

L'activité de l'acétylcholinestérase musculaire est-elle corrélée à la concentration du Ca^{2+} intracellulaire libre ?

Sabine de la PORTE, P. COURBIN, M. GROUSELLE (*), Denise DUFLO, J. P. DESMAZES (*), D. GEORGESCAULD (*), Jeanine KOENIG

*Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire
C.N.R.S. U.A. 1136. Avenue des Facultés, 33405 Talence, France.
(*) Centre de Recherche Paul Pascal,
C.N.R.S., Domaine Universitaire, 33405 Talence, France.*

Summary. *Study of a possible relationship between muscle acetylcholinesterase activity and the level of free intracellular Ca^{2+} .*

The role of the calcium ion Ca^{2+} as an agent of intracellular control in a variety of physiological processes is well established. In vertebrate skeletal muscle fibers, Ca^{2+} is involved in muscle contraction, modulation of membrane permeability and regulation of metabolic activity.

Recently it was suggested that ion fluxes through membranes regulate the level of two cholinergic macromolecules, the acetylcholine receptor and the A_{12} form of acetylcholinesterase (AChE), the presumed synaptic form of the enzyme. Muscle cells paralysed by veratridine, which maintains the Na^+ channel in the open state, showed an increase in total AChE and in the levels of the A_{12} form. The effect of veratridine on AChE was blocked in the presence of agents that block Ca^{2+} permeability suggesting that Ca^{2+} is involved in this effect.

To understand whether the level of muscle AChE is related in some way to the level of free intracellular Ca^{2+} , we analysed the variations of Ca^{2+} levels in rat muscle cells treated by agents which modify the ionic permeabilities. This level was determined by spectrofluorimetry using the fluorescent Ca^{2+} indicator : Quin 2. However no correlation between these parameters was observed in our experimental conditions.

Introduction.

L'acétylcholinestérase est une enzyme polymorphe qui présente deux classes de formes moléculaires, les formes globulaires G_1 , G_2 , G_4 composées de 1, 2 ou 4 sous-unités catalytiques et les formes asymétriques A_4 , A_8 , A_{12} composées de 1, 2 ou 3 tétramères reliés à une queue de type collagénique (pour revue : Massoulié et Bon, 1982). La forme A_{12} est particulièrement intéressante car elle est dépendante de l'innervation : chez le rat par exemple, elle disparaît après

dénervation et réapparaît après réinnervation du muscle (Vigny *et al.*, 1976). Il a été suggéré, qu'en culture cellulaire, la présence de la forme A_{12} était régulée par l'activité contractile des myotubes. Toutefois, la contraction musculaire est un processus complexe, normalement associé à une dépolarisation de la membrane musculaire, accompagnée par une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire de Na^+ et de Ca^{2+} (Ebashi, 1976).

L'addition, dans le milieu de culture, de tétrodontoxine qui bloque les canaux Na^+ et inhibe la propagation du potentiel d'action, entraîne une diminution de l'activité acétylcholinestérasique (AChEsique) totale et la disparition de la forme asymétrique A_{12} de l'enzyme (Koenig *et al.*, 1980 ; Rieger *et al.*, 1980). Par ailleurs, nous avons montré que l'activité AChEsique totale des myotubes, la proportion relative de la forme A_{12} et le nombre de sites récepteurs à l'acétylcholine (AChR) sont régulés par les flux ioniques membranaires plutôt que par l'activité contractile *per se* (de la Porte *et al.*, 1984). En effet, la vératridine qui, contrairement à la tétrodontoxine ; maintient les canaux Na^+ ouverts et dépolarise les myotubes, accroît considérablement l'activité de l'AChE et la forme A_{12} dans les cultures. Par contre, aucune modification de l'AChE n'a été observée lorsque la concentration du K^+ extracellulaire est augmentée jusqu'à obtenir une dépolarisation des myotubes identique à celle produite par la vératridine. Nous avons suggéré que l'effet produit par la vératridine résultait d'une entrée de Ca^{2+} dans la cellule musculaire puisqu'il était inhibé par certains agents qui bloquent cette entrée ($D600$, Co^{2+} , Cd^{2+}). Toutefois, ni le ionophore A_{23187} , ni une concentration élevée de Ca^{2+} dans le milieu de culture ne modifiaient l'activité de l'AChE et la forme A_{12} des myotubes en culture. Rubin en 1985, a également suggéré qu'une augmentation de la concentration du Ca^{2+} cytoplasmique pouvait intervenir dans l'effet de la contraction musculaire sur l'AChE et les AChRs. Cet auteur a montré que les effets de la tétrodontoxine sur ces deux macromolécules pouvaient être inhibés par le ionophore calcique A_{23187} .

Dans ce travail, nous nous sommes proposés de déterminer si l'on pouvait effectivement établir une relation entre la concentration du Ca^{2+} intracellulaire libre, l'activité de l'AChE, le pourcentage de la forme asymétrique A_{12} de l'enzyme et le potentiel de membrane dans des cultures de myotubes de rat auxquelles sont ajoutés la tétrodontoxine, la vératridine, le KCl ou les ionophores calcium (avec ou sans tétrodontoxine). La concentration du Ca^{2+} intracellulaire libre a été déterminée à l'aide d'une technique récente de spectrofluorimétrie, qui utilise un indicateur de Ca^{2+} , le Quin 2 (Tsien *et al.*, 1982).

Matériel et méthodes.

Cellules musculaires de rat. — Les myoblastes ont été obtenus à partir des muscles des pattes postérieures d'embryon de rat au 18^e jour de gestation. Pour faciliter la dissociation des myoblastes, les pattes ont préalablement été incubées pendant une heure dans le milieu de culture, à 4 °C. Après dissection, les muscles ont été coupés en fins morceaux et dissociés mécaniquement dans 5 ml de milieu, à l'aide d'une pipette Pasteur.

Les cellules obtenues ont été filtrées à travers une gaze stérile (afin d'éliminer les gros débris), mises en suspension dans le milieu de culture et réparties dans des boîtes de 35 mm de diamètre préalablement tapissées avec de la gélatine à 0,1 %. La densité cellulaire était approximativement de 2.10^5 cellules par boîte, ce qui correspond environ au 1/3 des cellules obtenues pour une patte.

Les myoblastes ont été incubés à 37 °C dans le milieu de culture (9 g/l de Eagle MEM ; 3 g/l de Medium 199 ; 2,5 g/l de bicarbonate de sodium ; 10 000 U/l de pénicilline ; 10 mg/l de streptomycine ; 10 % de sérum de cheval) sous une atmosphère de 7,5 % de CO₂. Le milieu de culture a été remplacé tous les 4 jours.

Conditions expérimentales. — La vératridine et la tétródotoxine ont été utilisées à la concentration de 20 µM. Pour obtenir une dépolarisation identique à celle observée avec la vératridine, nous avons ajouté du KCl au milieu de culture jusqu'à la concentration finale en potassium de 20 mM. Deux ionophores spécifiques des ions bivalents ont été utilisés, l'ionomycine et le A₂₃₁₈₇ à la concentration de 30 nM. L'ensemble des produits utilisés proviennent de Sigma.

Analyse des formes moléculaires de l'acétylcholinestérase par sédimentation sur gradient de saccharose. — Pour chaque point analysé, le contenu de 3 boîtes de culture a été recueilli à l'aide d'un embout de caoutchouc, homogénéisé dans 300 µl de milieu d'extraction [tampon 0,01 M Tris-HCl à pH 7 ; NaCl 1 M ; Triton X100 à 1 % ; EDTA à 0,01 M ; benzamidine 0,001 M ; bacitracine 1 mg/ml et 25 unités/ml d'aprotinine (zymofren)]. Les homogénats ont été centrifugés à 25 000 g pendant 30 min. Les surnageants ont été analysés soit immédiatement, soit après congélation à - 80 °C.

Les formes moléculaires de l'acétylcholinestérase ont été séparées par centrifugation sur un gradient de saccharose de 5 à 20 % (poids/volume) contenant du NaCl 1 mM, du tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7, du Triton X100 à 1 % et de la bacitracine 0,1 mg/ml (Bon *et al.*, 1979).

La β-galactosidase et la phosphatase alcaline, qui sédimentent respectivement à 16 S et 6,1 S ont été mélangées avec l'échantillon déposé sur le gradient et ont servi d'étalons de coefficient de sédimentation. Après centrifugation à 40 000 rpm (2.10^5g) pendant 19 h dans un rotor Beckman SW 41 à 4 °C, les gradients ont été collectés en 45 fractions de 250 microlitres.

L'activité AChEsique a été mesurée selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) en présence d'éthopropazine à 10^{-5} M pour inhiber spécifiquement les butyrylcholinestérases. L'unité de densité optique (DO/ml) que nous avons définie, correspond à l'activité qui produit une modification de l'absorbance de 1 unité de Do/min par ml de solution à doser dans une cuve de 1 cm à la longueur d'onde de 412 nm. Pour déterminer l'activité spécifique de l'enzyme, nous avons mesuré la concentration en protéines de certains échantillons par la méthode de Lowry *et al.* (1951).

Mesure de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire libre. — Les cellules ont été rincées dans du tampon PBS, Ca²⁺, Mg²⁺ free (144 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 5 mM NaH₂PO₄, pH 7,3) auquel a été ajouté 50 mM de glucose, puis dans ce

même tampon PBS contenant 1 % d'EDTA. Ensuite, elles ont été détachées en présence de 1 % de collagénase (Worthington Classe III) diluée dans le tampon PBS. L'effet de la collagénase a été stoppé en ajoutant 200 μ l de sérum de veau dans le tube prévu pour collecter les cellules. Après 10 min de centrifugation à 1 000 tr/mn (500 g), ces cellules ont été remises en suspension dans du tampon (118 mM NaCl, 4,6 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM D-glucose, 20 mM Hepes, pH 7,2).

L'utilisation d'un indicateur de calcium, le Quin 2, permet de mesurer la concentration intracellulaire libre de cet ion. La membrane plasmique étant imperméable au Quin 2, nous avons incubé de 1 à 2.10⁶ cellules en suspension dans 3 ml de tampon précédent en présence de 25 μ M d'ester acétoxy méthyle de Quin 2 (Quin 2-AM) qui pénètre dans les cellules. Après incubation de 20 min à 37 °C, les cellules ont été centrifugées et lavées deux fois avec le tampon.

La fluorescence a été mesurée à 37 °C à l'aide d'un spectrofluorimètre SLM 8000 équipé d'un système d'agitation mécanique doux. La fente d'excitation était de 4 nm et la fente d'émission de 16 nm. Pour vérifier que le Quin 2-AM (dont λ d'émission est de 445 nm) a effectivement été transformé en Quin 2 (dont le λ d'émission est de 500 nm) par les estérases cellulaires, nous avons enregistré le spectre d'émission de fluorescence à 500 nm, après excitation à 339 nm. Nous avons considéré que la transformation du Quin 2-AM en Quin 2 était terminée, 5 min après que le spectre d'émission déplacé à 500 nm soit resté stable et sans modification décelable. Les enregistrements des intensités de fluorescence ont été réalisés à 500 nm. La transformation du signal de fluorescence en concentration de Ca²⁺ intracellulaire a été calculée après l'équation :

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}$$

où K_d pour Ca²⁺-Quin 2 est de 115 nM et F est l'intensité de fluorescence en unités arbitraires. F_{max} est la fluorescence mesurée après l'addition de Triton X-100 (concentration finale 0,1 %) qui en détruisant les cellules a exposé le Quin 2 à 0,1 mM de Ca²⁺ extracellulaire et permet de déterminer l'intensité de fluorescence maximale de l'échantillon. F_{min} est la fluorescence mesurée après l'addition de 10 mM EGTA, le pH étant ramené à plus de 8.3. Dans ces conditions, la concentration de Ca²⁺ est en dessous de 1 nM et la fluorescence de l'échantillon est minimale (fig. 1).

Mesure du potentiel de membrane. — La différence de potentiel transmembranaire a été mesuré en utilisant un montage conventionnel d'enregistrement intracellulaire des potentiels membranaires. Les microélectrodes avaient une impédance située entre 50 M Ω et 100 M Ω et étaient remplies de KCl 3M.

Résultats.

Différenciation des cellules musculaires en culture.

Cette différenciation a été décrite avec précision par Koenig (1979). Rappelons que les myoblastes d'embryon de rat (âgés de 18 jours) arrivent à confluence à 24 heures et qu'ils commencent à fusionner après 48 heures de

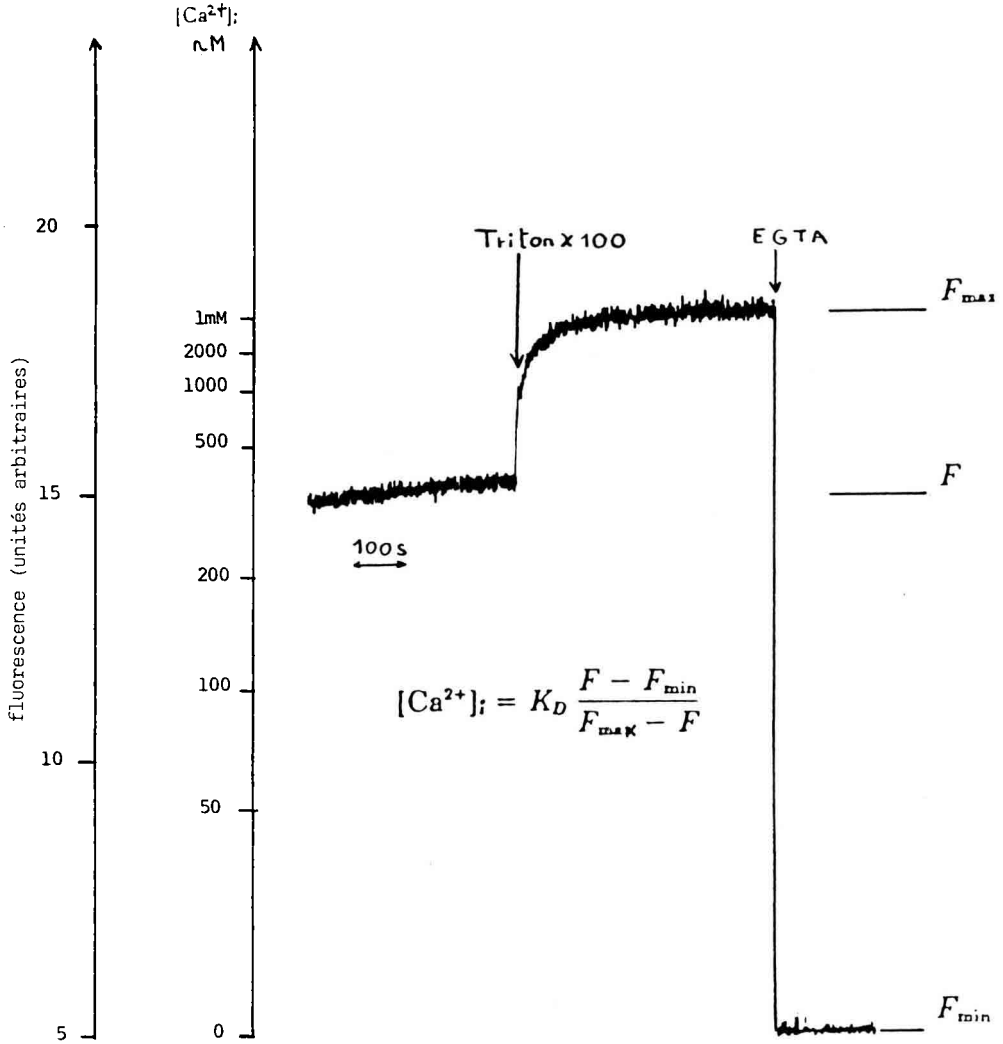


FIG. 1. — Exemple du dosage du Ca^{2+} libre intracellulaire. Le tracé initial représente la cinétique de l'intensité de fluorescence (F) du Quin 2 retenu dans les cellules musculaires ($\lambda_{ex} = 339$ nm, $\lambda_{em} = 500$ nm). L'éclatement des cellules à la suite de l'ajout de 0,1 % de Triton X 100 libère le Quin 2 qui interagit avec le Ca^{2+} libre du milieu (1 mM) donnant la fluorescence maximale du Quin 2 (F_{max}). EGTA à 5 mM concentration finale, pH = 8,5, en chélatant tout le Ca^{2+} libre, induit la fluorescence minimale du Quin 2 (F_{min}). L'équation inscrite sur le graphique permet de calculer le $[Ca]_i$, en utilisant un K_D de 115 nM.

culture. Cinq jours après la mise en culture, un grand nombre de myotubes sont ramifiés, ils présentent les premières striations transversales et quelques noyaux sont déjà marginaux. A ce stade apparaissent les contractions spontanées des myotubes.

Toutes les molécules que nous avons utilisées ont été ajoutées à des cultures de myotubes de 4 jours. Les analyses ont été effectuées 48 heures plus tard. Dans aucune des conditions expérimentales, nous n'avons observé de différences morphologiques importantes entre les cultures traitées et les cultures témoins.

Mesure du potentiel de membrane.

Dans les cultures témoins, le potentiel est de -57 ± 3 mV (tabl. 1). Nous avons observé que les cellules ne sont dépolarisées qu'en présence de KCl (20 mM) ou de vératridine (20 μ M), respectivement de 42 % et 25 % par rapport aux cultures témoins. En présence de tétrotoxine, le potentiel de membrane est comparable à celui des cultures témoins. Il en est de même en présence des ionophores calcium (qu'ils soient utilisés seuls ou en présence de tétrotoxine).

TABLEAU 1

Variations de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire libre, en fonction du potentiel de membrane, de l'activité de l'ACHé et du pourcentage de forme A_{12} .

Conditions expérimentales	n	$[Ca^{++}]_i$ libre (nM)	Potentiel de membrane mV	ACHé activité totale (DO/min/ml)	Forme A_{12} (%)
Témoin	6	337 ± 26	-61 ± 5	0,119	12
Tétrotoxine (TTX) (20 μ M)	2	330	-67 ± 6	0,032	0
Vératridine (20 μ M)	2	273	-33 ± 10	0,379	30
KCl (20 mM)	2	266	-43 ± 9	0,049	5
Ionomycine (30 nM)	2	560	-61 ± 9	0,087	12
A_{23187} (30 nM)	2	454	-57 ± 9	0,115	12
Ionomycine + TTX (20 μ M)	2	471	-62 ± 5	0,029	0
A_{23187} + TTX (20 μ M)	2	455	X	0,029	0

Dosage du Ca^{2+} libre intracellulaire.

La concentration du Ca^{2+} libre mesurée dans les myotubes en culture cellulaire (337 nM) n'est pas modifiée par l'addition de tétrotoxine à 20 μ M dans le milieu. En présence des ionophores la concentration en Ca^{2+} intracellu-

laire libre augmente d'environ 66 % pour l'ionomycine et de 35 % pour le A_{23187} ; la tétródotoxine ne modifie que légèrement les valeurs obtenues. Par contre, lorsque la vératridine à 20 μM et le KCl à 20 mM sont ajoutés aux milieux de culture, la concentration intracellulaire du Ca^{2+} est diminuée d'environ 20 %.

Taux d'acétylcholinestérase et pourcentage de la forme A_{12} .

En présence ou en l'absence d'ionophores, l'adjonction de tétródotoxine aux cultures, conduit à une diminution d'environ 75 % de l'activité AChEsique des myotubes et à une disparition totale de la forme asymétrique de l'enzyme. Les ionophores utilisés seuls, ne diminuent que très légèrement l'activité enzymatique et ne modifient pas la proportion relative de A_{12} . Dans un milieu riche en potassium (KCl à 20 mM), qui dépolarise les myotubes, l'activité AChEsique totale et la forme A_{12} sont diminuées d'environ 60 %. Par contre, en présence de vératridine, qui dépolarise également les cellules musculaires, l'activité enzymatique et la proportion de la forme A_{12} sont augmentés par un facteur d'environ 3.

Conclusion.

Dans nos conditions expérimentales, aucune relation n'a pu être établie entre les variations du Ca^{2+} intracellulaire libre et l'activité AChEsique. L'addition d'ionophore dans le milieu de culture augmente la concentration du Ca^{2+} libre dans les myotubes, alors que l'activité AChEsique et la proportion de la forme A_{12} ne sont pratiquement pas modifiées (tabl. 1). Au contraire, lorsque l'AChE mesurée en présence de vératridine est augmentée par un facteur 3, la concentration du Ca^{2+} n'est que très légèrement inférieure à celle des cultures témoins (tabl. 1).

Les résultats obtenus avec la tétródotoxine indiquent également que les deux paramètres (Ca^{2+} et AChE) sont disjoints. Lorsque la tétródotoxine et un des ionophores calcium sont utilisés simultanément ; le taux d'AChE est celui observé en présence de tétródotoxine seule. Par contre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ correspond à la valeur observée en présence de ionophore seul (tabl. 1). Par ailleurs, il ne semble pas y avoir le lien direct entre la dépolarisation de la membrane plasmique des myotubes et le calcium libre intracellulaire, dont la concentration est identique pour des modifications différentes du potentiel de membrane obtenues avec le KCl et la vératridine (tabl. 1).

L'absence de lien entre le calcium intracellulaire et l'acétylcholinestérase n'exclut pas que cet ion puisse jouer, néanmoins, un rôle de *messenger* dans la régulation de cette enzyme. Il est en effet possible que la sensibilité du Quin 2 soit insuffisante pour révéler une augmentation faible et/ou fugace du calcium intracellulaire dans les conditions où l'activité de l'AChE est modifiée. Cette interprétation est basée sur le fait que la concentration du Ca^{2+} , mesurée immédiatement après l'addition des ionophores, est similaire à celle obtenue ici après 48 heures de présence dans le milieu de culture (résultats non publiés). Dans ces conditions, le retour à la concentration initiale est rapide (quelques minutes). L'utilisation d'un indicateur de calcium trente fois plus sensible, le

Fura 2, devrait permettre de détecter des variations de concentrations beaucoup plus faibles, même si celles-ci sont transitoires. De plus, le Fura 2 permettra d'analyser, à l'aide d'une technique de vidéomicroscopie de fluorescence à bas niveau de lumière, la distribution spatiale du Ca^{2+} libre et sa dynamique intracellulaire à l'échelle d'un myotube ; ce que ne permet pas le Quin 2 que l'on utilise pour toute une population de myotubes.

Une des limites des techniques que nous utilisons est qu'elles ne permettent pas de mesurer le calcium lié à des protéines intracellulaires (calmoduline, troponine C ou calsequestrine, par exemple). Il est possible qu'après transport membranaire, le calcium soit immédiatement fixé sur une protéine et que, dans ces conditions, on ne puisse pas mesurer une concentration de Ca^{2+} libre plus élevée.

Enfin, la variation de concentration d'une autre molécule que le calcium lui-même pourrait être impliquée dans la régulation de l'AChE au cours de la contraction musculaire. Par exemple, on sait que, *in vivo*, une application externe d'inositol-1,4,5-triphosphate peut stimuler la contraction des muscles lisses de la peau et des muscles squelettiques, en libérant du Ca^{2+} contenu dans le réticulum sarcoplasmique (Somlyo *et al.*, 1985). Récemment, Walker *et al.*, (1987) ont montré que tout au moins dans le muscle lisse, cette molécule serait un second messager dans le mécanisme de la contraction.

*13^e Réunion du groupe Développement I.N.R.A.
Cap d'Adge, 25-27 mai 1987.*

Remerciements. — Ce travail a été partiellement réalisé à l'aide d'un contrat de la Communauté Européenne (n° ECI 1497).

References

- BON S., VIGNY M., MASSOULIÉ J., 1979. Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **76**, 2546-2550.
- DE LA PORTE S., VIGNY M., MASSOULIÉ J., KOENIG J., 1984. Action of veratridine on acetylcholinesterase in culture of rat muscle cells. *Dev. Biol.*, **106**, 450-456.
- EBASHI S., 1976. Excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.*, **38**, 293-313.
- ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. J., FEATHERSTONE R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Bioch. Pharmacol.*, **7**, 88-95.
- KOENIG J., 1979. Formation and maturation of nerve-muscle contacts in cultured rat embryo cells. *Biol. cell.*, **35**, 147-152.
- KOENIG J., BOURNAUD R., RIEGER F., 1980. Acetylcholinesterase and synapse formation in striated muscle, 313-325. In J. TAXI, *Symp. on Ontogenesis and functional mechanisms of peripheral synapse*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR M. A., RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MASSOULIÉ J., BON S., 1982. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.*, **5**, 57-106.
- RIEGER F., KOENIG J., VIGNY M., 1980. Spontaneous contractile activity and the presence of the 16S form of acetylcholinesterase in rat muscle in culture. Reversible suppressive action of tetrodotoxin. *Dev. Biol.*, **76**, 358-365.
- RUBIN L. L., 1985. Increases in muscle Ca^{2+} mediate changes in acetylcholinesterase and acetylcholine receptors caused by muscle contraction. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **82**, 7121-7125.

- SOMLYO A. V., BOND M., SOMLYO A. P., SCARPA A., 1985. Inositol triphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **82**, 5231-5235.
- TSIEN R. Y., POZZAN T., RINK T. J., 1982. Calcium homeophasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.*, **94**, 325-334.
- VIGNY M., KOENIG J., RIEGER F., 1976. The motor endplate specific form of acetylcholinesterase: Appearance during embryogenesis and reinnervation of rat muscle. *J. Neurochem.*, **27**, 1343-1353.
- WALKER J. W., SOMLYO A. V., GOLDMANN Y. E., SOMLYO A. P., TRENTHAM D. R., 1987. Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature*, **327**, 249-252.
-