



pleurodèle, une stratégie anti-sens pour perturber l'expression du canal sensible aux DHP au niveau des cellules de l'ectoderme dorsal inhibe la neurulation et le développement de l'embryon se poursuit avec une absence de structures nerveuses antérieures (encéphale, yeux) [19]. Chez le xénope, la surexpression des différentes sous-unités composant le canal sensible aux DHP produit une dorsalisation de l'embryon [20].

• Le second niveau nous amène à moduler le concept d'induction neurale par défaut. Nous montrons que le  $Ca^{2+}$  est nécessaire et suffisant pour orienter les cellules de l'ectoderme dans un destin neural même dans un contexte où BMP est actif ce qui donne un rôle instructif à  $Ca^{2+}$ . Ce rôle est relayé par l'activation d'une cascade de gènes nécessaire à la neuralisation de l'ectoderme. En particulier nous avons montré qu'une enzyme activée par le  $Ca^{2+}$  avait un rôle instructif dans le choix du destin cellulaire (neural ou épidermique). ♦

#### Neural induction in amphibians: a problem of calcium?

## RÉFÉRENCES

- Weinstein DC, Hemmati-Brivanlou A. Neural induction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15 : 411-33.
- Stern CD. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development* 2005; 132 : 2007-21.
- Delaune E, Lemaire P, Kodjabachian L. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* 2005; 132 : 299-310.
- Barth LG, Barth LJ. Sequential induction of the presumptive epidermis of the *Rana pipiens* gastrula. *Biol Bull* 1964; 127 : 413-27.
- Grunz H, Tacke L. Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer. *Cell Differ Dev* 1989; 28 : 211-7.
- Saint-Jeannot JP, Huang S, Duprat AM. Modulation of neural commitment by changes in target cell contacts in *Pleurodeles waltl*. *Dev Biol* 1990; 141 : 93-103.
- Moreau M, Leclerc C. The choice between epidermal and neural fate: a matter of calcium. *Int J Dev Biol* 2004; 48 : 75-84.
- Kuroda H, Fuentealba L, Ikeda A, et al. Default neural induction: neuralization of dissociated *Xenopus* cells is mediated by Ras/MAPK activation. *Genes Dev* 2005; 19 : 1022-7.
- Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* 1995; 376 : 331-3.
- Leclerc C, Daguzan C, Nicolas MT, et al. L-type calcium channel activation controls the *in vivo* transduction of the neuralizing signal in the amphibian embryos. *Mech Dev* 1997; 64 : 105-10.
- Moreau M, Leclerc C, Gualandris-Pariset L, et al. Increased internal  $Ca^{2+}$  mediates neural induction in the amphibian embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 : 12639-43.
- Leclerc C, Webb SE, Daguzan C, et al. Imaging patterns of calcium transients during neural induction in *Xenopus laevis* embryos. *J Cell Sci* 2000; 113 : 3519-29.
- Webb SE, Lee KW, Karplus E, et al. Localized calcium transients accompany furrow positioning, propagation, and deepening during the early cleavage period of zebrafish embryos. *Dev Biol* 1997; 192 : 78-92.
- Leclerc C, Duprat AM, Moreau M. Noggin upregulates Fos expression by a calcium-mediated pathway in amphibian embryos. *Dev Growth Differ* 1999; 41 : 227-38.
- Batut J, Vandel L, Leclerc C, et al. The  $Ca^{2+}$ -induced methyltransferase xPRMT1b controls neural fate in amphibian embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 : 15128-33.
- Neant I, Leclerc C, Batut J, et al. An increase in intracellular free calcium controls the expression of an arginine N-methyl-transferase involved in neural determination in amphibian embryo. *Med Sci (Paris)* 2006; 22 : 346-48.
- Drean G, Leclerc C, Duprat AM, et al. Expression of L-type  $Ca^{2+}$  channel during early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* 1995; 39 : 1027-32.
- Leclerc C, Duprat AM, Moreau M. *In vivo* labelling of L-type  $Ca^{2+}$  channels by fluorescent dihydropyridine: correlation between ontogenesis of the channels and the acquisition of neural competence in ectoderm cells from *Pleurodeles waltl* embryos. *Cell Calcium* 1995; 17 : 216-24.
- Leclerc C, Rizzo C, Daguzan C, et al. Neural determination in *Xenopus laevis* embryos: control of early neural gene expression by calcium. *J Soc Biol* 2001; 195 : 327-37.
- Palma V, Kukuljan M, Mayor R. Calcium mediates dorsoventral patterning of mesoderm in *Xenopus*. *Curr Biol* 2001; 11 : 1606-10.

## NOUVELLE

### Signalisation calcique cytosolique et nucléaire et réponses des plantes aux stimulus biotiques et abiotiques

Tou-Cheu Xiong, Stéphane Bourque, Christian Mazars, Alain Pugin, Raoul Ranjeva



Calcium et régulation des gènes en conditions normales et pathologiques

GDR 2688

► Pour convertir les variations d'un paramètre de leur environnement (stimulus) en réponse biologique adaptative, les plantes, comme tous les êtres vivants et, en particulier, les eucaryotes, mettent en jeu des « modules » de signalisation bien régulés. L'une des étapes-clés de ce processus complexe est le codage, par

la cellule, d'une information physique ou chimique dans un langage moléculaire qui prend en considération la nature, la force et la durée du stimulus. Ce codage est assuré par un nombre restreint de

T.C. Xiong, C. Mazars, R. Ranjeva :

UMR CNRS-UPS 5546, Signaux et messages cellulaires chez les végétaux, Pôle de Biotechnologie Végétale, 24, chemin de Borde Rouge, BP 42617, Auzeville, 31326 Castanet Tolosan, France.

GDR 2688, Calcium et régulation de l'expression des gènes en contexte normal et pathologique.

S. Bourque, A. Pugin : UMR Plante-Microbe-Environnement INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne, 17, rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

GDR 2688, Calcium et régulation de l'expression des gènes en contexte normal et pathologique.

[ranjeva@scsv.ups-tlse.fr](mailto:ranjeva@scsv.ups-tlse.fr)

« seconds messagers » qui interviennent dans le fonctionnement cellulaire de l'organisme, de la fécondation à sa mort [1]. L'un de ces composés est l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  qui, à l'état libre, est présent à des concentrations sub-micromolaires dans le cytosol ou dans les compartiments métaboliquement actifs alors que le calcium cellulaire total atteint des concentrations millimolaires.

Cette homéostasie résulte de l'équilibre entre le pouvoir tampon cellulaire, la séquestration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans des organites intracellulaires et/ou son efflux vers le milieu extérieur grâce à des pompes d'une part, et la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  de ces réservoirs ou son entrée du milieu extérieur *via* des canaux, d'autre part [2]. Le maintien de cette homéostasie est crucial car à des concentrations élevées, le  $\text{Ca}^{2+}$  exerce un effet cytotoxique en provoquant, par exemple, la précipitation des ions phosphates.

De très nombreux stimulus rompent l'homéostasie calcique et, ce faisant, déclenchent des effets biochimiques en cascade, participant au décodage des signaux perçus par les cellules et

aboutissant à l'expression de gènes. En raison de cet effet pléiotrope, le  $\text{Ca}^{2+}$  peut donc être un simple interrupteur, non spécifique, dans la signalisation cellulaire végétale [3]. Toutefois, de nombreux résultats expérimentaux montrent maintenant que les variations calciques ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ ) ne s'effectuent pas de manière stéréotypée mais selon une logique qui conduit à une « signature » ou « empreinte » propre à chaque stimulus et réponse [4]. Ce sont les composantes spatiales et temporelles de cette signature que nous allons considérer ici, en prenant des exemples montrant qu'elles spécifient la réponse des cellules végétales à des stimulus abiotiques ou biotiques.

#### Le taux de calcium libre est susceptible de varier dans les différents compartiments de la cellule végétale

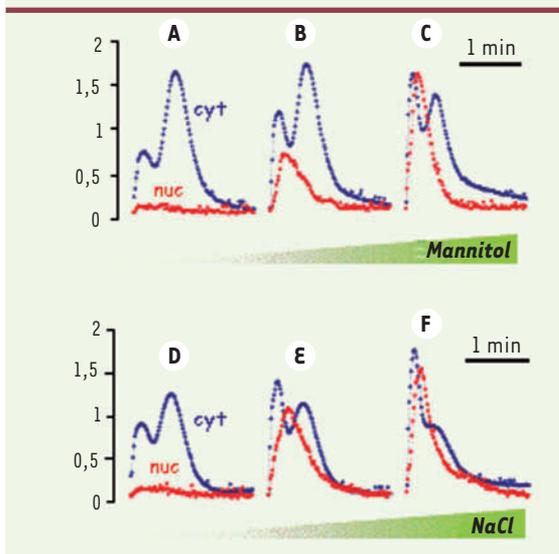
Le développement des méthodes de mesure des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  libre chez les plantes, surtout depuis l'utilisation de l'aequorine recombinante, a permis de suivre *in situ* les

$\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ . Cette protéine dont la bioluminescence est fonction de  $[\text{Ca}^{2+}]$  a été adressée sélectivement dans les différents organites de la cellule. Grâce à cette méthodologie, on a pu montrer que le taux de calcium libre ( $\text{Ca}^{2+}$  second messenger) variait spécifiquement dans le cytosol, les mitochondries, les chloroplastes ou le noyau de la cellule végétale, en réponse à différents stimulus [5, 6]. Ces données montrent d'une part, que les organites (vacuole et parois mises à part) ne sont pas de simples réservoirs de  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisable pour contrôler le niveau calcique du cytosol et posent,

d'autre part, la question de la gestion et du rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  messenger dans les différents compartiments où se déroulent aussi des processus  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendants. Dans cet article, nous nous limiterons strictement aux compartiments cytosolique  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , qui est le plus étudié, et nucléaire  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ , siège du contrôle de l'expression des gènes.

#### Le taux de calcium libre dans le cytosol varie de manière codifiée selon les stimulus perçus par la cellule

Comme l'illustre la Figure 1, l'information véhiculée par le  $\text{Ca}^{2+}$  est codée selon différents paramètres : amplitude, durée, fréquence et cinétique. Ainsi, un choc hyperosmotique provoque une  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  biphasique et transitoire, chez les cellules de tabac. De plus, pour une même osmolarité (520 mosmol), le rapport entre la première et la deuxième vague calcique qui est de 0,48 quand on utilise un composé neutre (le mannitol) passe à une valeur supérieure à 1 quand l'osmoticum est le NaCl. Dans les deux cas, les  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  qui peuvent atteindre des concentrations supérieures à  $1\ \mu\text{M}$  s'arrêtent dans les 2 minutes qui suivent l'application du stimulus. Des  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  cytosoliques et nucléaires différentielles sont également obtenues quand des cellules sont confrontées à des molécules d'origine microbienne appelées « éliciteurs » [7]. Ces composés induisent des réactions de défense qui protègent les plantes contre un large spectre de microorganismes pathogènes. Parmi ces réactions de défense, la réaction hypersensible est une forme de mort cellulaire programmée des cellules de l'hôte au point d'inoculation qui bloque le développement du pathogène. Ainsi, des éliciteurs « nécrosants » comme le polypeptide sécrété par *Phytophthora cryptogea*, la cryptogéine, provoque une seconde élévation soutenue pendant plusieurs heures du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans le cytosol qui conduit à la mort cellulaire [7]. Au contraire, des éliciteurs « non nécrosants », comme divers oligosaccharides, entraînent des



**Figure 1.** Variations calciques cytosoliques (Cyt) et nucléaires (Nuc) après stimulation, par du mannitol (A-C) ou du NaCl (D-F), de cellules de tabac BY-2 exprimant l'apoequorine dans le noyau ou dans le cytosol. Les variations d'osmolarité sont de 300 mosmol (A, D) 520 mosmol (B, E) ou 880 mosmol (C, F) (adaptée de [6] avec l'autorisation des Éditions Elsevier).



$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  très transitoires Avec les différents éliciteurs utilisés, l'amplitude des élévations calciques cytosoliques et nucléaires dépend de la concentration utilisée en éliciteur. De plus, ce système biologique se « désensibilise » à la suite d'une seconde confrontation avec le même signal, mais demeure apte à générer des augmentations calciques appropriées à un stimulus différent.

Enfin, les  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  peuvent se présenter sous forme d'oscillations dont la fréquence est cruciale. Ainsi, la fermeture des stomates (structures importantes dans les échanges d'eau et de gaz entre la plante et son milieu extérieur) induite par une hormone végétale, l'acide abscissique, implique une série d'oscillations calciques dans le cytosol. Le mutant *det 3* de *Arabidopsis thaliana*, affecté dans l'aptitude à séquestrer le  $\text{Ca}^{2+}$  dans les *pools* internes, est incapable d'engendrer ces oscillations et de fermer les stomates. La réponse biologique est restaurée en créant artificiellement des oscillations calciques ayant une amplitude et une fréquence identiques à celles des oscillations naturelles [8].

Ces données montrent donc que la  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  est porteuse d'une information codée dont l'amplitude est fonction de l'intensité de la stimulation.

### Le noyau et le cytosol contribuent à déterminer une signature calcique cellulaire

Chez les végétaux, comme chez les animaux, le noyau héberge de nombreux

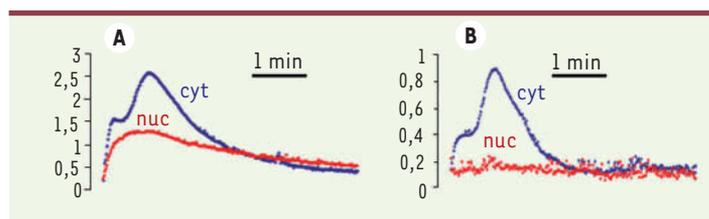
chaînon de la voie de signalisation calcique (protéines affines comme la calmoduline ou CaM, facteurs de transcription CaM-dépendants, protéines kinases...). Il n'est donc pas étonnant que l'on observe des variations calciques dans cet organite dont on pensait qu'elles reflétaient les fluctuations cytosoliques. Or, de nombreux faits expérimentaux vont à l'encontre de cette hypothèse. Ainsi, quand les cellules de tabac sont placées en situation hypotonique par rapport au milieu de culture standard (-150 mosmol), le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  libre augmente dans le cytosol et dans le noyau. En revanche, en situation hypertonique (+150 mosmol) l'élévation du  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  ne s'accompagne pas de variations du  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  [6]. De même, alors que la cryptogéine et les oligosaccharides induisent une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , seule la cryptogéine provoque des  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  importantes [9]. L'étude cinétique montre, par ailleurs, que les  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  se produisent tardivement par rapport au cytosol, ce qui exclut une simple diffusion et pose le problème des mécanismes de la production des signaux calciques nucléaires. Dans le cas de la réponse à la cryptogéine, les  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  sont sous contrôle d'autres seconds messagers : IP<sub>3</sub>,  $\text{H}_2\text{O}_2$  mais pas NO ni ADPRc.

### Le noyau est capable d'engendrer des signaux calciques indépendamment du cytosol

Le noyau est délimité par une double membrane ponctuée par des pores

les  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  correspondent à une diffusion du  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ . Or, des noyaux, morphologiquement intacts, isolés de cellules de tabac sont imperméables au calcium présent à différentes concentrations dans le milieu d'incubation mais répondent par des  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  dans le nucléoplasme, à des composés chimiques (mastoparan), à l'élévation de température ou à une stimulation mécanique. Ils sont donc capables de convertir directement un stimulus en  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  et le pH du milieu joue un rôle essentiel. Ainsi, à pH légèrement alcalin, les  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  dépendent strictement de la température, la stimulation mécanique restant sans effet. À l'inverse, à pH acide, la stimulation mécanique provoque des  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  qui suivent la fréquence des stimulus alors que l'élévation de la température reste sans effet. Les processus sont parfaitement réversibles en fonction du pH du milieu. La combinaison d'approches basées sur la pharmacologie et sur la modélisation suggère fortement que le noyau de la cellule végétale est capable de réguler les  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  grâce à l'action coordonnée de pompes et de canaux qui, localisés sur la membrane interne de l'enveloppe nucléaire, permettent d'injecter le calcium dans le nucléoplasme ou de le séquestrer dans l'espace intermembranaire du noyau [11]. Dans ce système « clos » les variations calciques provoquent des modifications du profil de protéines phosphorylées, ce qui suggère la possibilité d'un couplage direct entre stimulation externe et réponse nucléaire.

Dans la cellule, les échanges d'informations entre cytosol et noyau sont constants et, en terme de signalisation calcique, ces deux compartiments ne sont certainement pas déconnectés. Au contraire, ils pourraient participer, tous deux, à déterminer une « signature calcique » spécifiant un stimulus et une réponse biologique chez les plantes.



**Figure 2. Réponses calciques différentielles cytosolique (Cyt) et nucléaire (Nuc) de cellules de tabac BY-2 stimulées soit par un choc hypo-osmotique (A) soit par un choc hyperosmotique (B).** La variation d'osmolarité est de 150 mosmol, dans les deux cas (adaptée de [6] avec l'autorisation des Éditions Elsevier).

En conclusion, comme tous les eucaryotes, la cellule végétale utilise le calcium comme second messager dans de nombreux processus biologiques. Le codage obéit, pour l'essentiel, aux mêmes lois que celles mises en évidence notamment chez les animaux mais certains systèmes de décodage (*calcium-dependent protein kinases*, *CaM-like*) sont propres aux plantes. L'une des originalités du végétal est aussi la capacité du noyau isolé à percevoir des stimulus et à les convertir en variations de concentration en calcium nucléoplasmique indépendamment du cytosol. Cette propriété illustre l'autonomie (au moins partielle) du noyau en matière de gestion de l'homéostasie calcique qui fait débat dans le domaine général de la biologie

cellulaire. Le dialogue entre cytosol et noyau en matière de signalisation calcique et de régulation d'expression génique et/ou de réorientation du métabolisme chez les plantes sera l'un des thèmes de recherche privilégiés dans le futur. ♦

### Cytosolic and nuclear calcium signalling in plants reply to biotic and abiotic stimuli

#### RÉFÉRENCES

1. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000 ; 1 : 11-21.
2. Berridge M, Bootman MD, Roderick L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 ; 4 : 517-29.
3. Scrase-Field SA, Knight MR. Calcium: just a chemical switch? *Curr Opin Plant Biol* 2003 ; 6 : 500-6.
4. McAinsh MR, Hetherington AM. Encoding specificity in  $Ca^{2+}$  signalling systems. *Trends Plant Sci* 1998 ; 3 : 32-6.

5. Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trevas AJ. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 1991 ; 352 : 524-6.
6. Pauly N, Knight MR, Thuleau P, et al. The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium* 2001 ; 30 : 413-21.
7. Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, et al. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant J* 2002 ; 14 : 2627-41.
8. Allen GJ, Chu SP, Schumacher K, et al. Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science* 2000 ; 289 : 2338-42.
9. Lecourieux D, Lamotte O, Bourque S, et al. Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* 2005 ; 38 : 527-38.
10. Perez-Terzic C, Jaconi M, Clapham DE. Nuclear calcium and the regulation of the nuclear pore complex. *Bioessays* 1997 ; 19 : 787-92.
11. Xiong TC, Jauneau A, Ranjewa R, Mazars C. Isolated plant nuclei as mechanical and thermal sensors involved in calcium signalling. *Plant J* 2004 ; 40 : 12-21.

## NOUVELLE



### Les canalopathies calciques

#### Bilan et perspectives

Philippe Lory, Isabelle Bidaud,  
Alexandre Mezghrani, Arnaud Monteil



Calcium et régulation  
des gènes en conditions  
normales et pathologiques

GDR 2688

Département de Physiologie,  
Institut de Génétique Fonctionnelle (IGF),  
CNRS UMR 5203, Inserm U661,  
Universités de Montpellier I et II,  
141, rue de la Cardonille,  
34094 Montpellier Cedex 05, France.  
[philippe.lory@igf.cnrs.fr](mailto:philippe.lory@igf.cnrs.fr)

➤ Les canalopathies calciques représentent un groupe hétérogène de maladies héréditaires comprenant paralysie périodique, migraine, ataxie, rétinite pigmentaire, épilepsie et autisme. Souvent de transmission dominante, elles ont en commun d'être associées à des mutations dans les gènes des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire (canaux  $Ca_v$ ) (Figure 1) et, comme la plupart des canalopathies, présentent un caractère épisodique ou sporadique des manifestations de la maladie: une signature clinique caractéristique d'une atteinte électrophysiologique. Toutefois, bon nombre des mutations conduisent à des altérations électrophysiologiques discrètes, rendant l'interprétation des relations génotype-

phénotype difficile. L'objectif des études actuelles est multiple tant sur le plan fondamental que clinique: précision du diagnostic, compréhension du dysfonctionnement des canaux, développement de stratégies thérapeutiques. Toutefois, le chemin est long depuis l'interprétation du dysfonctionnement du canal jusqu'à la compréhension des mécanismes physiopathologiques chez le patient et leur traitement. Nous tentons d'identifier ici quelques faits marquants et les défis actuels des études des canalopathies calciques.

#### Canaux $Ca_v$ de type L ( $Ca_v1$ )

La paralysie périodique hypokaliémique (HypoPP1) fut la première maladie génétique humaine autosomale dominante

associée à des mutations d'un canal  $Ca_v$  ( $Ca_v1.1$ ) du muscle squelettique (Tableau 1). Toutefois, il n'a pas été possible jusqu'à ce jour d'établir une corrélation claire entre ces mutations faussés et le tableau clinique observé [1]. Tout récemment, des mutations responsables du syndrome de Timothy ont été identifiées dans le gène *CACNA1C* codant pour la sous-unité  $Ca_v1.2$  [2]. Cette maladie très rare comporte un trouble de la conduction cardiaque (LQT8), une syndactylie des mains et des pieds, des anomalies morphologiques faciales, un déficit immunitaire et des troubles neuropsychiatriques s'apparentant à