

## EFFET DE L'EXTRAIT DE CREVETTE SUR LES COURANTS ENDOGENES DE L'OVOCYTE DE XENOPE

**Amani CHEIKH, Yassine TLILI, Rym BENKHALIFA**

*Institut Pasteur de Tunis, Laboratoire des Venins et Molécules Thérapeutiques, 13 Place Pasteur, BP-74, 1002 Tunis, Tunisie.*

*Email : ameni.cheikh@pasteur.rns.tn; rym.benkhalifa@pasteur.rns.tn*

### ABSTRACT

*Xenopus* oocytes have been developed as an efficient expression system in the early 70's. Moreover, this cell has different types of conductances, as Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and even Ca<sup>2+</sup>. In fact, one of the most interesting features of the *Xenopus* oocyte is the possibility to study ion channels activity by electrophysiological methods as the two electrodes voltage clamp technique, TEVC. This work allows us to validate that the shell shrimp extract acts essentially on voltage dependent sodium channels of *Xenopus* oocytes by TEVC method.

### RESUME

Les ovocytes de xénopes sont considérés comme un système efficace d'expression hétérologue depuis 1970. En outre, l'ovocyte dispose de différents types de conductances, Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et aussi Ca<sup>2+</sup>. En effet, une des caractéristiques de l'ovocyte, est la possibilité de mesurer l'activité électrique des canaux ioniques par une méthode électrophysiologique ; méthode du voltage clamp en doubles microélectrodes intracellulaires, (Two Electrodes Voltage Clamp, TEVC). Par ce travail, nous validons que l'extrait de carapaces de crevettes agit majoritairement sur les canaux sodium dépendants du potentiel par la TEVC.

### INTRODUCTION

Les canaux ioniques constituent une cible de choix des molécules pharmacologiquement actives, et leur rôle est primordial dans la plupart des mécanismes physiologiques, de type hormonal, nerveux, musculaire, cardiaque..., bien que l'ovocyte de xénope soit une cellule non excitable, il est doté de différents types de canaux ioniques, responsables de ses propriétés bioélectriques et dont l'expression est dépendante du stade de maturation de l'ovocyte (Baud et Kado, 1984). L'ovocyte est utilisé dans de multiples domaines d'études, comme outil de criblage des biomolécules actives présentes dans les venins ou dans d'autres extraits. En effet, en raison d'une demande croissante dans la recherche de nouveaux médicaments d'origine naturelle, il y a un grand intérêt pour les organismes marins et les molécules antioxydantes. Cependant, les déchets d'organismes marins ont rarement été explorés pour leurs activités physiologiques. Dans le cadre de la valorisation des déchets de crevettes *Parapenaeus longirostris*, nous avons testé l'effet d'un extrait bioactif issu de leurs carapaces sur les courants endogènes de l'ovocyte de xénope, et ceci pour mettre en place un bioprocédé de validation de la bioactivité d'une molécule antioxydante.

### MATERIEL ET METHODES

**Préparation des ovocytes:** Le xénope est anesthésié (Tricaine, 0.7 g/l), placé sur le dos et les ovocytes

sont prélevés suite à une incision latérale. La peau de l'animal doit être hydratée au cours du prélèvement par du milieu **MBS** (NaCl 88, KCl 1, MgCl<sub>2</sub> 0.41, CaCl<sub>2</sub> 2.4, NaHCO<sub>3</sub> 2.4, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.33, MgSO<sub>4</sub> 0.82, Hepes 10, Gentamicine 5 (mM)). Les ovocytes renfermés dans des oothèques sont découpés en petits morceaux et gardés dans une boîte contenant du milieu **MBS-Ca<sup>2+</sup>** (NaCl 88, KCl 1, MgCl<sub>2</sub> 0.41, NaHCO<sub>3</sub> 2.4, MgSO<sub>4</sub> 0.82, Hepes 10, Gentamicine 5 (mM)) pour subir une digestion enzymatique par les collagénases A et B (Roche-Boehringer) à 2 mg/ml. Ils sont par la suite lavés dans une boîte contenant du milieu MBS et mis en agitation orbitale et douce. Après trois lavages successifs, une défolliculation mécanique manuelle est complétée pour sélectionner les meilleurs ovocytes. L'incubation des ovocytes se fait à 19°C dans la solution MBS.

**Mesures électrophysiologiques:** La technique de doubles microélectrodes intracellulaires, TEVC, est utilisée pour mesurer les flux ioniques traversant les canaux ioniques de l'ovocyte. La résistance externe des micropipettes est comprise entre 1 et 2 MΩ. Chaque microélectrode est remplie d'une solution de KCl à 3M, dans laquelle est plongé un fil d'argent chloruré. Au cours de l'enregistrement, l'ovocyte baigne dans du milieu BAM (BaOH, 40 mM ; CsOH, 2 mM ; NaOH, 5 mM ; pH 7,5 (ajusté à l'acid-methan-sulfonic)) et est empalé par deux microélectrodes à un potentiel de maintien de -80 mV (Fig.1). Il est stimulé selon le protocole adapté (des créneaux de potentiel de 5 en 5 mV de -50 à +50 mV pendant 500 ms).

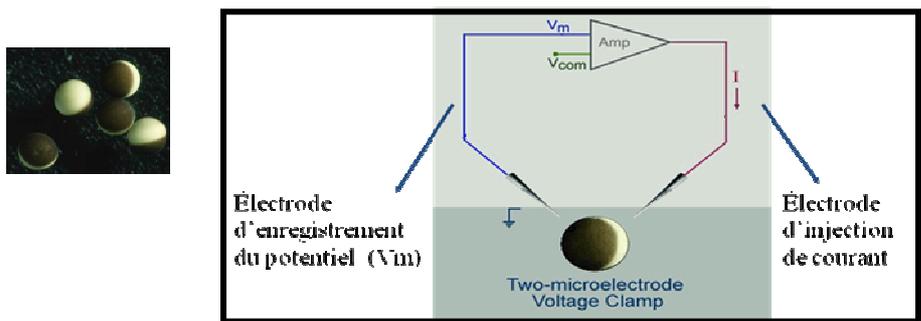


Figure 1 : Mesures électrophysiologiques en potentiel imposé par la TEVC

## RESULTATS

### 1- Effet de l'extrait bioactif sur les courants de l'ovocyte

L'extrait de crevette, *Parapenaeus longirostris* est préparé à partir de carapaces de crevettes séchées, par la méthode ASE (Assisted Solvent Extraction) à l'Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique. Afin de

caractériser l'activité de l'extrait bioactif sur les conductances de l'ovocyte de xénope, nous avons effectué les enregistrements dans le milieu BAM, qui élimine les courants chlore en favorisant les courants de type calcium (Bourinet *et al.*, 1992) et sodium dépendants du potentiel. En présence de l'extrait, nous avons constaté une diminution de l'amplitude des courants entrants d'une manière significative (Fig. 2).

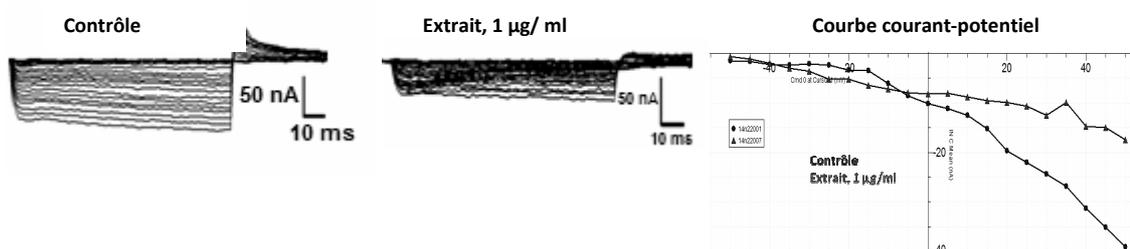


Figure 2: Effet de l'extrait bioactif sur les canaux endogènes de l'ovocyte de Xénope. Diminution de l'amplitude du courant en présence de l'extrait de crevette, 1 µg/ml

### 2- Détermination de l'effet de l'extrait de crevette par des inhibiteurs spécifiques des canaux calcium et sodium dépendants du potentiel

Pour identifier les familles des canaux sensibles à l'extrait de crevette, nous avons enregistré les courants endogènes dans les conditions de contrôle et en présence d'au moins un inhibiteur, tels que la tétrotoxine, l'amiloride ou le cadmium. La tétrotoxine inhibe d'une manière sélective les canaux sodium dépendants du potentiel. L'amiloride et le cadmium inhibent les courants sodium TTX-Résistants et les courants calcium (figure 3).

L'inhibition induite par l'extrait de crevettes est partiellement bloquée par la tétrotoxine. Par ailleurs l'application subséquente de cadmium, bloqueur de canaux calcium dépendants du potentiel, n'a aucun effet sur les courants TTX-résistants. Par contre l'amiloride abolit en grande partie l'effet de l'extrait et réverse l'effet sur le courant initial. Ces résultats suggèrent tout d'abord que l'extrait bioactif a très peu d'effet sur les conductances calcium alors qu'il inhibe aussi bien les courants de type Nav sensibles à la TTX et ceux à l'amiloride (figure 3).

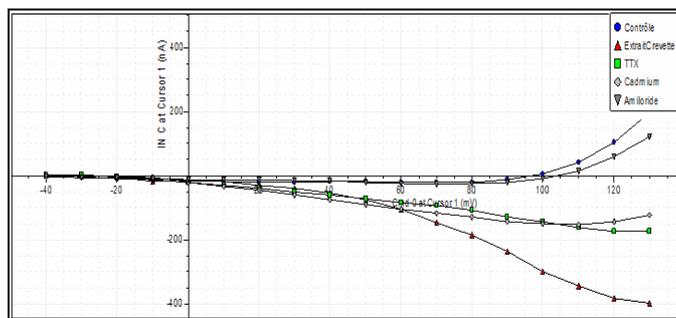


Figure 3 : Caractérisation pharmacologique de l'effet de l'extrait bioactif

## CONCLUSION

L'extrait bioactif issu des carapaces de la crevette *Parapenaeus longirostris* agit principalement sur les canaux sodium dépendants du potentiel. En se basant sur les travaux des recherches antérieurs réalisés sur les courants endogènes de l'ovocyte de Xénope (Baud *et al.*, 1982 ; Baud et Kado, 1984 ; Bourinet *et al.*, 1992 ; Parker et Miledi, 1987), il est essentiel d'isoler les deux types de courants et de tester l'extrait bioactif ainsi que la molécule antioxydante pour valider cette activité. Ceci nous permettrait de mettre en place un bioprocédé de validation bien défini et d'élucider encore le mode d'action sur d'autres modèles physiologiques.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3\_08 co-financé par l'UE.

## BIBLIOGRAPHIE

- BAUD C. & KADO, R.T. (1984). Induction and disappearance of excitability in the oocyte of *Xenopus laevis*: a voltage-clamp study. *J Physiol.* 356. 275-289.
- BAUD C., KADO R.T. and MARCHER K. (1982). Sodium channels induced by depolarization of the *Xenopus laevis* oocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79. 3188-3192.
- BOURINET E., NARGEOT J. and CHARNET, P.(1992).Electrophysiological characterization of a TTX-sensitive sodium current in native *Xenopus* oocytes. *Proc Biol Sci.* 250. 127-132.
- PARKER I. & MILEDI R. (1987). Tetrodotoxin-sensitive sodium current in native *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 232. 289-296.