

Flux calciques et expression génique

Vincent Coulon
Jean-Marie Blanchard

L'ion calcium est un second messager universel, utilisé par tous les types cellulaires dans les étapes précoces de la réponse à de nombreux stimulus. Les influx calciques ont une provenance, une fréquence, une amplitude et une étendue qui sont autant de paramètres permettant de raffiner le signal afin de lui donner une spécificité. En fonction de ces paramètres, la cellule va élaborer une réponse par l'entremise de protéines liant le calcium comme la calmoduline, qui ainsi activée va déclencher une cascade d'événements conduisant au comportement cellulaire approprié. Dans cette synthèse nous décrivons ces événements et leurs effets, en mettant l'accent sur l'influence des fluctuations calciques sur l'expression des gènes et en particulier sur la transcription. Ainsi, le calcium affecte cette dernière à différentes étapes : le démarrage, mais aussi la vitesse de transcription, de même que l'état de compaction de la chromatine.

L'ion calcium est toxique pour la plupart des cellules. Il est donc probable que les premières protéines capables de le chélater aient servi à l'empêcher de sévir. Au cours de l'évolution, certaines de ces protéines-tampons sont devenues des effecteurs, faisant de cet ion non plus un intrus toxique mais un second messager universel pouvant coder des informations cellulaires très raffinées.

Ainsi, les flux calciques sont à l'origine de multiples réponses cellulaires tant rapides que pouvant se maintenir sur de longues périodes, et cela dans la grande majorité des cellules, excitables ou non. Ce travail passe en revue les conséquences d'une varia-

tion de concentration calcique intracellulaire sur l'expression génique. Bien que le calcium affecte d'autres étapes de cette expression (stabilité des messagers et des protéines, transport, épissage des messagers...), nous nous limiterons essentiellement au niveau transcriptionnel.

Les sources de calcium

Le milieu extracellulaire, le réticulum endoplasmique, les mitochondries, l'appareil de Golgi [1] et, semble-t-il, l'enveloppe nucléaire sont riches en calcium. Ainsi, la concentration en calcium dépasse rarement les 300 nM dans le cytoplasme, alors que, dans ces stocks intracellulaires, elle peut localement

ADRESSE

V. Coulon, J.M. Blanchard : Institut de génétique moléculaire de Montpellier, Cnrs, UMR 5535, IFR 24, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

atteindre et parfois dépasser 1 mM [2]. Ce gradient de concentrations est principalement maintenu par des pompes à calcium nécessitant de l'ATP [3-6].

Dans les cellules excitables, le calcium extracellulaire peut entrer suite à l'ouverture de canaux calciques transmembranaires sensibles au potentiel (types T, L, N, P/Q), ou à la suite de la fixation d'un neurotransmetteur, tel que le glutamate, sur un récepteur. Ce récepteur peut être lui-même un canal (récepteur-canal, ionotropique) ou activer un canal indépendant par l'intermédiaire d'une protéine G (récepteur métabotropique) [5].

Toutes les cellules possèdent des réserves internes de calcium, dont la principale est le réticulum endoplasmique (sarcoplasmique dans les cellules musculaires). On trouve à sa surface deux types de canaux susceptibles d'enrichir le cytosol en calcium : (1) les récepteurs de l'inositol 1,4,5 triphosphate (InsP3R), qui s'ouvrent en réponse à la production d'InsP3 par les phospholipases C (PLC); (2) les canaux sensibles à la ryanodine (RyR) [6]. Ces deux types de canaux peuvent s'ouvrir en réponse à une entrée de calcium extracellulaire (*calcium-induced calcium release*, CICR), quoique cela soit moins bien connu pour les InsP3R que pour les RyR (*m/s 1999, n° 12, p. 1435*) [7]. Ce CICR permet d'introduire des effets de seuil, et donc d'obtenir des signaux « tout ou rien » plutôt que progressifs [8]. Le mécanisme inverse existe aussi : les canaux de la membrane plasmique I_{CRAC} (*calcium release activated calcium channel*) ou SOC (*store-operated calcium channel*) s'ouvrent lorsqu'ils sont activés par les canaux InsP3R ou RyR, probablement par interaction directe [9]. Ces canaux SOC permettraient de s'affranchir de la capacité limitée des stocks intracellulaires en utilisant le calcium extracellulaire, par exemple lors de stimulations prolongées.

Quels effecteurs pour le calcium ?

La calmoduline et ses partenaires

L'un des principaux médiateurs des effets moléculaires du Ca^{2+} est la cal-

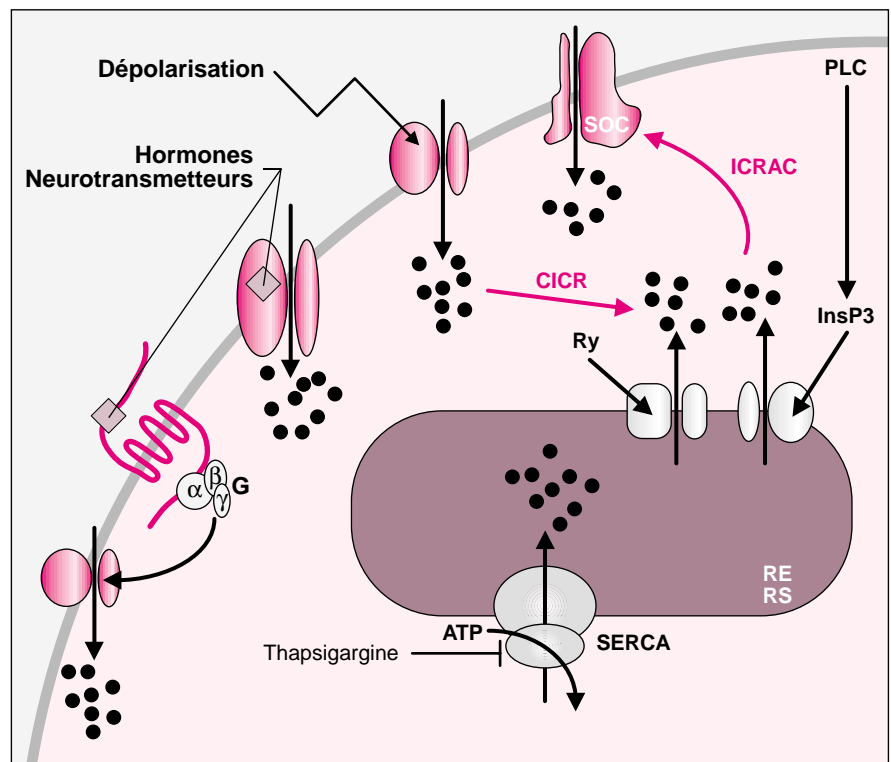


Figure 1. Sources de calcium et voies d'entrée dans le cytosol. Les points noirs désignent les ions calcium. Le calcium peut entrer depuis le milieu extracellulaire par (de gauche à droite) : un canal couplé via une protéine G à un récepteur (métabotropique) à 7 domaines transmembranaires, un récepteur-canal (ionotropique), un canal sensible au potentiel, ou un canal activé par les réserves intracellulaires (store-operated calcium channel, SOC). Le réticulum endoplasmique (RE) (ou sarcoplasmique, RS, dans le muscle) peut libérer du calcium par les récepteurs de l'InsP3 (InsP3R) ou par les canaux sensibles à la ryanodine (RyR). Ces réserves internes sont maintenues grâce à l'activité des SERCA (smooth ER calcium ATPase), qui pompent le calcium à l'inverse du gradient de concentration en consommant de l'énergie. Ces SERCA sont la cible de la thapsigargine. Le CICR (calcium-induced calcium release) est l'activation des canaux InsP3R ou RyR par l'ouverture des canaux sensibles au potentiel. Inversement, les SOC de la membrane plasmique s'ouvrent lorsqu'ils sont activés par les canaux InsP3R ou RyR. Les canaux nucléaires, encore hypothétiques, ne sont pas représentés.

moduline (CaM), une petite protéine de 17 kDa capable de changer de conformation lors de la fixation de 4 ions Ca^{2+} dans des poches de type « main EF ». Ce complexe (Ca^{2+} -CaM) peut activer de nombreuses cibles moléculaires dont la calcineurine et les CaM-kinases (*calcium-calmodulin-dependent kinases*, CaMK).

La calcineurine est une sérine-thréonine phosphatase exprimée dans un grand nombre de tissus, alors qu'on a longtemps cru qu'elle n'était présente que dans des neurones. Ses substrats dans le domaine transcriptionnel comprennent entre autres les facteurs de transcription NF-AT, NF-

KB et MEF2. Sa sous-unité catalytique, CnA, est libérée de sa sous-unité inhibitrice CnB par fixation du complexe Ca^{2+} -CaM [10].

Les CaM-Kinases constituent une famille de sérine/thréonine kinases dévolues soit à des substrats très particuliers (c'est le cas par exemple de la kinase qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine dans le muscle lisse), soit à un plus large spectre de substrats, dont certains facteurs de transcription (CaMKI, II, IV). Leur interaction avec le complexe Ca^{2+} -CaM abolirait l'effet d'un repliement intramoléculaire auto-inhibiteur [11]. La CaMKII possède un grand nombre

de substrats dans tous les compartiments de la cellule, ce qui lui vaut le nom de CaMK multifonctionnelle. Sa translocation vers les synapses, où elle phosphoryle localement certains substrats, jouerait un rôle dans la modulation de la transmission synaptique. On lui connaît depuis peu un inhibiteur naturel qui serait spécifique, CaMKIIN. L'activation de la CaMKII par le complexe Ca^{2+} -CaM est renforcée et prolongée par autophosphorylation sur la thréonine 286 [11]. Dans le cas des CaMKI et IV, ce processus est assuré par une CaM kinase kinase cytoplasmique (CaMKK α ou β selon les tissus), elle aussi sous contrôle du complexe Ca^{2+} -CaM [12]. Cette modulation de la durée du signal a certainement une importance dans le contrôle de la transcription, car seules des activations durables des CaMK conduisent à une phosphorylation du facteur de transcription CREB (*cyclic AMP responsive element binding protein*), une de leurs cibles les mieux caractérisées. Ainsi la CaMKIV, la seule CaMK détectée dans le noyau *in vivo*, stimule faiblement l'activité transactivatrice de CREB en transfection, alors que l'expression conjointe de la CaMKK potentialise fortement cet effet [12].

Signalons enfin la découverte toute récente d'une nouvelle kinase proapoptotique dont l'activité dépend du complexe Ca^{2+} -CaM : la DAP-kinase (*death associated protein kinase*). Exprimée dans de nombreux types cellulaires, cette kinase est associée au cytosquelette et son activation conduit à l'apoptose de fibroblastes en culture primaire [13].

Dialogues avec d'autres voies

On recense de nombreux phénomènes de couplage entre la cascade des CaMK et d'autres voies de signalisation. Ainsi, la PKA peut phosphoryler deux sites présents dans la CaMKK et inhiber son activité. Cette relation fonctionnelle avec la voie de l'AMP cyclique existe aussi dans l'autre sens : l'adénylate cyclase de type I peut être activée par fixation du complexe Ca^{2+} -CaM. Toutefois, la CaMKIV peut empêcher cet effet en phosphorylant son domaine de fixation de CaM [12]. De plus, le phénomène de potentialisation à long terme (LTP), phénomène d'acti-

tion neuronale lié à la mémoire, nécessite l'action indirecte de la PKA sur la CaMKII. En effet, PKA active-rait par phosphorylation PP1-I, un inhibiteur de la phosphatase PP1, empêchant ainsi la déphosphorylation de la CaMKII [14].

Il existe également des connexions entre la cascade des CaMK et les voies des MAP-kinases. Les MAP-kinases ERK, p38 et JNK sont activées par trois cascades différentes en aval de Ras, en réponse à de nombreux stimulus mitotiques ou de stress. Or, l'activation forcée de la CaMKIV ou de la CaMKK permet une activation de ERK, p38 et JNK à des degrés divers, ce qui favorise la transcription de leurs gènes-cibles [15]. Par ailleurs, le calcium peut activer les MAPK par l'intermédiaire de PYK2, une tyrosine-kinase capable de recruter des facteurs d'échange pour Ras, ce qui a pour effet d'activer la MAPK ERK [16]. Le mécanisme de cette activation de PYK2 par le calcium reste encore mystérieux (*figure 2*).

Les glycoprotéines de la famille Wnt sont des facteurs de croissance dont les effets sont très variés, le plus spectaculaire étant la duplication de l'axe rostro-caudal des embryons de xénope. Récemment, plusieurs

groupes ont montré que certains des récepteurs pour les Wnt n'utilisent pas la voie classique de la β -caténine mais lui préfèrent une voie impliquant le calcium. Ainsi, probablement par l'entremise d'une protéine G hétérotrimérique, ces récepteurs activeraient la phospholipase C, entraînant une production d'InsP3 et donc une libération de calcium par les réserves internes, suffisante pour activer la CaMKII [17]. Cette signalisation intracellulaire particulière de certains récepteurs pour les Wnt pourrait contribuer à leur faire jouer un rôle différent de celui des autres récepteurs de la famille au cours du développement.

Très récemment, il a été démontré que la voie de signalisation activée par les cytokines de la famille TGF- β , qui implique les protéines SMAD, est sous contrôle des flux calciques. Ainsi, la CaMK II phosphorylerait certaines SMAD, modifiant leur localisation subcellulaire, leur activité transcriptionnelle et leurs préférences de dimérisation. Il en découlerait une modulation de la signalisation en aval du TGF- β [18]. Cette découverte illustre à nouveau la façon dont des signaux calciques peuvent enrichir et moduler d'autres

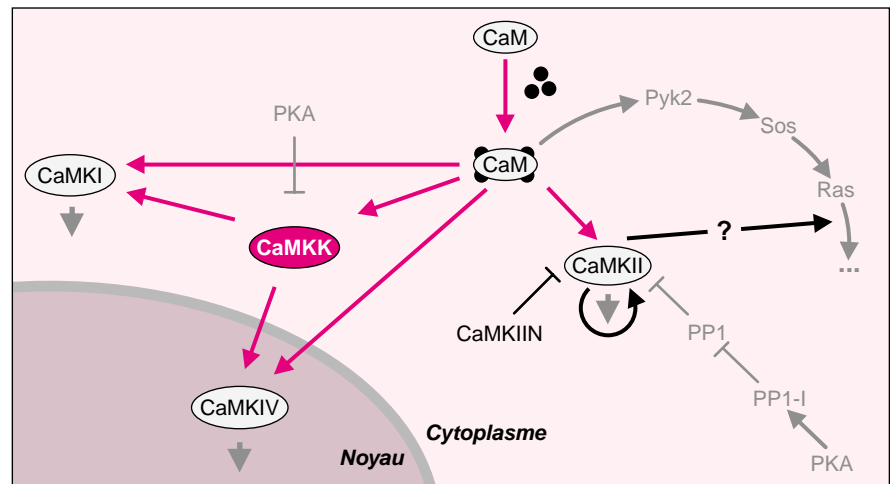


Figure 2. Principales voies activées par Ca^{2+} -CaM. Ce schéma récapitule la cascade des CaM-kinases et les spécificités fonctionnelles de CaMKII. Les principales voies qui affectent ou sont affectées par cette cascade sont représentées en grisé. Les flèches désignent soit des activations, soit, lorsqu'elles sont barrées, des inhibitions. Ainsi, les CaMK I et IV nécessitent l'activité CaMKK pour être pleinement activées, tandis que CaMK II peut s'autophosphoryler (flèche circulaire). Les dialogues entre la PKA et les CaMK sont représentés, ainsi que l'influence du calcium sur Pyk2, et donc sur la voie des MAP-kinases en aval de Ras.

signaux impliqués, par exemple, dans la prolifération cellulaire et le développement.

Enfin, au sein même de la voie CaMK existent des antagonismes : les CaMK I et IV peuvent empêcher la nucléarisation de la CaMKII en phosphorylant un résidu proche de son signal de localisation nucléaire (NLS) [12]. Le calcium apparaît donc comme un modulateur général de nombreuses voies de signalisation, permettant l'intégration de signaux très divers. Dans des systèmes artificiels, le calcium affecte encore beaucoup d'autres cascades que celle des CaMK, mais il faut remarquer que ces systèmes tiennent rarement compte des spécificités temporelles et spatiales du signal calcique enregistré *in vivo*.

Flux maintenus ou flux oscillatoires ? Flux nucléaires ou cytoplasmiques ?

La façon dont la concentration en calcium intracellulaire évolue au cours d'une stimulation n'est pas anodine. Suivant que cette variation présente un caractère oscillatoire ou maintenu, les effets se manifestent de façon très différente au niveau transcriptionnel. Grâce à des méthodes qui permettent de créer des oscillations contrôlées de Ca^{2+} intracellulaire [9, 19, 20], l'effet de ces oscillations calciques sur la réponse transcriptionnelle a été mesuré au moyen de gènes indicateurs contrôlés par plusieurs facteurs de transcription susceptibles de relayer les effets calciques (NF- κ B, Oct-1 ou NF-AT). Le résultat a été inattendu : la réponse transcriptionnelle est plus intense si les variations de concentration du Ca^{2+} intracellulaire sont oscillatoires que si elles sont maintenues. En outre, la réponse spécifique dépend de la fréquence des oscillations : seul par exemple NF- κ B répond aux oscillations de faible fréquence [20] !

Les CaMK nucléaires semblent agir comme des décodeurs de fréquence vis-à-vis des bouffées de calcium nucléosolique [21]. L'importance des oscillations calciques dans la modulation de la plasticité synaptique suggère un rôle des CaMK dans ces processus [22]. C'est également

une CaMK qui phosphoryle I κ B (un inhibiteur de NF- κ B), ce qui active sa dégradation : cette relation établie peut-être une cascade de signalisation oscillatoire.

La réponse transcriptionnelle va dépendre également du compartiment cellulaire qui subit la variation de concentration en Ca^{2+} . Ainsi, il semblerait que le site CRE (*cAMP responsive element*, cible de CREB) ne réponde qu'à des variations de concentration du Ca^{2+} intranucléaire consécutives à une activation des canaux calciques de type L, les types N et P/Q restant inefficaces. Dans les mêmes conditions, le site SRE (*serum responsive element*, cible de SRF, *serum response factor*) répondrait à des stimulus calciques cytoplasmiques [23] (figure 3). En parallèle, une translocation rapide (1 min) du complexe Ca^{2+} -CaM peut être observée dans des neurones pyramidaux de l'hippocampe, du cytoplasme vers le noyau, ce qui pourrait rendre compte de certains effets nucléaires du calcium [24]. Cependant, aucune translocation de protéine n'est nécessaire pour obtenir l'activation de CREB lors d'une dépolarisation : en l'absence de

toute translocation de calmoduline, la propagation du calcium libre vers le noyau pourrait seule rendre compte de l'activation de CREB par les CaMK nucléaires [25].

Ces résultats introduisent la notion de compartimentation des réserves calciques non seulement dans la cellule [26], mais aussi dans le noyau. L'enveloppe nucléaire possède en effet ses propres récepteurs pour l'InsP3, ses propres pompes d'établissement du gradient, et possède aussi la faculté d'engendrer des bouffées transitoires de calcium dont la fréquence constitue en soi une information. Ainsi, une faible stimulation déclenche une « bouffée » (*puff*) locale de calcium, tandis qu'une stimulation soutenue provoque une « vague » (*wave*) globale qui peut éventuellement se propager de cellule à cellule, dans certains types cellulaires [27]. Pour l'instant, ces phénomènes sont à peine identifiés, et un enjeu important de la recherche dans ce domaine est de comprendre comment un type particulier d'influx calcique (site, durée, fréquence) active une voie de signalisation adaptée.

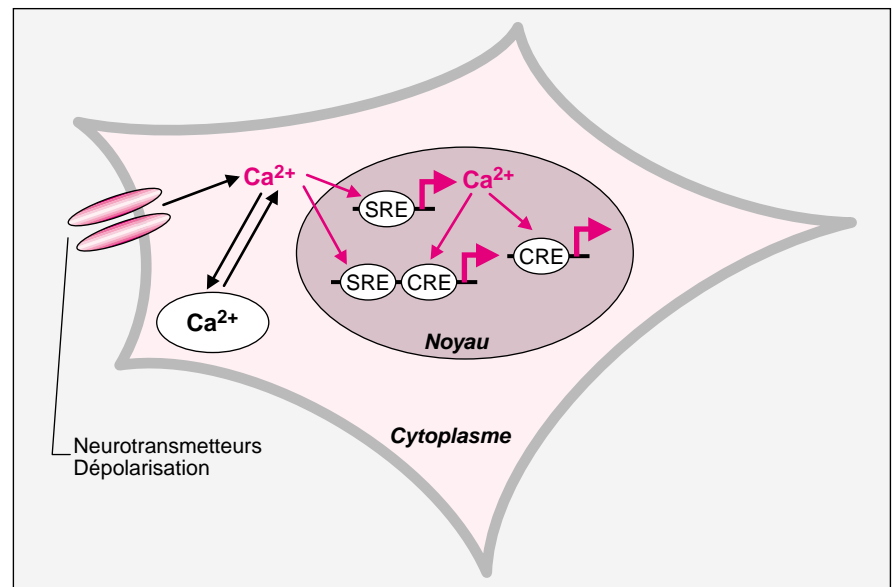


Figure 3. **Spécificité spatiale des effets du calcium sur la transcription.** Fondée sur le travail de Hardingham et al. [23], cette figure montre comment le calcium affecte, selon la localisation cytoplasmique ou nucléaire de l'influx calcique, la transcription dépendante de SRE (serum responsive element) ou de CRE (Ca-cAMP responsive element). Les flux calciques nucléaires suffiraient à déclencher la transcription dépendante de CREB sans translocation de la CaM.

Calcium et facteurs de transcription

Certaines des voies de signalisation décrites ci-dessus convergent vers des facteurs de transcription, qui en intègrent les signaux. L'état de phosphorylation d'un facteur de transcription peut moduler sa localisation subcellulaire, sa stabilité, son activité intrinsèque ou son association avec des cofacteurs, ou encore une combinaison de ces divers paramètres. Selon son état d'activation, un facteur de transcription aura donc un effet différent sur la machinerie basale de transcription, constituée de l'ARN polymérase et des facteurs généraux de transcription. La résultante de l'activité de tous les facteurs présents sur un promoteur détermine donc le niveau d'activation de la transcription du gène correspondant.

Translocation cytoplasme-noyau

Les facteurs de transcription comme NF-AT (*nuclear factor AT*) ou Oct-1 (protéine liant la séquence octamère présente dans le promoteur de nombreux gènes, dont ceux des immunoglobulines) sont la cible de la calcineurine, une phosphatase activée par le complexe Ca^{2+} -CaM. NF-AT est un complexe qui comprend une protéine constitutivement nucléaire, NF-ATn, et une protéine qui fait la navette entre le noyau et le cytosol, NF-ATc. En l'absence de stimulation, NF-ATc réside dans le cytoplasme et sa translocation vers le noyau est activée par déphosphorylation de sérines présentes dans un motif répété (*SP repeat*: SPXXSPXXSPXXXXXD/ED/E) situé dans sa région aminoterminal. Ces répétitions encadrent un motif faisant office de NLS qui est ainsi exposé [10].

La translocation de NF-AT se fait en association avec le complexe Ca^{2+} -CaM-calcineurine qui entre alors en compétition dans le noyau avec des kinases qui vont phosphoryler à nouveau les sérines régulatrices [10]. Le temps de résidence nucléaire de NF-ATc est donc sous la dépendance: (1) du NLS et d'un signal d'export nucléaire (NES); (2) de la déphosphorylation des sérines présentes dans les répétitions SP par le complexe Ca^{2+} -CaM-calcineurine; et (3) de leur rephosphorylation antagoniste par

des kinases. La nature de ces kinases peut varier suivant les variants de NF-AT concernés. Ainsi pour NF-ATc1, une première phosphorylation par PKA serait requise pour créer des sites reconnus par la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), qui donnerait ainsi le coup de grâce, renvoyant ce facteur dans le cytoplasme. En revanche, pour NF-ATc3, ce sont JNK, MEKK1 et caséine kinase 1 a qui seraient impliquées [10] (figure 4).

De nombreuses observations montrent que la transcription sous la dépendance des facteurs NF-AT n'est effective que si d'autres voies de signalisation sont sollicitées de façon conjointe [28]. En fait, il semblerait que, dans des conditions physiologiques, NF-ATc ne soit pas capable de lier avec une affinité suffisante les séquences d'ADN qu'il est sensé reconnaître. Cette liaison serait obtenue par synergie avec d'autres facteurs de transcription tels que c-MAF, GATA4 ou API (jouant alors le rôle de NF-ATn cité plus haut). La nécessité d'un partenaire introduit ainsi une convergence entre la voie contrôlée par la calcineurine et d'autres systèmes comme ceux de la PKC [28] ou de Ras, ce qui permet

au contexte cellulaire de s'exprimer pleinement au travers de modulations qui affinent la complexité du signal (figure 5).

De plus, il semble que la déphosphorylation de NF-AT par la calcineurine affecte non seulement sa localisation mais également sa capacité de transactivation [29].

Modulation de l'activité transcriptionnelle

L'intégration de plusieurs voies de signalisation peut se décliner d'une toute autre manière. Ainsi, un même site de phosphorylation peut être la cible de nombreuses kinases, comme c'est le cas pour le facteur de transcription CREB. Ce dernier appartient à la superfamille des protéines à domaine bipartite bZIP (*basic domain-leucine zipper*) dans lesquelles le premier domaine, en position aminoterminal, contient une série de lysines et d'arginines et contacte directement l'ADN, alors que le second, constitué par une répétition de leucines tous les 7 acides aminés, est responsable de la dimérisation [30]. Plusieurs variants engendrés par épissage alternatif peuvent former des

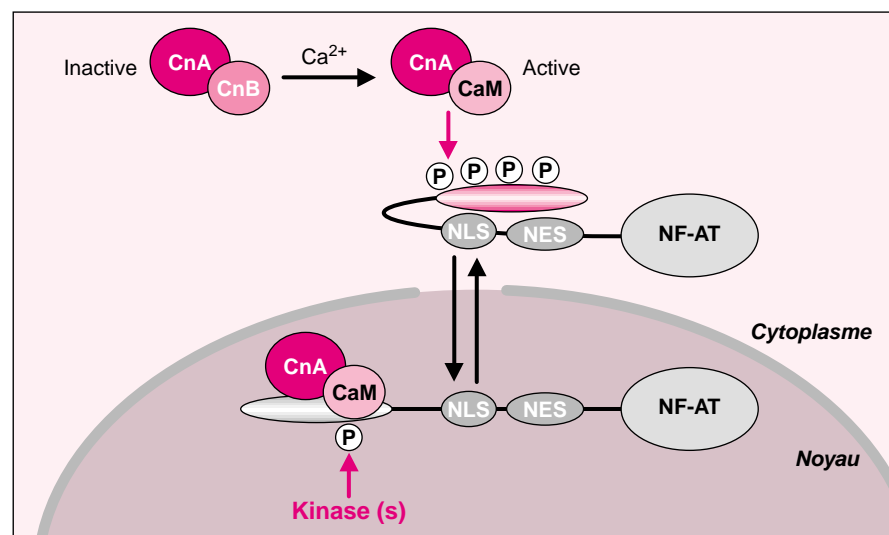


Figure 4. Calcineurine et localisation de NF-AT. La sous-unité catalytique CnA de calcineurine est activée lorsque sa sous-unité régulatrice, CnB, est chassée par fixation de Ca^{2+} -CaM. Cette forme active déphosphoryle alors NF-AT, permettant son importation dans le noyau grâce à un NLS. Certaines kinases nucléaires décrites dans le texte entrent en compétition avec CnA- Ca^{2+} -CaM car elles phosphorylent NF-AT de manière à rendre son NES (séquence d'export nucléaire) fonctionnel, et à le renvoyer dans le cytoplasme. La localisation subcellulaire de NF-AT est donc la résultante d'un équilibre dynamique entre les activités de la calcineurine et de kinases nucléaires.

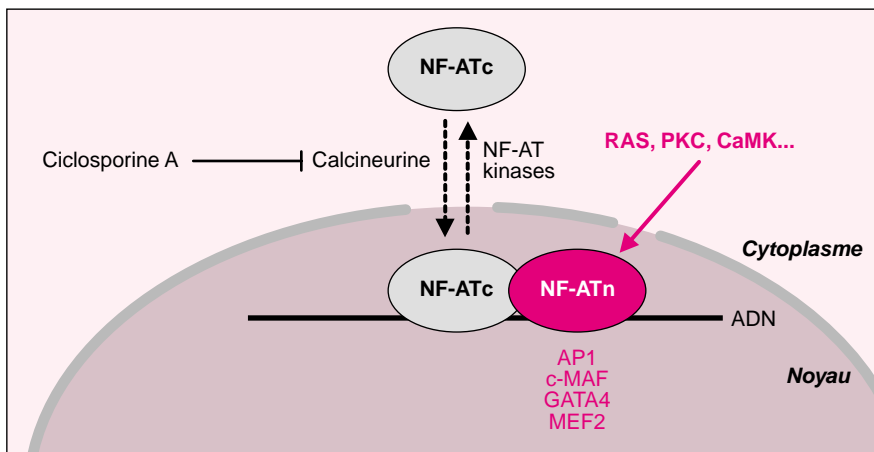


Figure 5. **NF-AT: un facteur bipartite intégratif.** Les facteurs NF-AT sont constitués d'une composante nucléaire, qui peut être AP1, c-MAF, GATA4, MEF2... et d'une composante qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme, NF-ATc. La diversité des partenaires de NF-ATc et l'activation de NF-ATc et n par des voies très différentes permettent, en intégrant différents aspects du contexte cellulaire, une combinatoire étendue dans la formation de dimères, et une modulation fine de l'expression génique.

homodimères ou bien s'associer à ATF-1 (*activating transcription factor 1*) ou à l'un des variants de CREM (*cAMP response element modulator*). Ces derniers sont soit des répresseurs (CREM α , β , γ), soit des activateurs (CREM τ) de la transcription et, au contraire de CREB et d'ATF-1, ils présentent des profils d'expression très spécifiques de certains tissus (testicule, cerveau, axe neuroendocrine) [30]. Ainsi, par des mécanismes d'épissage alternatif, ou encore de l'utilisation de promoteurs alternes, cette famille de protéines montre une grande diversité qui assure une flexibilité importante.

Dans la protéine CREB, deux sites majeurs de phosphorylation constitués par les sérines 133 et 142 sont présents au sein d'un motif susceptible d'être phosphorylé par de multiples kinases (KID: *kinase inducible domain*). Initialement décrite à la suite d'une augmentation de la concentration intracellulaire en cAMP, la phosphorylation de la sérine 133 est également observée après augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire. En fait, la même sérine est phosphorylée *in vitro* par les kinases CaMKI, II, IV, PKA, PKC et les MAPKAPK (*MAPK-activated protein kinases*)! Il est donc vraisemblable que, selon le type cellulaire et le mode de stimulation, de

nombreuses voies de signalisation convergent vers la sérine 133 (figure 6). De plus, la CaMKII phosphoryle en même temps la sérine 142 de CREB (ce qui a un effet inhibiteur), alors que la CaMKIV ne ciblerait que la sérine 133, avec pour résultat une stimulation de la transactivation [30]. De nombreux travaux, parfois contradictoires, ont cherché à déterminer le rôle joué par la phosphorylation de CREB: recrutement sur le CRE, augmentation de la stabilité du complexe CREB-CRE, recrutement de partenaires. L'hypothèse d'une liaison constitutive de CREB sur l'ADN *in vivo* (pour ses sites de haute affinité) a permis d'identifier des partenaires, ce qui a conduit à la purification de la protéine CBP (*CREB binding protein*). CBP fixe CREB quand il est phosphorylé sur la sérine 133 et sert alors de pont moléculaire entre CREB et le reste de la machinerie transcriptionnelle [31] (figure 7). Il semble toutefois que l'action de CBP dépasse largement le cadre des effets de CREB. En effet, CBP seule peut activer la transcription en réponse à un stimulus calcique relayé par la CaMKIV et la voie des MAPK, quand elle est artificiellement fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN [32]. Cela suggère que d'autres facteurs de transcription peuvent ainsi contribuer, *via* CBP, à

relayer des effets transcriptionnels sous le contrôle du calcium nucléaire. Des résultats récents montrent que tel est le cas pour c-JUN, en l'absence de toute activation des JNK (*JUN amino terminal kinases*) et sans que les sites canoniques sérine 63 et sérine 73 soient impliqués [33].

Dans les neurones, les influx calciques issus des canaux sensibles au potentiel de type L ou des récepteurs ionotropiques du glutamate (de type NMDA) stimulent la phosphorylation de CREB. Or, seule l'activation des canaux L conduit à une expression de *c-fos* tandis que les récepteurs NMDA sont inefficaces, même à de fortes concentrations de glutamate. Il semble donc que le site d'entrée du calcium détermine l'activation génique [34], vraisemblablement par un couplage différentiel aux réserves intracellulaires, en particulier celles de l'enveloppe nucléaire.

La famille des facteurs de transcription MEF2 (*myocyte enhancer binding factor 2*) représente encore un autre exemple de la multiplicité des signaux déclenchés par le calcium [35]. Cette famille est caractérisée par un domaine de liaison à l'ADN apparenté à celui de SRF, appelé MADS box, et on trouve ses membres exprimés, entre autres, dans les myocytes, les neurones et les lymphocytes. Certains membres de cette famille sont directement activés à la fois par la calcineurine et par la CaMKIV, ce qui stimule fortement l'activité transcriptionnelle de MEF2. En outre, MEF2 est susceptible de former un complexe tripartite avec NF-AT (lui-même activé par la calcineurine) et l'ADN. Enfin, ces deux facteurs interagissent avec CBP, lui-même activé directement par la CaMKIV [32]: ce système intégrateur, qui interviendrait dans la différenciation musculaire et l'apoptose des lymphocytes T, récapitule ainsi la plupart des effets transcriptionnels du calcium [36].

L'activation de la transcription par le calcium intervient très souvent sous forme d'une synergie. Parfois même, une voie impliquant le calcium est très peu efficace seule mais potentialise très fortement l'effet d'un autre signal. C'est le cas de la signalisation déclenchée par les nucléotides extracellulaires dans les ostéoblastes, dans lesquels les récepteurs membranaires

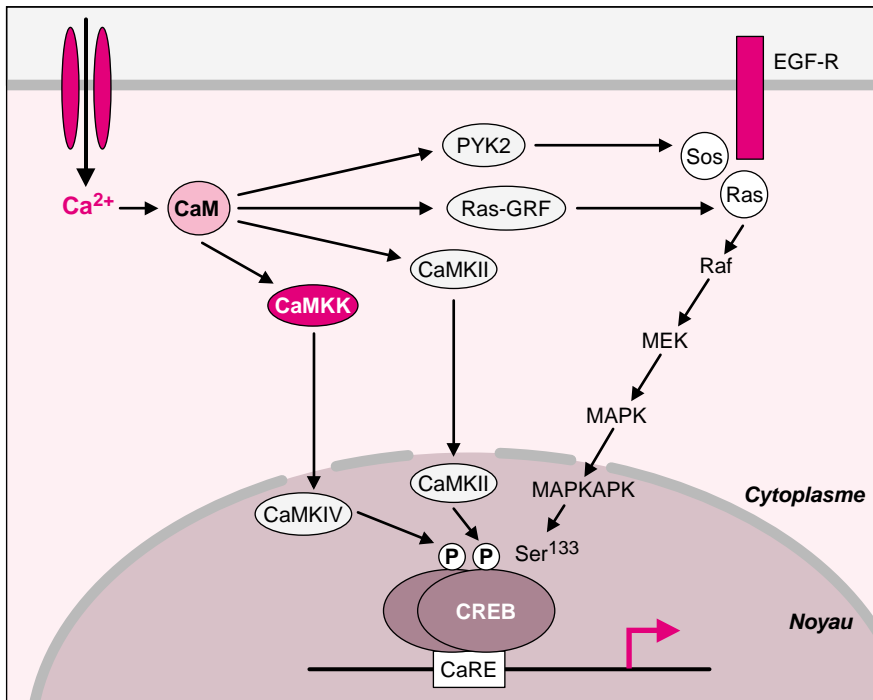


Figure 6. **CREB : une cible multiple des voies activées par le calcium.** Le complexe calcium/CaM peut activer la phosphorylation de CREB par les CaMK II et IV. Cependant, outre la sérine 133, CaMKII phosphoryle aussi la Ser 142, qui a un effet inhibiteur. CREB est aussi phosphorylé sur Ser 133 suite à l'activation de la cascade des MAPK via Pyk2 ou Ras-GRF.

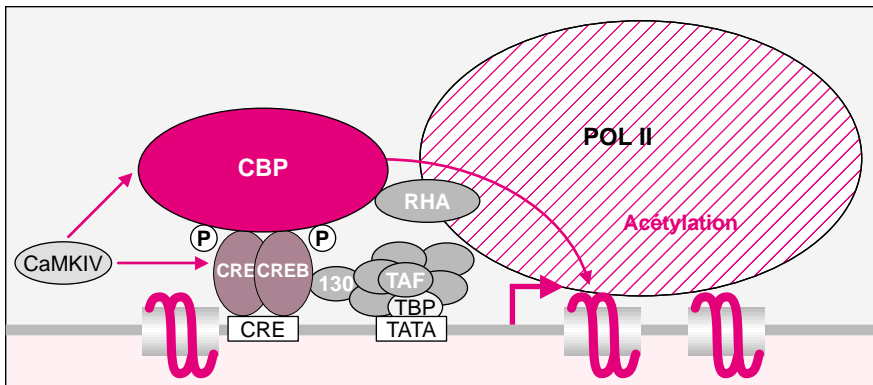


Figure 7. **Rôles de CBP.** À la fois activé par CaMKIV et par recrutement sur CREB phosphorylé, CBP sert à la fois : (1) de pont moléculaire entre les activateurs spécifiques (ici CREB) et la machinerie de base de la transcription (ARN polymérase et facteurs généraux associés), vraisemblablement via RHA, une ARN hélicase ; et (2) d'histone acétyl-transférase, permettant une décompaction de la chromatine propice à l'activation de la transcription. CREB lui-même interagit directement avec certains facteurs associés à l'ARN polymérase (Pol II), comme TAF130.

métabotropiques P2Y activent très faiblement l'accumulation du messager *c-fos* par libération de calcium intracellulaire. En revanche, l'effet de l'hormone parathyroïdienne (PTH) est fortement potentialisé. Étant don-

née la courte durée de vie des nucléotides hors des cellules, ils pourraient agir comme des potentiateurs locaux de réponses systémiques. Bien que la PTH déclenche une production de cAMP, la synergie

calcium/cAMP n'intervient pas sur le site CRE mais sur le site SRE, par un mécanisme n'impliquant pas les MAPK, et qui pourrait être lié aux CaMK [37]. Il existe en effet un mécanisme d'activation de SRF en réponse au calcium par une voie indépendante des MAPK, via une phosphorylation par la CaMKIV [38]. L'essentiel des effets du calcium sur la transcription semblent donc contrôlés par la calmoduline. Cependant, on a récemment caractérisé un répresseur transcriptionnel, pour le gène codant pour la prodynorphine humaine, qui se passerait de cette médiation de la calmoduline. Baptisé DREAM (*downstream regulatory element antagonist modulator*), ce dernier ne fixerait plus l'ADN en présence de calcium, en raison de la présence de motifs susceptibles de lier directement Ca^{2+} (*EF-hands*). La cible nucléaire de DREAM, appelée DRE, n'est efficace que lorsqu'elle est placée en aval du site de démarrage (figure 8). *c-fos* serait également une cible de ce répresseur dépendant du calcium [39]. Il est à noter que la PKA peut contrecarrer l'action de DREAM via CREM α , ce qui illustre à nouveau le couplage entre plusieurs stimulus [40]. En outre, DREAM est une protéine multifonctionnelle, qui fait partie d'une famille de modulateurs de l'activité d'un canal potassique, mais ceci est une autre histoire... [41].

Effets sur la progression des ARN polymérases et la structure de la chromatine

Le démarrage de la transcription n'est pas le seul niveau touché par le calcium. Le contrôle peut intervenir également en aval, alors que les ARN polymérases ont commencé à transcrire. Dans certains tissus ou types cellulaires en culture, le gène *c-fos* présente des polymérases engagées dans le processus de transcription bien que ne conduisant pas à la formation d'un transcrypt complet [42, 43]. Ce blocage intervient à la fin du premier exon et présente certaines analogies avec le mécanisme d'atténuation décrit chez les procaryotes. Ainsi, dans les macrophages murins en culture primaire, la reprise de la transcription de *c-fos* est induite par

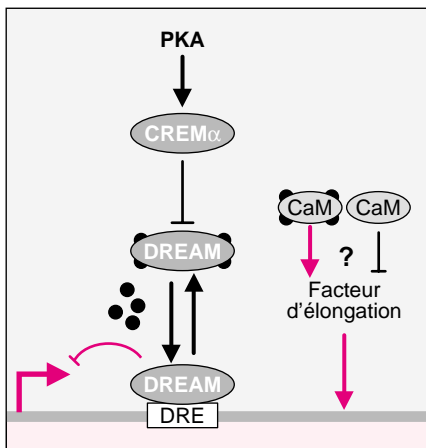


Figure 8. Effets du calcium en aval du site de démarrage de la transcription : l'exemple du gène c-fos. Outre les effets du calcium sur les séquences promotrices situées en amont du site de démarrage de la transcription (principalement SRE et CRE), il existe un contrôle intragénique de la transcription de c-fos. DREAM, un répresseur qui se lie au site DRE (downstream repressor element), libère ce site et permet l'accumulation du messenger lorsqu'il chélate des ions calcium. Son activité de répression peut aussi être levée par interaction avec CREM α . Le calcium a aussi un effet plus en aval dans le gène c-fos, car l'allongement des transcrits au-delà d'un site de blocage n'est efficace qu'en présence de fortes concentrations de calcium cellulaire. La levée de cette pause est liée à la calmoduline, indépendamment des CaMK et de la calcineurine.

de nombreux stimulus qui, tous, nécessitent la mobilisation du calcium intracellulaire. La levée du blocage ne peut être obtenue si l'on chélate spécifiquement cet ion, alors même que le démarrage de la transcription n'en est pas affecté [43]. Le même processus a été décrit dans des lymphocytes T [44]. Une analyse détaillée (dans des fibroblastes murins, dans lesquels ce phénomène existe, même s'il est moins efficace) suggère que les effets du calcium nécessitent le complexe Ca²⁺-CaM, mais pas la calcineurine ni les CaMK. En outre, le W7, un antagoniste de la calmoduline, active très fortement la transcription de c-fos, suggérant la levée d'une répression relayée par le complexe Ca²⁺-CaM indépendam-

ment de ses effecteurs connus, très probablement au niveau de certains facteurs d'élongation non identifiés (figure 8) [45].

Il apparaît donc que, lorsque le contrôle de l'expression d'un gène doit être très serré, comme c'est le cas pour un proto-oncogène, un verrou supplémentaire puisse être utilisé, intervenant au niveau de la progression des polymérases en plus de la régulation du démarrage de la transcription.

Le calcium peut avoir des effets plus généraux sur la transcription en agissant sur le remodelage de la chromatine. Ainsi, outre le recrutement de l'ARN polymérase, CBP affecte la structure chromatiniennne adjacente à son site de fixation. CBP possède une activité histone acétyl transférase (HAT) (figure 7) et s'associe à une autre protéine qui possède le même type d'activité, P/CAF [46]. En acétylant les résidus lysine présents dans la partie amino-terminale des histones, les deux protéines rendent la chromatine plus lâche, donc plus accessible à la machinerie transcriptionnelle. Il semblerait toutefois que seule CBP soit requise pour la médiation des effets calciques passant par le CRE [32]. A l'inverse, la phosphorylation de MEF2 par les CaMK supprimerait son interaction avec une histone désacétylase (HDAC), ce qui empêcherait la répression chromatiniennne associée à cette activité [36]. De plus, le complexe Ca²⁺-CaM pourrait directement entrer en compétition avec MEF2 pour sa liaison avec HDAC4 [47].

Conclusions

Le calcium peut donc agir sur la transcription à différents niveaux, depuis la translocation spécifique de certains facteurs du cytoplasme vers le noyau jusqu'au remodelage ciblé de la chromatine. Nombre de ces effets sont relayés par des enzymes dont l'activité est stimulée par la fixation du complexe Ca²⁺-CaM. Ce dernier peut également avoir des effets inhibiteurs directs, en se fixant par exemple à certaines protéines de la famille bHLH, ce qui diminue considérablement leur affinité pour l'ADN [48], ou encore à des facteurs qui pourraient agir au niveau de la progression des ARN polymérases, bien

après leur démarrage [45]. Toutefois, la calmoduline n'est pas toujours le médiateur, et le calcium peut agir directement sur un facteur de transcription comme DREAM [39]. Enfin, il est essentiel de noter que la distribution spatiale et temporelle des flux calciques semble jouer un rôle au moins aussi important que leur intensité ■

Remerciements

Nous remercions vivement Marc Moreau, Catherine Leclerc, Robert A. Hipskind, Julie Perroy et Emmanuel Vignal pour leur lecture critique du manuscrit. V. C. est soutenu par la Ligue Nationale Contre le Cancer.

RÉFÉRENCES

1. Lin P, Yao Y, Hofmeister R, Tsien RY, Farquhar MG. Overexpression of CALNOC (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca²⁺ storage in the Golgi. *J Cell Biol* 1999; 145 : 279-89.
2. Pozzo-Miller LD, Pivovarova NB, Leapman RD, Buchanan RA, Reese TS, Andrews SB. Activity-dependent calcium sequestration in dendrites of hippocampal neurons in brain slices. *J Neurosci* 1997; 17 : 8729-38.
3. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1 : 11-21.
4. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The Calcium Signalling Toolkit: http://www.nature.com/nrm/journal/v1/n1/poster_berridge/index.html. 2000.
5. Capiod T, Méry PF, Pacaud P, Takeda K, Des portes s'ouvrent sur les allées et venues des ions calcium. *Med Sci* 1995; 11 : 1027-33.
6. Clapham DE, Calcium signaling. *Cell* 1995; 80 : 259-68.
7. Nakamura T, Barbara JG, Nakamura K, Ross WN. Synergistic release of Ca²⁺ from IP3-sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials. *Neuron* 1999; 24 : 727-37.
8. Usachev YM et Thayer SA. Controlling the urge for a Ca²⁺ surge: all-or-none Ca²⁺ release in neurons. *Bioessays* 1999; 21 : 743-50.
9. Kiselyov KI, Shin DM, Wang Y, Pessah IN, Allen PD, Muallem S. Gating of store-operated channels by conformational coupling to ryanodine receptors. *Mol Cell* 2000; 6 : 421-31.

RÉFÉRENCES

10. Crabtree GR. Calcium, calcineurin and the control of transcription. *J Biol Chem* 2000; 96: 3.
11. Soderling TR, Chang BH, Brickey DA. Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 2000; 28: 28.
12. Corcoran EE, Means AR. Defining Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000; 28: 28.
13. Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 1-7.
14. Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, et al. Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 1998; 280: 1940-2.
15. Enslin H, Tokumitsu H, Stork PJ, Davis RJ, Soderling TR. Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10803-8.
16. Lev S, Moreno H, Martinez R, et al. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 1995; 376: 737-45.
17. Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 2000; 16: 279-83.
18. Wicks SJ, Lui S, Abdel-Wahab N, Mason RM, Chantray A. Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8103-11.
19. Li W, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien RY. Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature* 1998; 392: 936-41.
20. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 1998; 392: 933-6.
21. Dupont G, Goldbeter A. CaM kinase II as frequency decoder of Ca²⁺ oscillations. *Bioessays* 1998; 20: 607-10.
22. Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 1994; 4: 389-99.
23. Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 1997; 385: 260-5.
24. Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 1998; 392: 198-202.
25. Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 2001; 4: 261-7.
26. Finkbeiner S, Greenberg ME. Spatial features of calcium-regulated gene expression. *Bioessays* 1997; 19: 657-60.
27. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium-a life and death signal. *Nature* 1998; 395: 645-8.
28. Werlen G, Jacinto E, Xia Y, Karin M. Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO J* 1998; 17: 3101-11.
29. Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, et al. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 2000; 6: 539-50.
30. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 821-61.
31. Hardingham GE, Chawla S, Cruzalegui FH, Bading H. Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels. *Neuron* 1999; 22: 789-98.
32. Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR, Bading H. CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* 1998; 281: 1505-9.
33. Cruzalegui FH, Hardingham GE, Bading H. c-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *EMBO J* 1999; 18: 1335-44.
34. Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. Ca²⁺-dependent regulation in neuronal gene expression. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 419-29.
35. Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, et al. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J* 2000; 19: 1963-73.
36. Blaeser F, Ho N, Prywes R, Chatila TA. Ca²⁺-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem* 2000; 275: 197-209.
37. Bowler WB, Dixon CJ, Halleux C, et al. Signaling in human osteoblasts by extracellular nucleotides. Their weak induction of the c-fos proto-oncogene via Ca²⁺ mobilization is strongly potentiated by a parathyroid hormone/cAMP-dependent protein kinase pathway independently of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 14315-24.
38. Miranti CK, Ginty DD, Huang G, Chatila T, Greenberg ME. Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3672-84.
39. Carrion AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B, Naranjo JR. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* 1999; 398: 80-4.
40. Ledo F, Carrion AM, Link WA, Mellstrom B, Naranjo JR. DREAM-alphaCREM interaction via leucine-charged domains derepresses downstream regulatory element-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9120-6.
41. An WF, Bowlby MR, Betty M, et al. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000; 403: 553-6.
42. Mechti N, Piechaczyk M, Blanchard JM, Jeanteur P, Lebleu B. Sequence requirements for premature transcription arrest within the first intron of the mouse c-fos gene. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2832-41.
43. Collart MA, Tourkine N, Belin D, Vassalli P, Jeanteur P, Blanchard JM. c-fos gene transcription in murine macrophages is modulated by a calcium-dependent block to elongation in intron 1. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2826-31.
44. Lee G, Gilman M. Dual modes of control of c-fos mRNA induction by intracellular calcium in T cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4579-87.
45. Coulon V, Veyrune JL, Tourkine N, Vie A, Hipskind RA, Blanchard JM. A novel calcium signaling pathway targets the c-fos intragenic transcriptional pausing site. *J Biol Chem* 1999; 274: 30439-46.
46. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 1996; 87: 953-9.
47. Youn HD, Grozinger CM, Liu JO. Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *J Biol Chem* 2000; 275: 22563-7.
48. Corneliussen B, Holm M, Waltersson Y, et al. Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature* 1994; 368: 760-4.

Summary

Calcium fluxes and gene expression

Calcium fluxes modulate many biological processes including gene expression, and especially transcription. In this review, we describe the main possible sources of calcium, namely the internal stores and extracellular milieu, as well as the channels that connect them to the cytosol. Calcium influxes activate calmodulin (CaM), a calcium-binding protein, which in turn switches on several kinases (CaM-kinases, CaMK) and a phosphatase (calcineurin). The signalling pathway downstream the Ca^{2+} -CaM complex also includes the CaM-kinases kinases (CaMKK), thus elaborating a CaMK cascade that can cross-talk with other pathways such as the MAP-kinase cascade. The calcium message is discussed in terms of time and space: the transcriptional response depends on the subcellular compartment and on the frequency/duration of the stimuli. Calcium can modulate transcription by modifying not only the localisation and activity of transcription factors, but also RNA polymerases processivity and chromatin structure. All these processes act in concert to regulate calcium-dependent transcription. While most of these transactions are mediated by Ca^{2+} -CaM, a recently discovered calcium-sensitive transcriptional repressor, DREAM, directly binds calcium ions. This binding dramatically changes its DNA binding properties.

13^e COURS ANNUEL DE LA SFI Centre de Congrès des Pensières, Annecy

Vendredi 9 - Mardi 13 novembre 2001

2001 : L'ODYSSEE DE L'IMMUNOLOGIE

organisé par

la Société Française d'Immunologie (SFI)
avec le soutien de la Fondation MÉRIEUX
et la participation de l'Association des Enseignants
d'Immunologie des Universités de Langue Française
(ASSIM)

Objectif du Cours

- Le cours se déroule en immersion totale du vendredi après-midi au mardi midi. Il s'adresse aux enseignants d'immunologie qui peuvent y trouver une aide à la préparation de leurs cours propres, aux jeunes scientifiques qui peuvent y élargir la vue forcément focalisée qu'ils ont de l'immunologie, aux Chercheurs et Ingénieurs de laboratoires de recherche en immunologie ou dans des domaines interactifs avec cette discipline.
- Les huit conférenciers, qui assistent à l'intégralité du cours, donnent deux séminaires d'une heure et demie chacun. Cette organisation facilite les échanges tant entre les étudiants et les conférenciers, qu'entre les étudiants entre eux, que ce soit de façon formelle au cours d'une table ronde le dimanche après-midi, ou le soir, ou informels pendant les repas et les pauses.
- La SFI étant reconnue comme formateur agréé sous le n° 11.75.28.994.75, le cours peut être pris en charge par divers organismes (Inserm, Cnrs, Inra, etc.). Les frais d'inscription à deux niveaux ont été étudiés pour faciliter la venue de titulaires, pouvant être pris en charge par la formation continue, et d'autres personnes qui n'en sont pas bénéficiaires.

Inscriptions

Frais d'inscription comprenant le cours, le document, les repas et l'hébergement :

• titulaire :	680 euros	4 460,51 francs
• non-titulaire :	340 euros	2 230,25 francs

Fiche de pré-inscription à demander, à envoyer au secrétariat de la SFI : Institut Pasteur, 28, rue du Dr-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

Tél. : 01.45.68.81.64 – Fax : 01.45.67.46.98
e-mail : sgouel@pasteur.fr

TIRÉS À PART

J.M. Blanchard.