

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, Ranjiva 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



GDR 2688

Calcium et régulation
des gènes en conditions
normales et pathologiques

➤ 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

Département de Physiologie,
Institut de Génomique 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

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 faux-sens 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



Sous-unités	Gène (HUGO/GDB)	Localisation chromosomique	Pathologies associées
$Ca_v2.1/ \alpha_{1A}$	CACNA1A	19p13.1-.2	Ataxie spinocérébelleuse (SCA6) Ataxie épisodique (EA2) Migraine hémiplégique (FHM1)
$Ca_v2.2/ \alpha_{1B}$	CACNA1B	9q34	
$Ca_v1.2/ \alpha_{1C}$	CACNA1C	12p13.3	Syndrome de Timothy
$Ca_v1.3/ \alpha_{1D}$	CACNA1D	3p14.3	
$Ca_v2.3/ \alpha_{1E}$	CACNA1E	1q25-q31	
$Ca_v1.4/ \alpha_{1F}$	CACNA1F	Xp11	Cécité nocturne congénitale stationnaire (CSNB2)
$Ca_v3.1/ \alpha_{1G}$	CACNA1G	17q22	
$Ca_v3.2/ \alpha_{1H}$	CACNA1H	16p13.3	Épilepsie infantile de type absence (CAE)
$Ca_v3.3/ \alpha_{1I}$	CACNA1I	22q13	
$Ca_v1.1/ \alpha_{1S}$	CACNA1S	1q31-q32	Paralysie périodique hypokaliémique (HypoPP1), Hyperthermie maligne (MHS5)

Tableau I. Localisation chromosomique des dix gènes codant les sous-unités canalaire Ca_v . Des mutations ont été découvertes dans les trois grandes familles de canaux Ca_v (en gras : les gènes porteurs de mutations). L'ensemble des caractéristiques de ces gènes et des pathologies indiquées est consultable sur les sites de HUGO/GDB : <http://www.gdb.org/hugo/> ou <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/> et de OMIM : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

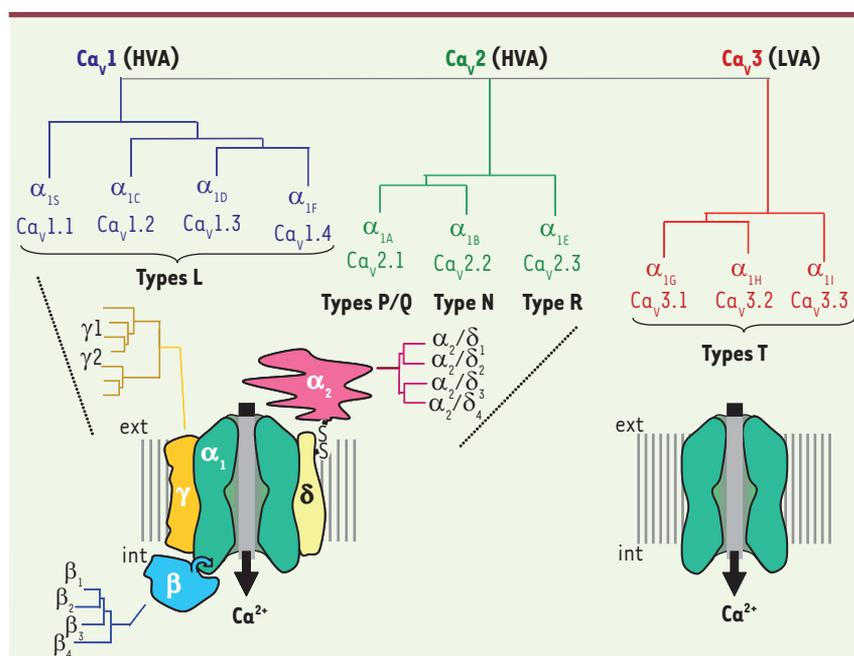


Figure 1. Les trois grandes familles de canaux calciques Ca_v comprenant : les canaux à haut seuil d'activation (HVA) Ca_v1 de type L (long lasting), les canaux Ca_v2 neuronaux (types N, P/Q et R) et les canaux à bas seuil d'activation (LVA) Ca_v3 de type T (transient ou tiny). Le répertoire des protéines codant pour les dix sous-unités canalaire (Ca_v ou α_1) est identifié depuis la fin des années 1990. Par opposition aux canaux Ca_v3 de type T pour lesquels on ne connaît pas de sous-unités associées, les canaux HVA forment un complexe hétéromultimérique associant les sous-unités régulatrices α_2/δ , β et γ , dont de nombreux gènes et isoformes sont identifiés.

l'autisme. La gravité de ce syndrome peut s'expliquer par le caractère ubiquitaire et la précocité de l'expression de ce canal. Ces mutations réduisent de façon importante l'inactivation du courant calcique : un mécanisme protégeant d'une surcharge calcique les cellules exprimant ce canal. Les deux mutations identifiées à ce jour impliquent un épissage différentiel de deux exons (8 et 8A). Alors que les conséquences électrophysiologiques des deux mutations sont proches en expression hétérologue, les patients atteints par l'une ou l'autre des mutations présentent des signes cliniques distincts, probablement lié à l'expression différentielle des exons 8 et 8A dans les nombreux tissus et cellules où le canal $Ca_v1.2$ est actif.

À l'image de la sous-unité $Ca_v1.1$, spécifique du muscle squelettique, $Ca_v1.4$ code pour un canal L presque exclusivement au niveau de la rétine. Plus de 20 mutations ont été identifiées dans *CACNA1F*, le gène correspondant. Elles sont associées à une forme de cécité noc-

turne congénitale stationnaire (CSNB2), une dysfonction rétinienne non évolutive et concernant préférentiellement les bâtonnets. Bon nombre sont des mutations non-sens et entraînent une perte de fonction dans la mesure où les protéines canalaire sont tronquées et incapables de permettre un influx de Ca^{2+} dans la cellule. Leurs conséquences fonctionnelles précises sont encore mal connues. Chez la souris, l'inactivation du gène *cacna1f* affecte le profil électrorétinographique, la transmission synaptique et l'organisation cellulaire de la rétine [3], des atteintes proches de celles observées chez les patients CSNB2.

Canaux Ca_v de type P/Q ($Ca_v2.1$)

Le gène *CACNA1A* codant pour la sous-unité $Ca_v2.1$ des canaux neuronaux P/Q est porteur de nombreuses mutations responsables de plusieurs maladies neurologiques à transmission dominante : FHM1, EA2 et SCA6 (Table 1), ainsi que de nombreuses formes intermédiaires de ces pathologies. Les études effectuées en expression hétérologue ne permettent pas toujours une interprétation aisée des relations génotype-phénotype pour certaines de ces mutations [4].

Une récente étude chez l'animal apporte un éclairage nouveau sur le mécanisme physiopathologique : l'introduction *in vivo* d'une mutation FHM1 (R192Q) par une stratégie de *knock-in* [5] résulte en une augmentation significative de la densité de courant P/Q dans les neurones du cervelet, une augmentation de la neurotransmission à la jonction neuromusculaire et un seuil abaissé de dépression corticale qui sous-tend l'aura migraineuse. Ces données suggèrent qu'une augmentation de l'activité des canaux P/Q, donc un gain de fonction, serait à la base de FHM1. Une augmentation de l'adressage membranaire et/ou une distribution neuronale anormale des canaux FHM1 sont également envisagées.

Concernant les mutations EA2, un certain nombre d'entre elles engendrent des formes tronquées de $Ca_v2.1$ qui ne produisent pas de canaux fonctionnels.

D'autres sont des mutations faux-sens qui affectent considérablement la densité de courant calcique, suggérant que les mutations EA2 sont « perte de fonction ». L'hypothèse jusqu'à présent avancée pour expliquer l'effet fonctionnel des mutations EA2 est l'haplo-insuffisance : la présence d'un allèle porteur d'une mutation EA2 réduirait de ~ 50 % le nombre de canaux P/Q fonctionnels. Cette explication n'est pas satisfaisante au regard des données obtenues sur les souris inactivées pour le gène *cacna1a* puisque les animaux hétérozygotes ne sont pas ataxiques [4]. EA2 étant de transmission dominante, une alternative récemment proposée est que les formes EA2 de $Ca_v2.1$ joueraient un rôle dominant négatif, réduisant significativement la fraction de canaux P/Q fonctionnels à la membrane plasmique [6].

Un défi actuel est d'identifier le mécanisme moléculaire impliqué dans ce phénomène de dominance négative à la base de l'EA2. Une autre étude suggère que certaines formes Ca_v tronquées pourraient interagir avec le canal pleine longueur et activer un stress cellulaire enclenchant un processus protecteur de type *unfolded protein response*, affectant la synthèse protéique [7]. Une autre énigme concerne la dégénérescence progressive des cellules de Purkinje du cervelet dans SCA6. Les mutations SCA6 affectent un domaine polyglutamine de l'extrémité C-terminale de $Ca_v2.1$ (exon 47). La taille normale de la répétition est de 18 codons CAG au plus, alors qu'une répétition égale ou supérieure à 20 codons entraîne une expression de la maladie. Plusieurs études ont identifié le caractère toxique des formes SCA6 de $Ca_v2.1$, la formation d'aggrégats intracellulaires et une altération des propriétés électrophysiologiques [8]. Une étude récente montre que la région carboxy-terminale de $Ca_v2.1$ peut être clivée et adressée au noyau [9] et qu'une région carboxy-terminale porteuse d'expansion polyglutamine s'avère particulièrement toxique pour la cellule.

Canaux Ca_v de type T ($Ca_v3.2$)

Les canaux calciques de type T sont activés par de faibles dépolarisations membranaires (LVA) et sont codés par trois gènes *CACNA1G*, *CACNA1H* et *CACNA1I* récemment caractérisés (Table 1). Des mutations du gène *CACNA1H* codant $Ca_v3.2$ ont été identifiées chez des patients CAE dans la population chinoise [10]. L'étude *in vitro* de ces mutations ne révélant pas d'altération majeure des propriétés électrophysiologiques [11], l'éventuel dysfonctionnement des canaux $Ca_v3.2$ doit être recherché ailleurs. Les mutations CAE favoriseraient l'adressage membranaire de $Ca_v3.2$, suggérant que l'atteinte primaire de ces canaux mutés concerne leur trafic cellulaire plutôt que les propriétés électrophysiologiques.

Perspectives offertes par l'étude des mutations des canaux calciques

Les canalopathies calciques sont des maladies génétiques rares. L'identification grandissante de mutations dans les gènes codant pour les canaux calciques a favorisé le développement de leur diagnostic génétique, mais il reste toutefois un pas immense entre diagnostic et traitement. L'effort effectué sur le plan de la génétique clinique, la recherche de mutations et leur analyse fonctionnelle a favorisé les interactions entre cliniciens et chercheurs, organisés en réseaux pour une meilleure interprétation des relations génotype-phénotype de ces pathologies. L'intérêt de ces études se situe à plusieurs niveaux. Elles permettent une meilleure compréhension des bases moléculaires du fonctionnement des canaux Ca_v . L'étude *in vitro* des mutations est assimilable à une forme d'étude structure-fonction « inverse » du canal puisque les conséquences *in vivo* sont connues. L'étude des canalopathies génétiques ouvre aussi des perspectives intéressantes pour la compréhension des mécanismes potentiellement mis en jeu dans les formes communes, ou acquises, de ces pathologies (exemple : migraine, épilepsie) et indique également l'intérêt potentiel d'évaluer ces canaux



comme candidats dans des pathologies plus complexes, à caractère multigénique (exemple : autisme, épilepsie). Par ailleurs, l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la dégénérescence neuronale dans les formes EA2 ou SCA6 pourrait renseigner sur les mécanismes mis en jeu dans le vieillissement.

Toute évolution dans la compréhension mécanistique des canalopathies calciques devrait à terme ouvrir sur des perspectives thérapeutiques mieux définies. Pour cela, il convient de développer les modèles d'études mimant au mieux les pathologies humaines. Suite aux études *in vitro*, en expression hétérologue, le développement de modèles animaux porteurs des mutations humaines (*knock-in*) présente un grand potentiel [5], non seulement pour l'étude du mécanisme

et de l'évolution des pathologies, mais également pour la recherche de molécules, ou d'autres stratégies thérapeutiques, capables de corriger ou d'atténuer les défauts identifiés. ♦

Calcium channelopathies : the current challenges

RÉFÉRENCES

1. Miller TM, Dias da Silva MR, Miller HA, et al. Correlating phenotype and genotype in the periodic paralyses. *Neurology* 2004 ; 63 : 1647-55.
2. Splawski I, Timothy KW, Decher N, et al. Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 8089-96
3. Mansergh F, Orton NC, Vessey JP, et al. Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina. *Hum Mol Genet* 2005 ; 14 : 3035-46.
4. Pietrobon D. Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Mol Neurobiol* 2002 ; 25 : 31-50.
5. Van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, et al. A *Cacna1a* knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 2004 ; 41 : 701-10.
6. Jeng CJ, Chen YT, Chen YW, et al. Dominant-negative effects of human P/Q-type Ca^{2+} channel mutations associated with episodic ataxia type 2. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 ; 290 : C1209-20.
7. Page KM, Hebllich F, Davies A, et al. Dominant-negative calcium channel suppression by truncated constructs involves a kinase implicated in the unfolded protein response. *J Neurosci* 2004 ; 24 : 5400-9.
8. Gomez CM. Polyglutamine aggregates in SCA6 Purkinje cells: a tail of two toxicities. *Neurology* 2001 ; 56 : 1618-9.
9. Kordasiewicz HB, Thompson RM, Clark HB, et al. Carboxyl termini of P/Q-type Ca^{2+} channel-1A subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity. *Hum Mol Genet* 2006 ; 15 : 1587-99.
10. Chen Y, Lu J, Pan H, et al. Association between genetic variation of *CACNA1H* and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol* 2003 ; 54 : 239-43.
11. Vitko I, Chen Y, Arias JM, et al. Functional characterization and neuronal modeling of the effects of childhood absence epilepsy variants of *CACNA1H*, a T-type calcium channel. *J Neurosci* 2005 ; 25 : 4844-55.

NOUVELLE

Un nouveau mécanisme de mémoire : connexions et déconnexions de neurones dans le néocortex de jeunes rats

Jean-Vincent Le Bé, Henry Markram

Laboratoire de Neurosciences des Microcircuits,
Institut Brain Mind, EPFL, 1015 Lausanne, Suisse.

jean-vincent.lebe@epfl.ch

henry.markram@epfl.ch

► L'apprentissage et la mémoire sont supposés provenir de changements dans les connexions synaptiques entre les neurones [1]. Le néocortex est le lieu d'intégration le plus avancé du cerveau. Il n'est présent que chez les mammifères et, chez l'homme, représente 80 % de la masse cérébrale. Il est possible de délimiter 6 couches de neurones dans le néocortex du rat qui sont numérotées du pia vers la substance blanche. Certains neurones pyramidaux de la couche 5 ont un dendrite apical qui s'étend jusque dans la couche 1 et y forme un épi. Ils ont un corps cellulaire plus grand que les autres neurones pyramidaux

du cortex, nous les appellerons les larges cellules pyramidales (LCP). Une récente étude [2] a montré que l'axone d'une LCP donnée forme plusieurs appositions (rapprochements de moins de 2 µm) sur les dendrites de toutes les LCP dont le corps cellulaire est situé dans un rayon de 200 µm. La différence entre les paires de neurones connectées et celles qui ne le sont pas réside dans la présence ou non de boutons sur l'axone présynaptique. Cet état de proximité des neurones suggère que les LCP peuvent se connecter et se déconnecter entre elles sans grand changement morphologique.

Le changement d'état du microcircuit à 12 heures d'intervalle

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la technique du *patch clamp*¹ sur des tranches sagittales de 300 µm d'épaisseur de cortex de rats Wistar âgés de 12 à 14 jours. Cette étude a été publiée en détail il y a quelques mois [3]. Notre installation dispose de 7 électrodes, permettant d'enregistrer et de stimuler jusqu'à 7 neurones simultanément. Lors d'un premier

¹ Enregistrement intracellulaire de l'activité électrique des neurones avec des microélectrodes en verre. La membrane est percée à l'intérieur de la pipette par application d'une pression négative dans la pipette qui contient une solution ionique proche de celle des cellules (même pH et même osmolarité).