



**PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE  
MOLECULAIRES**

④

CONCEPTS FONDAMENTAUX ET APPLICATIONS

MECANISMES DE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE ET MESSAGERS

MODULE 1

**-VI-**

**LA RECONNAISSANCE MOLECULAIRE :  
DES MESSAGERS AUX RECEPTEURS**

L'ION CALCIUM :  
FACTEUR DE LA COMMUNICATION CELLULAIRE

**J-P. MAUGER**  
(INSERM, Orsay)

St Aubin  
Mercredi 28 avril 2004

Jean-Pierre MAUGER

DR INSERM

UMRS 442

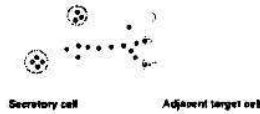
Inserm-Université Paris Sud  
Faculté des Sciences d'Orsay

### Communication intercellulaire

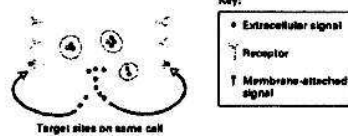
(a) Endocrine signaling



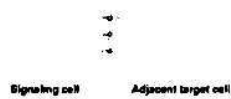
(b) Paracrine signaling



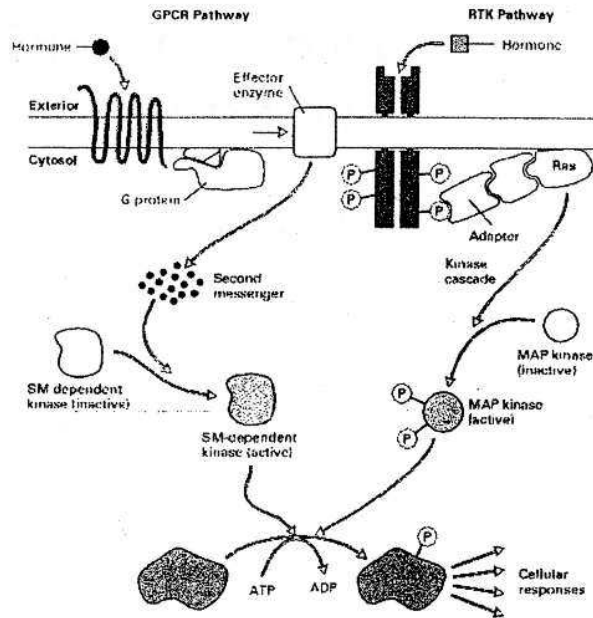
(c) Autocrine signaling



(d) Signaling by plasma membrane-attached proteins



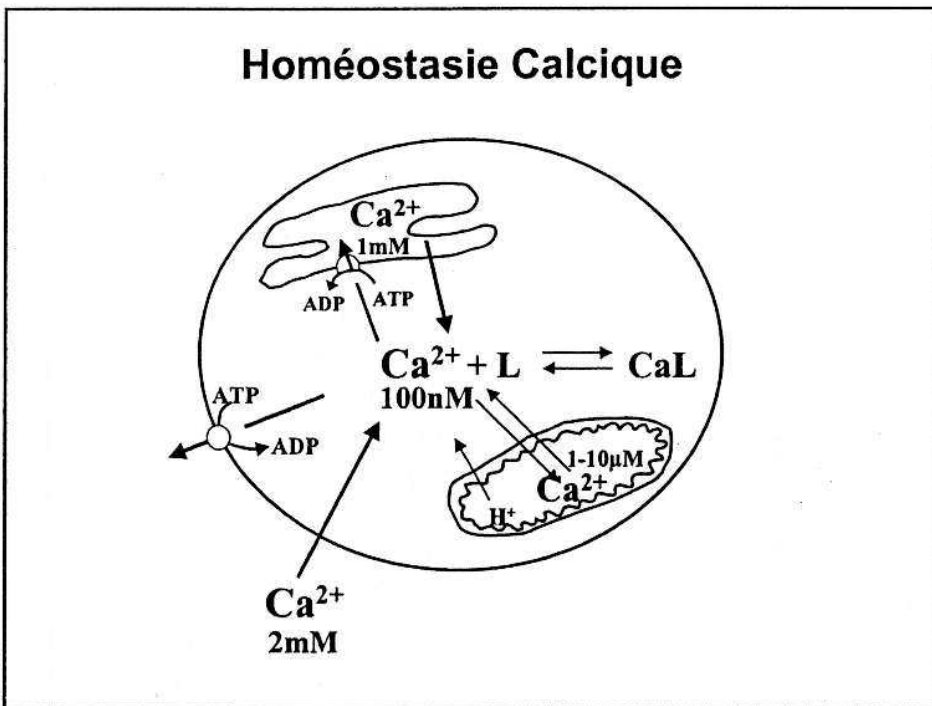
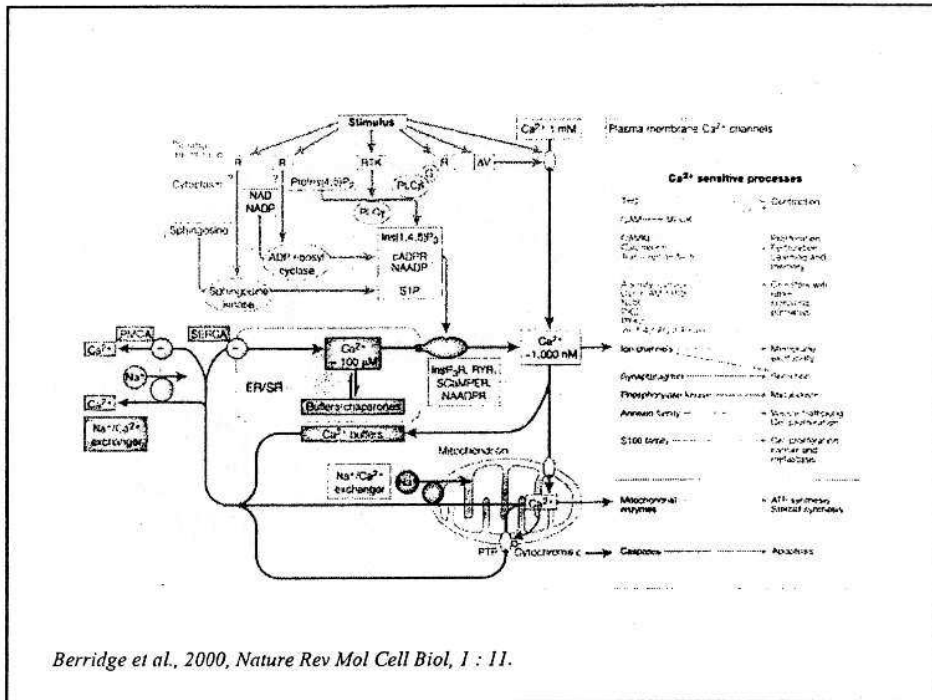
## Voies de signalisation en aval des GPCRs et des RTKs

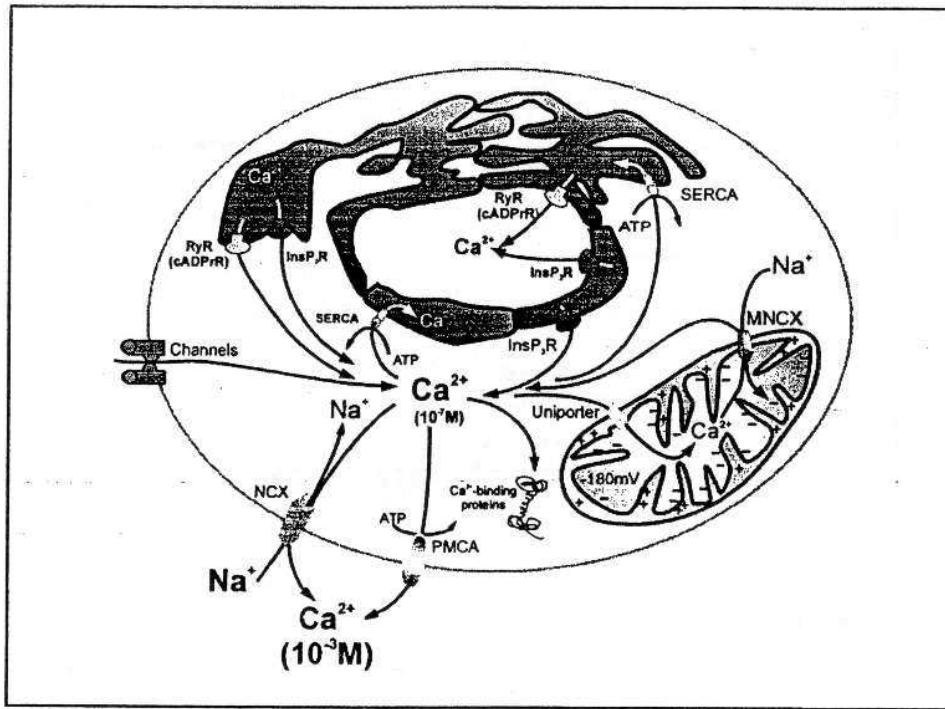


## Signalisation calcique

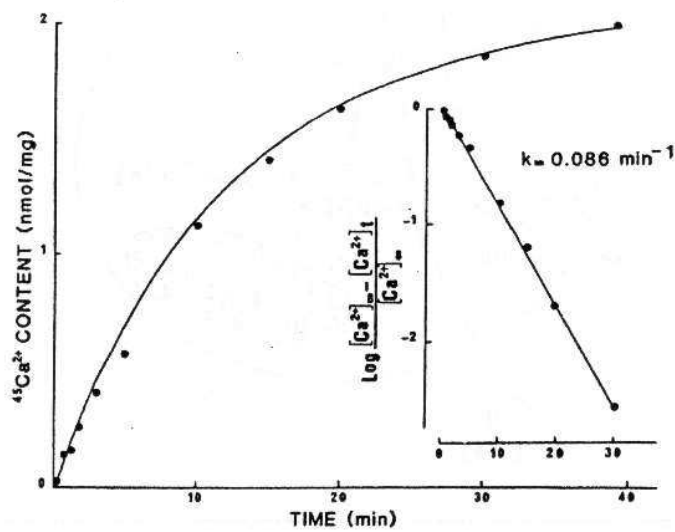
- **Fonctions régulées par le  $Ca^{2+}$**
- Sécration
- Contraction
- Métabolisme
- Apoptose
- Prolifération cellulaire
- Développement et différenciation
- Fécondation
- Apprentissage et mémorisation
- **Maladies impliquant le  $Ca^{2+}$**
- Hypertension
- Athérosclérose
- Hyperthermie maligne
- Cancérisation et métastases
- Maladie d'Alzheimer
- Maladie de Darier
- etc

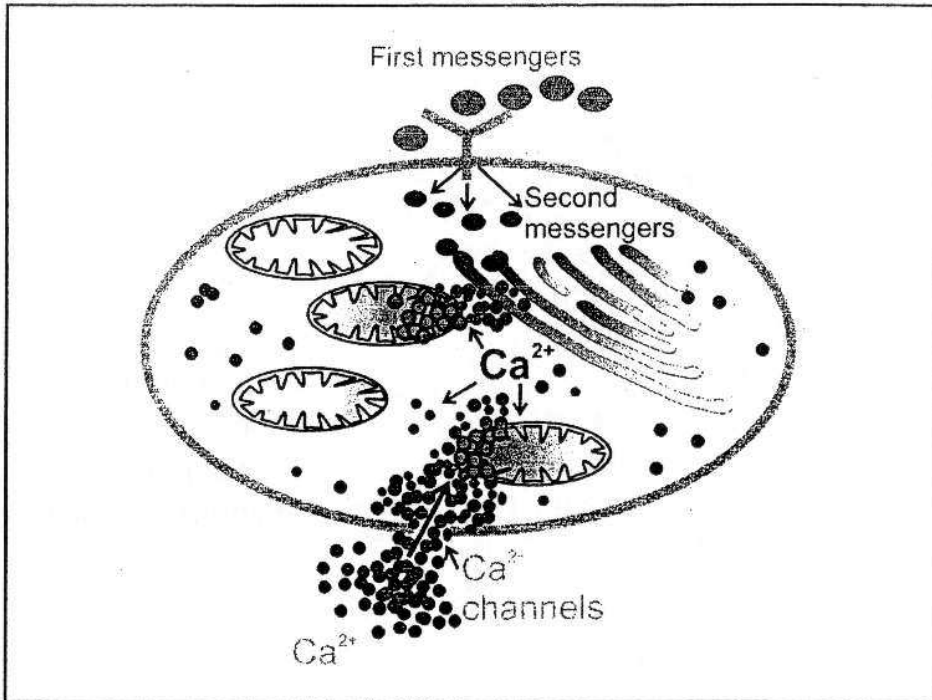
enclaw!



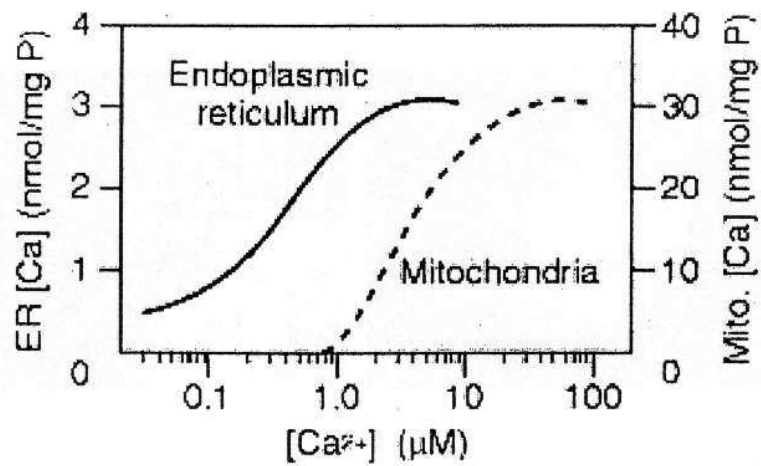


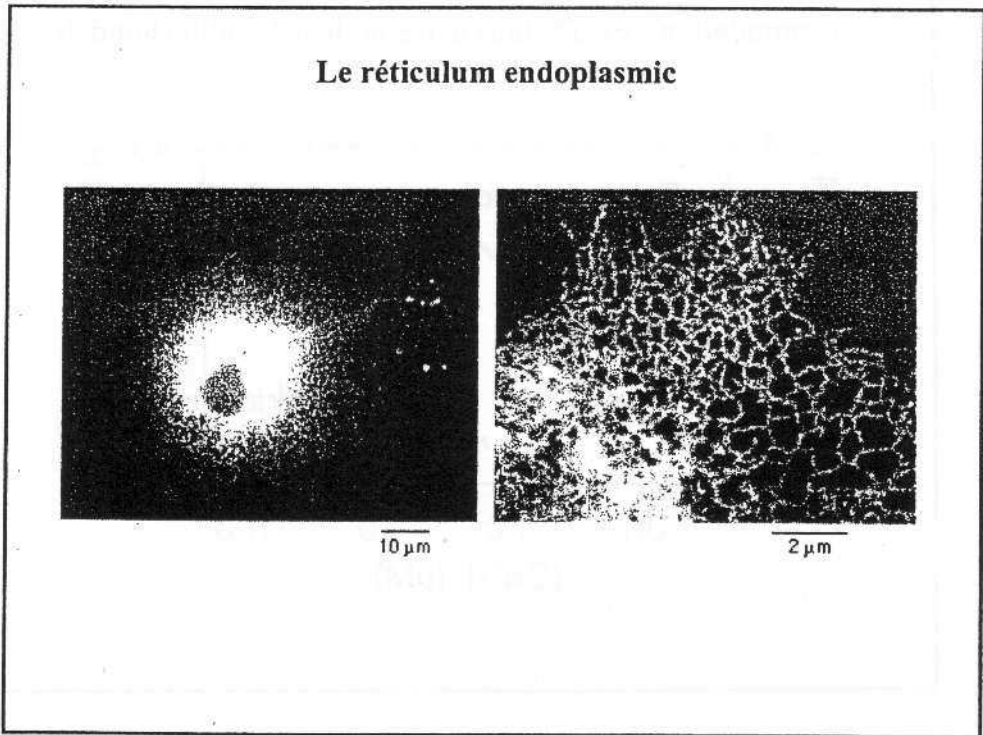
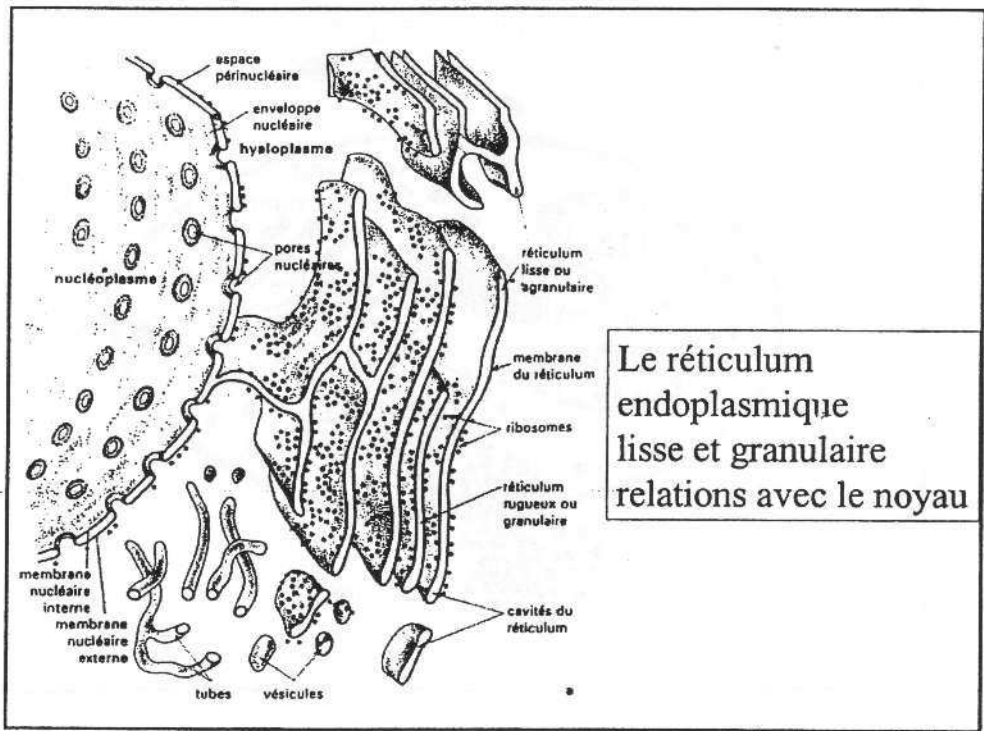
### Ca<sup>2+</sup> échangeable dans les hépatocytes





Accumulation de Ca<sup>2+</sup> dans le RE et dans les mitochondries



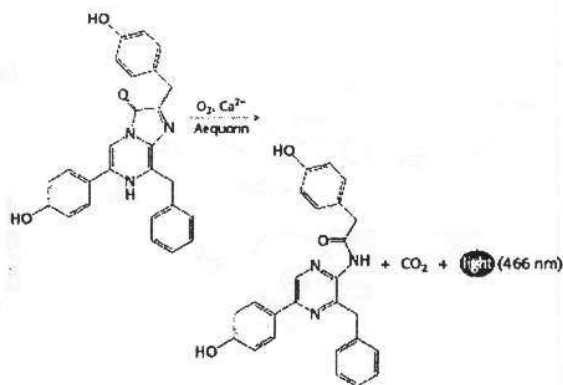


## Techniques de mesures du Calcium

### A- Méthodes indirectes

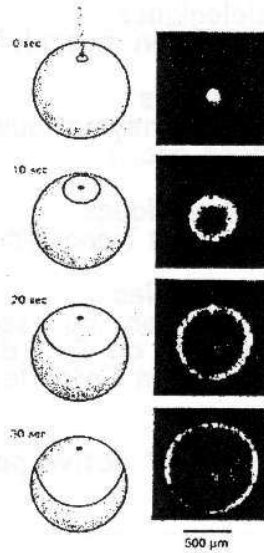
- 1) Réponses Physiologiques  
exple : contraction musculaire
- 2) Réponses Biochimiques  
exple : activité enzymatique dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$   
(phosphorylase etc...)
- 3) Réponses Pharmacologiques  
exple : ionophores (ionomycine, A23187)
- 4) Etudes Ultrastructurales  
exple : visualisation, au  $\mu$ scope électronique, de  
précipités de phosphate de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries  
de cellules exposées à un  $\text{Ca}^{2+}$  élevé
- 5) Patch-Clamp  
exple : Courant  $\text{K}^+$  activé par l'augmentation du  
 $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire

## Aequorine

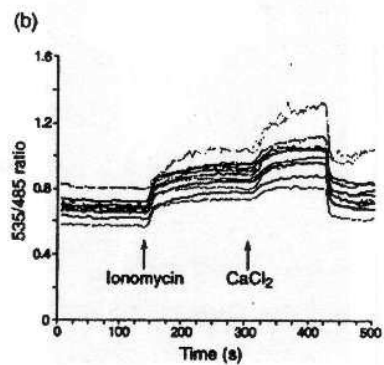
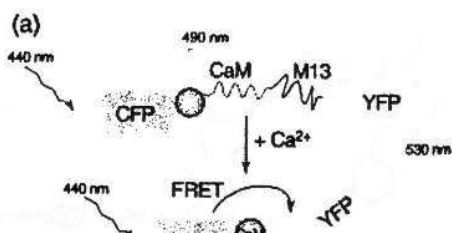












### Emission de lumière en présence de $\text{Ca}^{2+}$ par la protéine lumineuse aequorine

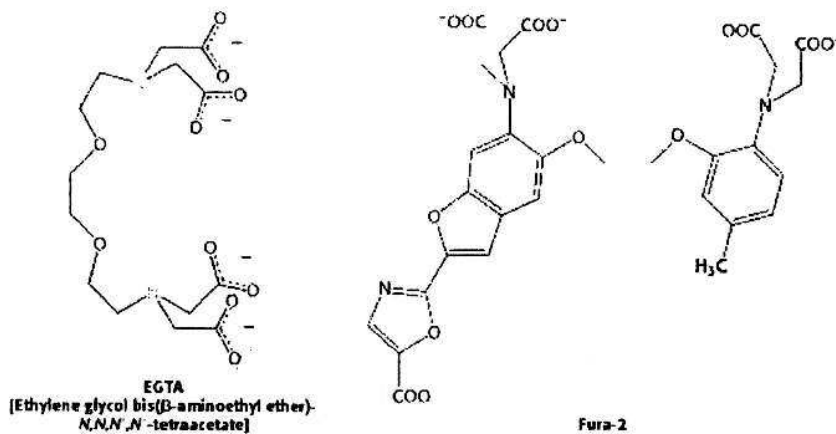


### Cameleon

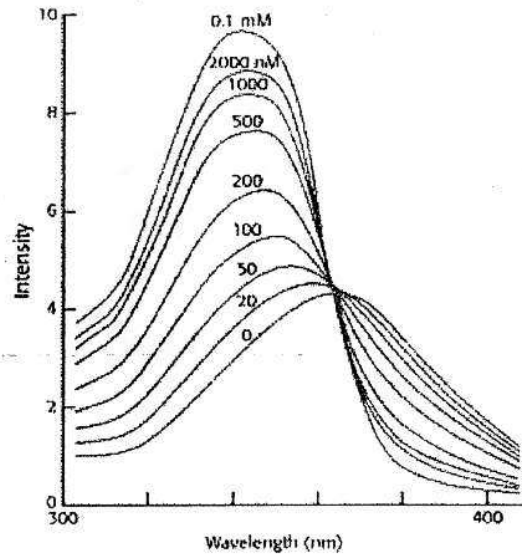


## Principales sondes calciques

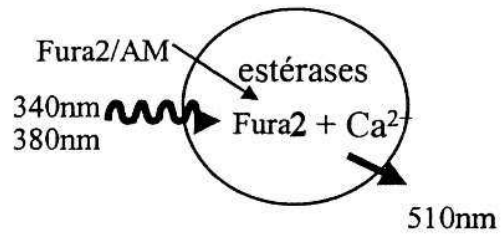
QUIN-2	$E_x$ 350		$E_m$ 490	
Fluo-3	$E_x$ 488		$E_m$ 525	
Fura -2	$E_x$ 340/380		$E_m$ 510	
INDO-1	$E_x$ 350		$E_m$ 405/480	



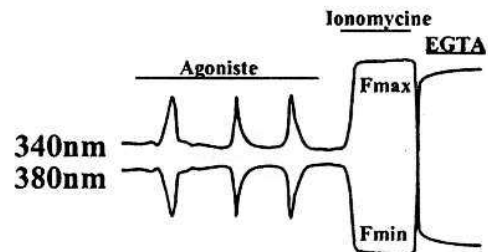
### Spectre de fluorescence du Fura 2



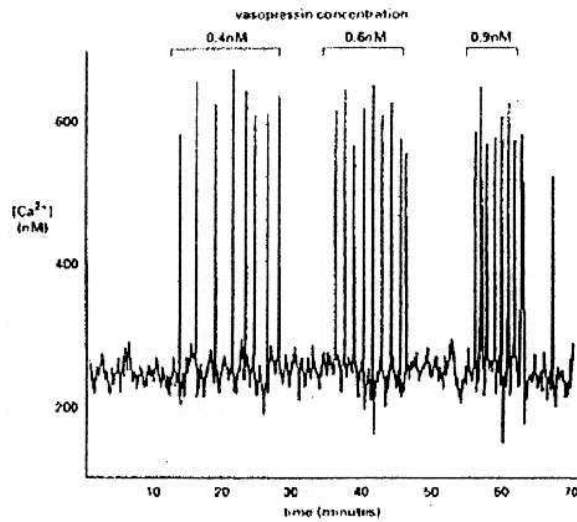
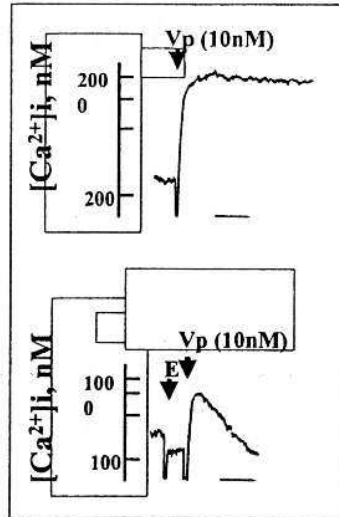
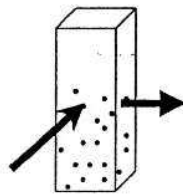
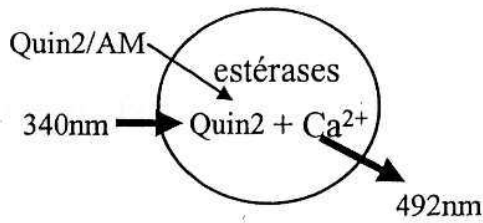
### Charge des cellules en fura2



### Détermination des variations de fluorescence sur cellule unique

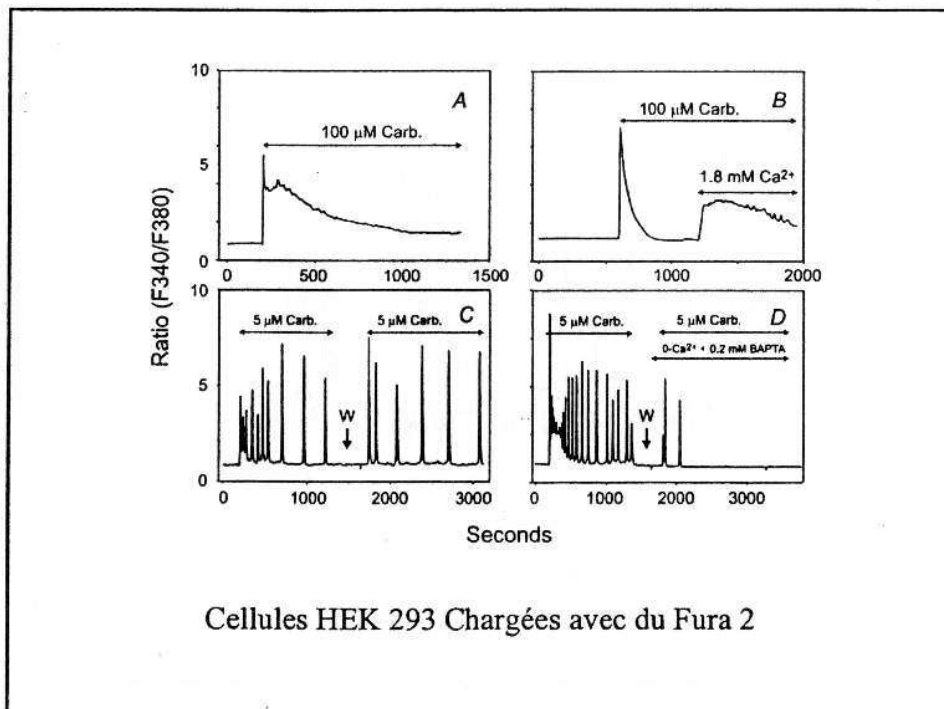
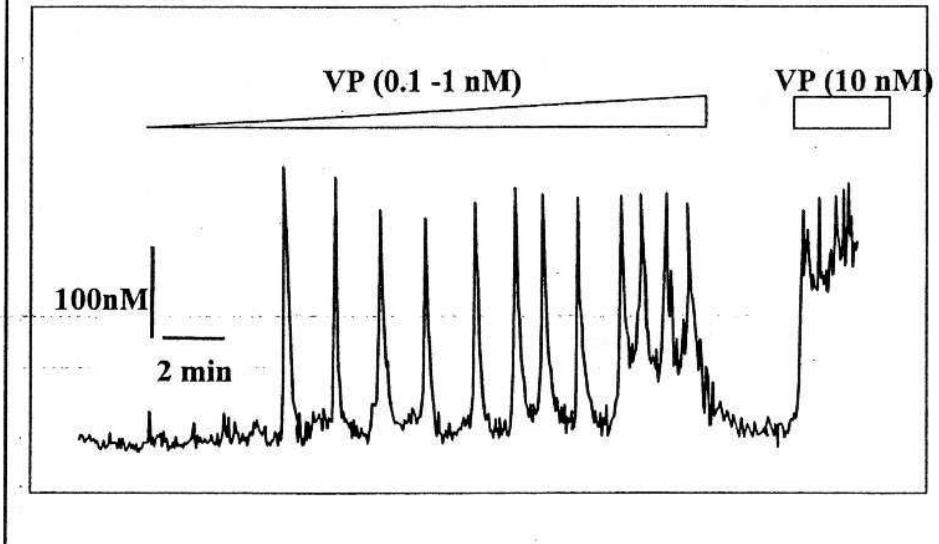


## Charge des cellules en Quin2

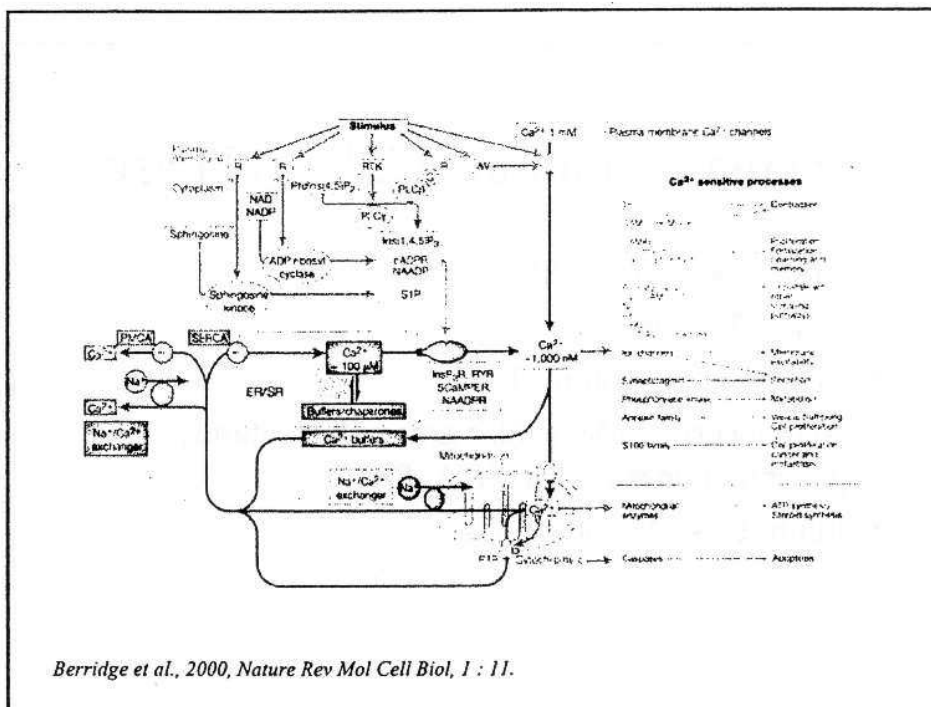
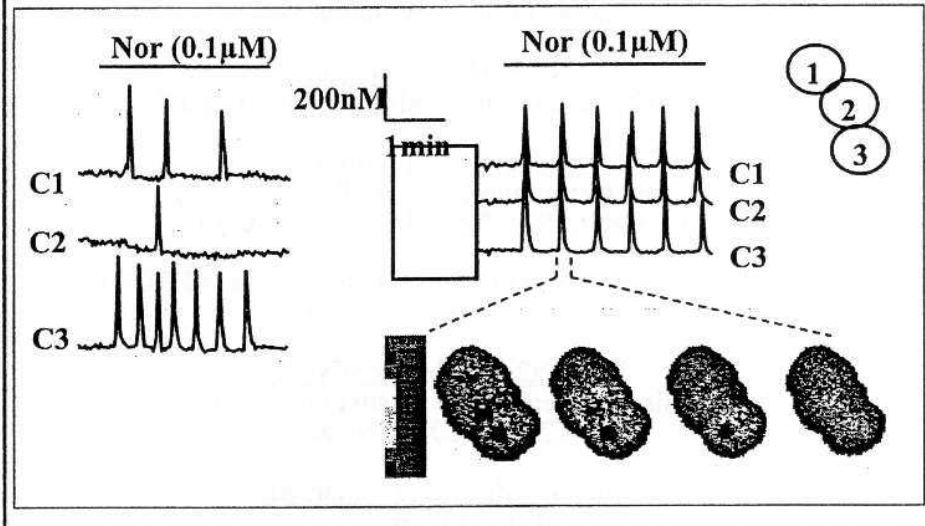


Wood et al., 1986, Nature, 319, 600.

## Organisation temporelle du signal $\text{Ca}^{2+}$ : «Modulation de fréquence»



## Oscillations et Vagues apparentes de $Ca^{2+}$ dans les hépatocytes



### **OFF mechanisms**

#### Ca<sup>2+</sup> buffers

Cytosolic buffers:

Parvalbumin ; calbindins 1-3

#### ER/SR buffers/chaperones:

Calnexin; calreticulin ; calsequestrins 1 and 2

#### Channels and pumps

Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA)

PMCA1 ; PMCA2 ; PMCA3 ; PMCA4

Sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA)

SERCA1 ; SERCA2 ; SERCA3

#### Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX)

This is present in the plasma membrane.

NCX1 ; NCX2 ; NCX3

#### Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels

Ca<sup>2+</sup> uniporter

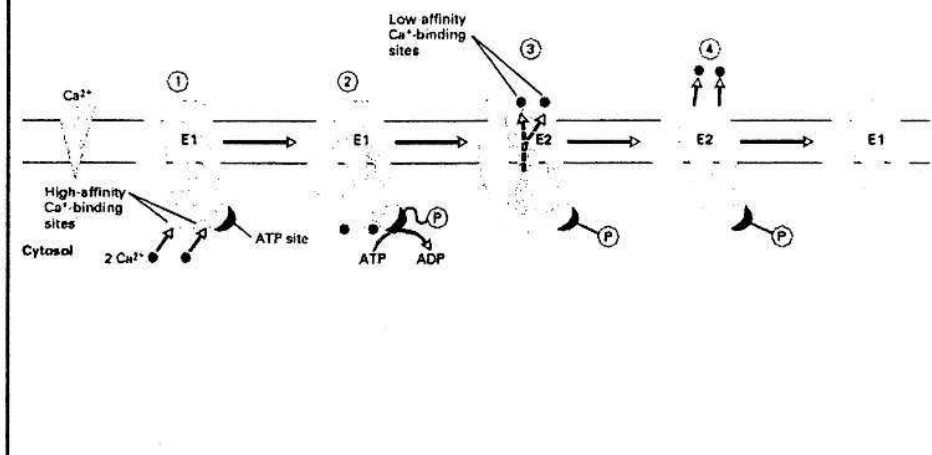
## Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>- ATPase

- Codée par 4 gènes différents
- PM : 130 kDa
- Echange Ca<sup>2+</sup> contre H<sup>+</sup>
- Activateurs : CaM, acides gras polyinsaturés, phospholipides acides, PKA, PKC
- Inhibiteurs : Vanadate, La<sup>3+</sup>

## Sarco(Endo)plasmic Reticulum $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

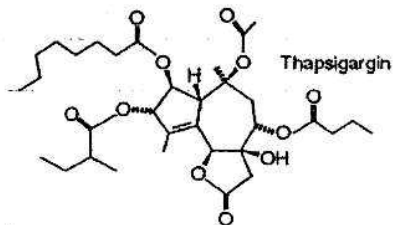
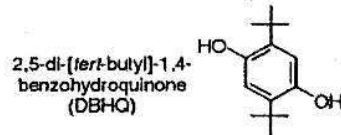
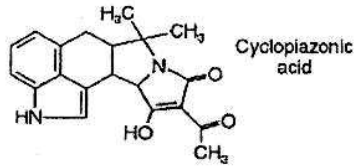
- SERCA 1 : Muscle squelettique
- SERCA 2a : Muscle cardiaque et muscles lisses
- SERCA 2b : Cellules non musculaires
- SERCA 3 : Divers
  
- PM : 100-110 kDa
- Régulateurs : Phosphorylation PKA ; Phospholamban
- Inhibiteurs : Vanadate ;  $\text{AlF}_4^-$  ; thapsigargine ; DBHQ ; acide cyclopiazonique

### Mecanisme d'action de la SERCA du muscle





### ER Calcium Pump Inhibitors



desbut conetti

0,2/30

)

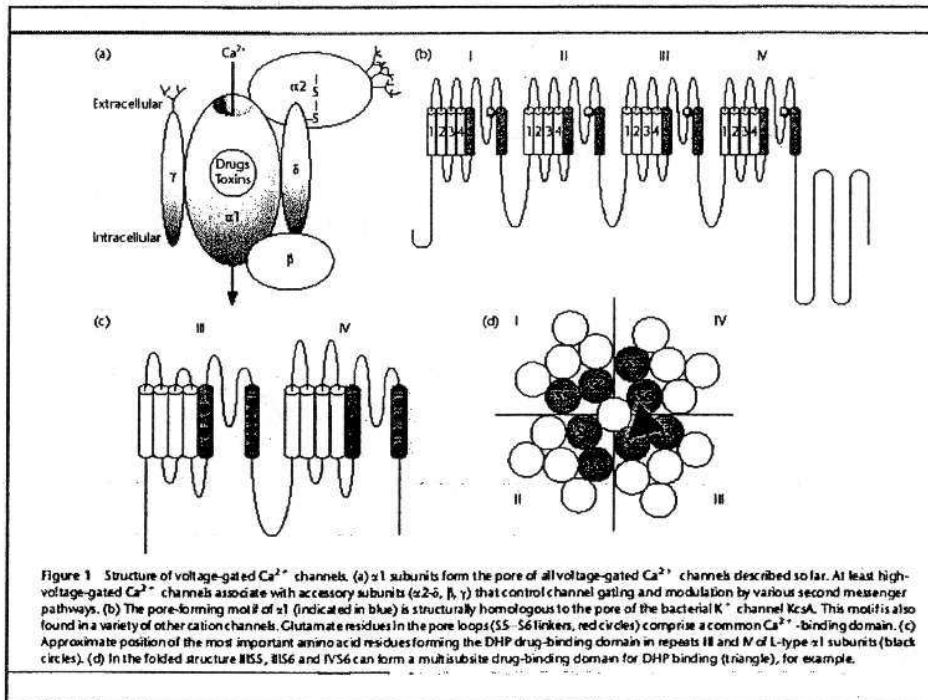
### Receptor-operated Ca<sup>2+</sup> channels (ROCs)

N-methyl D-aspartate receptors: NMDAR1; NMDAR2A;  
NMDAR2B; NMDAR2C; NMDAR2D

5-hydroxytryptamine receptors: 5-HT<sub>3A</sub>, 5-HT<sub>3B</sub>

ATP receptor: P<sub>2X</sub>

Nicotinic acetylcholine receptor: α7nAChR



2)

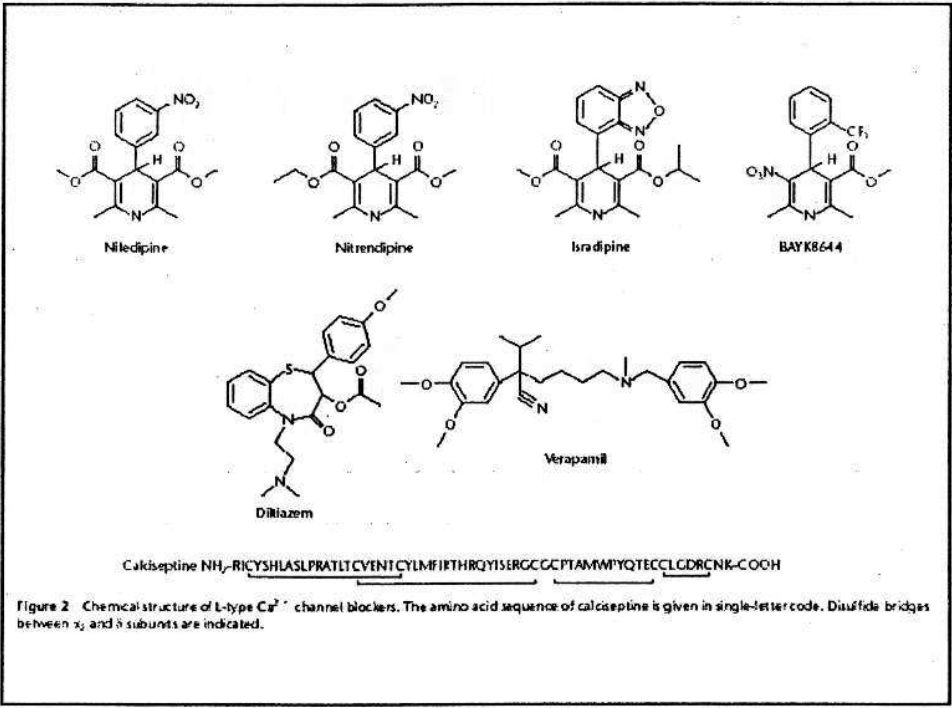
## Voltage-operated $\text{Ca}^{2+}$ channels (VOCs)

**Table 1**  $\text{Ca}^{2+}$  channel classification

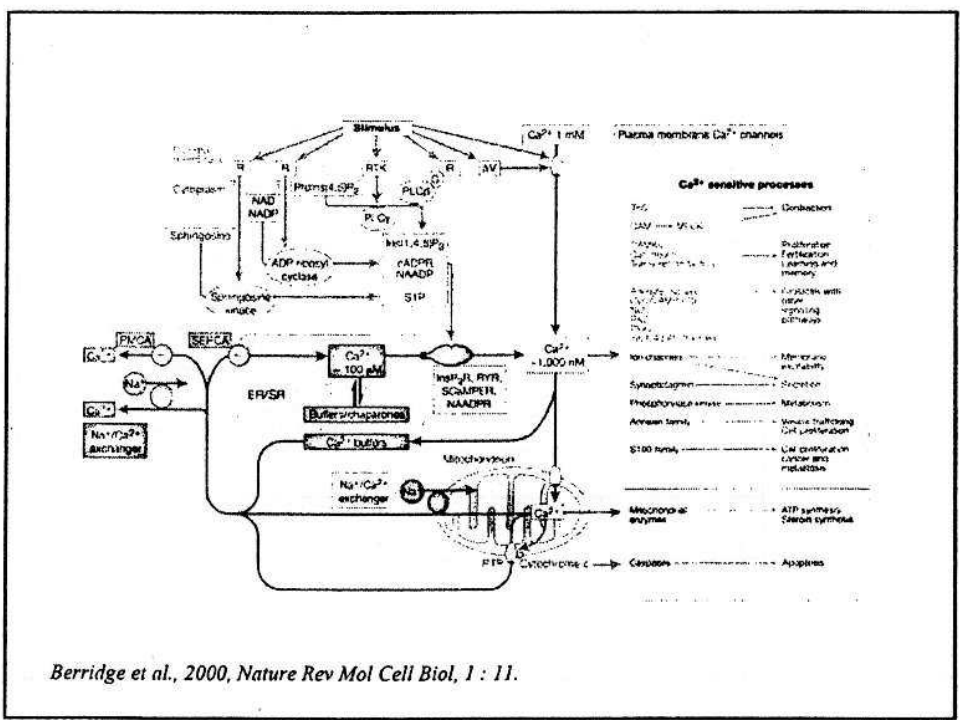
Type	Activation threshold	$\alpha 1$ subunit	Family	Drug and toxin sensitivity (selected list)	Pharmacotherapeutic potential			
L	High-voltage-activated	$\alpha 1S$ (Ca, 1.1)	Family 1 of $\alpha 1$ subunits	Classical $\text{Ca}^{2+}$ antagonists (DHPs, PAAAs, BTZs), caki/septine	Established for treatment of cardiovascular diseases in humans (mostly mediated by block of $\alpha 1C$ in heart and vascular smooth muscle)			
		$\alpha 1C$ (Ca, 1.2)						
		$\alpha 1D$ (Ca, 1.3)						
		$\alpha 1F$ (Ca, 1.4)						
N		$\alpha 1B$ (Ca, 2.2)				Family 2 of $\alpha 1$ subunits	$\omega$ -Conotoxin GVIA, MVIIA (SNX-111, ziconotide)	Ziconotide in phase III clinical trials for treatment of neuropathic pain; potential indication of future nonpeptide blockers as neuroprotective agents (traumatic brain injury, stroke; efficacy in animal models already demonstrated)
P		$\alpha 1A$ (Ca, 2.1)						
Q	$\alpha 1A$ (Ca, 2.1)							
R	$\alpha 1E$ (Ca, 2.3)	DW133 <sup>a</sup> , (+)-ACN <sup>b</sup>	Unclear					
T	Low-voltage-activated	$\alpha 1G$ (Ca, 3.1) $\alpha 1H$ (Ca, 3.2) $\alpha 1I$ (Ca, 3.3)	Family 3 of $\alpha 1$ subunits	Kurtoxin, mibefradil, (+)-ECN	Antiepileptic and bradycardic actions proposed for channel blockers			

<sup>a</sup>Drug sensitivity not yet proven.  
<sup>b</sup>Not selective.

*inhibiteurs des canaux calciques*



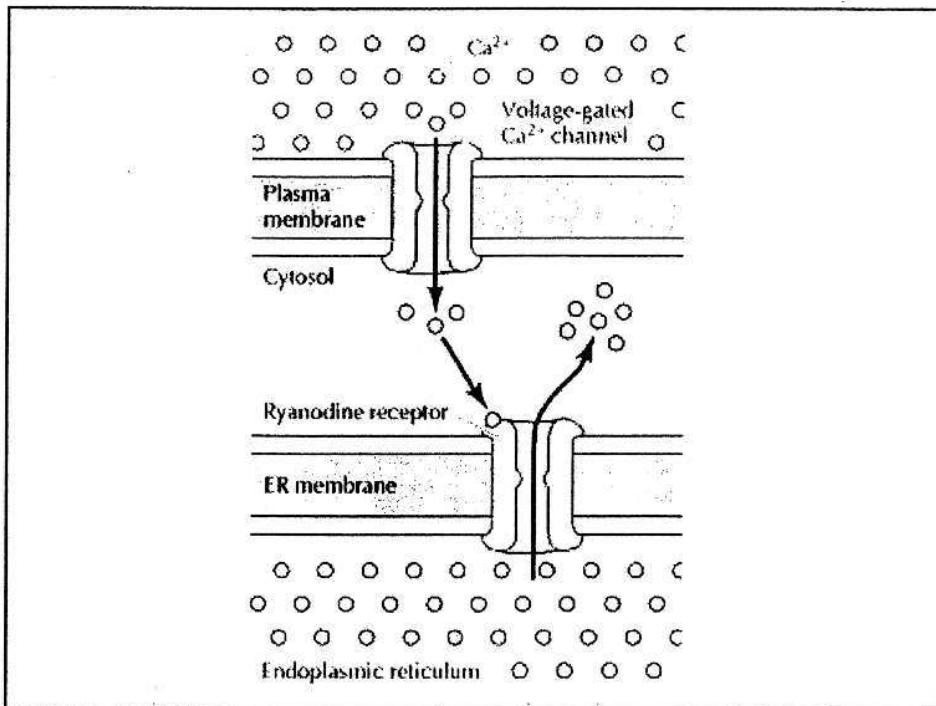
*à demander en part*

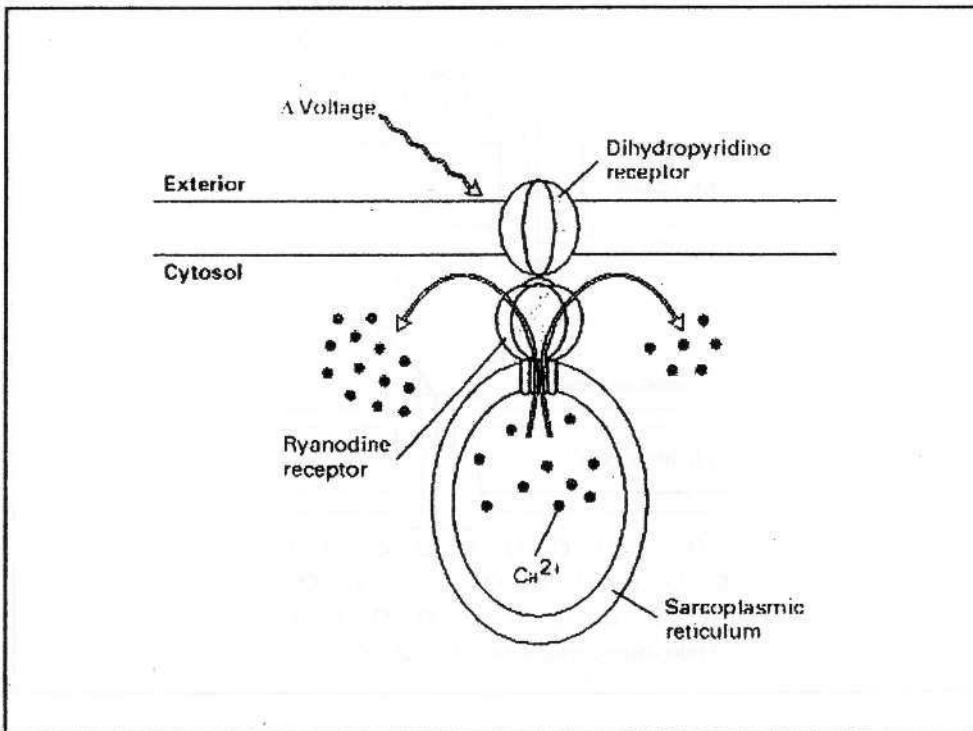
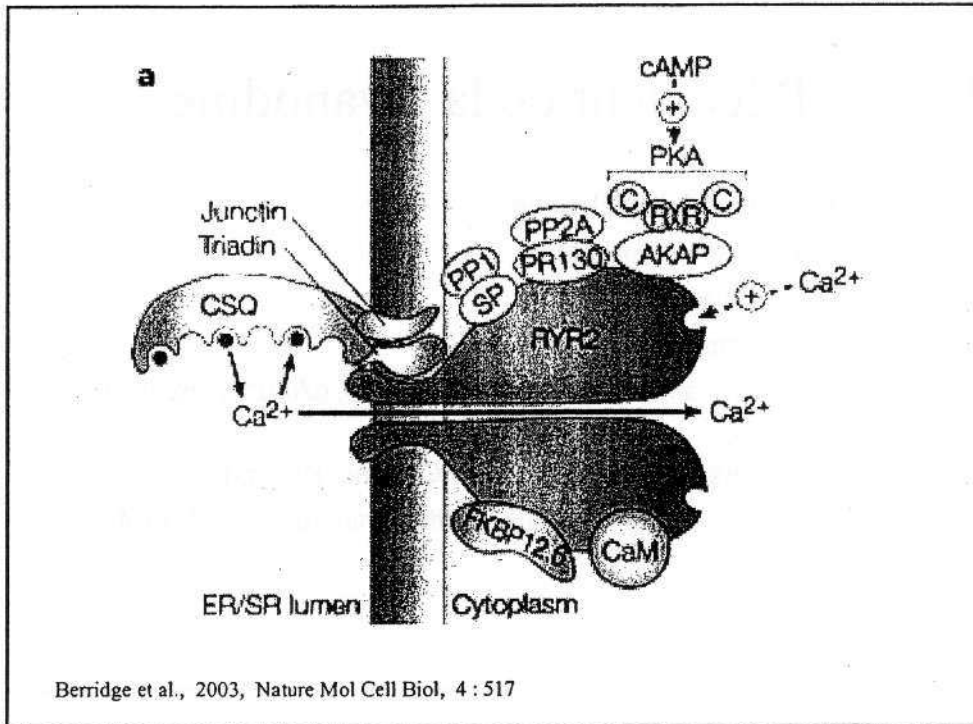


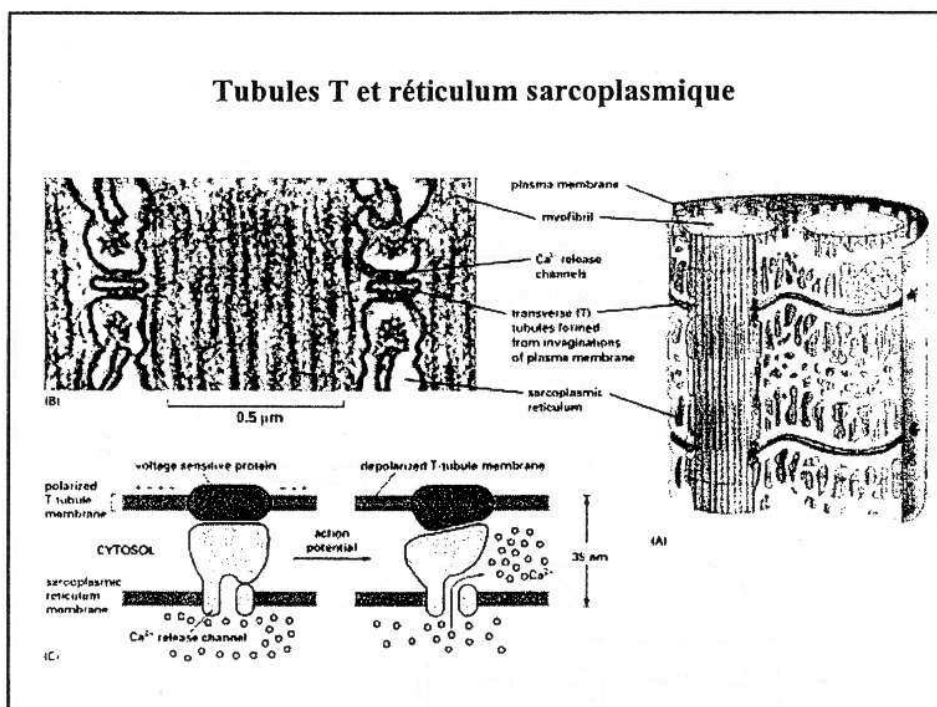
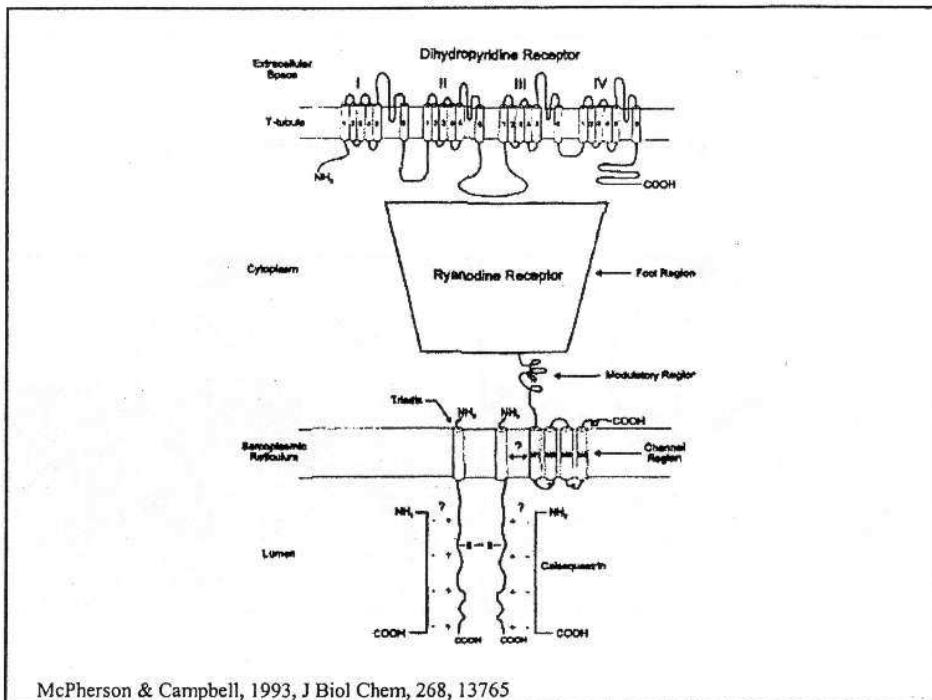
non componente → p 22

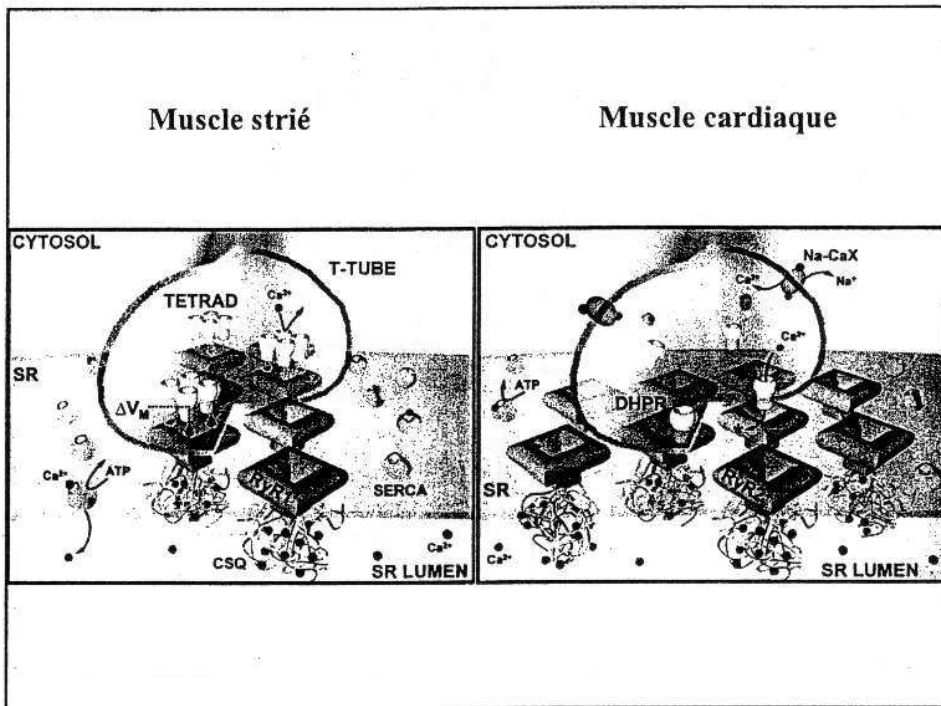
## Récepteur de la Ryanodine

- Type 1 muscle squeletique
- Type 2 muscle cardiaque
- Type 3 Cerveau
- Homotétramère (4 x 550 kDa)
- Activateurs physiologiques :  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\mu\text{M}$ ), cADPR, couplage mécanique
- Activateurs pharmacologiques : Caféine, Ryanodine,
- Inhibiteurs : Rouge de Ruthénium, Ryanodine,  $\text{Ca}^{2+}$  (mM)



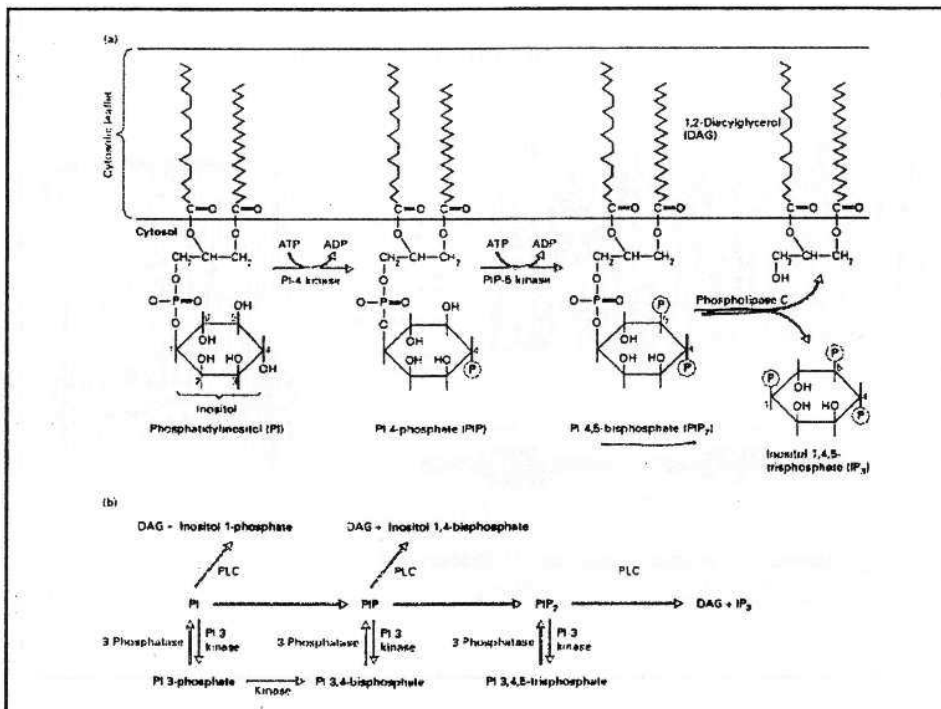




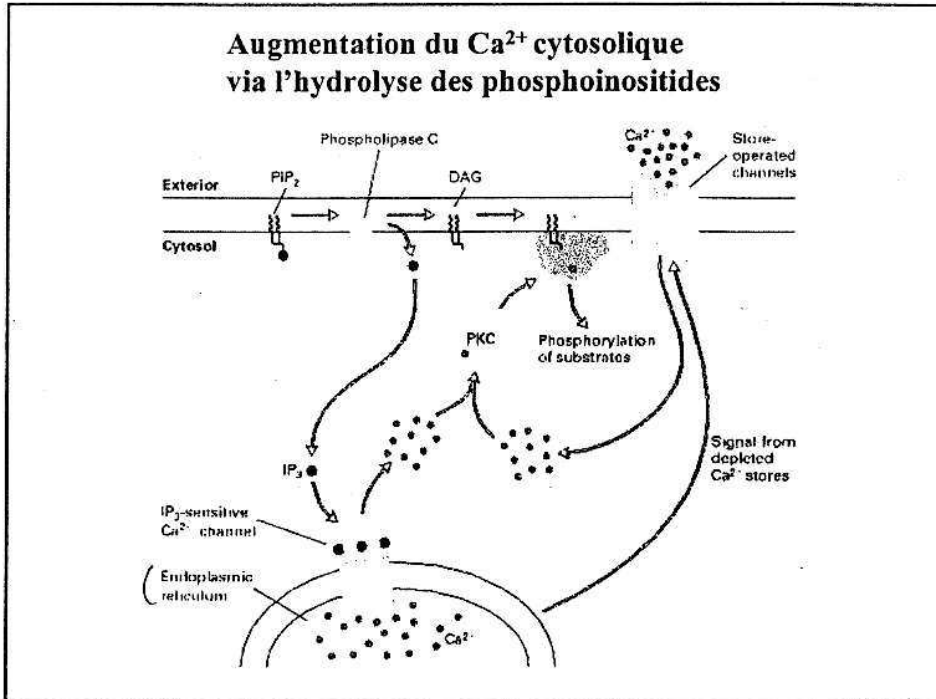


131

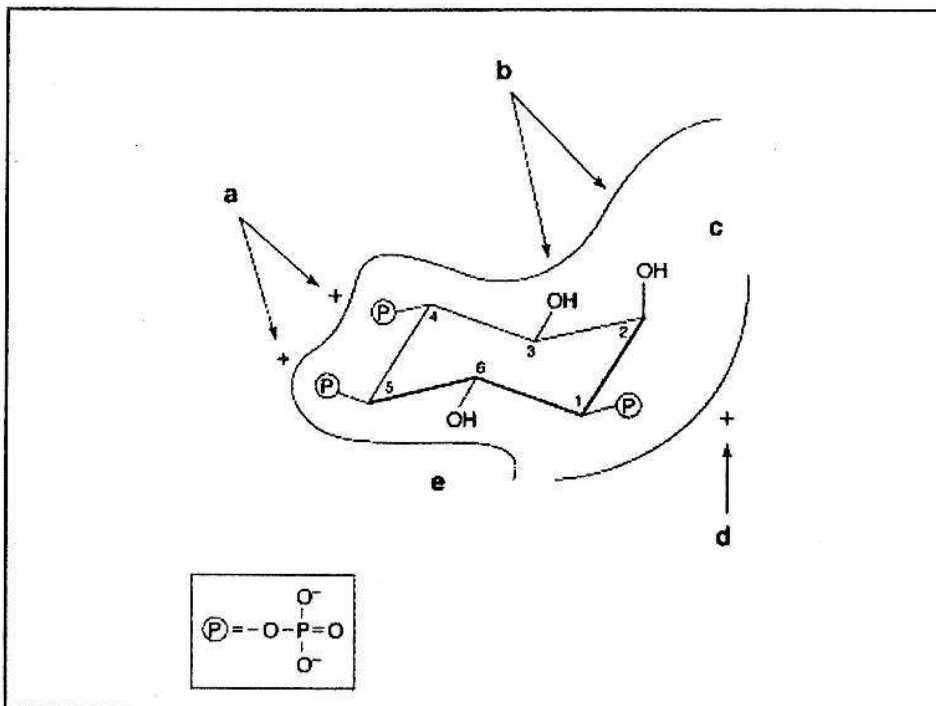
39, 33



16' + just Impus le cell utilise le RE

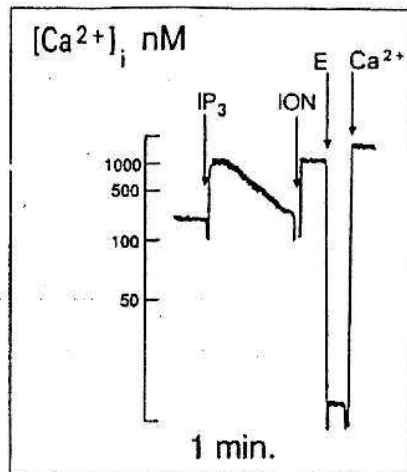


18'



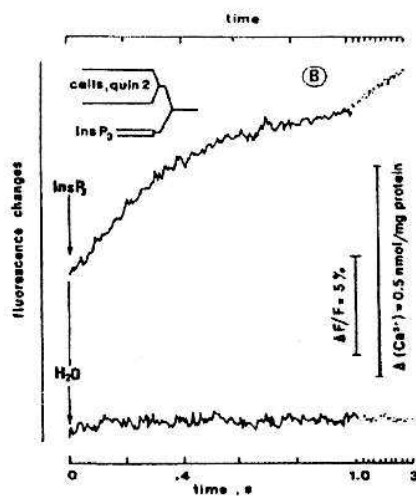


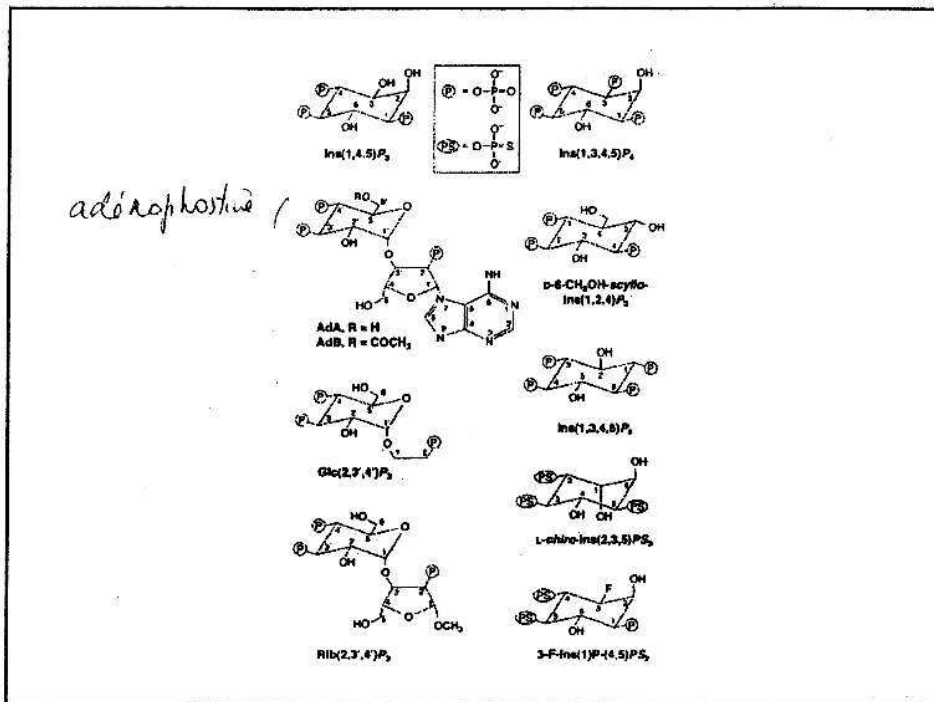
## Libération de $\text{Ca}^{2+}$ par l'InsP<sub>3</sub> dans des hépatocytes perméabilisés



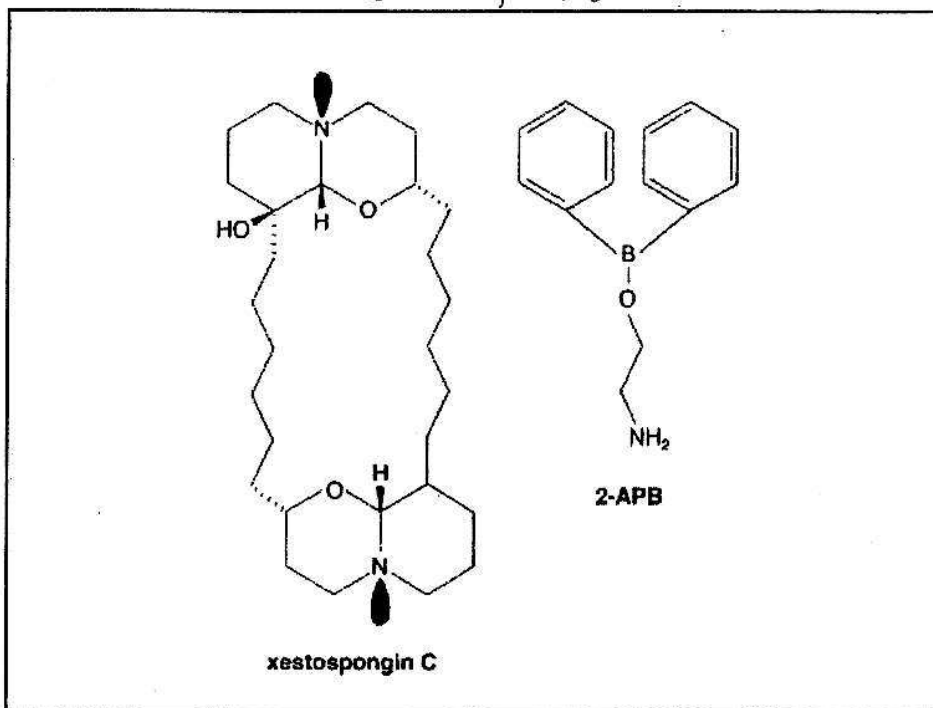
21'... Ph extrêmement rapide

## Mesure de libération de $\text{Ca}^{2+}$ par l'InsP<sub>3</sub> en cinétique rapide

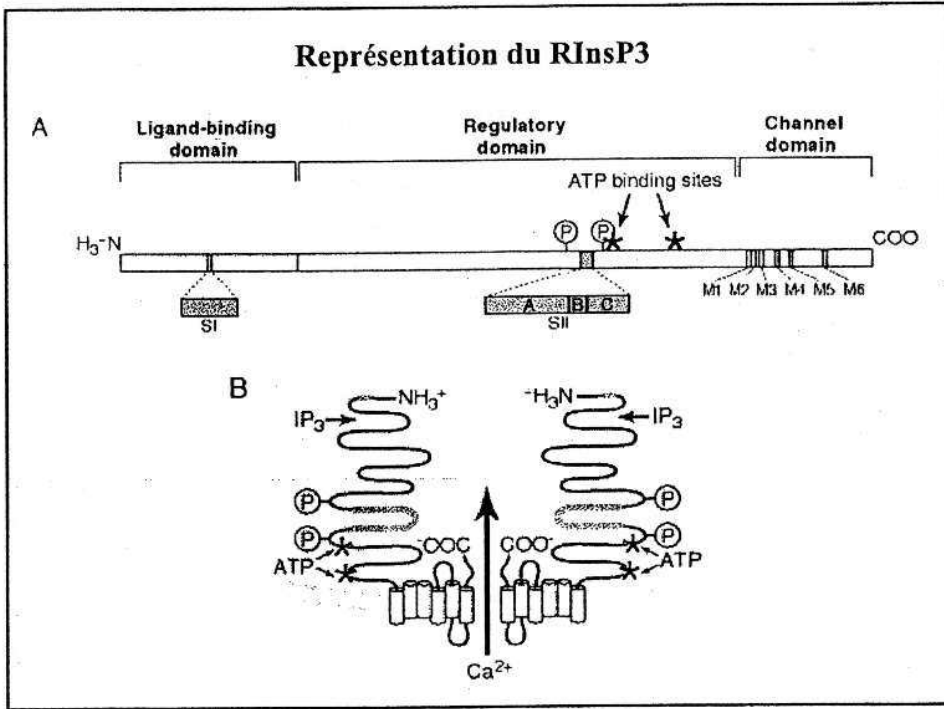




*inhibitors non specific*

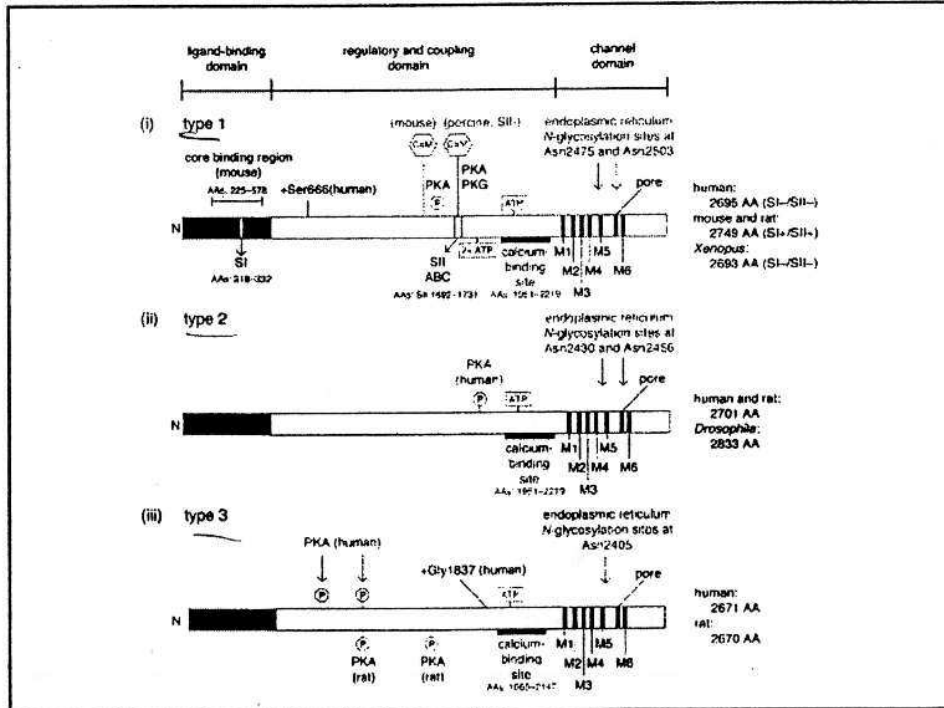


22/5



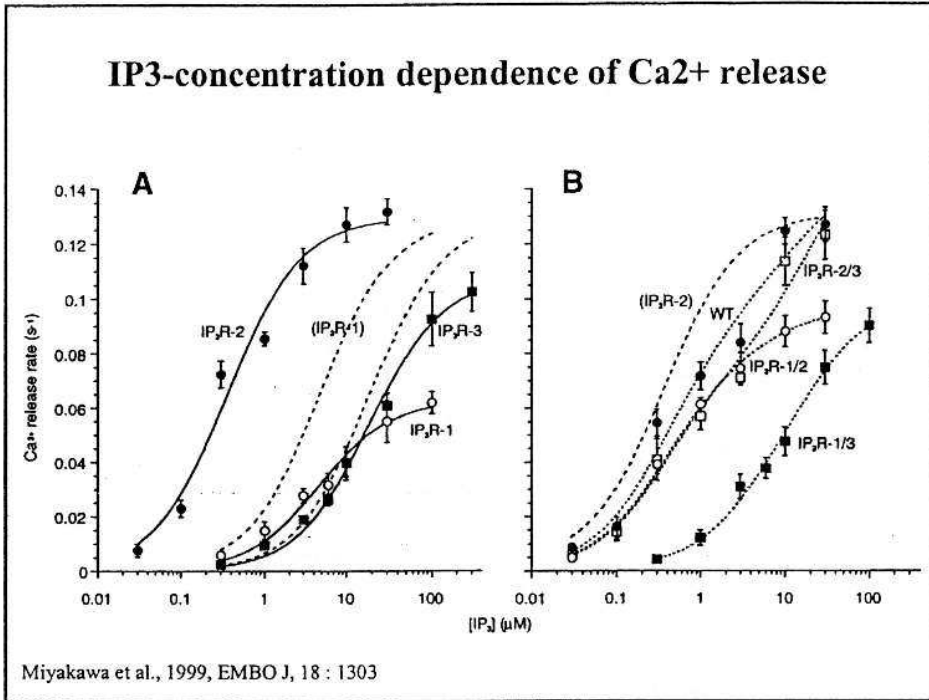
31,

Recep, pour IP3

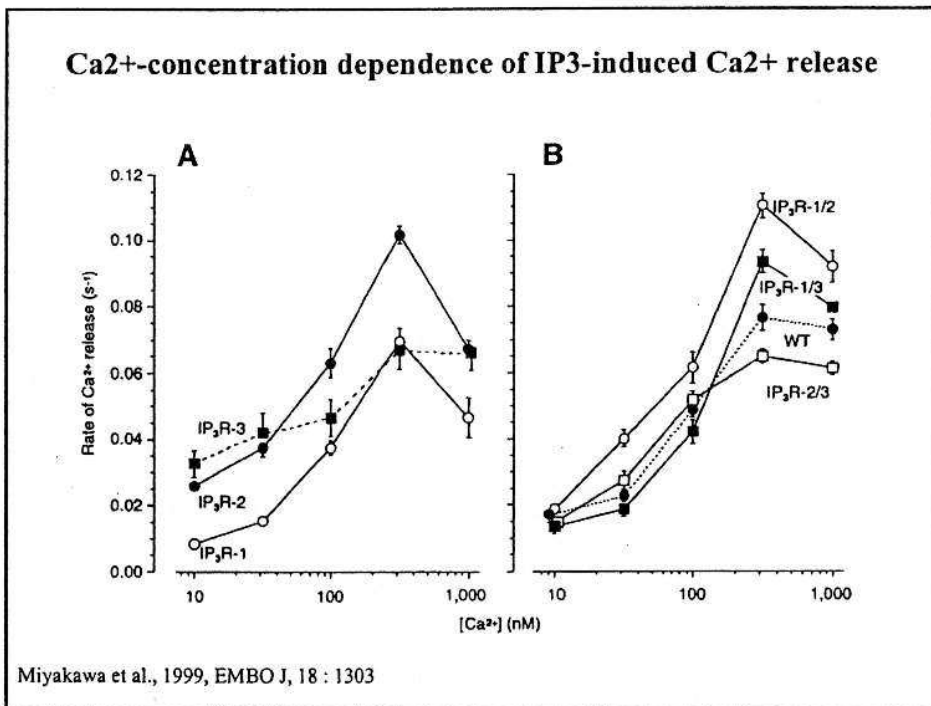


friends called yesterday 4:50 pm accepted

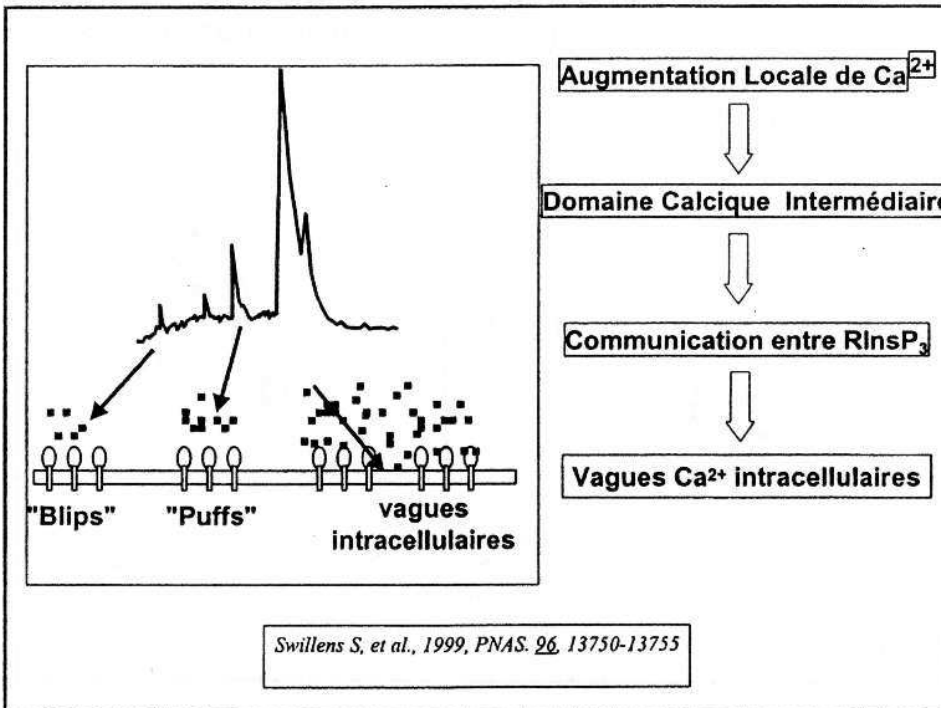
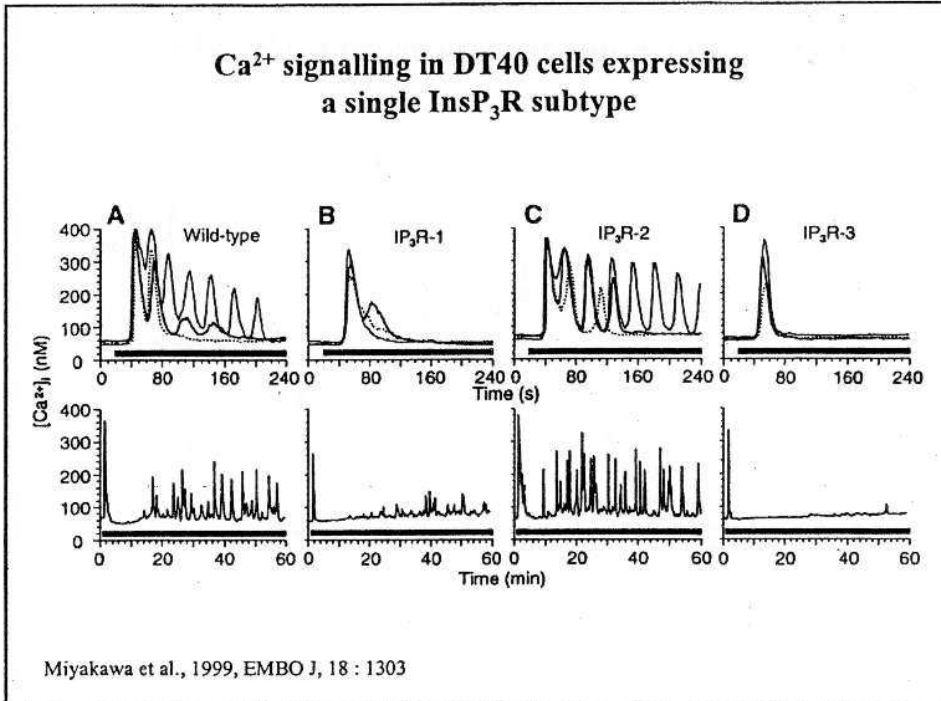
32



35



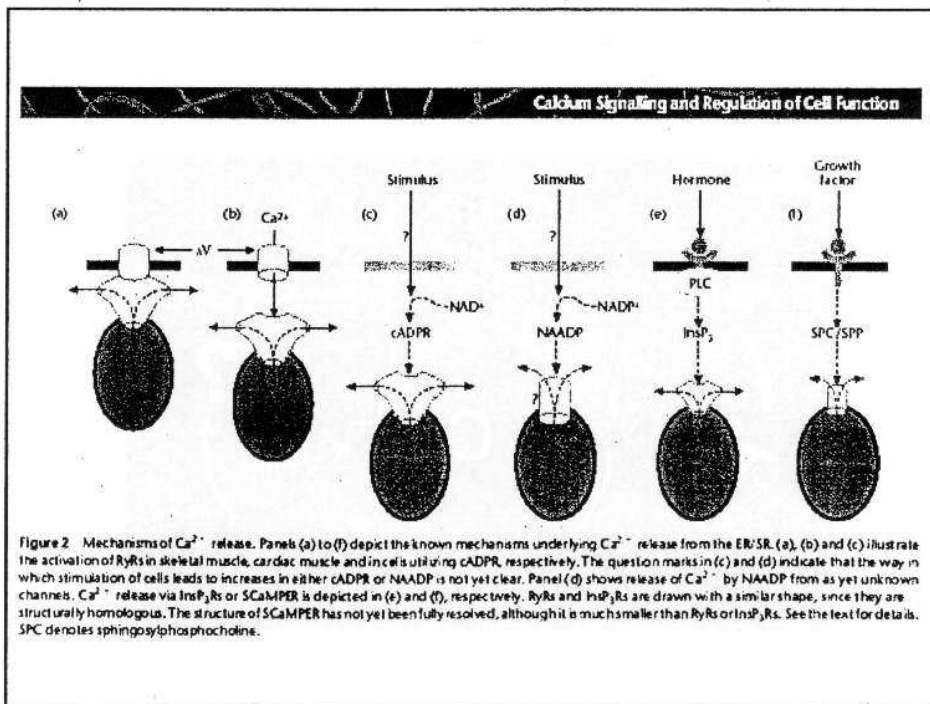
36'



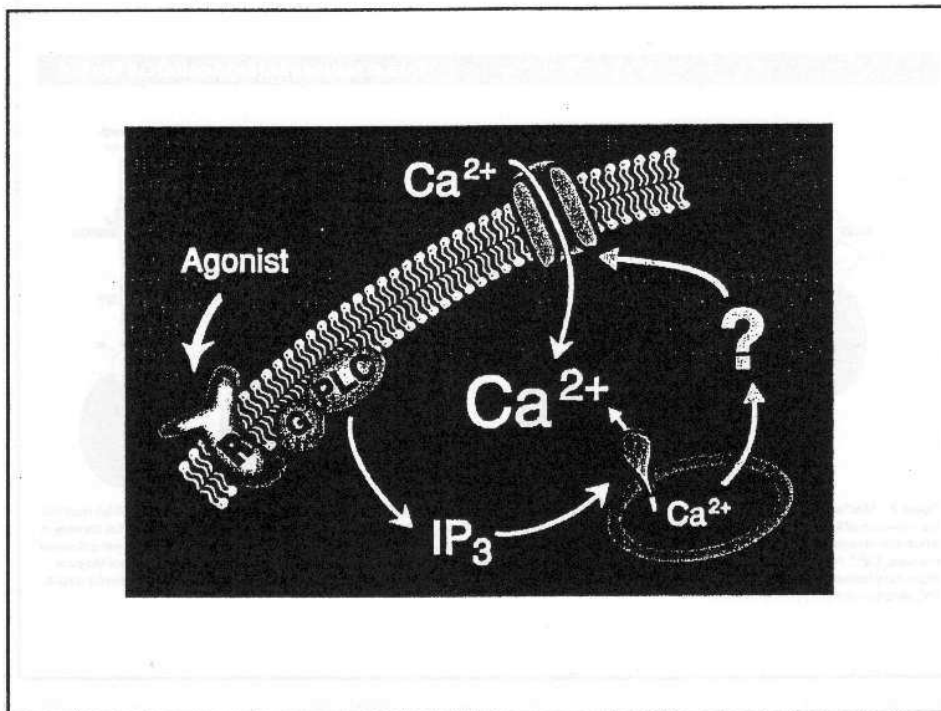
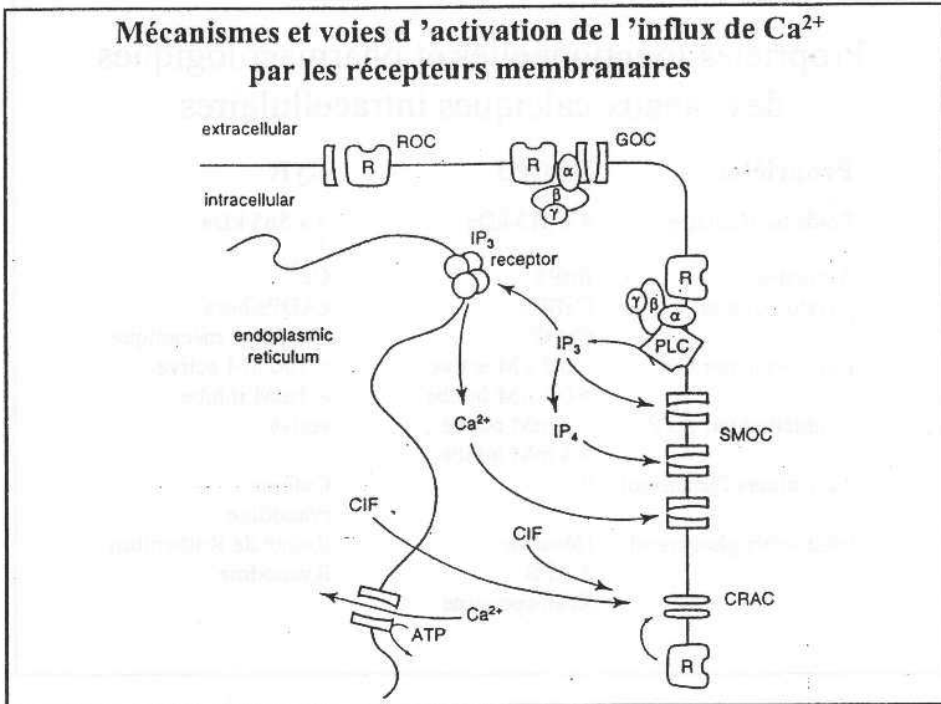
## Propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des canaux calciques intracellulaires

Propriétés	RInsP3	RyR
Poids moléculaire	4 x 313 kDa	4 x 565 kDa
Activateurs physiologiques	InsP3 CaBP Cyt C	Ca <sup>2+</sup> cADPribose Couplage mécanique
Régulation par Ca <sup>2+</sup>	< 0.3 μM active > 0.3 μM Inhibe	< 100 μM active > 1mM inhibe
Régulation par ATP	< 2 mM active > 4 mM inhibe	active
Activateurs Pharmacol	0	Caféine ryanodine
Inhibiteurs pharmacol	Héparine 2-APB Xestospongine	Rouge de Ruthenium Ryanodine

40'6 #

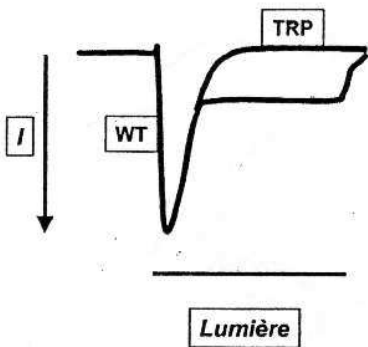


### Mécanismes et voies d'activation de l'influx de $\text{Ca}^{2+}$ par les récepteurs membranaires



## CANAUX CALCIQUES DE LA FAMILLE TRP

Photorécepteurs de la Drosophile

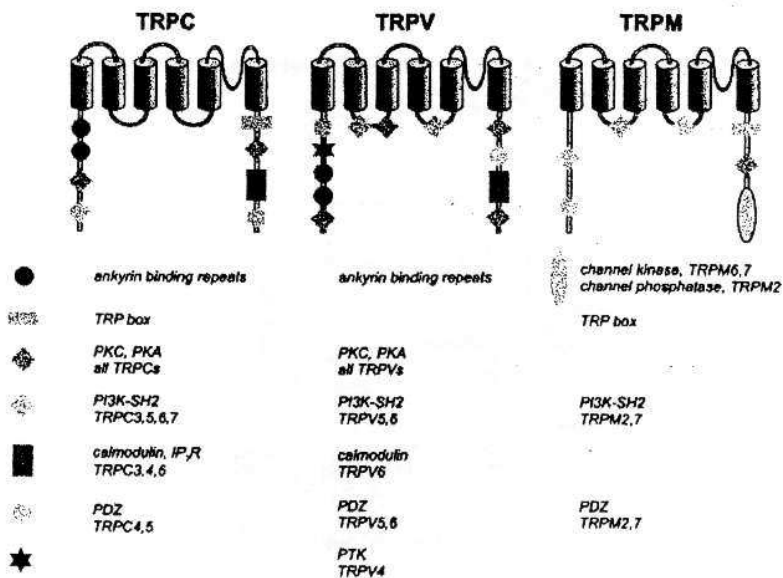


*trp* Transient Receptor Potential

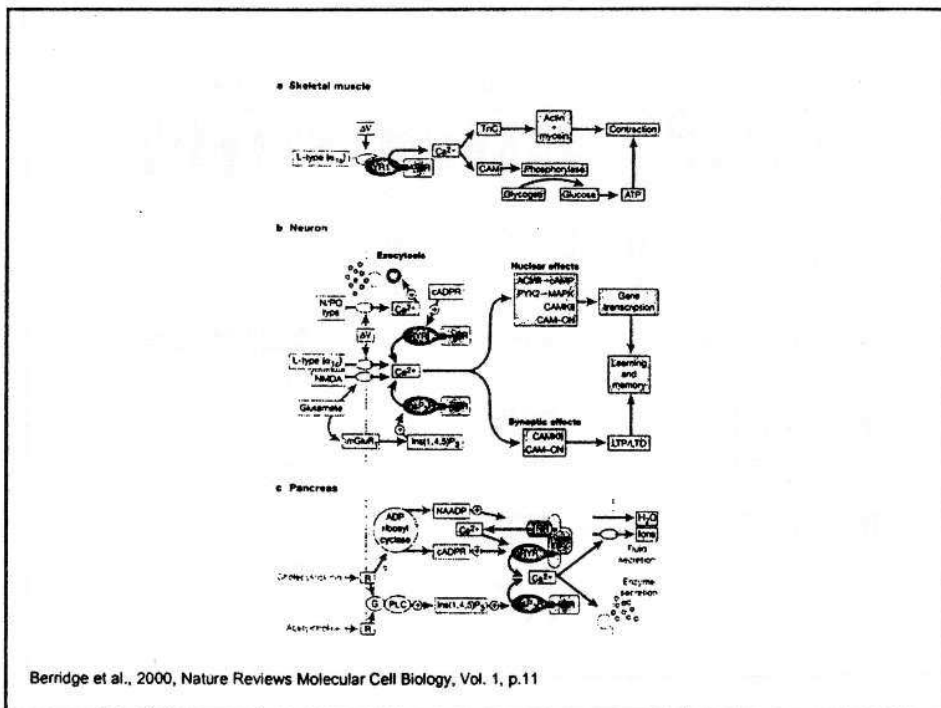
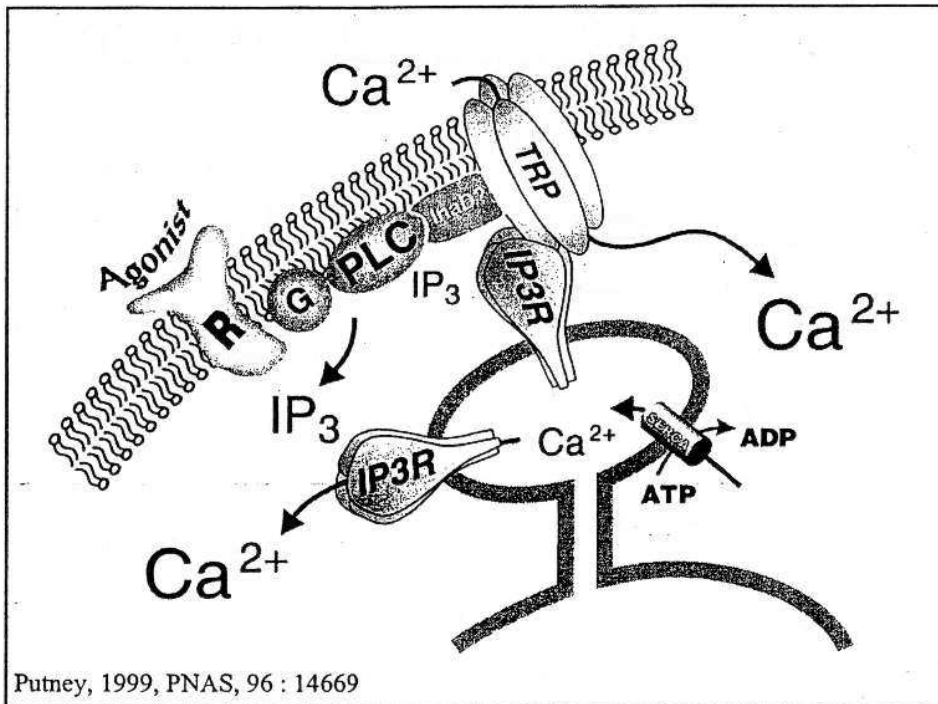
Canal cationique

Conservé de *C. elegans* à l'homme

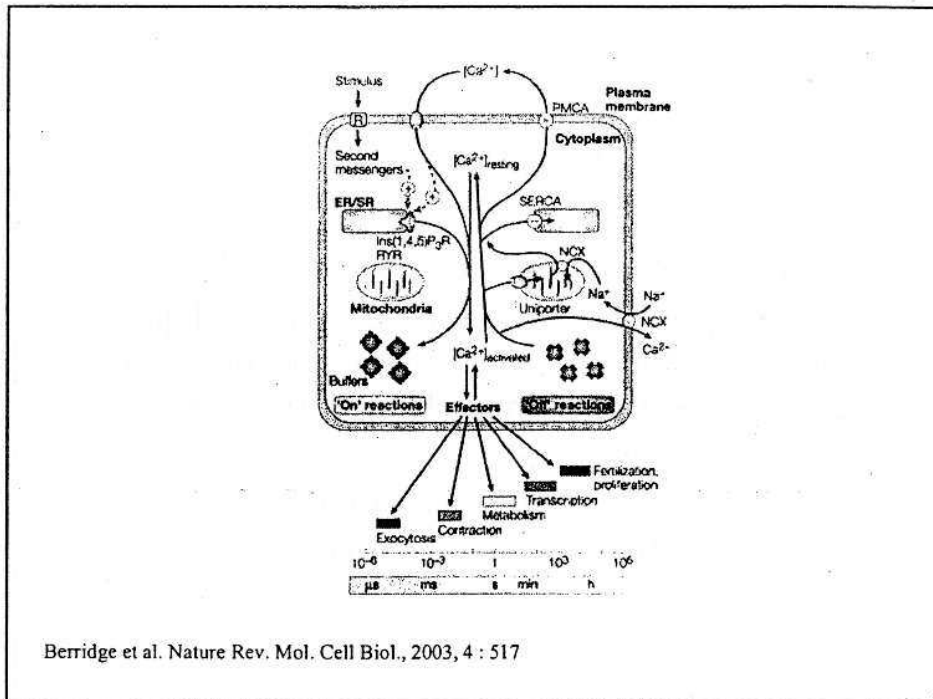
## Topology of TRP channels and putative functional domains







102!



## Les annexines

- Lient le calcium et les phospholipides
- L'affinité pour le calcium augmente en présence de phospholipides
- Rôles :
  - Sécretion ?
  - Interaction cytosquelette/membrane ?
  - Canal calcique ?

## Domaine C2

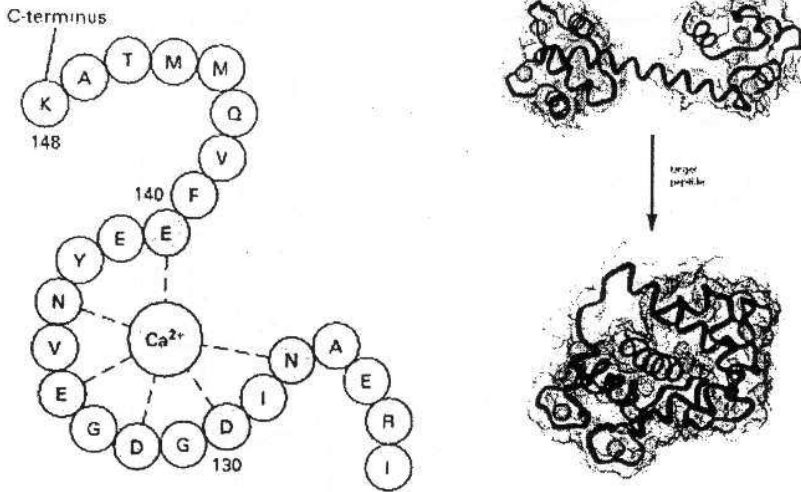
- Le domaine C2 est un motif de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$
- Les protéines avec un domaine C2 sont impliquées dans les cascades de signalisation et interagissent avec des membranes intracellulaires (PKC, PLC, cPLA2, PI3-kinase, synaptotagmine etc...)
- Agit comme un « switch » électrostatique. Cela permet des effets très rapides comme l'exocytose.

## EF-hand proteins

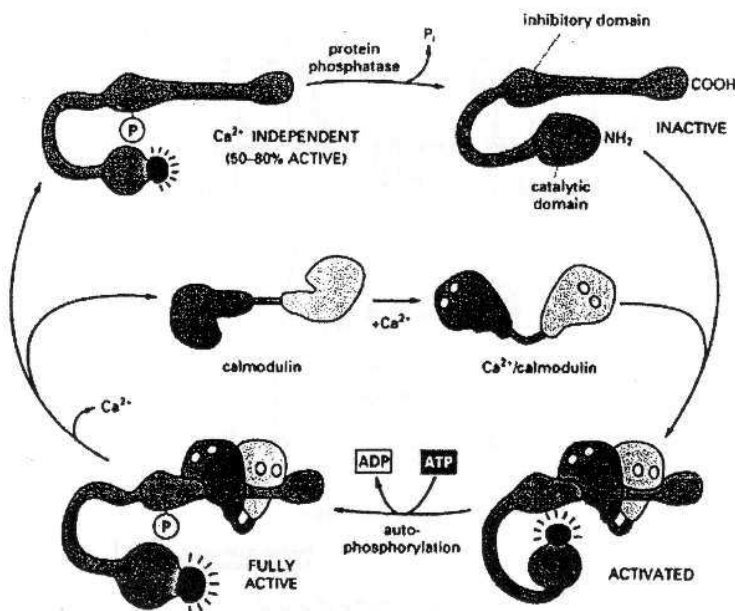
- Lient le  $\text{Ca}^{2+}$  avec une haute affinité
- Rôle :
  - Modulation du signal calcique
  - Régulation directe d'activité enzymatique
  - Tampon du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique
  
  - Exemple : Calmoduline, troponine C, parvalbumine

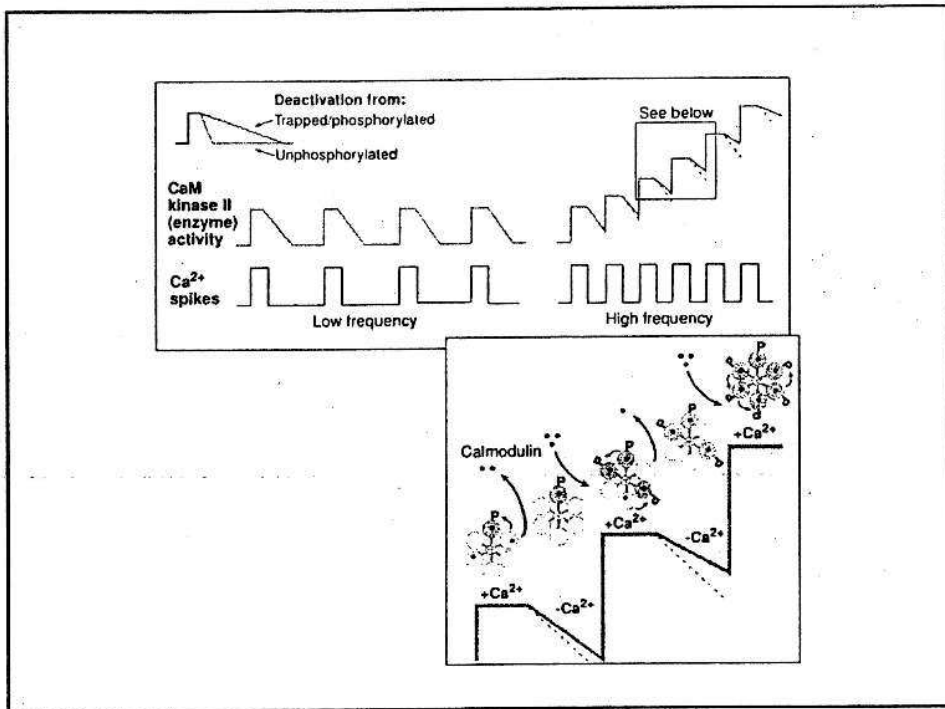
# Calmoduline

(b)

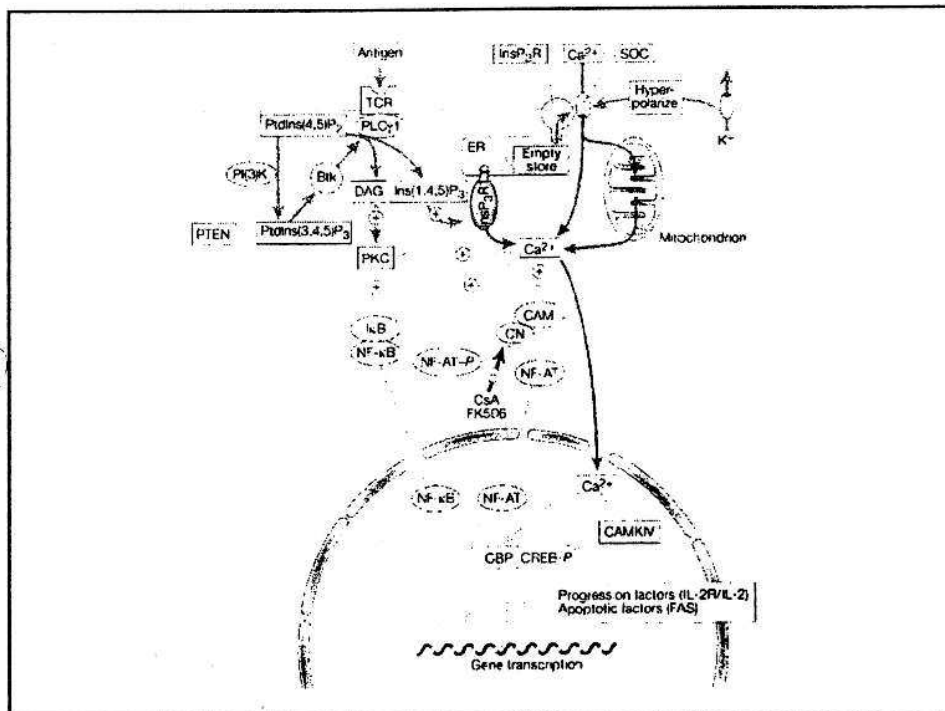


## Activation de la CaM-kinase II



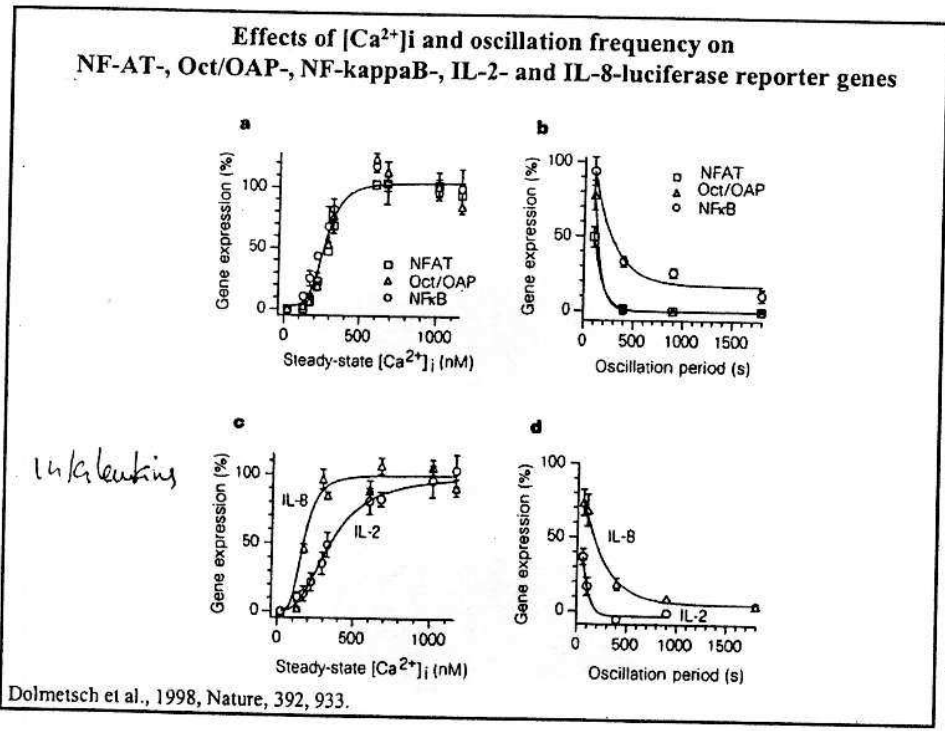
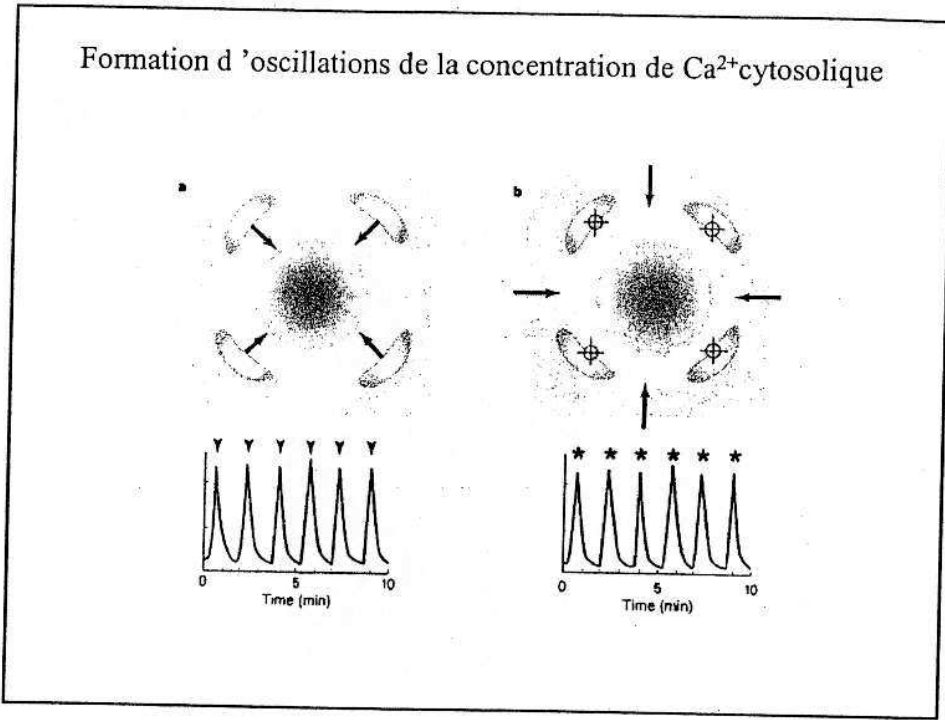


4/13

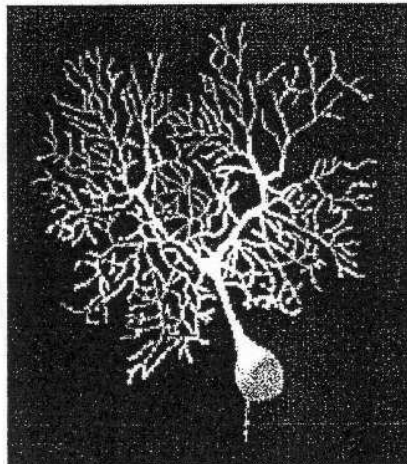


NFAT = facteur de transcription

68150



Concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans une cellule de Purkinje chargée en Fura-2



Rouge forte concentration

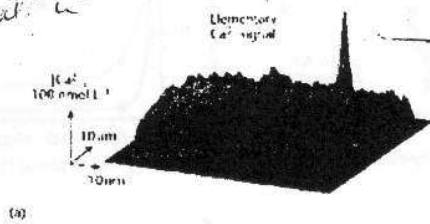
jaune

bleu (faible concentration)

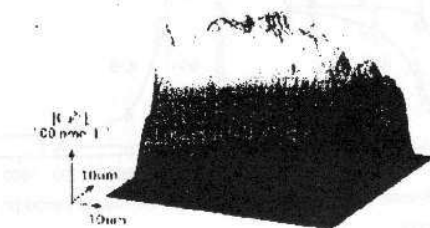
48'

Signaux calciques élémentaires ou globaux dans un cardiomyocyte isolé

élément élémentaire  
surtout à Ca<sup>2+</sup>



jaunâtre  
bleu



orange  
jaune  
bleu

48' 45"

en clair

①  
 de l'antab  
 i-ll c  
 de Ca<sup>2+</sup>  
 nées  
 de Ca<sup>2+</sup>  
 membrane  
 plasmique

## Spatial aspect of Ca<sup>2+</sup> signalling

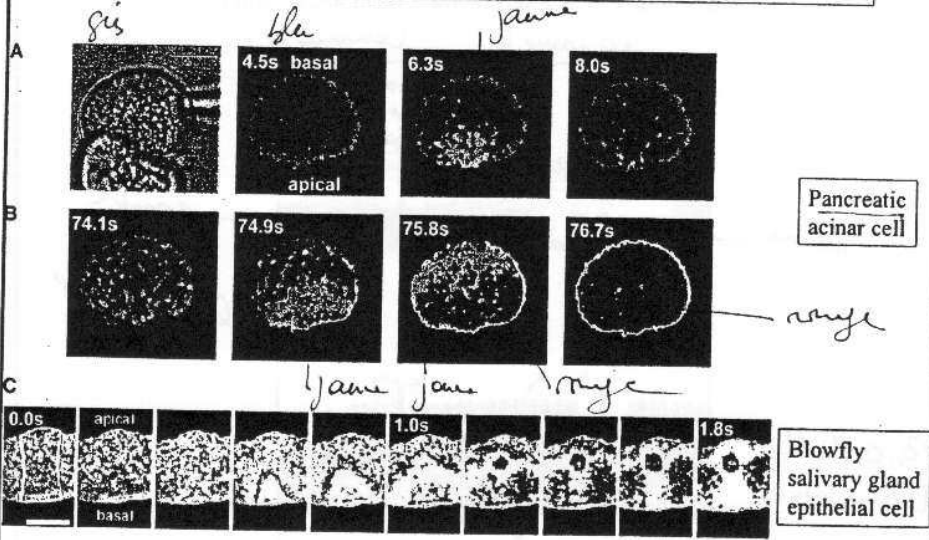


Exoglycose

glyceryl nitric

Berridge et al., 1998, Nature, 395:645

## Calcium responses in secretory epithelia



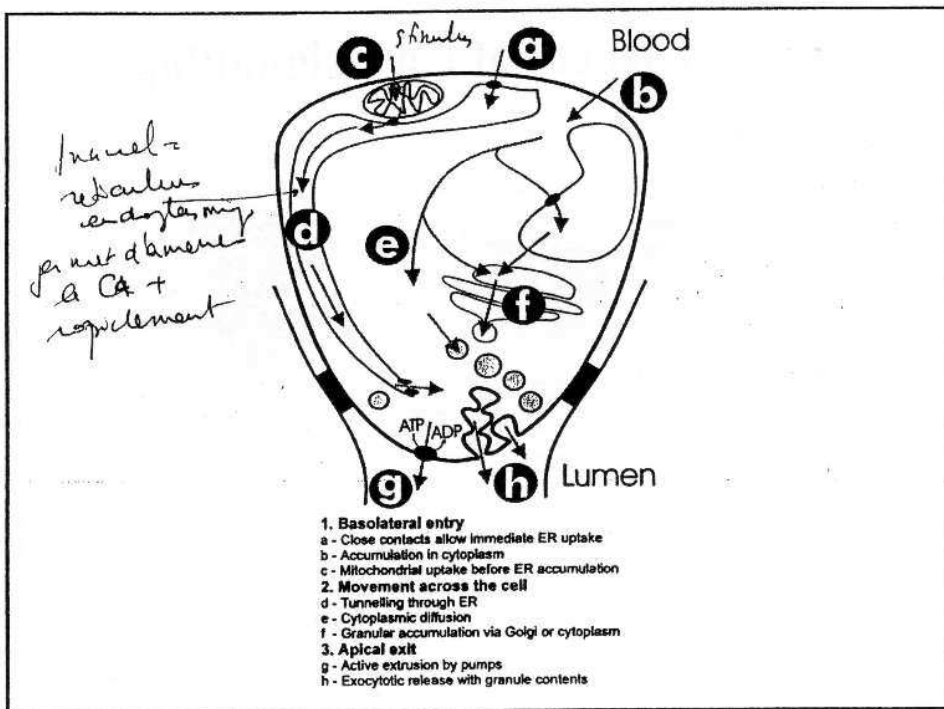
la vague de  
 Ca<sup>2+</sup>  
 fuyez

Ashby & Tepikin, 2002, Physiol Rev, 82 : 701.

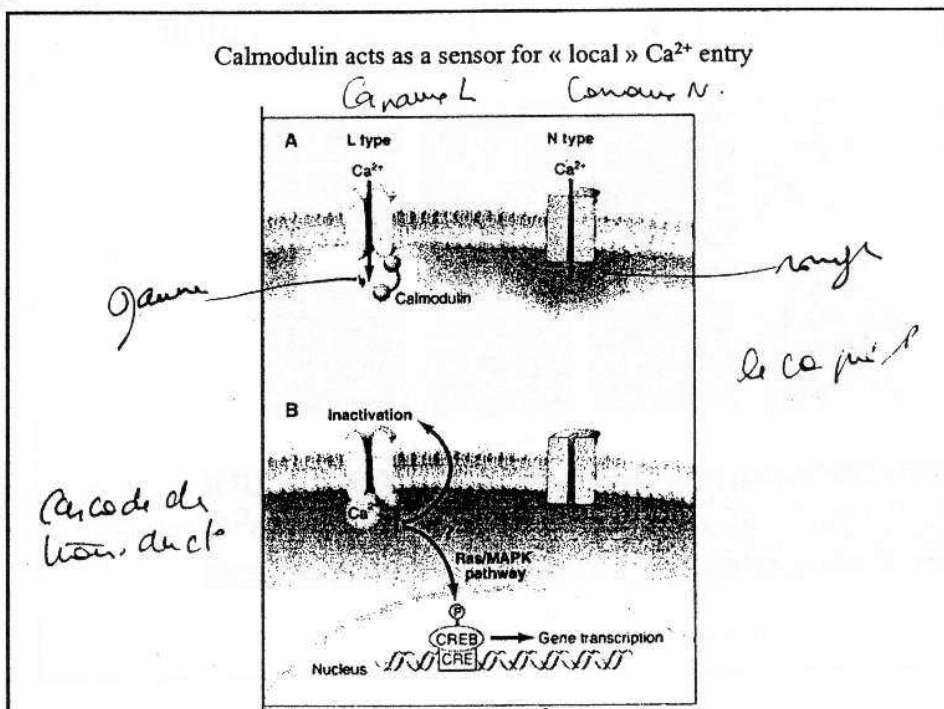


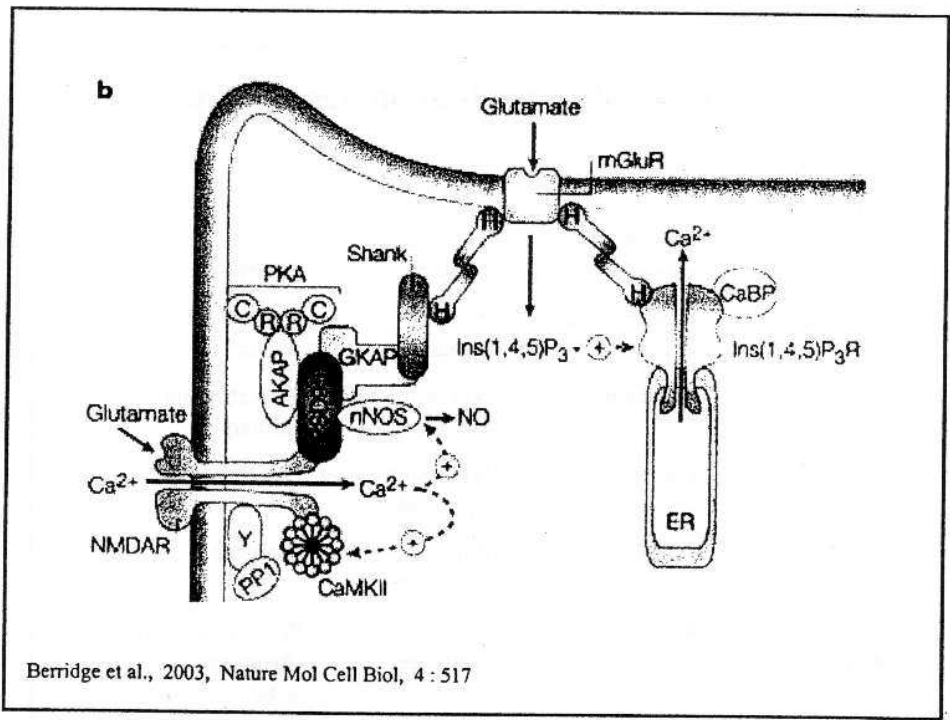
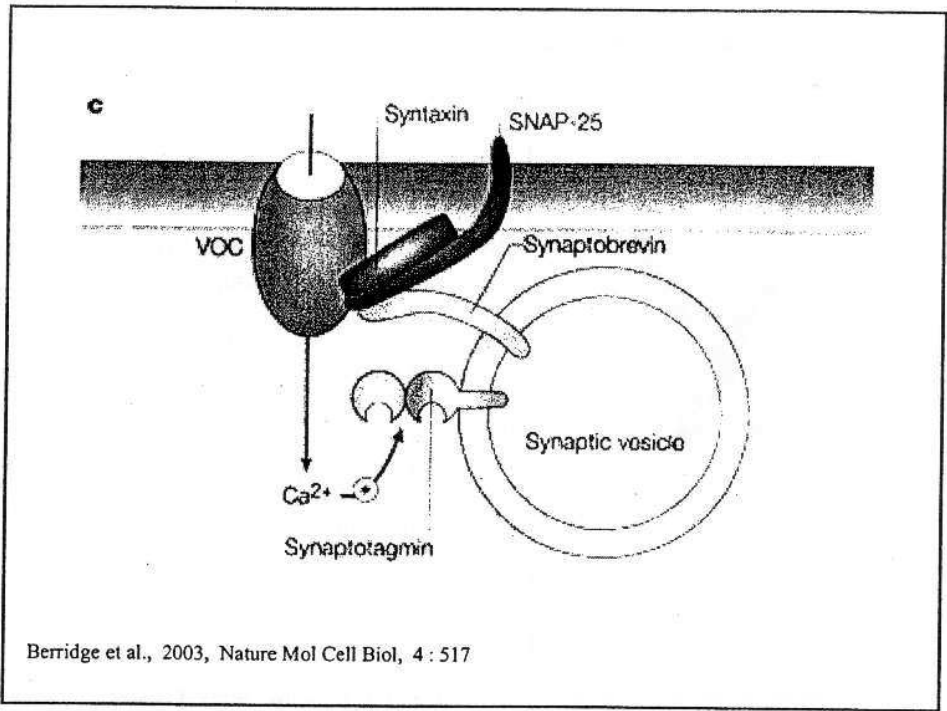
la diffusion de la  $Ca^{2+}$  le  $Ca^{2+}$  est extrêmement lente

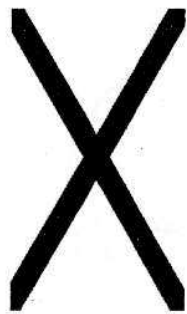
53



58,13







Visualisation des mitochondries (en rouge)  
et du reticulum endoplasmique (en vert).

Les régions en blanc indiquent une zone  
de proche contact

Des protéines adressées à la mitochondrie  
et au reticulum endoplasmique sont étiquetées  
respectivement avec deux formes  
d'une protéine fluorescente

Rutter & Rizzuto, 2000, TIBS, 25 : 215

1.05'17

### Pathologies impliquant les pompes calciques

SERCA1	Muscle squeletique	Mutation spontanée	Maladie de Brody
SERCA2	Keratinocyte	Mutation spontanée	Maladie de Darier
SERCA2	Myocarde	Expression diminuée	Hypertrophie cardiaque
SERCA3	Plaquette	Expression augmentée	Hypertension
SERCA3	Cellules b du pancréas	Mutation spontanée	Diabète
Pompe Ca <sup>2+</sup> Golgi	Keratinocyte	Mutation spontanée	Pemphigus bénin chronique familial

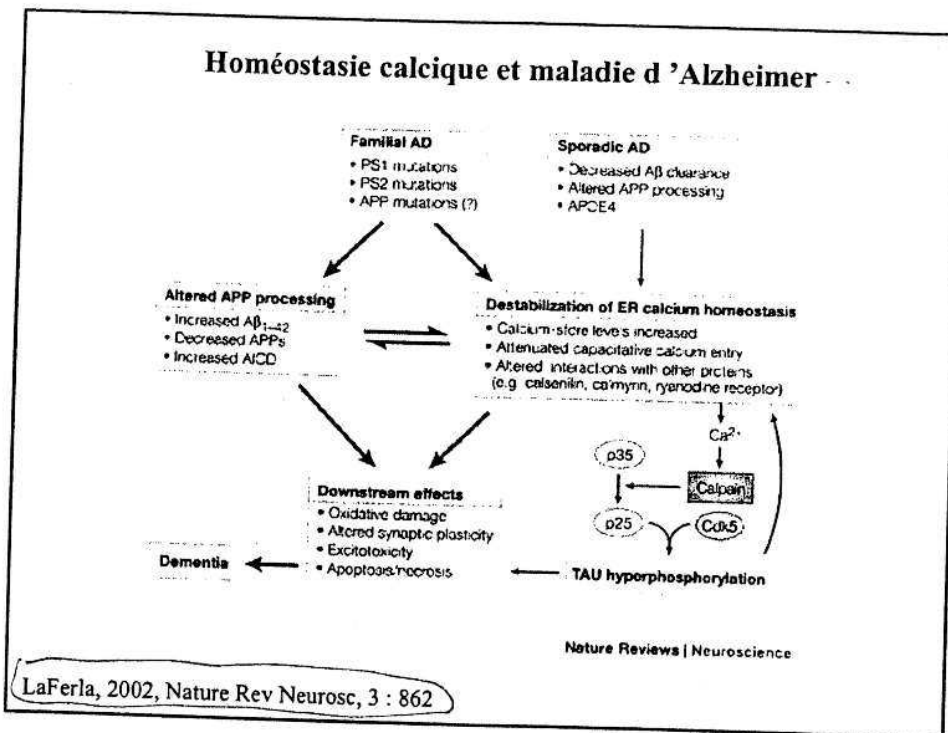
1.07

### Pathologies impliquant la libération de $Ca^{2+}$

<i>Ryanodine</i>			
RyR1	Muscle squelettique	Mutation spontanée	Hyperthermie maligne Myopathies des cores centraux
RyR2	Myocarde	Expression diminuée	Cardiomyopathie
FKBP 12.6	Myocarde	Effet FK506	Hypertrophie cardiaque
IP <sub>3</sub> R1	Système nerveux	Mutation spontanée	Souris opisthotonos
PS1 PS2	Système nerveux	Mutation spontanée	Maladie d'Alzheimer

*manque d'équilibre calcique*

1.08



1.10' <sup>D°</sup> rôle de la p53 l'apoptose

flise BRECHARD Da Inseru

gesteine du foie

- sécréta tumorel

virus → cancer

prolifération cellulaire → apoptose

cancer - p. accéléré

→ ~~en~~ suffisante

apoptose : il n'a pas encore H copies

HA n'est pas si précocité

TRP