

tants dans le mélanome et la maladie d'Alzheimer mais aussi dans la plupart des pathologies inflammatoires tant centrales que périphériques et dans le suivi thérapeutique de ces maladies, permettant ainsi une stratification des patients. La thérapie de demain associera une molécule ayant pour cible thérapeutique d'une pathologie, une protéine de liaison du calcium et des biomarqueurs utilisant le niveau d'expression d'un ensemble de calciprotéines afin de suivre l'évolution thérapeutique du malade. ♦

Calcium binding proteins as therapeutic targets?

RÉFÉRENCES

1. Liew CC, Ma J, Tang HC, et al. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med* 2006 ; 147 : 126-32.
2. Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, et al. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 2006 ; 312 : 217-24.
3. Mank M, Reiff DF, Heim N, et al. A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys J* 2006 ; 90 : 1790-6.
4. Haiech J, Moulhaye SB, Kilhoffer MC. The EF-handome: combining comparative genomic study using FamDBtool, a new bioinformatics tool, and the network of expertise of the European calcium society. *Biochim Biophys Acta* 2004 ; 1742 : 179-83.
5. Watterson DM, Haiech J, Van Eldik LJ. Discovery of new chemical classes of synthetic ligands that suppress neuroinflammatory responses. *J Mol Neurosci* 2002 ; 19 : 89-93.
6. Haiech J, Cavadore JC, Le Peuch C. Calcium signal and calcium antagonists. *J Pharmacol* 1985 ; 16 : 215-25.
7. Heizmann CW. The importance of calcium-binding proteins in childhood diseases. *J Pediatr* 2005 ; 147 : 731-8.
8. Subramanian L, Polans AS. Cancer-related diseases of the eye: the role of calcium and calcium-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 322 : 1153-65.
9. Braunewell KH. The darker side of Ca²⁺ signaling by neuronal Ca²⁺-sensor proteins: from Alzheimer's disease to cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2005 ; 26 : 345-51.
10. Melle C, Ernst G, Schimmel B, et al. Different expression of calgizarin (S100A11) in normal colonic epithelium, adenoma and colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2006 ; 28 : 195-200.
11. Nielsen K, Vorum H, Fagerholm P, et al. Proteome profiling of corneal epithelium and identification of marker proteins for keratoconus, a pilot study. *Exp Eye Res* 2006 ; 82 : 201-9.
12. Piazza O, Esposito G, De Robertis E, et al. S100B in Guillain-Barré syndrome. *Br J Anaesth* 2006 ; 96 : 141-2.

NOUVELLE



L'induction neurale chez les amphibiens
Un problème de calcium ?



Calcium et régulation des gènes en conditions normales et pathologiques

GDR 2688

Marc Moreau, Isabelle Néant, Julie Batut,
Anne Bibonne, Karen Lee, Catherine Leclerc

Centre de Biologie du Développement,
UMR 5547, 118, route de Narbonne,
31062 Toulouse Cedex 09
et GDR 2688, Toulouse, France.
leclerc@cict.fr

> La formation du système nerveux des vertébrés débute au moment de la gastrulation avec l'induction et la formation de la plaque neurale sur la face dorsale de l'embryon. Au stade blastula et jeune gastrula (7 à 9 heures après la fécondation), l'ectoderme de l'amphibien *Xenopus laevis* peut évoluer vers un destin épidermique ou neural. Les travaux de la dernière décennie ont montré que l'ectoderme se détermine en épiderme en réponse à l'activation de la voie de signalisation BMP4 et prend un destin neural lorsque cette voie est inhibée par des facteurs sécrétés par le mésoderme dorsal, tels que *noggin*, *chordin* ou *folistatine*. L'induction neurale se ferait donc selon un mécanisme « par défaut », qui ne nécessiterait que l'inhibition de la voie BMP4 et ne conduirait pas à l'activation d'une cascade de transduction spécifique [1]. Ce modèle, bien que largement admis, présente des limites.

Il a été principalement établi à partir d'expériences réalisées sur des ectodermes isolés et jamais sur l'embryon entier. Le modèle d'induction neurale « par défaut » n'est pas généralisable à l'embryon de poulet ou d'ascidie, où l'induction neurale nécessite un signal instructif faisant entre autres intervenir la voie de signalisation FGF [2]. Des résultats récents obtenus sur l'embryon de xénope montrent que la répression de la voie de signalisation BMP4 est requise pour supprimer le destin épidermique mais qu'elle n'est pas suffisante pour induire le destin neural [3].

Un certain nombre de travaux anciens ont permis de penser que le calcium jouait un rôle important dans le déclenchement de l'induction neurale. En 1964 Barth et Barth [4] furent les premiers à suggérer que l'environnement ionique et en particulier le Ca²⁺ contrôlait la neuralisation de l'ectoderme de *Rana pipiens*. De plus

la dissociation des cellules de l'ectoderme dans des milieux privés de Ca²⁺ oriente leur détermination vers la voie neurale [5, 6].

La neuralisation par dissociation des cellules de l'ectoderme est associée à un signal calcique

Nous avons montré que la dissociation entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ([Ca²⁺]_i). Cette augmentation est provoquée par une sortie du Ca²⁺ intracellulaire due à la modification du gradient calcique entre les milieux intra- et extracellulaires [7]. Ces résultats ainsi que ceux obtenus par l'équipe de De Robertis [8] montrent que l'effet observé n'est pas dû à une simple dilution des inducteurs épidermiques (BMP) ou une variation d'affinité de ces molécules vis-à-vis de leurs récepteurs qui entraîneraient une neuralisation de l'ectoderme par défaut comme il a été proposé par certains auteurs [9].

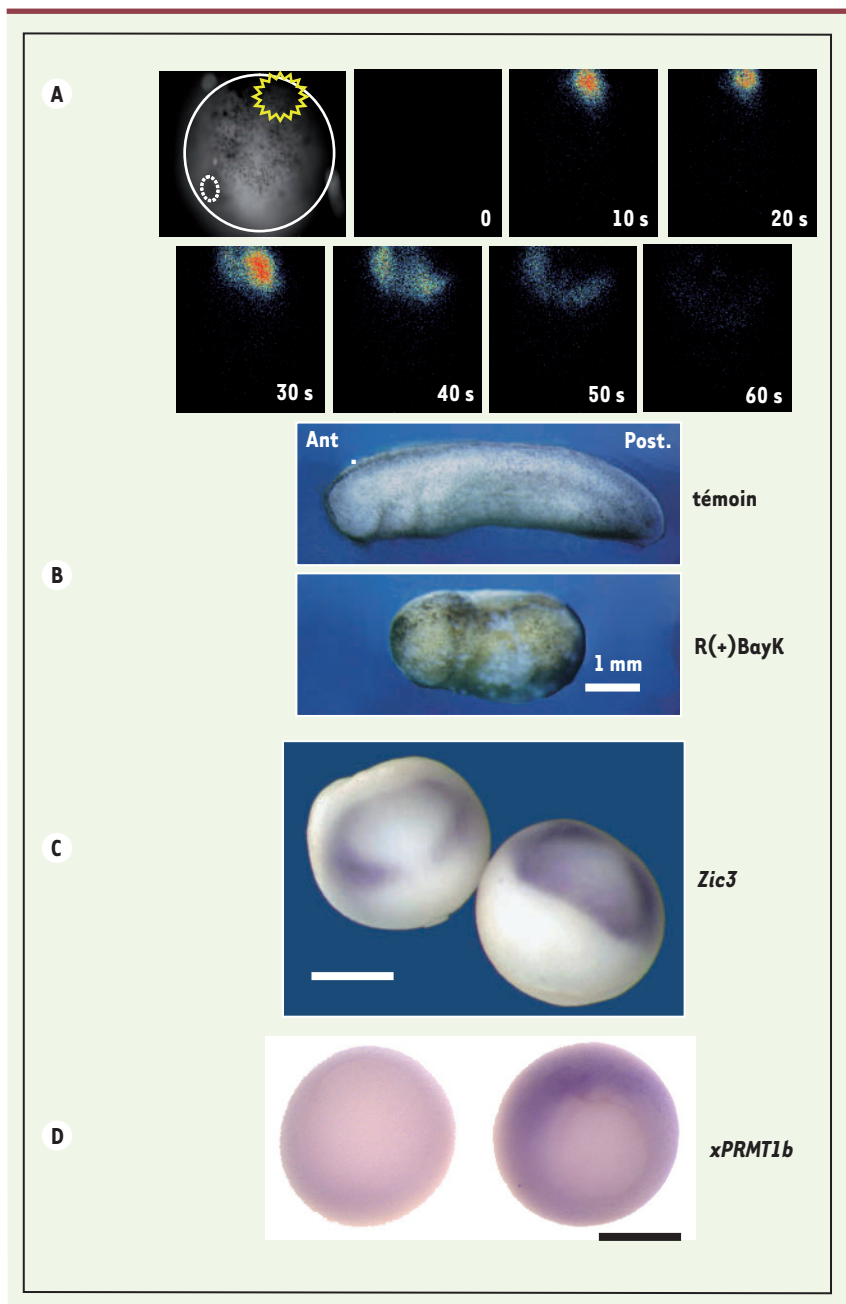


Figure 1. A. Exemple de variations transitoires de Ca^{2+} se produisant dans l'ectoderme dorsal de l'embryon de xénope au stade 10,5 (11 heures après la fécondation). Les embryons ont été injectés avec l'aéuorine et les variations de Ca^{2+} ont été visualisées à l'aide du *photo imaging microscope* (PIM) selon la technique décrite dans [12, 13]. Chaque variation transitoire de Ca^{2+} correspond à une intégration de 120 secondes. Échelle : 0,3 mm. **B.** Les antagonistes des canaux sensibles aux DHP altèrent la formation des structures antérieures du système nerveux. Comparaison des phénotypes obtenus pour des embryons incubés du stade *blastula* au stade *neurula* (de 5 à 15 heures après la fécondation) en présence de R(+)-BayK 10 μM (antagoniste des canaux sensibles aux DHP) et des embryons témoins. **C, D.** Les antagonistes des canaux Ca^{2+} sensibles aux DHP inhibent l'expression de gènes impliqués dans l'induction neurale. Effet de la nicardipine 500 μM et de la nifédipine 500 μM (antagonistes des canaux sensibles aux DHP) sur l'expression du gène proneural *Zic3* (C) et de l'arginine N-méthyltransférase *xPRMT1b* (D). À droite, témoin ; à gauche, embryon traité. Échelle : 0,5 mm

Sur des ectodermes isolés, Noggin induit une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$

L'ectoderme, prélevé au stade jeune *gas-trula*, garde la capacité de répondre aux signaux ventraux et dorsaux comme dans l'embryon. En présence d'un signal inducteur tel que *noggin*, il adoptera un destin neural. Par imagerie calcique nous avons observé que, sur des ectodermes, l'ajout de *noggin* provoque une augmentation transitoire de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [10].

Origine du $[\text{Ca}^{2+}]_i$

La variation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provoquée par *noggin* résulte de l'activation de canaux voltage dépendants sensibles aux dihydropyridines (DHP). Les antagonistes de ces canaux tels la nifédipine bloquent les variations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [10]. Il n'est pas exclu que d'autres sources de Ca^{2+} puissent être impliquées, tout au moins partiellement. Les méthylxanthines telles la caféine sont connues pour libérer du Ca^{2+} à partir des réserves internes. Nous avons montré, sur des ectodermes isolés que cet agent était un inducteur neural [11].

L'activation directe des canaux Ca^{2+} sensibles aux dihydropyridines déclenche l'induction neurale

Les ectodermes isolés, stimulés par des dihydropyridines, agonistes spécifiques des canaux sensibles aux DHP tels que le S(-)-Bay K 8644, déclenchent une augmentation transitoire de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ qui présente une cinétique comparable à celle provoquée par *noggin*. Elle est suffisante, dans un contexte BMP actif, pour déclencher l'induction neurale. Les ectodermes ainsi traités se différencient dans les deux lignées neurales, neurones et cellules gliales, identifiables en immunocytochimie [11].

Les observations réalisées sur des ectodermes isolés (*ex vivo*) sont-elles le reflet des phénomènes physiologiques se produisant sur l'embryon entier (*in vivo*) ?

Avec une sonde bioluminescente, l'aéuorine, et à l'aide d'un système d'imagerie original par comptage de photons [12,13], nous avons visualisé au sein

de l'ectoderme dorsal des variations transitoires de $[Ca^{2+}]_i$ au cours de la gastrulation. Ces variations sont localisées dans des groupes de 10 à 20 cellules. Le plus grand nombre de variations transitoires est atteint en milieu de gastrulation, pendant la période où se déroule l'induction neurale, soit environ 9 heures après la fécondation chez le xénope (Figure 1A). Il ne se produit pas de variation détectable de $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules de l'ectoderme ventral. Il faut rappeler que les cellules ventrales ne reçoivent pas de signaux inducteurs neuraux. Comme dans les ectodermes isolés, les dihydropyridines antagonistes des canaux DHP bloquent ces variations de $[Ca^{2+}]_i$ et l'induction neurale est fortement perturbée (Figure 1B). Les embryons présentent des phénotypes de microcéphalie et de microphthalmie ; les phénotypes les plus sévères donnent des embryons dépourvus de tête [10,12].

Les cibles du Ca^{2+}

Certains facteurs de transcription sont des cibles privilégiées du Ca^{2+} . Ainsi le gène *c-fos* est activé pendant l'induc-

tion neurale, qu'elle soit déclenchée par noggin ou par une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ [14]. Deux gènes proneuraux *XIPOU2* et *Zic3*, sont également activés suite à la stimulation de l'ectoderme par noggin ou par une variation de $[Ca^{2+}]_i$ induite par les DHP ou par la caféine. Inversement, le blocage des signaux calciques inhibe l'expression des gènes proneuraux [12, 14] (Figure 1C). Afin de mieux comprendre le rôle du Ca^{2+} au cours de l'induction neurale, par une approche soustractive, nous avons recherché des gènes précoces de la détermination neurale contrôlés par le Ca^{2+} . Une banque soustractive d'ADNc a été construite à partir d'ectodermes isolés induits par une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ provoquée par la caféine versus non induits. Une trentaine de gènes précoces contrôlés par le Ca^{2+} et qui s'expriment dans les futurs territoires neuraux ont ainsi été sélectionnés [15]. Nous avons plus particulièrement porté notre attention sur une arginine N-méthyl-transférase, *xPRMT1b*. C'est un gène de réponse directe au Ca^{2+} et son expression est détectée dès le début de

la gastrulation, dans tout l'ectoderme ainsi que dans le mésoderme dorsal. Son expression est ensuite restreinte aux territoires neuraux dans les stades plus tardifs (Figure 1D). Le rôle de *xPRMT1b* au cours de l'induction neurale a été abordé par gain (surexpression de l'ARN messager) et perte de fonction (approche morpholino). En particulier, dans l'embryon, la perte de fonction de *xPRMT1b* bloque le développement de la partie antérieure du système nerveux. Nos résultats suggèrent que l'enzyme *xPRMT1b* fait le lien entre l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ et les événements en aval de l'induction neurale [15, 16] (Figure 2).

Conclusions

Ces travaux montrent le rôle primordial que peuvent jouer les canaux sensibles aux DHP dans le processus d'induction neurale. Nous soulignerons deux niveaux.

- Le premier concerne le concept de compétence neurale. La compétence neurale est une propriété transitoire de l'ectoderme. Elle correspond pendant la gastrulation à une fenêtre de temps (entre 8 et 14 heures après la fécondation) pendant laquelle l'ectoderme peut être induit par un signal neuralisant. L'ectoderme au stade gastrula répond d'une manière optimale au signal alors que l'ectoderme de la gastrula âgée ne répond plus ; les bases moléculaires de cette propriété ne sont pas connues. Les expériences précédentes suggèrent que les canaux calciques sensibles aux DHP jouent un rôle crucial dans le déclenchement de l'induction neurale. Nous avons analysé l'ontogenèse de ces canaux au niveau des cellules de l'ectoderme de deux amphibiens ; *Pleurodeles waltl* et *Xenopus laevis* depuis le stade non compétent jusqu'à la perte de compétence. Nos résultats démontrent sans ambiguïté une stricte corrélation entre l'acquisition de la compétence neurale et la densité des canaux calciques sensibles aux DHP. La densité des canaux calciques sensibles aux DHP n'est plus mesurable lorsque la compétence a disparu [17, 18]. Chez le

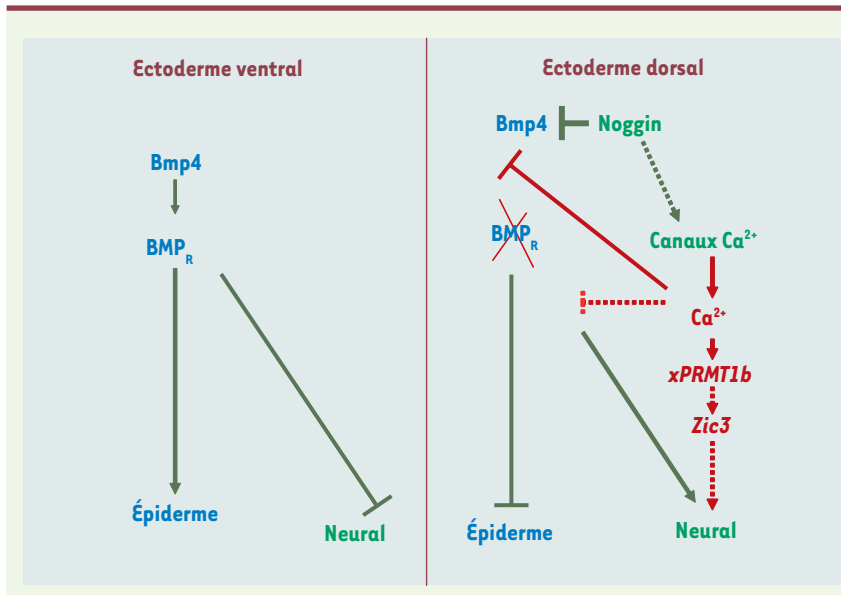


Figure 2. Modèle instructif de l'induction neurale. Dans l'ectoderme dorsal le Ca^{2+} joue un rôle central pour (1) contrôler l'expression de gènes neuraux (en particulier *xPRMT1b* et *Zic3*) et (2) participer à l'inhibition de l'expression de *bmp4*. Le Ca^{2+} pourrait aussi réprimer la voie épidermique en aval du récepteur BMP4. Ce Ca^{2+} provient d'un influx via des canaux Ca^{2+} sensible aux DHP. Noggin est capable d'activer ces canaux selon un mécanisme indirect encore inconnu.



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-Jeannet 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