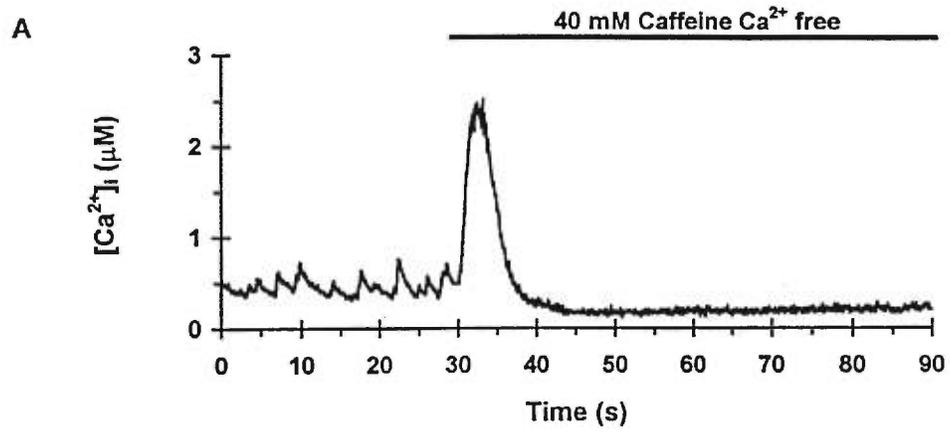
- O'Neill, S.C., Donoso, P. and Eisner, D.A. 1990. The role of  $[Ca^{2+}]_i$  and  $[Ca^{2+}]_o$  sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  and [caffeine]<sub>i</sub>. *J. Physiol. (Lond.)* **425**: 55-70.
- Schöfl, C., Sandow, J. and Knepel, W. 1987. GRF elevates cytosolic free calcium concentration in rat anterior pituitary cells. *Am. J. Physiol.* **253**: E591-E594.
- Sims, S.M., Lussier, B.T. and Kraicer, J. 1991. Somatostatin activates an inwardly rectifying  $K^+$  conductance in freshly dispersed rat somatotrophs. *J. Physiol. (Lond.)* **441**: 615-637.
- Sutko, J.L., Airey, J.A., Welch, W. and Ruest, L. 1997. The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacol. Rev.* **49**: 53-98.
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drøbak, B.K., Hanley, M.R. and Dawson, A.P. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 2466-2470.
- Vais, H., Rucareanu, C. and Usherwood, P.N.R. 1996. Ryanoids change the permeability of potassium channels of locust (*Schistocerca gregaria*) muscle. *Pflüg. Arch.* **432**: 700-707.

Willams, D.A. 1995. Fluorescence imaging of cytosolic calcium: An introduction to basic experimental principles. In Measurement and manipulation of intracellular ions. Edited by J. Kraicer and S.J. Dixon. Academic Press, Inc, San diego. pp. 69-80.

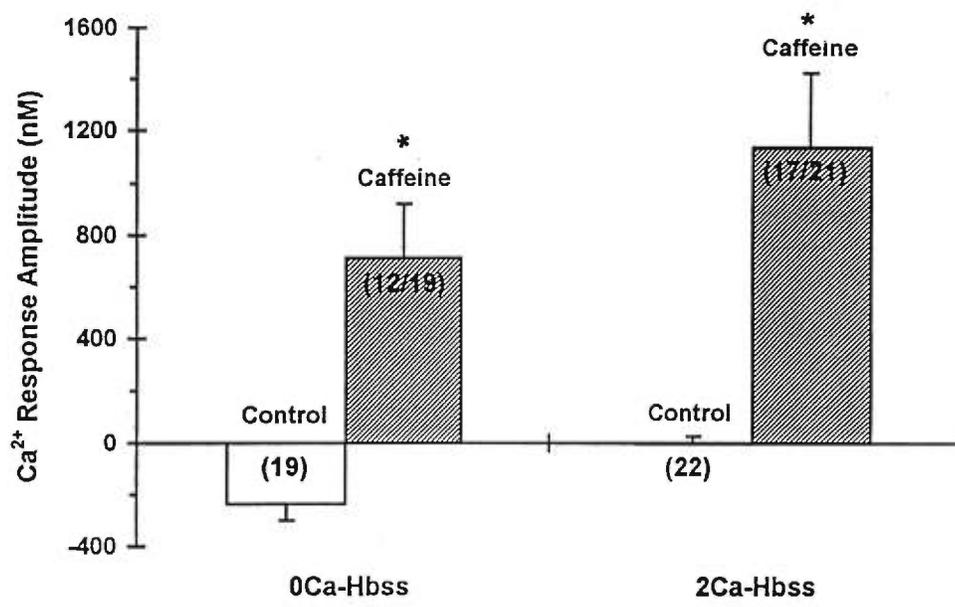
**Fig. 1.** Ionophore-induced release of intracellularly stored  $\text{Ca}^{2+}$ . Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was measured in single rat somatotroph using the indo-1 ratiometric method. The solid bars indicate the time and duration of the pressure ejection of ionophores dissolved in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium. Cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in a medium containing 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . **A** Calcium release induced by 10  $\mu\text{M}$  ionomycin. **B** Calcium release induced by 10 $\mu\text{M}$  4-Br-A23187.



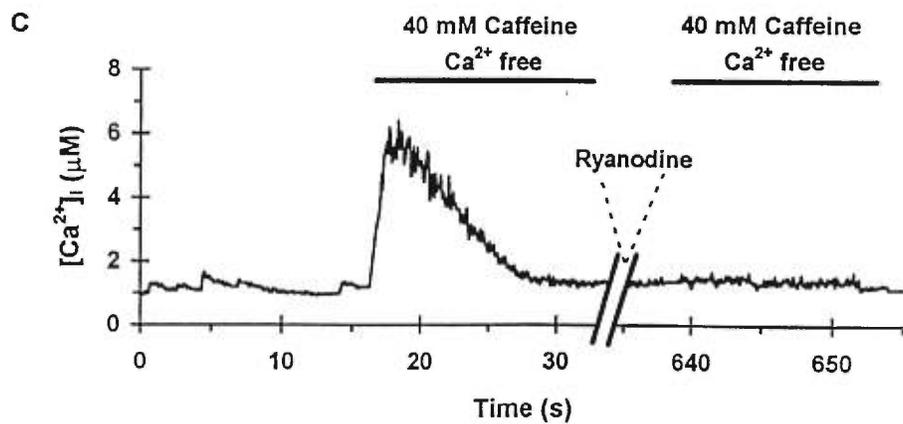
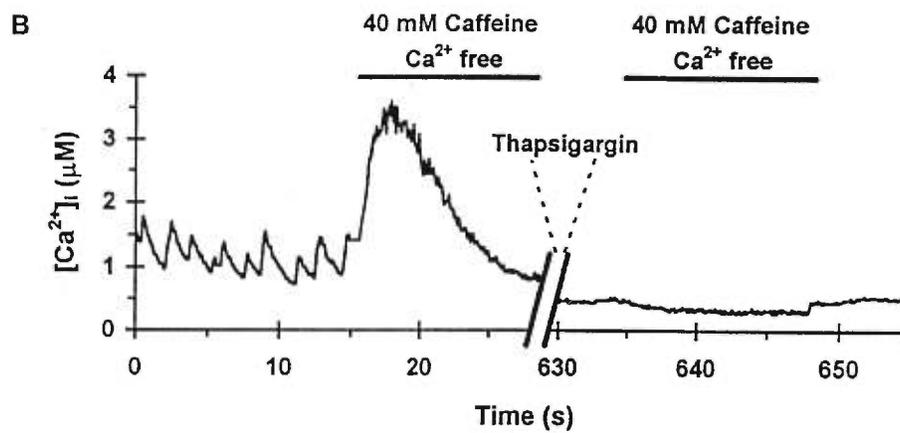
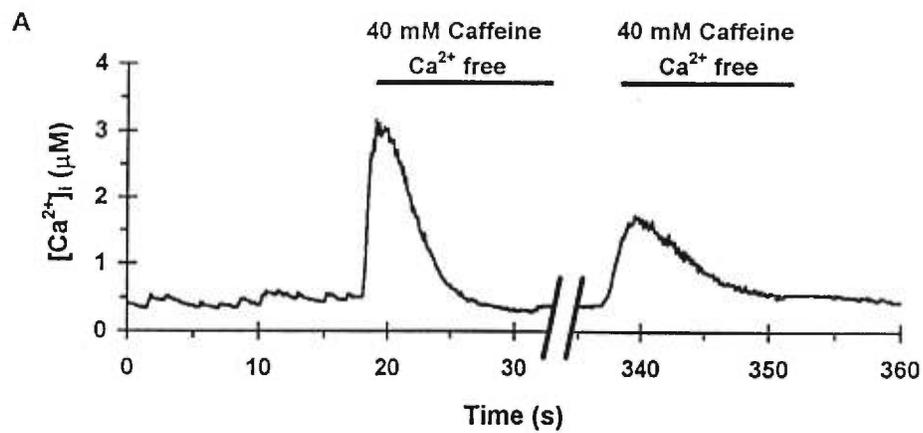
**Fig. 2.** Caffeine-induced release of intracellularly stored  $\text{Ca}^{2+}$ . Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was measured in single rat somatotroph using the indo-1 ratiometric method. The traces are quench corrected. The solid bars indicate the time and duration of the pressure ejection of 40 mM caffeine. Cells were incubated at 37° C in a medium containing 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . **A** Caffeine was dissolved in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium. **B** Caffeine was dissolved in the incubation medium containing 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .



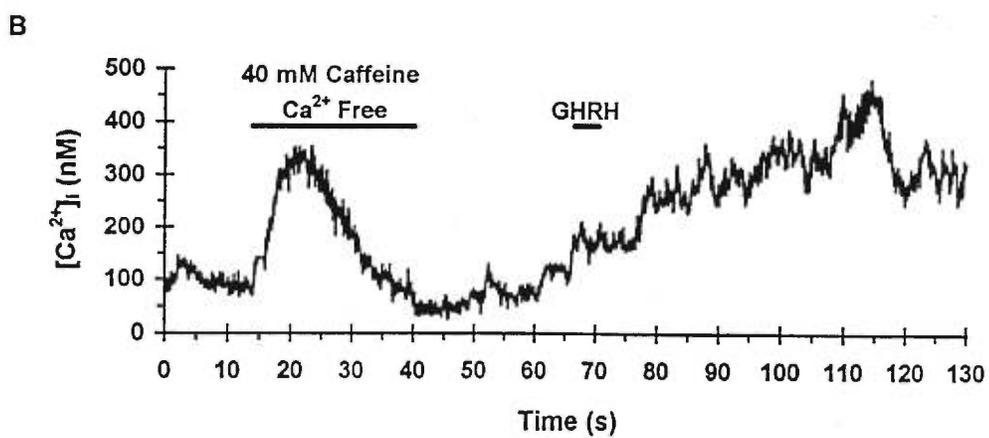
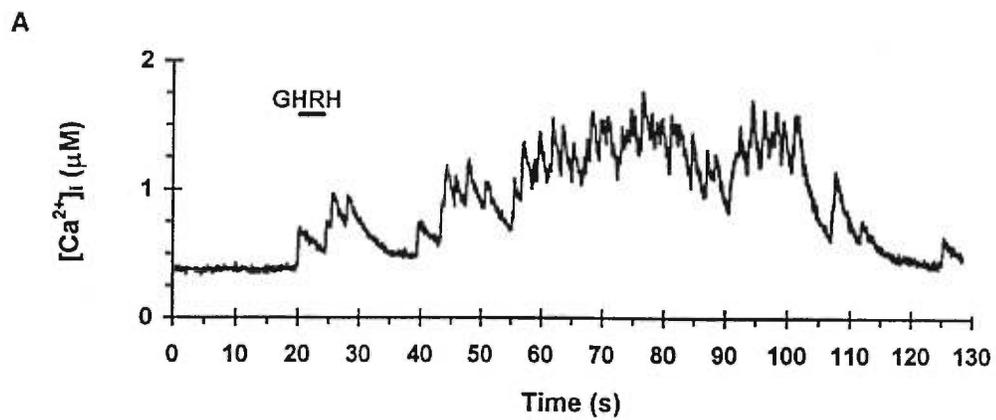
**Fig. 3.** Amplitude of the  $[Ca^{2+}]_i$  response to 40 mM caffeine. For controls, the response amplitude was calculated as the peak  $[Ca^{2+}]_i$  during the pressure ejection of media containing either no  $Ca^{2+}$  or 2 mM  $Ca^{2+}$  minus the basal (inter transient)  $[Ca^{2+}]_i$  before the ejection. For caffeine, the amplitude was calculated as the peak  $[Ca^{2+}]_i$  during the caffeine treatment minus the basal  $[Ca^{2+}]_i$  before the treatment in responsive cells. The proportion of responsive cells is indicated in parentheses. The error bars are SEM and asterisks indicate values significantly different from their control ( $p < 0.05$ ).



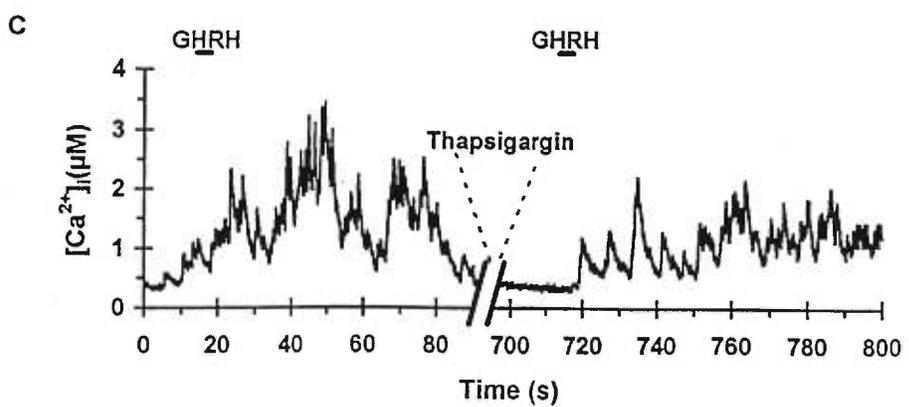
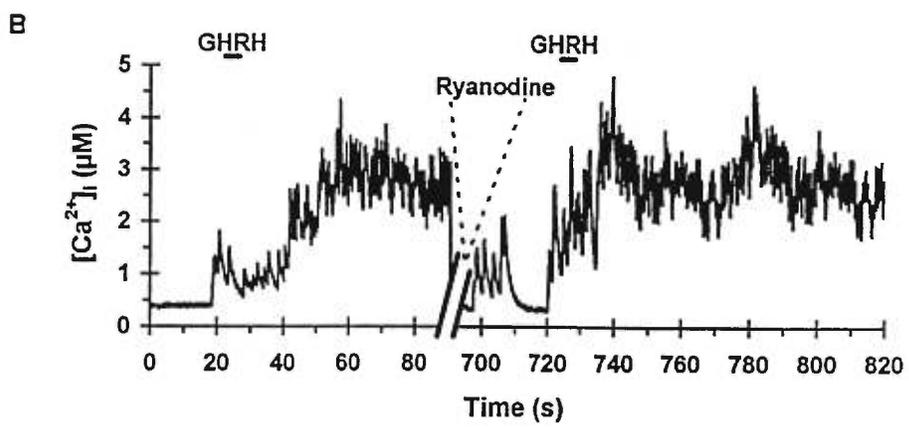
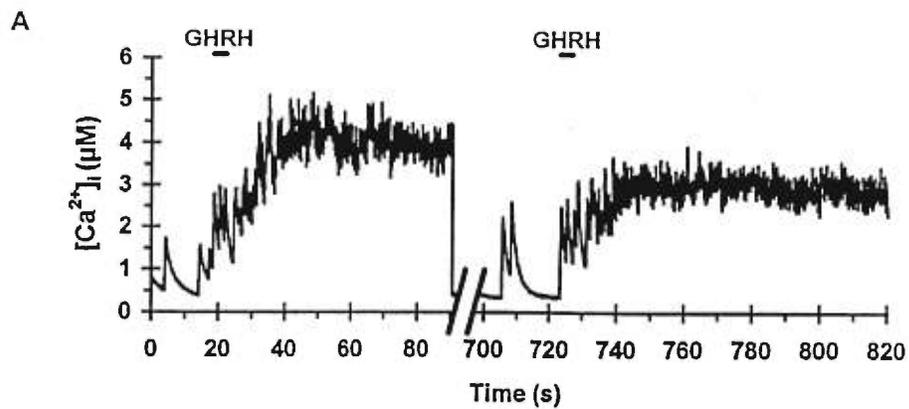
**Fig. 4.** Effects of ryanodine and thapsigargin on caffeine-induced release of intracellularly stored  $\text{Ca}^{2+}$ . Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was measured in single rat somatotroph using the indo-1 ratiometric method. Traces are quench corrected. The solid bars indicate the time and duration of the pressure ejection of 40 mM caffeine in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium. Cells were incubated at 37° C in a medium containing 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Breaks in the traces and time axes indicate a recovery/treatment period during which the light source for the excitation of indo-1 was turned off. **A** Two caffeine exposures separated by a 5 min recovery period. **B** Two caffeine exposures separated a thapsigargin treatment. The treatment consisted of 9 min recovery period followed by a 1 min exposure to 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium. **C** Two caffeine exposures separated by a ryanodine treatment. The treatment consisted of a 2.5 min recovery followed by a 2.5 min exposure to 10  $\mu\text{M}$  ryanodine and 40 mM caffeine, followed by a second 5 min recovery.



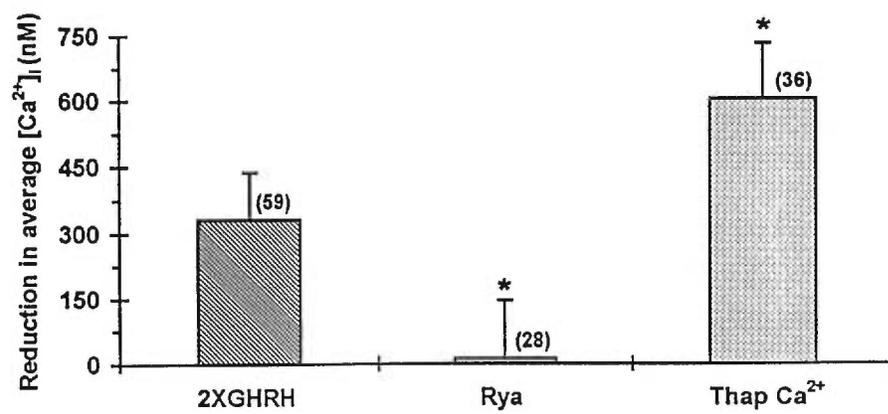
**Fig. 5.** Effect of GHRH in caffeine responsive somatotrophs. Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was measured in single rat somatotroph using the indo-1 ratiometric method. Traces are quench corrected. The solid bars indicate the time and duration of the pressure ejection of  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizing agents. The cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in a medium containing 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . **A** effect of 10 nM GHRH on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . **B** Effect of 10 nM GHRH on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in cells in which 40 mM caffeine in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium mobilizes intracellularly stored  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Fig. 6.** Effects of ryanodine and thapsigargin on GHRH-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . Cytosolic  $Ca^{2+}$  was measured in single rat somatotroph using the indo-1 ratiometric method. The solid bars indicate the time and duration of the pressure ejection of 10 nM GHRH. The cells were incubated at 37° C in a medium containing 2 mM  $Ca^{2+}$ . Breaks in the traces and time axes indicate a recovery/treatment period during which the light source for the excitation of indo-1 was turned off. **A** Two GHRH exposures separated by a 10 min recovery period. **B** Two GHRH exposures separated by a ryanodine treatment. The treatment consisted of a 2.5 min recovery, followed by a 2.5 min exposure to 10  $\mu$ M ryanodine with 40 mM caffeine, followed by a second 5 min recovery. **C** Two GHRH exposures separated a thapsigargin treatment. The treatment consisted of 9 min recovery period followed by a 1 min exposure to 1  $\mu$ M thapsigargin in  $Ca^{2+}$ -free medium.



**Fig. 7.** Effect of ryanodine and thapsigargin on the reduction of the average  $[Ca^{2+}]_i$  of the response to a second 10 nM GHRH exposure. Somatotrophs were challenged once with 10 nM GHRH, then exposed to different treatments before they were challenged a second time. Control (2XGHRH): no treatment during a the 10 min recovery; Rya: the cells were exposed to 10  $\mu$ M ryanodine for 2.5 min following an initial 2.5 min recovery and then allowed to recover for another 5 min; Thap  $Ca^{2+}$ -free: 1 min of 1  $\mu$ M thapsigargin in  $Ca^{2+}$ -free medium following a 9 min recovery; Thap  $Ca^{2+}$ : 1 min of 1  $\mu$ M thapsigargin in medium containing 2 mM  $Ca^{2+}$  following a 9 min recovery. The reduction was calculated as the amplitude of the first response minus the amplitude of the second response. The number of responsive cells is shown in parentheses for each protocol. The error bars are SEM and asterisks indicate values significantly different from their control ( $p < 0.05$ ).



**Table 1** Proportion of cells that raise cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in response to ionophores.

Treatment	% of responsive cells	number of cells tested
Ionomycin (10 $\mu\text{M}$ )	74	23
after 1 $\mu\text{M}$ thapsigargin + 0 $\text{Ca}^{2+}$ -Hbss	0	5
after 1 $\mu\text{M}$ thapsigargin + 2 $\text{Ca}^{2+}$ -Hbss	0	5
4-Bromo-A23187 (10 $\mu\text{M}$ )	92	26
after 1 $\mu\text{M}$ thapsigargin + 0 $\text{Ca}^{2+}$ -Hbss	0	5
after 1 $\mu\text{M}$ thapsigargin + 2 $\text{Ca}^{2+}$ -Hbss	0	5

**Table 2** Caffeine-dependent peak cytosolic calcium concentration in the presence or absence of extracellular calcium.

[Caffeine] (mM)	Peak $[Ca^{2+}]_i$ in 0 $Ca^{2+}$ (nM)	frequency % (m/n)	Peak $[Ca^{2+}]_i$ in 2 $Ca^{2+}$ (nM)	frequency % (m/n)
5	729 ± 130	47 (10/21)	1267 ± 295	67 (16/24)
10	904 ± 165	65 (13/20)	1293 ± 418	71 (15/21)
15	1386 ± 872	28 (5/18)	1620 ± 340	80 (16/20)
20	1166 ± 431	35 (7/20)	1220 ± 122	68 (15/22)
30	1086 ± 217	48 (11/23)	1334 ± 122	90 (18/20)
40	1333 ± 193	63 (12/19)	1430 ± 300	71 (17/21)
50	974 ± 220	82 (23/28)	1240 ± 134	73 (16/22)

Peak  $[Ca^{2+}]_i$  is expressed as a mean ± standard error of the mean, n=number of cells tested and m=number of responsive cells. 0  $Ca^{2+}$ =  $Ca^{2+}$ -free medium and 2  $Ca^{2+}$ = 2 mM  $Ca^{2+}$  medium.

## CHAPITRE 5

### DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Au moment de débiter cette étude, nous avions certaines hypothèses fondées sur les connaissances déjà acquises concernant le mécanisme CICR et la cellule somatotrope. Nous savions que la mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par ce type de mécanisme nécessite une augmentation initiale de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (44, 45, 46, 56, 86). De plus, il avait été établi que la cellule somatotrope répond à la stimulation de la GHRH par une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via des canaux calciques voltage-dépendants (13, 29, 44, 56) et non par une mobilisation calcique suite à la production d' $\text{IP}_3$  (10, 20, 27). Un autre élément primordial intervenant dans l'élaboration de nos hypothèses était que la sécrétion de la GH nécessite une augmentation de calcium cytoplasmique (55). Sur la base de ces prémices, nous avons élaboré un modèle cellulaire.

Selon notre modèle, la liaison de la GHRH à son récepteur membranaire induirait, via une dépolarisation membranaire, un influx de  $\text{Ca}^{2+}$ . Une fois le  $\text{Ca}^{2+}$  introduit dans le cytoplasme, il se lierait aux récepteurs ryanodine du stock CICR afin d'ouvrir le canal et de permettre la libération du contenu calcique, augmentant ainsi davantage la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (4, 5, 29, 86). Finalement, ce calcium cytoplasmique permettrait la sécrétion de GH. Nous escomptions donc que le stock calcique de

type CICR soit présent dans ce type cellulaire et intervienne comme amplificateur du signal calcique cytoplasmique déjà existant.

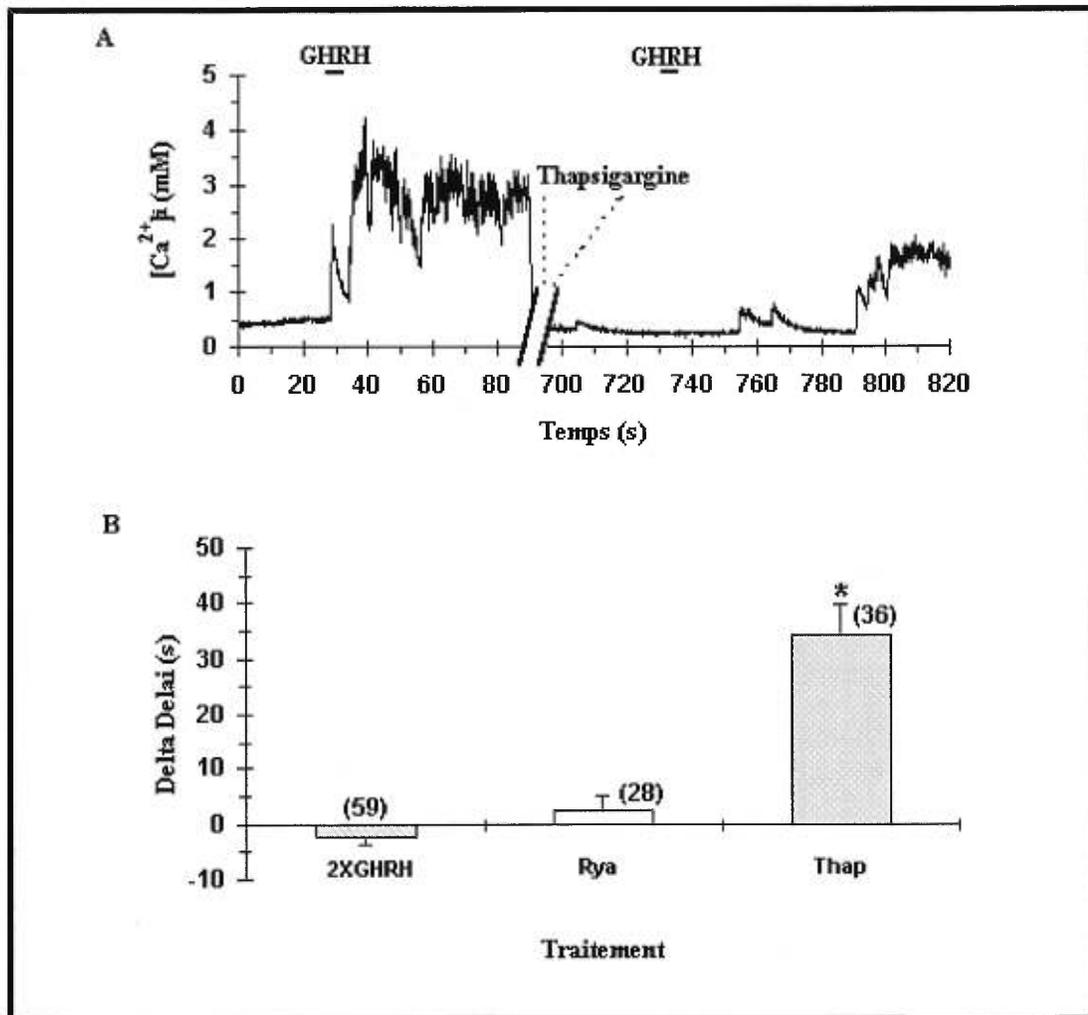
Notre hypothèse s'est avérée juste quant à la présence de compartiments calciques de type CICR dans la cellule somatotrope. En revanche, notre hypothèse quant au rôle d'amplificateur du stock CICR n'a pu que partiellement être vérifiée. Certains résultats obtenus et présentés dans ce mémoire sont des plus inattendus.

Pour identifier le stock CICR nous avons exploité les particularités de son récepteur: la sensibilité à la caféine et à la ryanodine. Une fois la sensibilité à la caféine clairement démontrée nous voulions vérifier la sensibilité à la ryanodine qui, lorsqu'utilisée à une concentration de l'ordre du nanomolaire, ouvre le canal du stock CICR alors qu'à une concentration de l'ordre du micromolaire elle ferme le canal. Dans un premier temps, nous avons tenté d'observer l'effet direct de la ryanodine sur la  $[Ca^{2+}]$  cytoplasmique. À faible concentration de ryanodine, nous nous attendions à une augmentation transitoire de la  $[Ca^{2+}]_i$  lorsque le milieu extracellulaire serait dépourvu de  $Ca^{2+}$ , toutefois aucun résultat ne fut concluant. Nous avons également testé l'effet d'une forte concentration de ryanodine sur la mobilisation calcique caféine dépendante. Pour optimiser l'effet de la ryanodine nous avons ouvert les canaux CICR au moment du traitement avec la ryanodine. La ryanodine inhibe l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  produite par la caféine, donc les stocks caféine sensibles sont aussi ryanodine sensibles, ce qui confirme la présence de stocks CICR.

Avant de déterminer l'effet de la ryanodine sur la réponse calcique induite par une stimulation à la somatocitrine (GHRH) nous devions savoir si une même cellule pouvait répondre à deux stimulations à la somatocitrine. Une cellule peut répondre à deux stimulations successives par la GHRH, mais la seconde réponse calcique est de moindre importance que la première (fig. 6A). À partir de ce moment, nous pouvions étudier les effets de la ryanodine sur la réponse à la GHRH. Dans le but de fermer le canal et donc d'empêcher la mobilisation du contenu calcique, la ryanodine à forte concentration (10  $\mu\text{M}$ ) est utilisée entre les deux stimulations à la GHRH (fig. 6B). Étonnement, la ryanodine élimine la diminution de la réponse calcique produite suite à la seconde stimulation à la GHRH plutôt que de l'augmenter (fig. 6B et 7). Cet effet de la ryanodine sur la seconde réponse calcique à la GHRH était inattendu et surprenant! Il peut s'expliquer par une action présumément dépolarisante de la ryanodine. La littérature fait mention d'un effet inhibiteur de la ryanodine sur la conductance des canaux potassiques (87). Cet effet aurait plusieurs implications au niveau de la membrane plasmique: une dépolarisation plus longue ou une hyperpolarisation retardée se traduisant toutes les deux par une durée d'ouverture plus longue pour les canaux calciques voltage-dépendants. Cette durée d'ouverture accrue ferait en sorte qu'une plus grande quantité de calcium pourrait entrer dans le cytoplasme suite à un traitement à la ryanodine et en réponse à une seconde stimulation par la GHRH. Cette présumée entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  masquerait une éventuelle diminution de la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisable du compartiment CICR.

Nous croyons que lors de la situation contrôle de la double stimulation à la GHRH (fig. 6A), la première augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à une stimulation par la GHRH, mobilise le calcium contenu dans le stock de type CICR. L'augmentation subite du contenu calcique du cytoplasme active le fonctionnement des pompes calciques de la membrane plasmique ainsi que celles du réticulum endoplasmique. Le calcium cytoplasmique étant rapidement pompé à l'extérieur de la cellule, il est fort possible que le contenu calcique du stock soit inférieur à ce qu'il était avant la première stimulation. Cette hypothèse a été vérifiée car les résultats de la double stimulation à la caféine abondent dans le même sens: après 5 minutes de pause la seconde augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , en réponse à une deuxième application de caféine, est toujours moindre que la première augmentation (fig. 4A). Donc, une stimulation de GHRH subséquente mobiliserait encore une fois le  $Ca^{2+}$  du stock CICR, mais cette fois-ci le  $Ca^{2+}$  mobilisable est en moindre quantité qu'au moment de la première stimulation, d'où une réponse calcique atténuée.

L'utilisation de la thapsigargine a donné des résultats tout à fait inattendus. En plus d'affecter significativement l'amplitude de la réponse calcique comme nous nous y attendions, la thapsigargine a prolongé le délai (fig. 5.1A) entre la stimulation par la GHRH et l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Figure 5.1: Délai produit par la thapsigargine dans la réponse calcique induite par la GHRH.** Le panneau A montre un tracé de la  $[Ca^{2+}]_i$  pour une cellule à laquelle nous avons appliqué deux éjections de GHRH (10 nM) de 5 secondes chacune et entre lesquelles il y a 9 minutes de repos, suivi d'une éjection de thapsigargine (1  $\mu$ M) durant 1 minute. Le panneau B présente l'effet de la ryanodine et de la thapsigargine sur les délais de la réponse calcique induite par la GHRH (10 nM), le delta délai étant la différence entre les délais de la seconde et de la première réponse.

La thapsigargine est reconnue pour inhiber spécifiquement le fonctionnement des SERCAs tout en permettant une fuite de  $Ca^{2+}$  vers le cytoplasme (8, 80, 85). Tous les cas rapportés dans la littérature mentionnent une augmentation marquée de la  $[Ca^{2+}]_i$  suite à l'application de la thapsigargine (59, 70).

Dans notre cas, aucune cellule testée à la thapsigargine a répondu par une hausse de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

Afin de nous assurer de l'effet de la thapsigargine sur les cellules somatotropes normales de rat, nous avons effectué deux types de contrôle. Sachant qu'une même cellule peut répondre à deux applications subséquentes de caféine, nous avons appliqué de la thapsigargine entre les deux éjections de caféine. Il en résulte une totale inhibition de la deuxième augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par la caféine. Ceci confirme que la source du  $Ca^{2+}$  libéré par la caféine est un sous-compartiment du réticulum endoplasmique et qu'il est complètement vidé par un traitement à la thapsigargine. La seconde confirmation de l'action de la thapsigargine vient d'une série d'expérimentations contrôles. Lors de la mise en contact des cellules avec un ionophore calcique, soit le 4-Bromo A23187 ou l'ionomycine (90), aucune des cellules préalablement traitées à la thapsigargine a produit une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Alors que l'exposition aux ionophores seuls a produit une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans 84 % des cellules testées. La conclusion s'impose d'elle même: la thapsigargine vide les compartiments calciques intracellulaires de la cellule somatotrope, mais suivant un modèle qui n'avait encore jamais été décrit avant nous. En effet, dans nos cellules somatotropes la thapsigargine ne produit pas cette augmentation marquée de la  $[Ca^{2+}]_i$  que plusieurs auteurs ont observé dans d'autres types cellulaires (59, 70).

Cette réponse atypique à la thapsigargine pourrait être une indication de l'importance des compartiments intracellulaires comme puits de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules somatotropes. En effet, l'équilibre calcique des compartiments intracellulaires est maintenu par l'activité des pompes SERCAs d'un côté et par la présence d'une fuite calcique de l'autre. Si les pompes ont une activité d'importance supérieure pour un organe donné par rapport à l'activité de fuite du  $\text{Ca}^{2+}$ , en bloquant les SERCAs avec la thapsigargine il est possible que l'activité des canaux de fuite soit si faible ou si lente qu'elle passe inaperçue. Dans ce cas l'arrêt de l'activité de pompage des SERCAs ne permettrait pas, malgré tout, d'observer une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  de fuite qui est trop faible. Il est également possible que les pompes de la membrane plasmique soient à ce point efficaces que la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  lors de l'utilisation de thapsigargine ne soit pas détectée.

N'ayant plus de doute quant à l'effet de la thapsigargine sur les SERCAs, nous pouvons tenter d'expliquer le délai observé dans la réponse à la GHRH suite à l'application de thapsigargine. En effet, voulant observer l'effet de la thapsigargine sur la réponse calcique induite par la GHRH, nous avons essayé le protocole suivant: une éjection de GHRH suivie d'une période de pause à la fin de laquelle il y a éjection de thapsigargine dans le milieu entourant la cellule, et finalement une seconde éjection de GHRH. En vidant les compartiments calciques intracellulaires avec la thapsigargine nous avons observé une diminution plus importante de la seconde réponse calcique en comparaison avec le contrôle double éjections de GHRH (fig. 7). La thapsigargine augmente la diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

de 67 %, ce qui signifie que la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire pourrait participer à 33 % de l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Jusque là nous pouvons expliquer ce résultat par la participation des compartiments calciques intracellulaires dans l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en réponse à une stimulation par la GHRH. Les complications surviennent lors de l'analyse des délais de la réponse calcique induite par une stimulation par la GHRH, le délai de réponse étant le temps à partir du début de l'éjection de GHRH jusqu'à l'augmentation de la concentration calcique. Le délai observé pour la réponse calcique produite par la seconde stimulation à la GHRH suite à l'application de thapsigargine est en moyenne de  $35 \pm 1$  secondes plus long que pour la situation contrôle (le délai pour la première stimulation GHRH est en moyenne de  $9 \pm 1$  secondes alors que la deuxième réponse survient après un délai de  $7 \pm 1$  secondes) (fig. 5.1A et B). Les complications découlent des faits que nous connaissons sur l'effet de la GHRH et de la thapsigargine: la GHRH induit une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  par un influx de calcium provenant de canaux calciques voltage-dépendants et la thapsigargine agit sur le fonctionnement des pompes calciques des compartiments calciques intracellulaires. Différentes possibilités s'offrent à nous pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, nous avons observé, suite au traitement à la thapsigargine, un niveau de calcium basal qui est significativement plus bas ( $495 \pm 45$  nM) que le niveau de calcium observé avant la seconde application de GHRH pour le protocole contrôle ( $795 \pm 45$  nM). Cependant, la corrélation linéaire entre le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  basal et le délai de la seconde réponse à la GHRH est non significative (contrôle:  $r=-0.128$ ,  $n=59$ ; thapsigargine:  $r=-0.188$ ,  $n=36$ ). Donc, nous pouvons exclure la possibilité

d'un effet du calcium basal sur le délai. Toutefois, une autre possibilité est envisageable, la thapsigargine pourrait avoir un effet direct sur les canaux calciques voltage-dépendants de la membrane plasmique. En effet, le délai observé pourrait résulter d'une inhibition des canaux calciques ou d'une diminution de la conductance des canaux sodiques et/ou potassiques, se traduisant par une hyperpolarisation qui réduirait la probabilité d'ouverture des canaux calciques. La littérature rapporte un seul cas dans lequel la thapsigargine aurait un effet direct sur le potentiel membranaire; elle dépolarise la membrane des neutrophiles (73). Nous sommes tentés de rejeter cette explication car le délai pourrait résulter d'une hyperpolarisation qui retarderait l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux calciques voltage-dépendants, mais on ne peut invoquer l'effet dépolarisant rapporté. L'utilisation de la thapsigargine semble donc agir sur les canaux calciques voltage-dépendants de la membrane plasmique. Cet effet de la thapsigargine n'a jamais été rapporté auparavant, c'est pourquoi nous allons spéculer sur les causes possibles de ce résultat.

Tout d'abord, ce délai suppose la participation d'au moins un type de compartiment calcique lors de la dépolarisation membranaire induite par la liaison de la GHRH à son récepteur. Ce stock calcique ne serait pas important dans la formation du signal calcique en lui-même car, malgré le délai, il y a tout de même une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , mais il serait important pour l'initiation de ce signal en réponse à la GHRH. Peu importe le mécanisme sous-tendant cette

fonction, il suggère un mode de communication entre le stock et la membrane plasmique.

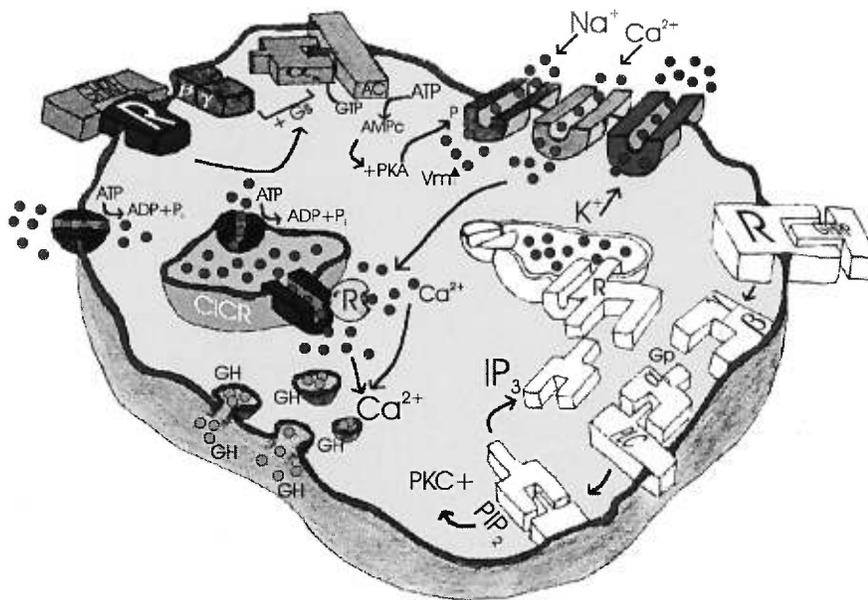
Cette idée de communication entre un compartiment calcique intracellulaire et la membrane plasmique n'est pas nouvelle en soi. Selon le modèle capacitif proposé par Putney (66, 67), l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'extérieur de la cellule nécessite tout d'abord une libération du  $\text{Ca}^{2+}$  emmagasiné dans les compartiments intracellulaires (6). Le  $\text{Ca}^{2+}$  entrerait dans la cellule via un canal SOC (stock-operated channel), dont l'ouverture serait déterminée par la vidange du compartiment. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer le couplage de ces deux états. Une première hypothèse suggère qu'un stock vide produirait la libération d'un messenger, CIF (calcium influx factor), qui aurait la propriété de se lier au SOC pour stimuler son ouverture (29, 68, 83, 84). Cette hypothèse a été vérifiée dans les lymphocytes T où une petite molécule polaire a été identifiée comme étant un CIF et sa production augmenterait en fonction du temps suivant la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par une application de thapsigargine (83). Nous savons également que l'inactivation du CIF se ferait par des phosphatases et serait calcium dépendante (6, 68). La deuxième hypothèse consiste en un changement de conformation du récepteur  $\text{IP}_3$  lorsque le stock est vide. Cette transformation permettrait l'activation d'un canal CRAC (calcium-release-activated channel) par un contact direct entre les deux protéines (29). Le récepteur  $\text{IP}_3$  impliqué ici pourrait être d'un type différent de celui impliqué dans la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  (29).

Il est clair que le modèle de Putney ne s'applique pas dans ce cas puisqu'il s'agit d'une inhibition plutôt que d'une activation du canal  $\text{Ca}^{2+}$  (6, 66, 67). Par contre, le principe de l'initiation d'un mode de communication lorsqu'un stock calcique intracellulaire est vidé de son contenu peut très bien expliquer que la thapsigargine ait un effet sur l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Le stock vidé inhiberait les canaux calciques voltage-dépendants, soit par contact direct avec un récepteur du stock, soit par la production d'un facteur inhibiteur soluble.

Le délai et la diminution de la réponse calcique observés suite à un traitement à la thapsigargine pourraient être des indicateurs de la présence d'un phénomène physiologique impliqué dans la diminution de la réponse calcique induite par la seconde stimulation à la GHRH. Le rôle physiologique d'un tel compartiment calcique intracellulaire qui retarde et réduit l'amplitude de la réponse calcique induite par la GHRH pourrait être de limiter dans le temps la libération de l'hormone de croissance. Ceci concorde avec l'observation d'une libération de GH sous forme de bouffée. L'explication proposée pour cette libération pulsatile est une diminution de la concentration des récepteurs à la GHRH à la surface de la membrane. Ceci pourrait être également dû à une diminution de la quantité de vésicules sécrétrices disponibles dans le cytoplasme. Nous proposons une troisième explication par une diminution du signal calcique. En effet, ce compartiment calcique affecté par la thapsigargine pourrait être à la

base de la désensibilisation de la cellule somatotrope; des stimulations répétées de GHRH produisent une libération d'une quantité de plus en plus petite de GH (39).

Le stock de type CICR est présent dans les cellules somatotropes normales de rat et nous suggérons qu'il amplifie le signal calcique en réponse à la GHRH. Bien que nos résultats soient en accord avec cette idée, nous ne pouvons affirmer hors de tout doute que le stock CICR est impliqué dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à la GHRH. L'effet possible de la ryanodine sur la conductance potassique et par le fait même sur le potentiel de membrane pourrait être vérifié en électrophysiologie, mais ce type d'expérimentation ne saurait faire partie de ce projet de recherche. La diminution de la seconde réponse à la GHRH suite à un traitement à la thapsigargine confirme l'importance des compartiments intracellulaires dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les cellules somatotropes possèdent également un compartiment calcique intracellulaire qui semble intervenir dans l'initiation de la dépolarisation membranaire et qui est affecté par la thapsigargine. Le contenu calcique de ce stock serait à la base de la communication avec la membrane plasmique. À la lumière de ces résultats le modèle cellulaire proposé semble valable (fig. 5.2). Comme prévu dans notre modèle, l'influx de  $Ca^{2+}$  qui survient suite à la liaison de la GHRH à son récepteur membranaire mobilise le calcium contenu dans le stock CICR, amplifiant ainsi le signal initial.



**Figure 5.2: Modèle de la cellule somatotrope.** La cellule somatotrope a des stocks CICR et ils sont impliqués dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à la GHRH. GTP: guanosine-triphosphate, ATP: adénosine triphosphate,  $AMP_c$ : adénosine-monophosphate cyclique, DAG: diacylglycérol,  $IP_3$ : inositol triphosphate, PLC: phospholipase C, PKC: protéine kinase C, PKA: protéine kinase A,  $G_s$ : protéine G stimulatrice,  $G_p$ : protéine G spécifique,  $\alpha \beta \gamma$ : sous-unités de la protéine G, AC: adényl cyclase,  $V_m$ : dépolarisation membranaire, GH: hormone de croissance, R: récepteur,  $Ca^{2+}$ : calcium, P: phosphate, GHRH: somatotrocinine, GHRP: hexapeptide de synthèse,  $Na^{2+}$ : sodium,  $K^+$ : potassium, +: activation, ATPase: pompe calcique.

## RÉFÉRENCES

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson JD. Biologie moléculaire de la cellule. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1990: 1219 pp.
2. Argente J., Garcia-Segura LM., Pozo J., Chowen JA. Growth hormone-releasing peptides: clinical and basic aspects. *Hormone research*, 1996; **46**: 155-159.
3. Avidor T., Clementi E., Schwartz L., Atlas D. Caffeine-induced transmitter release is mediated via ryanodine-sensitive channel. *Neuroscience Letters*, 1994; **165**: 133-136.
4. Berridge MJ., Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 1989; **341**: 197-205.
5. Berridge MJ. Inositol triphosphate and cell signalling. *Nature*, 1993; **361**: 315-325.
6. Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochemical Journal*, 1995; **312**: 1-11.
7. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium: two interacting second messengers. *American Journal of Nephrology*, 1997; **17**: 1-11.
8. Bian J., Ghosh TK., Wang JC., Gill DL. Identification of intracellular calcium pools selective modification by thapsigargin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991; **266**: 8801-8806.
9. Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Rivier J., Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibit the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 1973; **179**: 77-79.
10. Bresson-Bépolain L., Dufy-Barbe L. GHRP-6 induces a biphasic calcium response in rat pituitary somatotrophs. *Cell Calcium*, 1994; **15**: 247-258.
11. Carofoli E. Biogenesis: Plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB Journal*, 1994; **8**: 993-1002.

12. Catt KJ., Stojilkovic SS. Calcium signaling and gonadotropin secretion. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 1989; **1**: 15-20.
13. Chen C., Clarke L. Modulation of Ca<sup>2+</sup> influx in ovine somatotroph by growth hormone-releasing factor. *The American Physiological Society*, 1995; **1849**: E204-E212.
14. Cheng J., Wu T-J., Butler B., Cheng K. Growth hormone releasing peptides: a comparison of the growth hormone releasing activities of GHRP-2 and GHRP-6 in rat primary pituitary cells. *Life sciences*, 1997; **60**: 1385-1392.
15. Cobbold PH. Oscillatory calcium signals in hormone-stimulated cells. *News in physiological sciences*, 1989; **4**: 211-215.
16. De Flora A., Guida L., Franco L., Zocchi E., Pestarino M., Usai C., Marchetti C., Fedele E., Fontana G., Raiteri M. Ectocellular in vitro and in vivo metabolism of cADP-ribose in cerebellum. *Biochemical Journal*, 1996; **320**: 665-672.
17. Dufy B., Israël J-M. Techniques de base en électrophysiologie et spectrofluorométrie. Éditions du CNRS, Centre régional de publication de Bordeaux. 1992: pp.182.
18. Ehrlich BE., Kaftan E., Bezprozvannaya S., Bezprozvanny I. The pharmacology of intracellular Ca<sup>2+</sup> release channels. *Trends in Pharmacological Science*, 1994; **15**: 145-149.
19. Finch E., Turner TJ., Goldin SM. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate induced calcium release. *Science*, 1991; **252**: 443-446.
20. French M., Lussier B., Moor B., Kraicer J. Effect of growth hormone-releasing factor or phosphoinositide hydrolysis in somatotrophs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1990; **72**: 213-220.
21. Frohman LA., Jansson J-O. Growth Hormone-releasing hormone. *Endocrine Reviews*, 1986; **7**: 223-246.
22. Ghigo E., Arvat E., Muccioli G., Camanni F. Growth hormone-releasing peptides. *European journal of Endocrinology*, 1997; **136**: 445-460.
23. Gilbert SF. Developmental biology. Massachusetts, Sinauer Associates Inc., 1988: pp. 843.

24. Guillemin R., Brazeau P., Böhlen P., Esch F., Ling N. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science*, 1982; **218**: 585-587.
25. Guyton AC. Textbook of medical physiology. W.B. Saunders Company, Canada, 1981: pp. 1074.
26. Hehl S., Golard A., Hille B. Involvement of mitochondria in intracellular calcium sequestration by rat gonadotropes. *Cell Calcium*, 1996; **20**: 515-524.
27. Herrington J., Hille B. Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms. *Endocrinology*, 1994; **135**: 1100-1108.
28. Holl R., Thorner M., Leong DA. Intracellular calcium concentration and growth hormone secretion in individual somatotropes: effects of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology*, 1988; **122**: 2927-2932.
29. Holl R., Thorner M., Zysk J., Leong D. Ionophore bromo-A23187 reveals cellular calcium stores in single pituitary somatotropes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1989; **64**: 105-110.
30. Humerickhouse RA., Besch HR., Gerzon K., Ruest L., Sutko JL., Emmick JT. Differential activating and deactivating effects of natural ryanodine congeners on the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum: evidence for separation of effects at functionally distinct sites. *Molecular pharmacology*, 1993; **44**: 412-421.
31. Inesi G., Cantilina T., Yu X., Nikic D., Sagara Y., Kirtley ME. Long-Range intramolecular linked functions in activation and inhibition of SERCA ATPases. *Annals New York Academy of Sciences*, 1992; **671**: 32-47.
32. Jencks WP. How does a calcium pump pump calcium? *The Journal of Biological Chemistry*, 1989; **264**: 18855-18858.
33. Jenden DJ., Fairhurst AS. The pharmacology of ryanodine. *Pharmacological Reviews*, 1969; **21**: 1-23.
34. Katayama E., Funahashi H., Michikawa T., Shiraishi T., Ikemoto T., Lino M., Hirose K., Mikoshiba K. Native structure and arrangement of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor molecules in bovine cerebellar purkinje cells as studied by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *The EMBO Journal*, 1996; **15**: 4844-4851.

35. Kato M. Withdrawal of somatostatin augments L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in primary cultured rat somatotrophs. *Journal of endocrinology*, 1995; **7**: 855-859.
36. Kato M., Hoyland J., Sikdar SK., Mason WT. Imaging of intracellular calcium in rat anterior pituitary cells in response to growth hormone releasing hormone. *Journal of Physiology*, 1992; **447**: 171-189.
37. Kato M., Suzuki M. Growth hormone releasing factor depolarizes rat pituitary cells in  $\text{Na}^+$ -dependant mechanism. *Brain Research*, 1989; **476**: 145-148.
38. Katsuhiko M. The  $\text{InsP}_3$  receptor and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, 1997; **7**: 339-345.
39. Kraicer J., Lussier B., Moor BC., Cowan JS. Failure of growth hormone (GH) to feed back at the level of the pituitary to alter the response of the somatotrophs to GH-releasing factor. *Endocrinology*, 1988; **122**: 1511-1514.
40. Kraicer J., Spencer JW. Release of growth hormone from purified somatotrophs: use of high  $\text{K}^+$  and the ionophore A23187 to elucidate interrelations among  $\text{Ca}^{2+}$ , adenosine 3', 5'-monophosphate, and somatostatin. *Endocrinology*, 1981; **108**: 651-657.
41. Lai FA., Erickson HP., Rousseau E., Liu Q-Y., Meissner G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*, 1988; **331**: 315-319.
42. Lattanzio FA., Schlatterer RG., Nicar M., Campbell KP., Sutko JL. The effects of ryanodine on passive calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1987; **262**: 2711-2718.
43. Lipp P., Niggli E. A hierarchical concept of cellular and subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  - signalling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1996; **65**: 265-296.
44. Lussier B., French M., Moor B., Kraicer J. Free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx raises  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . *Endocrinology*, 1991; **128**: 570-582.
45. Lussier BT., Wood DA., French MB., Moor BC., Kraicer J. Free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. II. Somatostatin lowers  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Endocrinology*, 1991; **128**: 583-591.

46. Lussier B., Corcuff J-B., Mollard P (non-publié). The peptide GRF evokes two membrane electrical events and multiple cytosolic calcium signals in single rat somatotrophs. 48 pp.
47. Malgaroli A., Fesce R., Meldolesi J. Spontaneous  $[Ca^{2+}]_i$  fluctuations in rat chromaffin cells do not require inositol 1,4,5- trisphosphate elevations but are generated by caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular  $Ca^{2+}$  store. *The Journal of biological chemistry*, 1990; **265**: 3005-3008.
48. Martinez RJ., Willis S., Puente S., Wells J., Helmke R., Zhang GH. Evidence for a  $Ca^{2+}$  pool associated with secretory granules in rat submandibular acinar cells. *Biochemical Journal*, 1996; **320**: 627-634.
49. Mau SE., Witt MR., Bjerrum OJ., Saermark T., Vilhardt H. Growth hormone releasing hexapeptide (GHRP-6) activates the inositol (1,4,5)-trisphosphate/diacylglycéról pathway in rat anterior pituitary cells. *Journal of Receptor and signal Transduction Research*, 1995; **15**: 311-323.
50. Mayo KE., Godfrey PA., Suhr ST., Kulik DJ., Rahal JO. Growth Hormone-releasing hormone: Synthesis and signaling. *Recent Progress in Hormone Research*, 1995; **50**: 35-69.
51. McNulty TJ., Taylor CW. Caffeine-stimulated  $Ca^{2+}$  release from the intracellular stores of hepatocytes is not mediated by ryanodine receptors. *Biochemical Journal*, 1993; **291**: 799-801.
52. McPherson PS., Campbell KP. The ryanodine receptor/  $Ca^{2+}$  release channel. *The journal of Biological Chemistry*, 1993; **268**: 13765-13768.
53. Meissner G. Ryanodine activation and inhibition of the  $Ca^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986; **261**: 6300-6306.
54. Mikoshiba K. The  $InsP_3$  receptor and intracellular  $Ca^{2+}$  signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, 1997; **7**: 339-345.
55. Müller EE., Nisticò G. The role of brain peptides in the control of anterior pituitary hormone secretion. In: *Brain messengers and the pituitary*. San Diego, Academic Press, 1989: pp. 372-537.
56. Naumov A., Herrington J., Hille B. Actions of growth-hormone-releasing hormone on rat pituitary cells: intracellular calcium and ionic currents. *Pflügers Archiv*, 1994; **427**: 414-424.

57. Niki I., Yokokura H., Sudo T., Kato M., Hidaka H.  $\text{Ca}^{2+}$  Signaling and Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Binding Proteins. *Journal of Biochemistry*, 1996; **120**: 685-698.
58. O'Neill SC., Donoso P., Eisner DA. The role of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and  $[\text{Ca}^{2+}]$  sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: measurement of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and  $[\text{caffeine}]_i$ . *Journal of Physiology, (London)*.1990; **425**: 55-70.
59. Osada S., Okano Y., Saji S., Nozawa Y. Spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release from a caffeine and ryanodine-sensitive intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  store in freshly prepared hepatocytes. *Hepatology*, 1994; **19**: 514-517.
60. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*. London. 1982.
61. Pelletier G. The secretory process in the anterior hypophysis. In: Cantin M. (Ed.), *Cell Biology of the Secretory Process*, New York, Karger, 1984: pp. 196-213.
62. Pessah IN., Waterhouse AL., Casida JE. The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochemical and Biophysical research communications*, 1985; **128**: 449-456.
63. Petersen OH. Can  $\text{Ca}^{2+}$  be released from secretory granules or synaptic vesicles? *Trends in Neurosciences*, 1996; **19**: 411-413.
64. Plotsky PM., Vale W. Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science*, 1985; **230**: 461-463.
65. Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews*, 1994; **74**: 595-636.
66. Putney JW Jr. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, 1990; **11**: 611-624
67. Putney JW Jr. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium*, 1997; **21**: 257-261.
68. Randriamampita C., Tsien RY. Degradation of a calcium influx factor (CIF) can be blocked by phosphatase inhibitors or chelation of  $\text{Ca}^{2+}$ . *The Journal of Biological Chemistry*, 1995; **270**: 29-32.

69. Rivier J., Spiess J., Thorner M., Vale W. Characterization of a growth hormone-releasing factor from human pancreatic islet tumor. *Nature*, 1982; **300**: 276-278.
70. Robinson IM., Burgoyne RD. Characterisation of distinct inositol 1,4,5-trisphosphate sensitive and caffeine-sensitive calcium stores in digitonin-permeabilised adrenal chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, 1991; **56**: 1587-1593.
71. Scanlon MF., Issa BG., Dieguez C. Regulation of growth hormone secretion. *Hormone research*, 1996; **46**: 14-154.
72. Schally AV., Huang WY., Chang RCC., Arimura A., Redding TW. Isolation and structure of pro-somatostatin: A putative somatostatin precursor from pig hypothalamus. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 1998; **77**: 4489-4493.
73. Scharff O., Foder B. Depletion of calcium stores by thapsigargin induces membrane depolarization by cation entry in human neutrophils. *Cell calcium*, 1996; **20**: 31-41.
74. Sheppard S., Kraicer J., Milligan JV. Mechanisms governing the release of growth hormone from acutely dispersed purified somatotrophs. In: *Synthesis and release of adenohipophyseal hormones* (Eds. M. Jutisz, kW. Kenneth), 1980; pp 495-523.
75. Sitsapesan R., Williams AJ. Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Physiology*, 1990; **423**: 425-439.
76. Stevens A., Lowe J. *Histologie*. Paris, Pradel, 1993: 378 pp.
77. Sutko JL., Airey JA., Welch W., Ruest L. The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacological Reviews*, 1997; **49**: 53-94.
78. Tannenbaum GS. Physiological role of somatostatin in regulation of pulsatile growth hormone secretion. In: *Somatostatin* (Eds. Patel YC., Tannenbaum GS), New York, Plenum Press, 1985: pp. 229-259.
79. Tattersall R. A History of Growth Hormone. *Hormone Research*, 1996; **46**: 236-247.
80. Thastrup O., Cullen PJ., Dr•bak BK., Hanley MR., Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by

- specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 1990; **87**: 2466-2470.
81. Thastrup O., Dawson AP., Scharff O., Foder O., Cullen PJ., Dr•bak BK., Bjerrum PJ., Christensen SB., Hanley MR. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents and Actions*, 1989; **27**: 17-23.
  82. Thomas AP., Bird G., Hajnóczy G., Robb-Gaspers LD., Putney J. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *The FASEB Journal*, 1996; **10**: 1505-1517.
  83. Thomas D., Hanley MR. Pharmacological tools for perturbing intracellular calcium storage. In: *A practical guide to the study of calcium in living cells* (Ed. R. Nuccitelli), 1994; pp 65-89. Academic Press, San Diego.
  84. Thomas D., Hanley MR. Evaluation of calcium influx factors from stimulated jurkat T-lymphocytes by microinjection into *Xenopus* Oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995; **270**: 6429-6432.
  85. Toescu EC., Peterson OH. The thapsigargin-evoked increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  involves an  $\text{InsP}_3$ -dependent  $\text{Ca}^{2+}$  release process in pancreatic acinar cells. *Pflügers Archiv*, 1994; **427**: 325-331.
  86. Tsien R., Tsien R. Calcium channels, stores and oscillations. *Annual Review of Cellular Biology*, 1990; **6**: 715- 760.
  87. Vais H., Rucareanu C., Usherwood PNR. Ryanoids change the permeability of potassium channels of locus (*Schistocerca gregaria*) muscle. *Pflügers Archiv*, 1996; **432**: 700-707.
  88. Wagenknecht T., Radermacher M. Ryanodine receptors: structure and macromolecular interactions. *Current Opinion in Neurobiology*, 1997; **7**: 258-265.
  89. Williams DA. Fluorescence imaging of cytosolic calcium: an introduction to basic experimental principles. *Methods in Neurosciences*, 1995; **27**: 69-80.
  90. Woolley GA., Pfeiffer DR., Deber CM. Use of ionophores for manipulating intracellular ion concentrations. *Methods in Neurosciences*, 1995; **27**: 52-68.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, M. Benoit Lussier. Ses connaissances et ses conseils ont été d'une aide précieuse pour la réalisation de cette recherche.

Je remercie également Frédéric pour avoir participé par ses talents d'artiste et d'informaticien à l'aboutissement de ce projet ainsi que pour son soutien continu.

Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance à mes parents pour leur support tout au long de mes études.

Mes remerciements à deux grandes amies, Louise Cloutier et Claudette Blanchard qui ont collaboré à la mise en forme de ce mémoire.

Je termine en remerciant mes amis et collègues pour leurs encouragements, leur présence et leur sens de l'humour. Natacha, Isabelle, Cristelle, Pauline, Carole, Marc-Antoine, Pierre et Alain, Merci...