

# LA TRACHYNILYSINE, TOXINE ISOLÉE DU VENIN DU POISSON-PIERRE *SYNANCEIA TRACHYNIS*, FORME DES PORES DANS LES BICOUCHES LIPIDIQUES

par

César MATTEI (1), Carole POMPA (1), Michel THIEFFRY (1),  
Arnold S. KREGER (2) & Jordi MOLGÓ (1)

**RÉSUMÉ.** La trachynilysine (TLY) est une protéine de 159 kDa, isolée à partir du venin de poisson-pierre *Synanceia trachynis*. À la jonction neuromusculaire de grenouille, elle augmente la libération quantique spontanée d'acétylcholine, sous la forme d'une exocytose des vésicules claires, sans affecter les vésicules à cœur dense (Colasante *et al.*, 1996). Au niveau de cellules chromaffines de bœuf, elle induit une libération de catécholamines insensible aux inhibiteurs des canaux  $Ca^{2+}$  sensibles au potentiel de membrane, mais dépendante du  $Ca^{2+}$  externe et des réserves de  $Ca^{2+}$  interne sensibles à la caféine (Meunier *et al.*, 2000). Nous montrons dans cette étude que la TLY est apte à former des canaux dans des bicouches lipidiques planes. Ces canaux, d'une conductance maximum d'environ 90 pS (NaCl 150 mM *cis* / KCl 150 mM *trans*) sont bloqués de manière réversible par le  $Ni^{2+}$ . La TLY pourrait donc agir, comme l' $\alpha$ -latrotoxine, en formant des pores dans les membranes naturelles.

**ABSTRACT.** Trachynilysin, a toxin isolated from stonefish *Synanceia trachynis* venom, forms pores in planar lipid bilayers.

Trachynilysin (TLY), a 159-kDa protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, increases spontaneous quantal acetylcholine release at the frog neuromuscular junction in a  $Ca^{2+}$  dependent manner and depletes clear vesicles without affecting large dense-core vesicles (Colasante *et al.*, 1996). TLY induces a catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells via external and stored  $Ca^{2+}$ . This release is not affected by voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel inhibitors (Meunier *et al.*, 2000). We show in this study that TLY is able to form pores in planar lipid bilayers. These pores have a maximum conductance of about 90 pS (NaCl 150 mM *cis* / KCl 150 mM *trans*) and are blocked by  $Ni^{2+}$ . Thus, TLY, like  $\alpha$ -latrotoxin, might act by forming pores in natural membranes.

**Keywords.** *Synanceia trachynis* - Stonefish - Trachynilysin - Lipid bilayer - Pore-forming activity.

Les venins de poissons-pierre appartenant au genre *Synanceia* sont extrêmement dangereux pour l'Homme (Halstead, 1988; Gwee *et al.*, 1994). L'appareil venimeux est composé d'épines à la base desquelles se situe une glande à venin très développée. Chez l'Homme, l'envenimation survient lorsque l'épine perce la peau et que la pression exercée sur les glandes venimeuses est suffisante pour faire circuler le venin dans le canal de l'épine jusqu'au tissu sous-cutané de la victime. Les symptômes occasionnés par une piqûre de poisson sont souvent les mêmes, quelle que soit l'espèce incriminée: douleur violente, action locale avec nécrose plus ou moins étendue, action générale avec nausées,

---

(1) Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR 9040 CNRS., 91198 Gif-sur-Yvette, FRANCE. [Jordi.Molgo@nbcn.cnrs-gif.fr]

(2) Department of Epidemiology and Preventive Medicine, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD 21201-1595, USA.

vomissements, malaises et tendances syncopales, frissons, douleurs épigastriques, arythmies et incontinenances urinaires; dans les cas plus graves sont observés des symptômes cardio-vasculaires comme une bradycardie, des arrêts respiratoire et cardiaque entraînant la mort dans les cas les plus sévères (Goudey-Perrière et Perrière, 1998). Parfois, interviennent des effets neurotoxiques, en particulier une paralysie des membres inférieurs et des crises convulsives intenses ou des secousses cloniques, typiques de crises d'épilepsie. Plusieurs toxines ont été purifiées à partir des venins des différentes espèces de *Synanceia*: la stonustoxine de *S. orrida* (Poh *et al.*, 1991), la verrucotoxine de *S. verrucosa* (Garnier *et al.*, 1995) et la trachynilysine (TLY) de *S. trachynis* (Colasante *et al.*, 1996).

À la jonction neuromusculaire de grenouille et de souris, de faibles concentrations du venin du poisson-pierre *S. trachynis* provoquent une libération spontanée très importante d'acétylcholine (Kreger *et al.*, 1993). La protéine plus particulièrement impliquée dans cette libération de neurotransmetteur a été purifiée à partir du venin, pour mieux caractériser les altérations physiologiques qu'elle provoque au niveau des terminaisons nerveuses motrices. Cette protéine, nommée trachynilysine, est composée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ayant respectivement une masse moléculaire de 76 et 83 kDa (Colasante *et al.*, 1996). La séquence N-terminale de la sous-unité  $\beta$  a été déterminée: elle est homologue à la sous-unité  $\beta$  de la stonustoxine. La TLY présente des activités létale, hémolytique et inductrice d'œdème. Elle a une DL50 de 1,6  $\mu$ g/g en injection intrapéritonéale chez la souris (Kreger, 1991; Perrière et Goudey-Perrière, 1999).

La TLY stimule la libération quantique asynchrone d'acétylcholine des terminaisons nerveuses motrices de grenouille, de souris et de poisson en présence de  $Ca^{2+}$  externe. L'analyse ultrastructurale des terminaisons nerveuses motrices de grenouilles soumises à l'action de la TLY (3  $\mu$ M) montre un gonflement des terminaisons ainsi qu'une déplétion des vésicules synaptiques claires sans modification des vésicules à cœur dense (Colasante *et al.*, 1996). Les bases moléculaires de cette libération vésiculaire différentielle n'ont pas encore pu être déterminées. Il est néanmoins important de noter que l' $\alpha$ -latrotoxine, extraite du venin de l'araignée veuve noire, est également responsable d'une déplétion différentielle à la jonction neuromusculaire de grenouille (Matteoli *et al.*, 1988). Ces données suggèrent que l' $\alpha$ -latrotoxine et la TLY agissent sélectivement sur le mécanisme neuroexocytotique des vésicules synaptiques claires.

En outre, il a récemment été montré que la TLY provoque une libération des granules denses contenant des catécholamines au niveau de cellules chromaffines de bœuf. Cette sécrétion catécholaminergique nécessite la présence de  $Ca^{2+}$  dans le milieu externe et se trouve potentialisée par les réserves internes de  $Ca^{2+}$  sensibles à la caféine (Meunier *et al.*, 2000). La libération induite par la TLY n'est pas modifiée par des inhibiteurs des canaux  $Ca^{2+}$  sensibles au potentiel de membrane, mais elle est bloquée par les ions  $La^{3+}$  qui sont des inhibiteurs non spécifiques des canaux  $Ca^{2+}$  (Pruss et Stauderman, 1988). De plus, l'augmentation de  $Ca^{2+}$  induite par la TLY dans les cellules chromaffines est inhibée par les ions  $Ni^{2+}$  et  $La^{3+}$  (Meunier *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que la TLY pourrait former des pores dans les membranes, sans agir directement sur un canal ionique préexistant. Dans cette étude, nous avons cherché à savoir si la TLY peut modifier la conductance d'une bicouche lipidique plane de synthèse et, éventuellement, y former un pore.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Purification de la trachynilysine (TLY)

La TLY a été purifiée à partir du venin du poisson-pierre *Synanceia trachynis* par chromatographie séquentielle échangeuse d'ions en phase liquide (Colasante *et al.*, 1996). La TLY est conservée à  $-60^{\circ}\text{C}$  à une concentration d'environ  $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ .

### Formation des bicouches lipidiques planes

Les bicouches lipidiques planes sont formées par la méthode de Mueller et Rudin (1963) sur un trou de  $0,3\text{ }\mu\text{m}$  de diamètre percé dans une cuve de polystyrène. Une solution de diphytanoylphosphatidylcholine (DPPC) dans le n-décane ( $20\text{ }\mu\text{g/l}$ ) est préparée avant chaque expérience à partir d'une solution de DPPC dans le chloroforme et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Le chloroforme est évaporé sous azote et le phospholipide est repris dans le n-décane. Deux  $\mu\text{l}$  de cette solution sont appliqués petit à petit sur le trou de la cuve et le n-décane est évaporé sous azote de façon à enduire les parois du trou de phospholipide. La cuve est ensuite placée dans une chambre et l'ensemble est fixé dans un boîtier blindé. Les compartiments *cis* (chambre; volume  $1,8\text{ }\mu\text{l}$ ) et *trans* (cuve; volume  $2,4\text{ }\mu\text{l}$ ) sont remplis avec des solutions contenant respectivement:  $150\text{ }\mu\text{M}$  NaCl,  $2\text{ }\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $5\text{ }\mu\text{M}$  MOPS-NaOH,  $\text{pH } 7$  en *cis* et  $150\text{ }\mu\text{M}$  KCl,  $5\text{ }\mu\text{M}$  MOPS-KOH,  $\text{pH } 7$  en *trans*. Pour former la bicouche lipidique, un cône de pipette est trempé dans la solution de DPPC dans le n-décane et une bulle d'air formée à sa pointe est passée sur le trou de la cuve. La formation de la bicouche est suivie en enregistrant le courant capacitif produit par une succession d'impulsions triangulaires transmembranaires de  $10\text{ }\mu\text{V}$  d'amplitude et de fréquence  $50\text{ Hz}$ , courant proportionnel à la surface de la bicouche. Lorsque la bicouche lipidique est stabilisée, on vérifie que sa capacité membranaire est d'environ  $400\text{ pF}$ , correspondant à une capacité spécifique de l'ordre de  $0,6\text{ pF/cm}^2$ , valeur habituelle dans ce type d'expérimentation.

### Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements sont réalisés au moyen d'un amplificateur (Biologic) fournissant une tension proportionnelle au courant traversant la bicouche en présence d'un potentiel imposé entre les compartiments *cis* et *trans*. Par convention, le potentiel du compartiment *trans* est pris comme référence ( $V_{\text{trans}} = 0\text{ }\mu\text{V}$ ). Chaque entrée de l'amplificateur est reliée par une électrode d'argent chloruré à un puits contenant du KCl ( $150\text{ }\mu\text{M}$ ). Ces puits sont respectivement reliés aux compartiments *cis* et *trans* par des ponts d'agar (2%) contenant du KCl ( $150\text{ }\mu\text{M}$ ). Le courant est visualisé sur un oscilloscope et enregistré sous forme numérique sur un magnétoscope (Sony). Le traitement ultérieur des données se fait sur ordinateur après conversion analogique-numérique du signal. Dans les figures présentées ci-dessous, une augmentation de la conductance de la bicouche (due par exemple à l'ouverture d'un pore) se traduit par une déflexion du signal vers le haut à un potentiel positif et vers le bas à un potentiel négatif.

## RÉSULTATS

Les résultats obtenus antérieurement (voir plus haut) suggèrent que la TLY est capable de former elle-même un pore dans la membrane cellulaire, c'est-à-dire y former un canal sensible à des bloquants non spécifiques comme les ions  $\text{La}^{3+}$  ou  $\text{Ni}^{2+}$ . Nous avons



Fig. 1. Courant enregistré à 60 mV à travers une bicouche de DPPC après addition de trachinylisine (TLY) à une concentration finale de 120  $\mu$ M. La TLY provoque une augmentation du courant sous forme d'un bruit où l'on ne distingue pas de canaux. Dans cette figure et les suivantes, le courant est filtré à 0,2 kHz et échantillonné à 0,4 kHz. La ligne pointillée indique le niveau 0 pA. [Current flowing at 60 mV through a DPPC bilayer after addition of TLY at a final concentration of 120  $\mu$ M. TLY initially induces noisy current variations without detectable channel activity. In this figure and the following ones, the current is filtered at 0,2 kHz and sampled at 0,4 kHz. The dashed line indicates the 0 pA level.]

donc entrepris de tester l'aptitude de la TLY à modifier les propriétés électriques de membranes artificielles en s'y insérant, à l'instar de l' $\alpha$ -latrotoxine (Finkelstein *et al.*, 1976).

#### Destabilisation des membranes

La TLY (concentration finale 120  $\mu$ M) est introduite dans le compartiment *cis* et la solution est agitée pendant une minute. Après quelques minutes, on observe des modifications de la conductance (Fig. 1). Ces perturbations sont surtout observées pour des valeurs hautes du potentiel imposé ( $\pm 80$ , 60, 50 mV). Elles évoquent de très brèves ruptures de la membrane. Aucune insertion typique d'un canal bien caractérisé n'est observée. Ces perturbations peuvent apparaître de façon transitoire, disparaître et réapparaître de façon aléatoire. Elles n'apparaissent pas en l'absence de toxine. Ces observations suggèrent que la toxine peut s'insérer dans une bicouche lipidique en y créant des structures transitoires perméables aux ions des solutions.

#### Formation de pores

Dans certains cas, nous avons observé après ces "bouffées" déstabilisatrices, des activités évoquant nettement celles d'un canal (Fig. 2A). Le courant oscille alors entre deux états de conductance principaux bien définis, correspondant aux états "ouvert" et "fermé". Le courant à l'état "fermé", plusieurs fois supérieur au courant de fuite de la bicouche, indique que le pore n'est en réalité pas complètement fermé dans cette configuration.

Ce pore a pratiquement la même sélectivité pour le Na<sup>+</sup> et le K<sup>+</sup>. En présence de 150  $\mu$ M NaCl, 2  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M MOPS-NaOH, pH 7 en *cis* et 150  $\mu$ M KCl, 5  $\mu$ M MOPS-KOH, pH 7 en *trans*, les courbes courant-voltage sont presque linéaires et le potentiel d'inversion (2,4-3,5 mV, n=3) est proche de 0 mV (Fig. 2B). Dans les conditions physiologiques, la conductance, déduite des courbes courant-voltage, varie de 50 à 90 pS dans l'intervalle de potentiel [-100 mV, +100 mV] (Fig. 2B). Au voisinage du potentiel d'inversion, elle est d'environ 75 pS. Le pore formé par la TLY n'est pas sensible au potentiel (Fig. 2A).

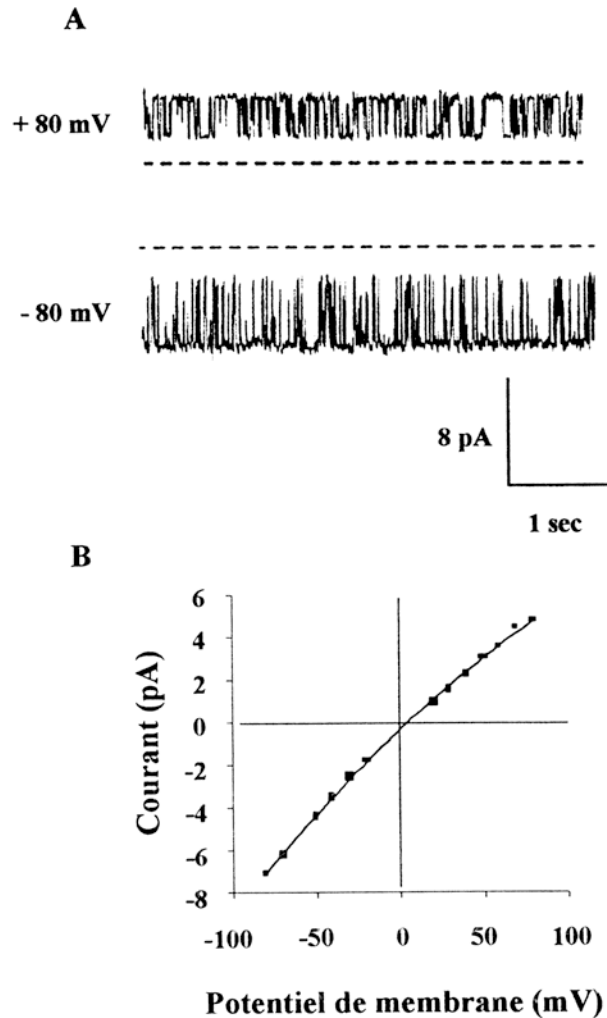


Fig. 1. Caractéristiques des pores formés par la TLY dans les bicouches lipidiques planes. **A**: Échantillons de courant enregistrés à  $+80$  mV et  $-80$  mV en présence de  $120$   $\mu$ M TLY. **B**: Valeur du courant traversant le pore à l'état ouvert en fonction du potentiel transmembranaire. [Characteristics of pores formed by TLY in lipid planar bilayers. **A**: Samples of current traces recorded at  $+80$  mV and  $-80$  mV in the presence of  $120$   $\mu$ M TLY. **B**: Voltage-dependence of the current flowing through the open pore.]

Les deux types d'activité décrites précédemment (bouffées déstabilisatrices et canaux) peuvent être observés soit en alternance, soit simultanément. Dans certains cas, nous avons également enregistré une activité de type canal, présentant des sauts de conductance plus grands que la conductance élémentaire du pore canal décrit ci-dessus; ces événements (conductance  $\approx 100$  pS) apparaissent de manière aléatoire pendant de courtes durées pour de hautes valeurs absolues du potentiel imposé ( $\pm 30$  à  $\pm 90$  mV). Étant donné le caractère sporadique de leur apparition, ces "canaux géants" n'ont pas pu être caractérisés de façon précise.

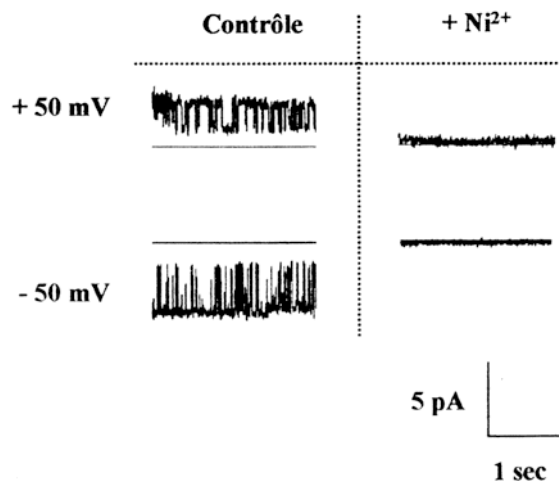


Fig. 3. Blocage du pore induit par la TLY par le  $\text{Ni}^{2+}$ . Gauche: Echantillons de courant enregistrés à  $+50\text{ mV}$  et  $-50\text{ mV}$  avant addition de  $\text{Ni}^{2+}$ . Droite: Echantillons de courant enregistrés aux mêmes potentiels après addition de  $\text{Ni}^{2+}$  à une concentration finale de  $1\ \mu\text{M}$ . [Blockade of the TLY-induced pore by  $\text{Ni}^{2+}$ . Left: samples of current traces recorded at  $+50\text{ mV}$  and  $-50\text{ mV}$  before  $\text{Ni}^{2+}$  addition. Right: samples of current traces recorded at the same voltages after  $\text{Ni}^{2+}$  addition at a final concentration of  $1\ \mu\text{M}$ .]

Nous avons voulu savoir si les pores formés par la TLY dans des bicouches lipidiques planes pouvaient être bloqués par le  $\text{Ni}^{2+}$ , bloquant non spécifique qui, comme le  $\text{La}^{3+}$ , bloque totalement l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire évoquée par la TLY. Nous avons donc ajouté au milieu d'étude du  $\text{Ni}^{2+}$  à une concentration finale de  $1\ \mu\text{M}$ . Nous avons immédiatement observé un blocage du pore (Fig. 3).

Ce blocage est réversible par simple lavage du  $\text{Ni}^{2+}$  (résultat non montré). Cependant, deux types de situation ont été rencontrés. Dans le premier, on récupère bien une activité canal analogue à l'activité observée avant addition du  $\text{Ni}^{2+}$ . Dans d'autres cas, l'activité retrouvée après lavage correspond alors aux bouffées déstabilisatrices décrites précédemment. Ce résultat n'est pas étonnant, les deux types d'activité pouvant, comme nous l'avons signalé ci-dessus, alterner spontanément en l'absence de tout effecteur.

## DISCUSSION

Les expériences menées sur des bicouches lipidiques planes de synthèse montrent que la TLY peut s'insérer dans une membrane et y former un pore d'une conductance voisine de  $80\text{ pS}$  à  $-80\text{ mV}$  ( $\text{NaCl } 150\ \mu\text{M cis} / \text{KCl } 150\ \mu\text{M trans}$ ), bloqué d'une manière réversible par les ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Ces résultats suggèrent que la TLY est apte à former des pores dans les membranes naturelles et provoquer ainsi une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. La TLY agirait donc par un mécanisme analogue à celui qui a été proposé pour de nombreuses autres toxines animales ou bactériennes. Parmi celles-ci, l' $\alpha$ -latrotoxine (LTX) a fait l'objet de nombreuses études qui montrent que cette toxine, isolée du venin de l'araignée *Latrodectus mactans tredecimguttatus*, induit de manière irréversible des canaux perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans la membrane (Finkelstein *et al.*, 1976). La LTX, tout comme la TLY, induit une libération massive de neurotransmetteurs à la jonction neuromusculaire de grenouille

(Clark *et al.*, 1970; Frontali *et al.*, 1976; Colasante *et al.*, 1996) et de catécholamines au niveau de cellules neuro-endocrines (Liu et Misler, 1998; Meunier *et al.*, 2000).

À la différence de la LTX, la TLY forme des pores instables, l'activité canal pouvant alterner avec une activité de bouffées. Cela suggère que la molécule une fois insérée dans la membrane pourrait prendre plusieurs conformations. Les bouffées seraient dues à une perturbation de la bicouche par la toxine insérée alors que dans l'activité de type canal, les ions transiteraient par un véritable pore. Ce dernier pourrait être formé d'une seule molécule de TLY, mais on ne peut écarter l'hypothèse d'un pore formé par un assemblage transitoire de plusieurs molécules de TLY. Un tel modèle expliquerait simplement l'instabilité du pore. Il permettrait également d'expliquer l'existence de pores de plus grande conductance observés de façon sporadique par des assemblages polymériques différents de celui qui correspond au pore de 80 pS.

La structure de la LTX n'a pas été résolue, mais les toxines aptes à former des pores dans les membranes présentent dans leur structure secondaire des motifs de type hélice amphiphile, c'est-à-dire une hélice présentant une face hydrophobe et une face hydrophile. Plus proche de la TLY (deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , de 76 et 83 kDa), la stonustoxine (SNTX), est une toxine isolée du poisson-pierre *Synanceia horrida* et formée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , de 71 et 79 kDa. Ces deux toxines de poissons-pierre ont une activité hémolytique (Kreger, 1991; Chen *et al.*, 1997). La SNTX est apte à former des pores hydrophiles dans les membranes, responsables de la lyse des érythrocytes (Chen *et al.*, 1997). Des prédictions de structure secondaire montrent la présence de deux hélices amphiphiles dans les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Ghadessy *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997). L'action de la TLY sur le  $Ca^{2+}$  intracellulaire et sur la sécrétion dans les cellules chromaffines pourrait être déclenchée par la formation de pores dans la membrane et l'influx consécutif de  $Ca^{2+}$ .

**Remerciements.** Ce travail a été possible grâce aux subventions de la Direction des Systèmes de Forces et de la Prospective (contrat n° 98/1051) et à une bourse de doctorat accordée par la Direction des Recherches Etudes et Techniques à C.M.

## RÉFÉRENCES

- CHEN D., KINI R.M., YUEN R. & H.E. KHOO, 1997. Hemolytic activity of stonustoxin from stonefish (*Synanceja horrida*) venom: Pore formation and the role of cationic amino acid residues. *Biochem. J.*, 325: 685-691.
- CLARK A.W., MAURO A., LONGENECKER H.E. Jr. & W.P. HURLBUT, 1970. Effects of black widow spider venom on the frog neuromuscular junction. Effects on the fine structure of the frog neuromuscular junction. *Nature*, 225: 703-705.
- COLASANTE C., MEUNIER F.A., KREGER A.S. & J. MOLGÓ, 1996. Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom. *Eur. J. Neurosci.*, 8: 2149-2156.
- FINKELSTEIN A., RUBIN L.L. & M.C. TZENG, 1976. Black widow spider venom: effect of purified toxin on lipid bilayer membranes. *Science*, 193: 1009-1011.
- FRONTALI N., CECCARELLI B., GORIO A., MAURO A., SIEKEVITZ P., TZENG M.C. & W.P. HURLBUT, 1976. Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junctions. *J. Cell. Biol.*, 68: 462-479.

- GARNIER P., GOUDEY-PERRIERE F., BRETON P., DEWULF C., PETEK F. & C. PERRIERE, 1995. Enzymatic properties of the stonefish (*Synanceia verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. *Toxicon*, 33: 143-155.
- GHADESSY F.J., CHEN D., KINI R.M., CHUNG M.C.M., JEYASEELAN K., KHOO H.E. & R. YUEN, 1996. Stonustoxin is a novel lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. cDNA cloning and characterization. *J. Biol. Chem.*, 271: 25575-25581.
- GOUDEY-PERRIERE F. & C. PERRIERE, 1998. Propriétés pharmacologiques des venins de poissons. *C.R. Séances Soc. Biol. Fil.*, 192: 503-548.
- KREGER A.S., 1991. Detection of a cytolytic toxin in the venom of the stonefish (*Synanceia trachynis*). *Toxicon*, 29: 733-743.
- KREGER A.S., MOLGÓ J., COMELLA J.X., HANSSON B. & S. THESLEFF, 1993. Effects of stonefish (*Synanceia trachynis*) venom on murine and frog neuromuscular junctions. *Toxicon*, 31: 307-317.
- LIU J. & S. MISLER, 1998.  $\alpha$ -latrotoxin-induced quantal release of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *Brain Res.*, 799: 55-63.
- MEUNIER F.A., MATTEI C., CHAMEAU P., LAWRENCE G., COLASANTE C., KREGER A.S., DOLLY J.O. & J. MOLGÓ, 2000. Trachynilysin mediates SNARE-dependent release of catecholamines from chromaffin cells via external and stored  $Ca^{2+}$ . *J. Cell Sci.*, 113: 1119-1125.
- MUELLER P., RUDIN D.O., TIEN H.T. & W.C. WESCOTT, 1963. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions. *J. Phys. Chem.*, 67: 534-535.
- POH C.H., YUEN R., KHOO H.E., CHUNG M., GWEE M. & P. GOPALAKRISHNAKONE, 1991. Purification and partial characterization of stonustoxin (lethal factor) from *Synanceja horrida* venom. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 99: 793-798.
- PRUSS R.M. & K.A. STAUDERMAN, 1988. Voltage-regulated calcium channels involved in the regulation of enkephalin synthesis are blocked by phorbol ester treatment. *J. Biol. Chem.*, 263: 13173-13178.

Reçu le 01.04.2000.

Accepté pour publication le 23.08.2000.