



**HAL**  
open science

**ROLE DU NAADP ET DE SON ENZYME DE  
SYNTHESE, L'ADP RIBOSYL CYCLASE, DANS LES  
NEURONES : LA REGULATION DE  
L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE NUCLEAIRE.**

Stéphanie Bezin

► **To cite this version:**

Stéphanie Bezin. ROLE DU NAADP ET DE SON ENZYME DE SYNTHESE, L'ADP RIBOSYL CYCLASE, DANS LES NEURONES : LA REGULATION DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE NUCLEAIRE.. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT: . tel-00238506

**HAL Id: tel-00238506**

**<https://theses.hal.science/tel-00238506>**

Submitted on 4 Feb 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS XI  
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

**THESE**  
pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI**

Ecole doctorale Signalisation, Neurosciences, Endocrinologie et Reproduction

Présentée et soutenue publiquement par  
Stéphanie BEZIN

Le 20 décembre 2007

**ROLE DU NAADP ET DE SON ENZYME DE  
SYNTHESE, L'ADP RIBOSYL CYCLASE, DANS LES  
NEURONES : LA REGULATION DE  
L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE NUCLEAIRE.**

Directeurs de Thèse : José Manuel CANCELA

JURY

M. Hervé Daniel

Président

M Raoul Ranjeva  
M. Marc Moreau

Rapporteur  
Rapporteur

M. Jean-Pierre Ozil  
M. Thierry Tordjmann  
M. José Manuel Cancela

Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

## Remerciements

Je remercie tout d'abord Gérard Baux qui m'a accueillie au NBCM, soutenue et encouragée pendant toutes ces années.

Je remercie José Cancela, pour m'avoir accueillie dans son équipe.

Je remercie également Philippe Fossier pour toute l'aide qu'il m'a apportée et pour sa gentillesse.

Merci à Seana O'Regan et François Meunier pour leur aide.

Je tiens aussi à remercier particulièrement Evelyne Benoît pour ses conseils, son soutien dans les moments difficiles, sa bonne humeur.

A Gilles Ouanounou, un grand merci pour tes conseils, tes explications, ta patience, ton aide indispensable sur les neurones spinaux. Merci pour tout le temps passé à mes côtés pour le patch.

Je tiens à remercier M. Hervé Daniel le président du jury, mes rapporteurs : M. Marc Moreau et M. Raoul Ranjeva, mes examinateurs : M. Thierry Tordjmann et M. Jean-Pierre Ozil, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier l'Association Française contre les Myopathies, pour le financement de ma dernière année de thèse, ainsi que pour le financement accordé au projet « neurones spinaux ».

Je remercie tous mes amis : Christelle, Marine, Nathalie T., Astride, Elodie, Alexis, Jean-Christophe, Cédric, qui m'ont soutenue moralement.

Merci à Yves-Edouard qui m'a accompagnée pendant les moments difficiles.

Merci à mes parents (Martine et Didier), à ma sœur (Manon) et mon frère (Maxime) pour leur soutien sans faille, leur écoute, leur présence, pour tout ce qu'ils ont pu m'apporter et sans qui je n'aurais pas pu réaliser ce travail.

INTRODUCTION.....	5
PARTIE I.....	5
LES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL CALCIQUE VERS LE NOYAU POUR LE CONTROLE DE L'EXPRESSION GENIQUE.....	5
1) LES FACTEURS DE TRANSCRIPTIONS ACTIVES PAR LE CALCIUM .....	6
1.1) <i>L'Aplysie, un modèle de choix pour l'étude de la physiologie neuronale</i> .....	6
1.2) <i>L'activation du facteur CREB par le calcium</i> .....	13
1.3) <i>L'activation du SRE (Serum Response Element)</i> .....	17
1.4) <i>NF-AT, un autre élément clé pour la transcription calcium dépendante</i> .....	18
1.5) <i>NF-κB</i> .....	19
1.6) <i>DREAM, (Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator)</i> .....	21
2) LES VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL ACTIVEES PAR LE CALCIUM.....	22
2.1) <i>La calmoduline</i> .....	24
2.2) <i>Les kinases activée par le calcium</i> .....	24
2.3) <i>Les phosphatases</i> .....	30
PARTIE II .....	32
LES VARIATIONS DE LA CONCENTRATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE DANS LES NEURONES : LES DIFFERENTES SOURCES DE L'AUGMENTATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE .....	32
1) L'ENTREE DE CALCIUM EXTRACELLULAIRE .....	32
1.1) <i>Les récepteurs canaux perméables au calcium</i> .....	32
1.2) <i>Les canaux calciques sensibles au potentiel : VOC « Voltage Operated Channels »</i> .....	32
1.3) <i>Les canaux SOC, CRAC et SMOC</i> .....	33
1.4) <i>Les TRP (Transient Receptor Potential)</i> .....	34
1.5) <i>De l'activation de certains canaux membranaires à la modulation de l'expression génique</i> .....	35
2) LA LIBERATION DE CALCIUM A PARTIR DES RESERVES INTRACELLULAIRES .....	37
2.1) <i>Le réticulum endoplasmique</i> .....	38
2.2) <i>L'enveloppe nucléaire</i> .....	42
2.3) <i>Les mitochondries</i> .....	45
2.4) <i>Les autres réserves</i> .....	47
PARTIE III.....	48
LE NAADP, NOUVEL ACTEUR POUR LA TRANSDUCTION DU SIGNAL CALCIQUE .....	48
1) LE NAADP, UN MESSAGER RECEMMENT DECOUVERT .....	48
1.1) <i>Rôles physiologiques du NAADP</i> .....	49
1.2) <i>Mécanisme d'action du NAADP : quelles réserves et quel récepteur ?</i> .....	51
2) LES VOIES DE SYNTHÈSE DU NAADP ET LEURS REGULATIONS.....	59
2.1) <i>Des enzymes pouvant synthétiser à la fois le NAADP et le cADPR</i> .....	59
2.3) <i>Paradoxe topologique et biochimique</i> .....	64
2.4) <i>Enfinement : CD38, un acteur important mais pas essentiel ?</i> .....	65
2.5) <i>La modulation de la synthèse des messagers, produits par les cyclases</i> .....	66
TRAVAIL DE THESE .....	70
MATERIEL ET METHODES.....	73
1) <i>Préparation de noyaux isolés</i> .....	73
2) <i>Culture primaire des neurones spinaux ventraux d'embryon de souris</i> .....	74
3) <i>L'imagerie</i> .....	75
4) <i>Immunomarquages</i> .....	80
5) <i>Dosage de la synthèse du NAADP par l'ADPribosyl cyclase en HPLC</i> .....	81
6) <i>Enregistrements électrophysiologiques par la technique de patch clamp</i> .....	83
7) <i>RT PCR</i> .....	85
RESULTATS.....	87
Article 1.....	87
Article 2.....	96
Article 3.....	108

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>147</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>158</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>160</b>
<b>RESULTATS PRELIMINAIRES .....</b>	<b>162</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>177</b>

# **INTRODUCTION**

Dans les neurones l'homéostasie calcique nucléaire est un point clé pour la régulation de certains processus physiologiques. Mon travail expérimental porte sur la régulation de la concentration calcique dans le noyau par différents second messagers et particulièrement par le NAADP (acide nicotinique dinucléotide phosphate) dont le mode d'action est encore mal connu. Afin de cerner l'intérêt de mon travail et de cette approche expérimentale j'aborderai trois points dans mon introduction :

- le rôle du calcium dans la régulation de l'expression génique
- l'origine et le déclenchement du signal calcique intracellulaire
- une synthèse des connaissances concernant un nouveau messenger atypique libérant du calcium : le NAADP

# INTRODUCTION

## PARTIE I

### Les protéines impliquées dans la transduction du signal calcique vers le noyau pour le contrôle de l'expression génique

Dans les neurones, les réponses adaptatives à l'environnement passent dans de nombreux cas par des régulations à moyen, voir long terme de certaines fonctions cellulaires telles que la plasticité synaptique qui régule la communication inter-neuronale. Cette adaptation va souvent mettre en jeu la modulation de l'expression génique qui, dans les neurones, se trouve particulièrement sensible aux variations de calcium intracellulaire. Ainsi les augmentations de calcium intracellulaire conditionnent un nombre important de réponses en aboutissant à l'activation de divers facteurs de transcription. Les voies de transduction du signal calcique conduisant à ces différents profils d'expression, se composent de multiples effecteurs directement ou indirectement activés par le calcium. Ceux-ci vont chacun décoder les profils particuliers de variation de la concentration calcique. Ces effecteurs se trouvent en partie dans le domaine cytoplasmique et certains sont localisés dans le noyau. Ainsi, l'activation sélective de certains facteurs de transcription va nécessiter une augmentation du calcium nucléoplasmique, tel que cela a été montré pour le facteur CREB dans la lignée neuroendocrine AtT20. A l'inverse, la voie de signalisation aboutissant à l'activation du SRF requiert exclusivement une augmentation du calcium cytoplasmique (Hardingham et al., 1997).

Il est ainsi devenu évident que le contrôle de l'homéostasie calcique nucléaire constitue un point critique pour le contrôle de l'expression génique dans la cellule neuronale. Il n'est donc pas surprenant, même si ce sujet est encore controversé, que le noyau soit capable de réguler au moins en partie la concentration du calcium nucléoplasmique qui semble tellement importante pour la régulation fine des fonctions neuronales nécessitant la modulation de l'expression génique. De même, de plus en plus d'études portant sur la localisation des protéines activées par le calcium montrent que bon nombre d'entre elles sont retrouvées localisées au noyau. Ceci souligne encore l'importance d'une éventuelle autonomie du noyau pour l'ajustement de la concentration calcique nucléoplasmique.

## **1) Les facteurs de transcriptions activés par le calcium**

Dans les neurones, un des phénomènes les plus étudiés et mettant en jeu la modulation de l'expression génique afin d'engendrer des changements à long terme dans la communication entre les cellules est celui de la plasticité synaptique (LTP ou LTD). Les variations calciques dans la cellule conduisant à la LTP induisent rapidement la transcription de gènes dits « précoces » : les IEGs (Immediate early genes) tels que c-fos, fos B, zif268, c-jun, nur/77 et jun B (Bading et al., 1995). Ces IEGs sont tous des facteurs de transcription qui vont ensuite donner lieu à une vague transcriptionnelle secondaire pour la production de protéines nécessaires aux changements structuraux conduisant à la modulation de l'efficacité synaptique. Un des ces IEGs sur lequel se sont focalisées de nombreuses études en vue de comprendre les mécanismes de l'activation de la transcription calcium dépendante est le gène c-fos. Celui-ci comporte dans son promoteur deux éléments régulateurs de réponse au calcium (Bading et al., 1993; Hardingham et al., 1997): une séquence CRE (cAMP response element) qui répond aussi à la production d'AMPC (Comb et al., 1986; Montminy et al., 1986) et une séquence SRE (serum response element). Le facteur capable d'induire la transcription, à partir de la séquence CRE à laquelle il est fixé, est le facteur CREB (CRE Binding protein) (Montminy et Bilezikjian, 1987). Le SRE quant à lui est activé par le SRF (Serum Response Element) (Norman et al., 1988).

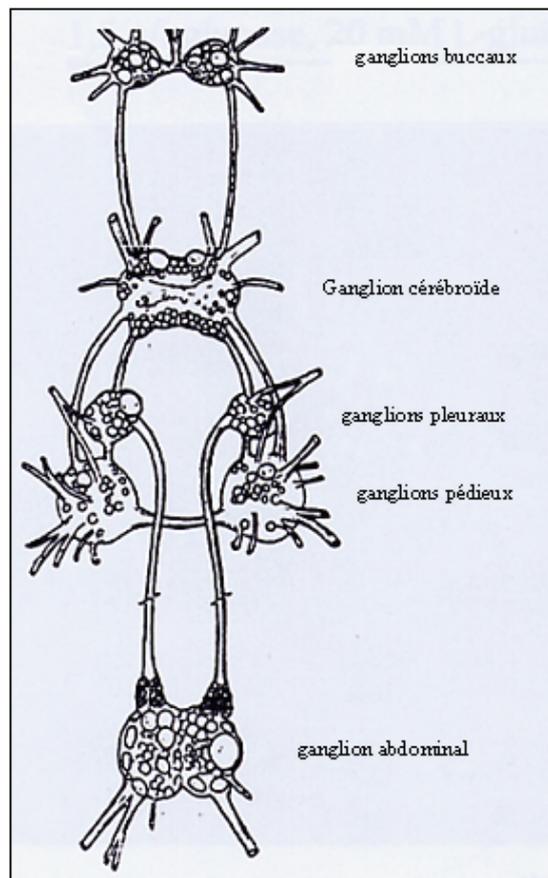
### **1.1) L'Aplysie, un modèle de choix pour l'étude de la physiologie neuronale**

L'Aplysie (figure 1a), est un mollusque marin qui constitue le modèle sur lequel j'ai réalisé la majeure partie de mes travaux de thèse concernant l'homéostasie calcique nucléaire. Cet animal présente de nombreux avantages sur le plan expérimental, qui en ont fait un modèle de choix en neurobiologie. Il s'agit d'un animal très simple sur lequel ont été réalisées les études pionnières concernant les mécanismes de l'apprentissage et la mémoire. Son système nerveux est de petite taille puisqu'il compte environ 20 000 neurones de grande taille (plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$ ). Ces derniers sont localisés au sein de ganglions (figure 1b) bien identifiés : le ganglion buccal, les ganglions du collier (contenant les ganglions pleuraux, pédieux et cérébroïdes) et le ganglion abdominal. La densité en neurone et la teneur en tissu conjonctif des différents ganglions varient fortement, c'est la raison pour laquelle, dans mes expériences, seuls les noyaux issus des ganglions pleuraux, pédieux et abdominal ont été utilisés. L'Aplysie possède un grand nombre de neurones de taille très importante, ce qui a rendu les études électrophysiologiques plus faciles et s'est avéré un avantage pour mes expériences puisque certaines cellules possèdent des noyaux de plusieurs dizaines de

**a**



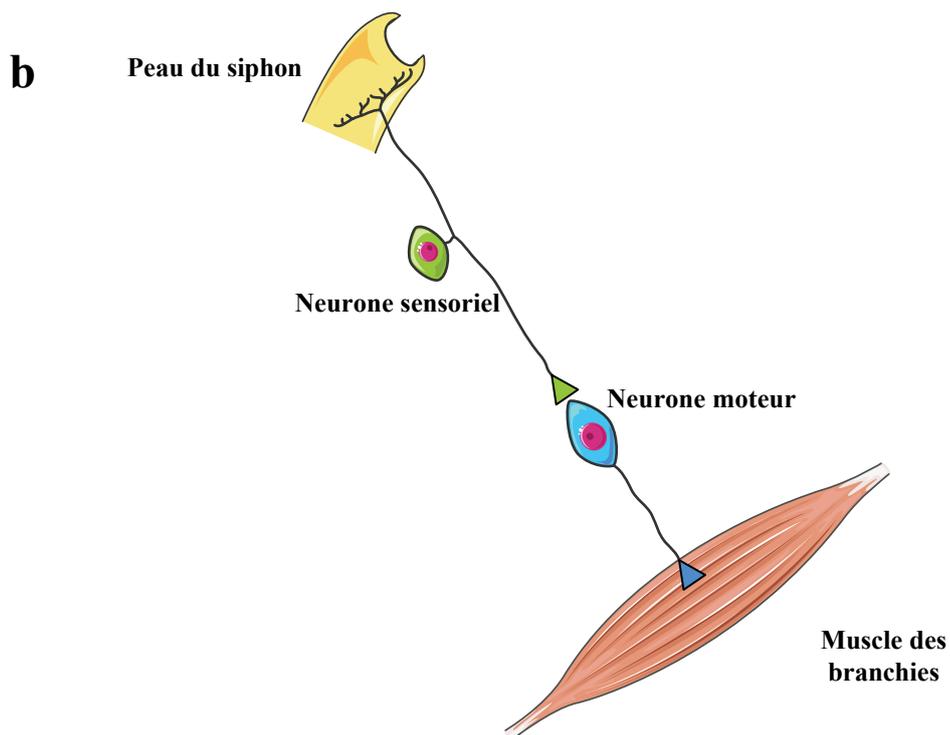
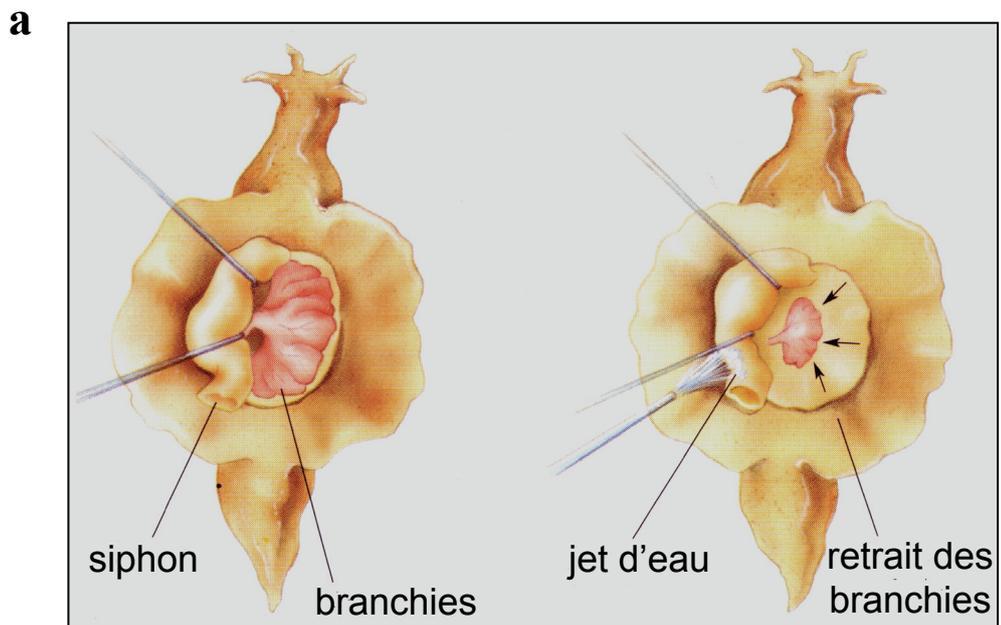
**b**



**Figure 1.** Photographie de l'espèce *Aplysia punctata* (a). Le système nerveux de l'aplysie compte environ 20 000 gros neurones localisés au sein de ganglions (b). Différents ganglions sont identifiés: le ganglion buccal, les ganglions du collier contenant les ganglions pleuraux, pédieux et cérébroïdes et le ganglion abdominal

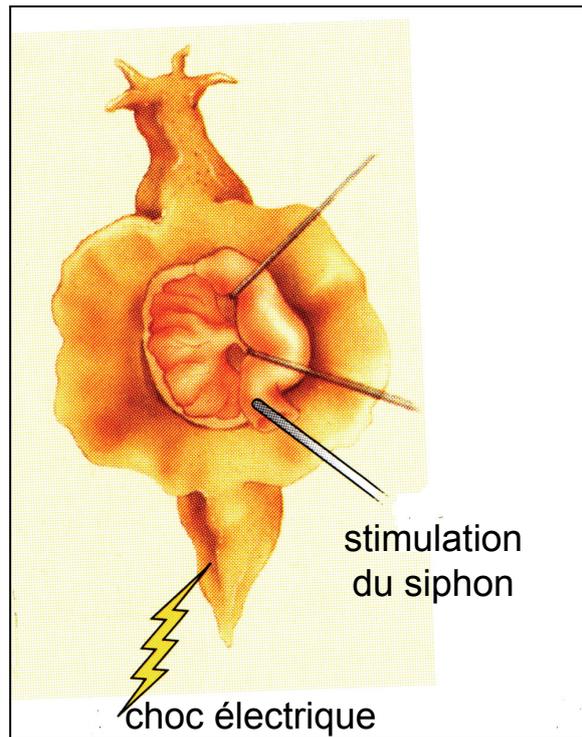
micromètres de diamètre. Ces neurones ont la propriété d'être agencés selon un schéma fixe et reproductible d'un animal à un autre. Ainsi, chacun est identifiable selon sa taille, son emplacement et ses propriétés électrophysiologiques. Les circuits qu'ils établissent sont reconnaissables et présentent les mêmes connexions d'un animal à l'autre. C'est grâce à toutes ces propriétés que l'Aplysie est le modèle ayant permis aux neurobiologistes de poser les grands concepts moléculaires de l'apprentissage et du conditionnement. Ces concepts ont constitué la base à partir de laquelle se sont développées les études visant à comprendre les phénomènes d'apprentissage plus élaborés et les mécanismes de la mémoire procédurale chez les vertébrés.

C'est l'étude de l'habituation du « réflexe du retrait des branchies » aussi appelé « réflexe du siphon » qui a fait l'objet des premières études (figure 2a). Lorsque de l'eau est projetée sur le siphon de l'animal, il se produit une rétraction des branchies. Si cette stimulation est répétée, il y a habituation et le retrait des branchies est atténué. L'information sensorielle perçue au niveau du siphon est acheminée jusqu'au ganglion abdominal où un neurone sensoriel forme une synapse glutamatergique (Dale et Kandel, 1993) avec un neurone moteur des branchies (figure 2b). Les expériences ont pu montrer que le support de l'habituation observée est la synapse et que la stimulation électrique répétée du neurone sensoriel provoque une réduction des potentiels post synaptiques excitateurs (PPSE). Dès lors, la question de savoir à quel niveau la synapse se modifiait s'est posée : soit la quantité de neurotransmetteur libéré au niveau pré synaptique était modifiée, soit la sensibilité post synaptique était régulée. Dans ce cas, l'habituation résultait d'une diminution du nombre de quanta de neurotransmetteur libéré par potentiel d'action et donc d'une modification pré synaptique (Castellucci et Kandel, 1974). Plus tard, c'est la sensibilisation de ce même réflexe du siphon qui a été étudiée (figure 3a). Pour provoquer cette sensibilisation, un choc électrique était appliqué sur la queue de l'animal et la réponse de retrait consécutive à la stimulation du siphon qui suivait était alors plus importante. Cette sensibilisation est due à l'activation d'un troisième neurone modulateur lors de l'application du choc électrique sur la queue (figure 3b). Celui-ci libère de la sérotonine (5-HT) au niveau de l'élément présynaptique du neurone sensoriel (figure 4). La 5-HT active un récepteur couplé à une synthèse d'AMP cyclique, activant ensuite la Protéine Kinase A, qui va phosphoryler des canaux potassiques, et entraîner leur fermeture. Cela provoque une augmentation de la durée du potentiel d'action et une entrée accrue de calcium dans l'élément pré synaptique qui augmente la quantité de neurotransmetteur libérée (Castellucci et al., 1986; Dale et al., 1988; Klein et al., 1982). Dans un premier temps, il est donc apparu que les mécanismes menant à la facilitation avaient lieu au niveau pré

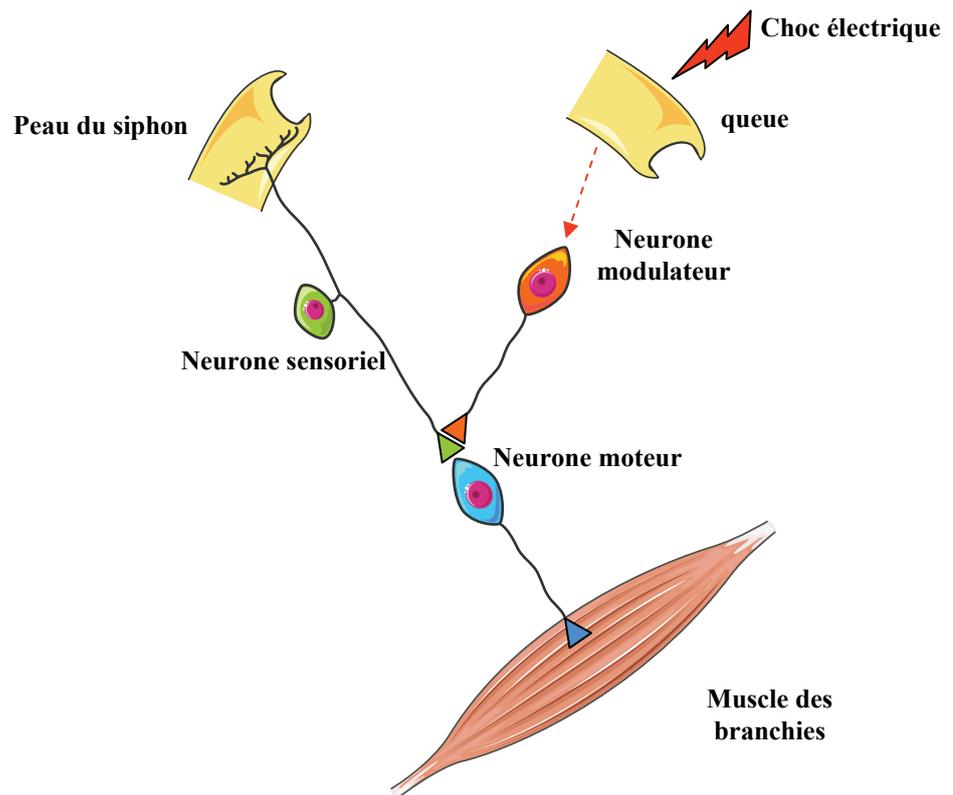


**Figure 2. L'habituation du réflexe du siphon chez l'aplysie.** Lorsque de l'eau est projetée sur le siphon de l'animal, il se produit une rétraction des branchies. Si cette stimulation est répétée, il y a habituation et le retrait des branchies est atténué (a). L'information sensorielle perçue au niveau du siphon est acheminée jusqu'au ganglion abdominal où un neurone sensoriel forme une synapse glutamatergique avec un neurone moteur des branchies (b).

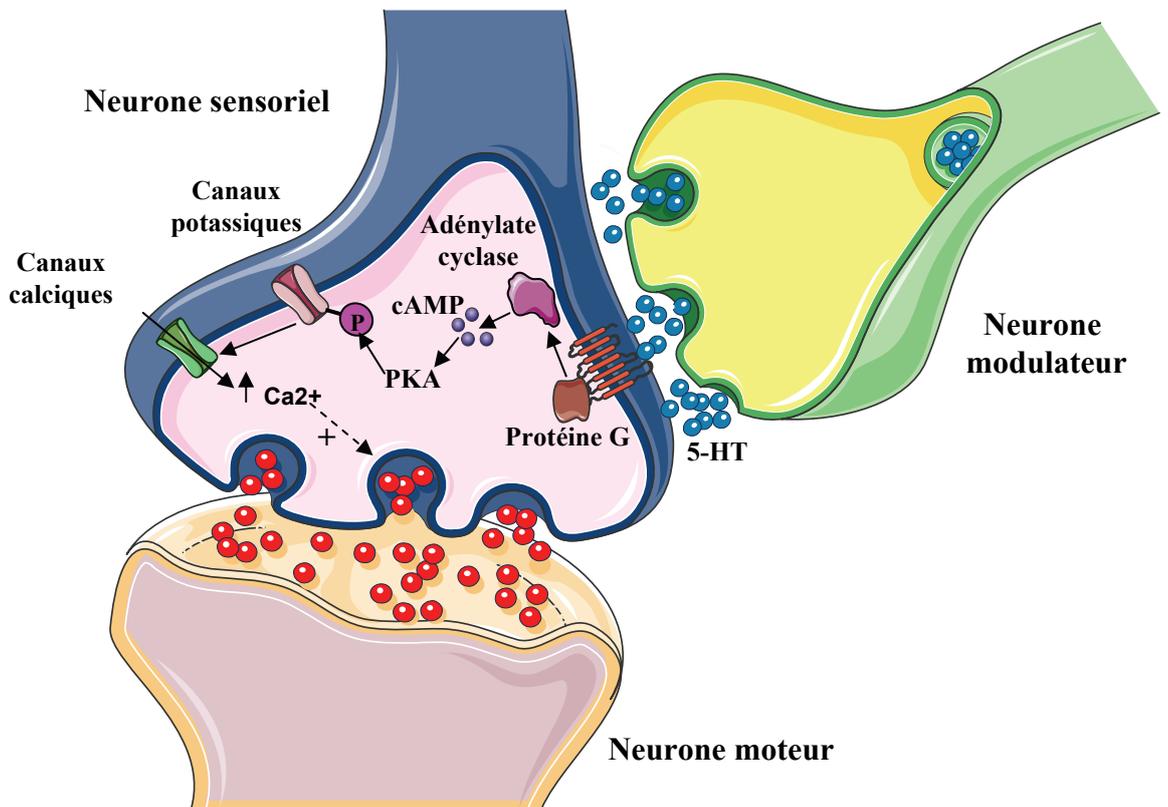
**a**



**b**



**Figure 3. Le sensibilisation du réflexe du siphon chez l'aplysie.** Pour provoquer la sensibilisation, un choc électrique était appliqué sur la queue de l'animal et la réponse de retrait consécutive à la stimulation du siphon qui suit est plus importante (a). Schématisation du réseau neuronal support de la sensibilisation (b). La sensibilisation est due à l'activation d'un troisième neurone modulateur lors de l'application du choc électrique sur la queue.



**Figure 4. Mécanisme cellulaire de la sensibilisation du réflexe du siphon chez l'aplysie.** Le neurone modulateur libère de la sérotonine (5-HT) au niveau de l'élément présynaptique du neurone sensoriel. La 5-HT active un récepteur couplé à une synthèse d'AMP cyclique. L'AMPc active ensuite la Protéine Kinase A, qui va phosphoryler des canaux potassiques, et entraîner leur fermeture. Cela provoque une augmentation de la durée du potentiel d'action et une entrée accrue de calcium dans l'élément pré synaptique qui augmente la quantité de neurotransmetteur libérée

synaptique. Cependant, les expérimentateurs ont pu déterminer qu'il existait plusieurs niveaux de facilitation mettant à contribution des mécanismes moléculaires différents (Byrne et Kandel, 1996). Une application de 5-HT sous forme d'un pulse de 1 min produit une facilitation de courte durée : la STF (short term facilitation) qui dure quelques minutes. Par contre, une application d'un pulse de 5-HT plus long (10 min) recrute ensuite la PKC, ce qui augmente encore la durée du potentiel d'action présynaptique (Ghirardi et al., 1995; Sutton et Carew, 2000). La 5-HT sous forme de pulses répétés produit une facilitation beaucoup plus importante (LTF pour long term facilitation) qui peut durer de plusieurs heures à plusieurs jours (Montarolo et al., 1986). Contrairement à la STF, pour l'établissement de la LTF, c'est essentiellement au niveau post synaptique que siègent les modifications entraînant la plasticité. Les auteurs ont démontré que ces modifications passent par une augmentation du calcium post synaptique ainsi que par l'activation de la CaMKII et l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA (Li et al., 2005; Roberts et Glanzman, 2003). L'étude plus approfondie de la LTF, a montré que celle-ci dépend de modifications profondes et à long terme de la synapse, qui passe par la régulation de l'expression génique. L'importance du facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein) pour la plasticité synaptique est apparue très tôt. Une des premières études soulignant cette importance a été effectuée chez l'Aplysie où la Facilitation à Long Terme (LTF, équivalent de la LTP), est bloquée par les inhibiteurs de transcription et de synthèse protéique. D'autre part, l'injection dans le noyau du neurone sensoriel d'oligonucléotides contenant le CRE qui entrent en compétition avec les CRE endogènes pour la fixation de CREB bloque la LTF. Parallèlement, l'injection d'anticorps dirigés contre CREB2 (un répresseur de CREB) exprimé constitutivement permet de convertir la facilitation à court terme en facilitation à long terme (Bartsch et al., 1998; Bartsch et al., 1995; Dash et al., 1990). Les formes de plasticité que nous avons jusqu'alors abordées sont dépendantes de l'action d'un interneurone qui vient libérer un neuromodulateur (la 5-HT) au niveau de la synapse entre le neurone sensoriel et le neurone moteur. Mais d'autre part, en plus de ce type de plasticité, l'Aplysie présente aussi une plasticité dépendante de l'activité électrique de la synapse et qui ne fait intervenir ni interneurone, ni neuromodulateur. Cette plasticité peut être bidirectionnelle. Elle s'exprime sous forme de LTP (potentialisation à long terme de la transmission synaptique) ou de LTD (dépression à long terme de la transmission synaptique). La LTP s'obtient par une stimulation présynaptique de fréquence élevée alors que la LTD s'obtient par une stimulation pré-synaptique basse fréquence. Cette forme de plasticité a aussi été observée sur d'autres modèles et est très étudiée chez les mammifères au niveau de l'hippocampe, une structure du cerveau impliquée

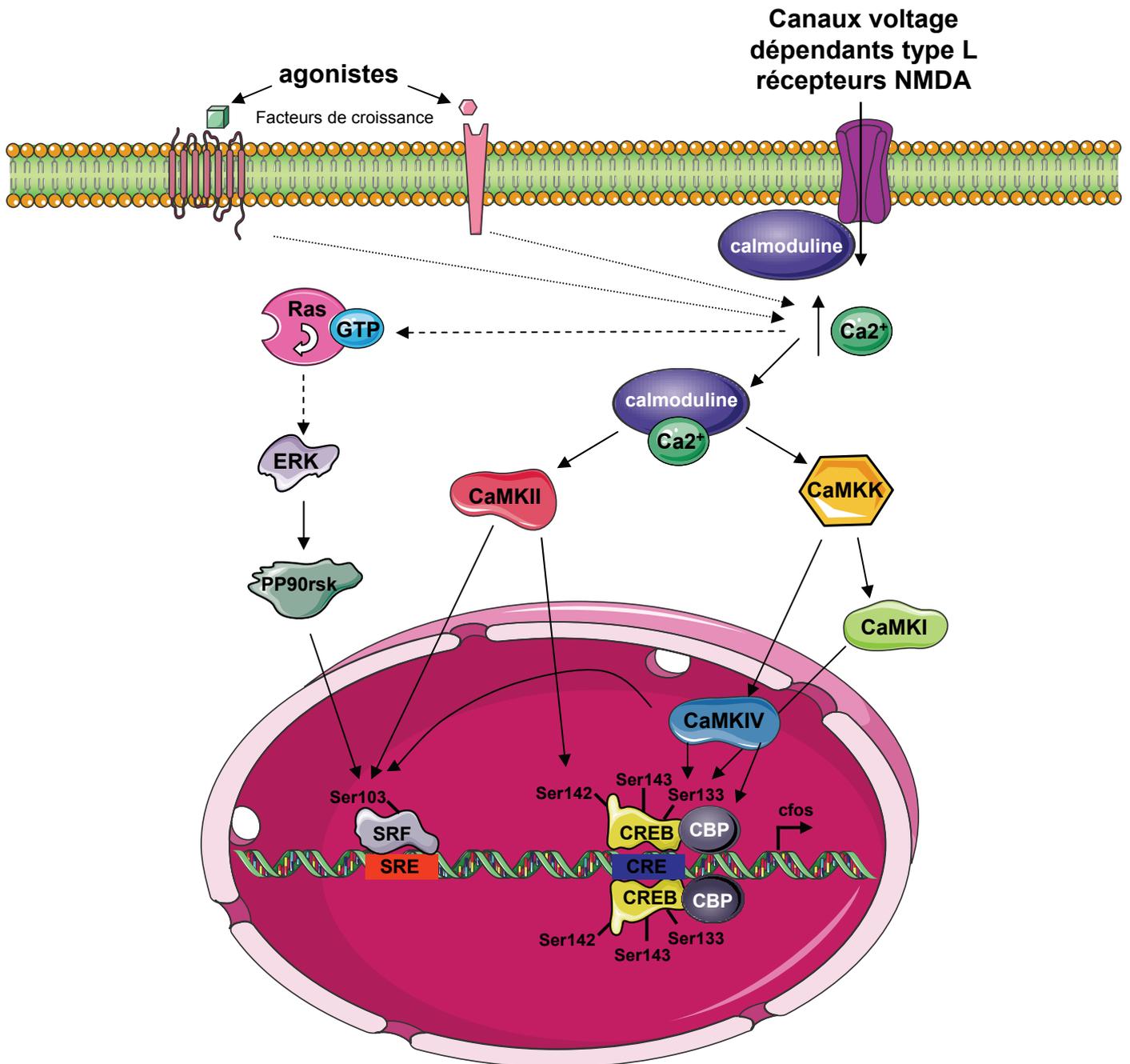
dans la mémoire spatiale et déclarative et le cortex (Miyamoto, 2006). Chez l'Aplysie, la LTP a été montrée dépendante de l'activation de récepteurs glutamatergiques (NMDA ionotropiques ou métabotropiques). Elle est sensible aux inhibiteurs de la libération du calcium par les réserves intracellulaires et aux inhibiteurs de la CaMKII injectés aux niveaux pré ou post synaptique (Bao et al., 1997; Bao et al., 1998; Jin et Hawkins, 2003). Des mécanismes de régulation transcriptionnelle similaires à ceux proposés pour la LTF ont ensuite été retrouvés chez les mammifères et suite à ces études chez l'invertébré, il a été montré que des souris mutantes pour certaines isoformes de la protéine CREB présentent des défaillances concernant la LTP, la mémoire à long terme et l'apprentissage de certaines tâches (Bourtchuladze et al., 1994). Ainsi, l'activation de CREB qui est calcium dépendante est apparue essentielle au contrôle du mécanisme de plasticité synaptique, de première importance pour la fonction neuronale. Depuis, les études concernant la régulation de l'expression génique dans les neurones par CREB et beaucoup d'autres facteurs de transcription se sont multipliées mettant à jour la finesse mais aussi la complexité des mécanismes dont le neurone dispose pour s'adapter à son environnement.

## **1.2) L'activation du facteur CREB par le calcium**

### **1.2.1) Les régulation transcriptionnelles par CREB : des mécanismes complexes**

Le facteur CREB appartient à la famille des protéines dont la propriété est de pouvoir se lier à l'ADN grâce à un motif « leucine zipper ». Son expression est constitutive et sa localisation nucléaire. Dans cette famille de facteurs, on peut également trouver les protéines fos et jun. Ces différents produits sont capables de former des homo ou hétéro-dimères avec des facteurs d'une famille proche (ATF-1 ou CREM). Ces dimères ont une morphologie qui est comparable à un Y, ce qui leur permet d'interagir avec l'ADN.

Le facteur CREB possède de nombreux sites de phosphorylation mais seul un nombre restreint semble être en relation avec la régulation de la transcription par ce facteur. La régulation de l'activation de CREB passe par des étapes de phosphorylation sur trois sites principaux qui sont la Ser133, la Ser142 et la Ser143 (figure 5). En général, les études concernant l'activation de ce facteur de transcription assimilent la phosphorylation sur la Ser133, qui peut être provoquée par plusieurs stimuli dont l'augmentation du calcium intracellulaire, à l'activation du facteur. Plusieurs études montrent qu'au-delà de la quantité de calcium qui entre dans l'espace intracellulaire, c'est la voie par laquelle entre le calcium et la localisation sous forme de domaines des augmentations de calcium qui vont être déterminantes pour l'activation de CREB. Dans la lignée de cellules pituitaire AtT20, c'est



**Figure 5. Cascade de signalisation activant des facteurs de transcriptions SRF et CREB en réponse au calcium.** L'augmentation du calcium intracellulaire lié à la dépolarisation, l'activation des récepteurs NMDA, l'activation récepteurs à tyrosine kinase ou couplés à des protéines G permet la formation du complexe  $Ca^{2+}$ / calmoduline. Celui-ci active directement la CaMKII et les CaMKKs responsables de l'activation des CaMKI et IV. La CamKIV est plutôt nucléaire et la CaMKI peut être nucléaire et cytoplasmique. Elles phosphorylent CREB sur la Ser 133, alors que la CaMKII phosphoryle plutôt la Ser 142. La CaMKII et IV peuvent aussi activer le SRF en le phosphorylant sur la Ser 103. Celle-ci peut aussi être phosphorylée par la MAPKinase PP90rsk. La voie des MAPkinase peut être, elle aussi, activée par le calcium.

l'augmentation du calcium dans le nucléoplasme et pas dans l'espace cytoplasmique qui va conditionner son activation (Hardingham et al., 1997). Ceci est à rapprocher d'une étude montrant que dans les neurones d'hippocampe, la phosphorylation sur la Ser 133 de CREB suite à la dépolarisation, ne nécessite pas l'import de protéines au noyau (Hardingham et al., 2001b). Seule l'augmentation du calcium nucléaire permettrait de rendre compte de l'activation de CREB par les CaM kinases nucléaires.

Dans les neurones corticaux, il a été montré que l'influx calcique par les canaux de type L spécifiquement engendre la phosphorylation de CREB et la transcription calcium dépendante. Cette sélectivité est due à l'activation de la calmoduline ancrée au canal et qui constitue ainsi le senseur de l'entrée de calcium par cette voie (Deisseroth et al., 1996; Dolmetsch et al., 2001). Dans un premier temps, la phosphorylation de CREB sur la Ser 133 serait accomplie principalement par la CaMKIV et la PKA, la CaMKII en étant aussi capable mais de manière moins efficace. De plus il semble que la CaMkinase I puisse phosphoryler aussi ce résidu (Sheng et al., 1991). Après cette première étape, ce sont les MAPKinases de type ERK qui assurent le maintien à plus long terme de cette phosphorylation (Wu et al., 2001). C'est cette étape de phosphorylation sur la Ser-133 qui permet le recrutement du co-activateur CBP/P300 (CREB Binding Protein) (Chrivia et al., 1993), responsable du recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Kwok et al., 1994). Cependant il semble que si la phosphorylation de la Ser133 est nécessaire à l'activation de CREB, elle n'est pas toujours suffisante pour initier la transcription (Bito et al., 1996; Bonni et al., 1995; Tao et al., 1998). Dans certain cas, la phosphorylation d'autres facteurs comme CBP, dépendante du calcium nucléaire et de la CaMKIV (Chawla et al., 1998; Hu et al., 1999), ou encore d'autres protéines recrutées au niveau de ce complexe, pourrait être nécessaire. Par exemple, dans les neurones corticaux, le recrutement de la protéine CREST (Calcium Responsive Transactivator) capable de se lier à CBP (Aizawa et al., 2004) est un élément essentiel pour la réponse transcriptionnelle dépendante de l'activité et permettant la croissance dendritique (West et al., 2001). CREST semble activer la transcription de manière calcium dépendante mais le mécanisme de régulation de ce facteur par le calcium reste encore inconnu.

### **1.2.2) D'autres sites, impliqués dans la régulation de la transcription**

Outre le recrutement couplé à l'activation de protéines supplémentaires au niveau du complexe CREB/CBP, des étapes de phosphorylation supplémentaires sur les Ser142 et 143 de CREB permettraient elles aussi de contrôler la transcription. Il a été montré que la phosphorylation par la CaMKII de la Ser 142 est capable de bloquer l'activation de CREB

suite à la phosphorylation sur la Ser-133 par la CaMKIV. De plus, la mutation de cette sérine 142 augmente l'activation de CREB suite à l'influx de calcium (Sun et al., 1994). La Ser 142 est alors apparue comme un site de régulation négative de la transcription. Ce site serait phosphorylé préférentiellement par la CAMKII, ce qui gênerait le recrutement du co-activateur CBP (Wu et McMurray, 2001). Selon certains auteurs, l'absence de CBP inhiberait la dimérisation de CREB, provoquant une éventuelle dissociation de l'ADN (Parker et al., 1998).

Cependant, l'étude plus poussée des sites Ser 142 et Ser 143 a laissé apparaître un fonctionnement plus complexe de la régulation de la transcription par le facteur CREB, capable à lui seul d'activer différents programmes transcriptionnels selon le stimulus.

Dans tous les cas l'activation de CREB nécessite la phosphorylation préalable de la Ser133 et dans les neurones, l'activité, provoquant l'entrée de calcium par les canaux voltage dépendants de type L mène en quelques minutes à cette phosphorylation (Dolmetsch et al., 2001). Cependant, même si la Ser 133 apparaît comme un site essentiel que ce soit pour l'initiation de la transcription par CREB suite à la dépolarisation ou l'activation de la PKA (Kornhauser et al., 2002), dans certains cas, la phosphorylation sur la Ser133 ne semble pas suffisante pour induire la transcription (Bonni et al., 1995; Tao et al., 1998; West et al., 2001). Pour certains programmes transcriptionnels, comme ceux déclenchés par l'activité et qui peuvent permettre une réponse adaptative du neurone, les étapes de phosphorylation sur les Ser 142 et 143 (en plus de la Ser 133) pourraient être essentielles (Kornhauser et al., 2002). La phosphorylation sur le site Ser 142 semble être inhibitrice (Kornhauser et al., 2002; Sun et al., 1994) et la phosphorylation sur ce site Ser 143 serait activatrice (Kornhauser et al., 2002). Finalement même si la double phosphorylation sur la Ser 142 et la Ser 143 semble causer la perte de l'interaction CREB/CBP, il apparaît qu'elle est induite de façon sélective par l'activité neuronale et qu'elle permet alors clairement d'activer la transcription génique. Cette activation semble donc indépendante de CBP et se ferait par un autre mécanisme. Dans les neurones corticaux, ces deux sites se trouvent phosphorylés à long terme et de manière coordonnée par des CaM kinases (et pas par les MAP Kinases contrairement à la Ser 133). Ces deux étapes de phosphorylation sont liées spécifiquement à la dépolarisation et l'entrée de calcium par les canaux voltage dépendants (de type L surtout) mais aussi par les récepteurs NMDA. Au contraire, la réponse aux neurotrophines telles que le BDNF ou encore à l'AMPC perméant ne provoque pas la phosphorylation des Ser 142 et 143, et passe par la phosphorylation de la Ser133 uniquement. De manière intéressante, la phosphorylation sur la

Ser143 ou sur les Ser 142 et 143 simultanément n'a aucun effet sur la transcription initiée par CREB suite à une stimulation par l'AMPC activant la PKA (Kornhauser et al., 2002).

Beaucoup de travaux ont donc été produits pour comprendre de quelles manières et dans quelles circonstances le facteur CREB se trouvait activé et induisait ainsi la transcription des gènes comportant l'élément CRE dans leur promoteur. Les mécanismes de la régulation de la transcription par CREB sont encore mal compris puisque la plupart de ces travaux ont assimilé la phosphorylation sur la Ser 133 au phénomène d'activation de la transcription. Les données concernant les sites Ser 142 et Ser 143 font apparaître une grande complexité concernant le fonctionnement de la régulation transcriptionnelle par un même facteur de transcription au niveau duquel convergent plusieurs voies de transduction de signaux extracellulaires. Ainsi, ces expériences laissent entrevoir les bases des mécanismes de régulation pouvant conduire à des réponses transcriptionnelles spécifiques en fonction des stimuli extérieurs. Elles soulignent l'importance des événements de phosphorylation et déphosphorylation calcium dépendants et montrent à quel point le contrôle de la balance kinases/phosphatases peut jouer sur la spécificité de la réponse cellulaire.

### **1.3) L'activation du SRE (Serum Response Element).**

Même si l'activation de CREB est primordiale pour l'activation de l'expression génique en réponse à des augmentations de calcium nucléaire, l'activation du SRF (Serum Response Factor) est nécessaire pour déclencher la transcription de certains gènes en réponse à l'augmentation de calcium cytosolique (Hardingham et al., 1997). Au cours du développement du système nerveux, la transcription médiée par le SRF semble importante pour la migration neuronale et le guidage axonal (Alberti et al., 2005; Knoll et al., 2006). Récemment, il a été montré que ce facteur pouvait être de première importance pour la LTD dans l'hippocampe (Etkin et al., 2006). Le SRF peut être activé par la voie des MAP kinases en réponse aux facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou le NGF (Nerve Growth Factor). La pp90rsk activée par les MAP kinases ERKs phosphoryle le SRF sur la sérine 103 en réponse à la stimulation par ces facteurs (Rivera et al., 1993). D'autre part, la phosphorylation de ce même résidu a aussi été montrée dans le cas de l'entrée de calcium par les canaux voltage dépendants de type L (Misra et al., 1994). Peu après, des travaux ont mis en évidence une activation du SRF par le recrutement des CaMkinases II et IV (Miranti et al., 1995). Ceci a été confirmé par certaines études montrant que le calcium pouvait induire l'activation de la transcription SRF dépendante de manière indépendante de la voie des MAP kinases (Johnson et al., 1997). En plus des facteurs de croissance, le calcium

est apparu lui aussi comme un activateur de la voie des MAP kinases puisque dans les neurones d'hippocampe, corticaux, du striatum, ainsi que dans les lignées cellulaires, l'entrée de calcium suite à l'activation des récepteurs NMDA ou des canaux voltage dépendants de type L induit l'activation de la voie des MAP kinases (Dolmetsch et al., 2001; Mao et al., 2004; Rosen et al., 1994). Ainsi, comme dans le cas de CREB, on observe pour l'activation du SRF une convergence et une coopération entre les voies des CaMkinases et des MAPkinases. Toutes deux sont recrutées par des augmentations du calcium intracellulaire et semblent agir de manière complémentaire.

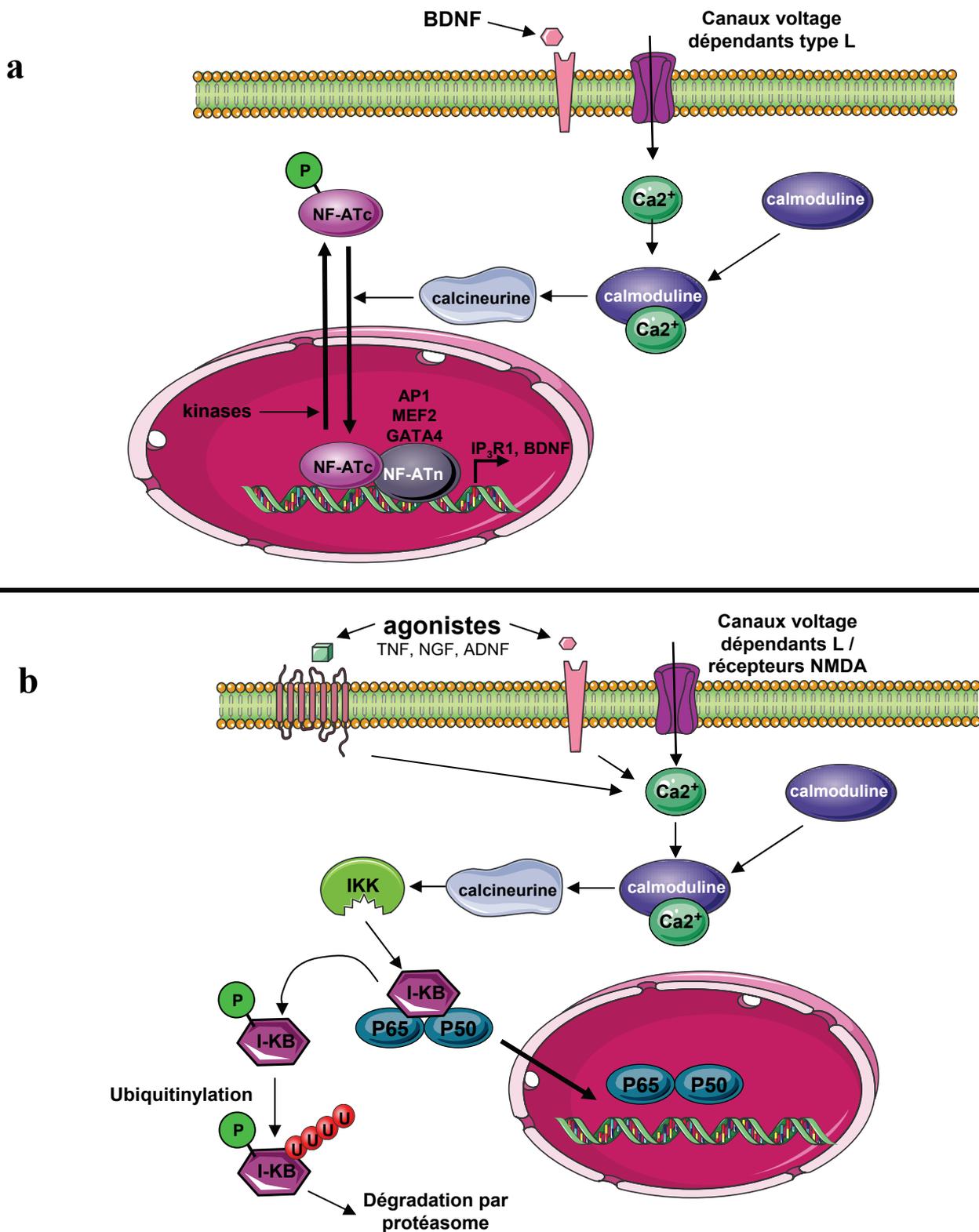
#### **1.4) NF-AT, un autre élément clé pour la transcription calcium dépendante**

NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells) a d'abord été décrit comme un facteur de transcription régulant l'expression de gènes clés (IL2) dans les lymphocytes T. Cependant il est apparu que celui-ci avait aussi un rôle majeur dans la régulation de la transcription calcium dépendante au sein du système nerveux (Wu et al., 2007). L'augmentation du calcium intracellulaire provoque en effet l'assemblage sur le promoteur de certains gènes d'un « complexe NF-AT » (figure 6a). Le complexe NF-AT se compose d'une sous unité nucléaire, fixée constitutivement à l'ADN (NF-ATn) et d'une sous unité cytoplasmique (NF-ATc) qui présente 4 isoformes (Crabtree, 1999; Lee et Park, 2006). Lors d'une stimulation provoquant l'augmentation du calcium intracellulaire, les sérines qui encadrent un signal de localisation nucléaire (NLS) de NF-ATc sont déphosphorylées par la calcineurine, une phosphatase activée par le calcium. Ceci provoque une exposition du signal de localisation nucléaire et NF-ATc est transportée à l'intérieur du noyau en association avec le complexe Calcium/Calmoduline/Calcineurine. Celui-ci va alors entrer en compétition avec de nombreuses kinases nucléaires telles que la GSK3, les Caséine kinases I et II pour NF-ATc1 ou la JNK, MEKK1 et la Caséine K1 pour NF-ATc3. Celle-ci sont capables de rephosphoryler NF-ATc et de provoquer sa sortie du noyau (Flanagan et al., 1991; Shen et al., 2007). Ainsi, ce facteur ne sera maintenu au noyau que par une activation persistante de la calcineurine et donc une augmentation persistante du calcium nucléaire. Un point important est que le facteur NF-ATc ne semble pas posséder une assez forte affinité pour l'ADN lui permettant d'activer seul la transcription (Wolfe et al., 1997). Ainsi, l'activation de la composante nucléaire NF-ATn est nécessaire. NF-ATn représente une famille générique de protéines dans laquelle on retrouve les facteurs AP-1, MEF2 et GATA4 qui sont phosphorylées par la voie des MAPKinases et de la PKC (Flanagan et al., 1991; Macian, 2005). Le complexe NF-AT apparaît donc comme un détecteur de coïncidences capable

d'intégrer plusieurs voies de signalisation. Cette propriété fait apparaître les complexes NF-AT comme des candidats appropriés pour la régulation de la morphogenèse neuronale. En effet, dans les neurones de l'hippocampe la transcription dépendante de NF-ATc4 est activée par le BDNF (brain derived neurotrophic factor). Ceci permet d'augmenter l'expression du récepteur à l'IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5 triphosphate) de type I (IP<sub>3</sub>R1) et du BDNF lui-même. Il en résulterait une sensibilité accrue des cellules aux stimulations et une augmentation les quantités de neurotrophines libérées dans le milieu. Ces éléments seraient à l'origine d'une boucle de rétroaction positive qui participerait à l'augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique (Groth et Mermelstein, 2003). Ces données vont de paire avec celles montrant que chez les souris mutantes pour NF-ATc2, 3 et 4, la poussée axonale en réponse aux neurotrophines et à la nétrine n'a plus lieu (Graef et al., 2003). D'autre part, NF-ATc3 été montré de première importance pour la survie neuronale en réponse à la dépolarisation et au sérum (Benedito et al., 2005). Certains auteurs lui attribuent un rôle potentiel dans la mémoire et des maladies neurodégénérative en raison de sa capacité à activer l'expression du TNF- $\alpha$  (Canellada et al., 2006). Finalement un point important pour la régulation de l'expression génique dans les cellules excitables est que NF-AT est capable d'agir comme un décodeur de fréquence des oscillations calciques. Et l'étude de son adressage au noyau comparée à celle de NF- $\kappa$ B, un autre facteur de transcription régulé par le calcium, montre que des fréquences d'oscillations calciques différentes peuvent aboutir à l'activation de ces deux facteurs.

### **1.5) NF- $\kappa$ B**

Ce facteur de transcription a été beaucoup étudié dans le cadre de la régulation de l'expression des cytokines dans les lymphocytes. Depuis peu, il a été impliqué dans la régulation de processus neuronaux tels que la survie neuronale, la plasticité synaptique, la réponse aux neurotrophines, au glutamate, à l'activité électrique ou encore au stress oxydatif (Kaltschmidt et al., 2006; Mattson et al., 2000; Meffert et al., 2003; Memet, 2006; O'Neill et Kaltschmidt, 1997). Ce facteur, dont le rôle clé dans les neurones commence seulement à émerger constitue une cible supplémentaire régulée par le calcium en réponse à de nombreux stimuli (Han et Logsdon, 2000; Jefferson et al., 1999; Lilienbaum et Israel, 2003; Pahl et Baeuerle, 1996). Il est impliqué dans l'expression de nombreux gènes du système nerveux tels que les N-CAM, la NOSII (Nitric Oxyde Synthase), l'APP (Amyloid  $\beta$  Precurseur Protein), la CaMkinase II (Memet, 2006). Le facteur NF- $\kappa$ B est localisé dans le cytoplasme où il est inactif. Il est constitué de 3 sous unités : un dimère constituant le facteur de transcription et une sous unité inhibitrice (I $\kappa$ B). Le dimère NF- $\kappa$ B constitue une famille regroupant plusieurs protéines : p65



**Figure 6. L'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et NF-AT dans les neurones par le calcium.** L'augmentation du calcium intracellulaire permet la formation du complexe calcium/calmoduline. Celui-ci active une phosphatase: la calcineurine. Dans le cas de NF-AT, la calcineurine déphosphoryle directement NF-ATc. Son signal de localisation nucléaire est alors démasqué et NF-ATc entre dans le noyau. Il se fixe sur l'ADN et sur NF-ATn, ce qui permet d'initier la transcription (a). La calcineurine peut aussi stimuler les kinases IKKs qui phosphorylent I- $\kappa$ B, permettant sa dégradation par le protéasome. NF- $\kappa$ B (P65 et P50) est alors libéré et migre dans le noyau où il peut activer la transcription.

(Rel-A), Rel-B, c-Rel, p50 (produites à partir d'un précurseur de 105 kDa) et p52 (produit à partir d'un précurseur de 100 kDa). La famille des sous unités inhibitrices regroupe les protéines I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\delta$ , et Bcl-3. Mais dans les neurones, le complexe NF- $\kappa$ B le plus commun est formé par p65, p50 et I $\kappa$ B $\alpha$  (Kaltschmidt et al., 1994; Simpson et Morris, 1999; Yu et al., 1999). L'activation de NF- $\kappa$ B implique la phosphorylation de I $\kappa$ B par une kinase IKK (I $\kappa$ B kinase complex), menant à sa dégradation par le protéasome (May et Ghosh, 1999). Le facteur de transcription est alors libéré et migre au noyau où il se fixe sur le site  $\kappa$ B, situé dans le promoteur de gènes cibles (figure 6b). Suite à sa translocation nucléaire, NF- $\kappa$ B serait soumis à une seconde étape de régulation par phosphorylation de la sous unité P65 dans son domaine de transactivation (Meffert et Baltimore, 2005). Le TNF (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) et l'activation directe des IKKs mène à la phosphorylation de P65 sur respectivement les Ser-529 et 536. Ceci permet de potentialiser l'effet transactivateur de cette sous unité et constitue ainsi un second niveau de régulation du facteur, indépendant de la translocation (Sakurai et al., 1999; Wang et Baldwin, 1998). La CaMkinase est capable de phosphoryler la P65 et de stimuler le recrutement de coactivateurs tels que CBP par cette sous unité (Jang et al., 2001). Dans les neurones, de nombreux stimulus tels que le TNF, le glutamate, le NGF (nerve growth factor), des molécules d'adhésion cellulaire, l'ischémie cérébrale, l'activité neuronale...etc, sont capables d'activer ce facteur de transcription (Barger et al., 1995; Carter et al., 1996; Guerrini et al., 1995; Krushel et al., 1999; Meffert et Baltimore, 2005; Yi et al., 2007). Cette activation a lieu par la stimulation de voies mettant en jeu la calmoduline, la calcineurine et des kinases dont la CaMKII, la PKC et Akt (Lilienbaum et Israel, 2003; Meffert et al., 2003; Wooten, 1999). Dans les neurones primaires, il a récemment été montré que l'activation de la transcription par NF- $\kappa$ B ne résulte pas de l'activation linéaire d'une de ces voies mais d'une synergie entre ces dernières. Ces voies sont activées par l'entrée de calcium par les canaux de type L et l'activation indirecte des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> (Lilienbaum et Israel, 2003).

### **1.6 DREAM, (Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator)**

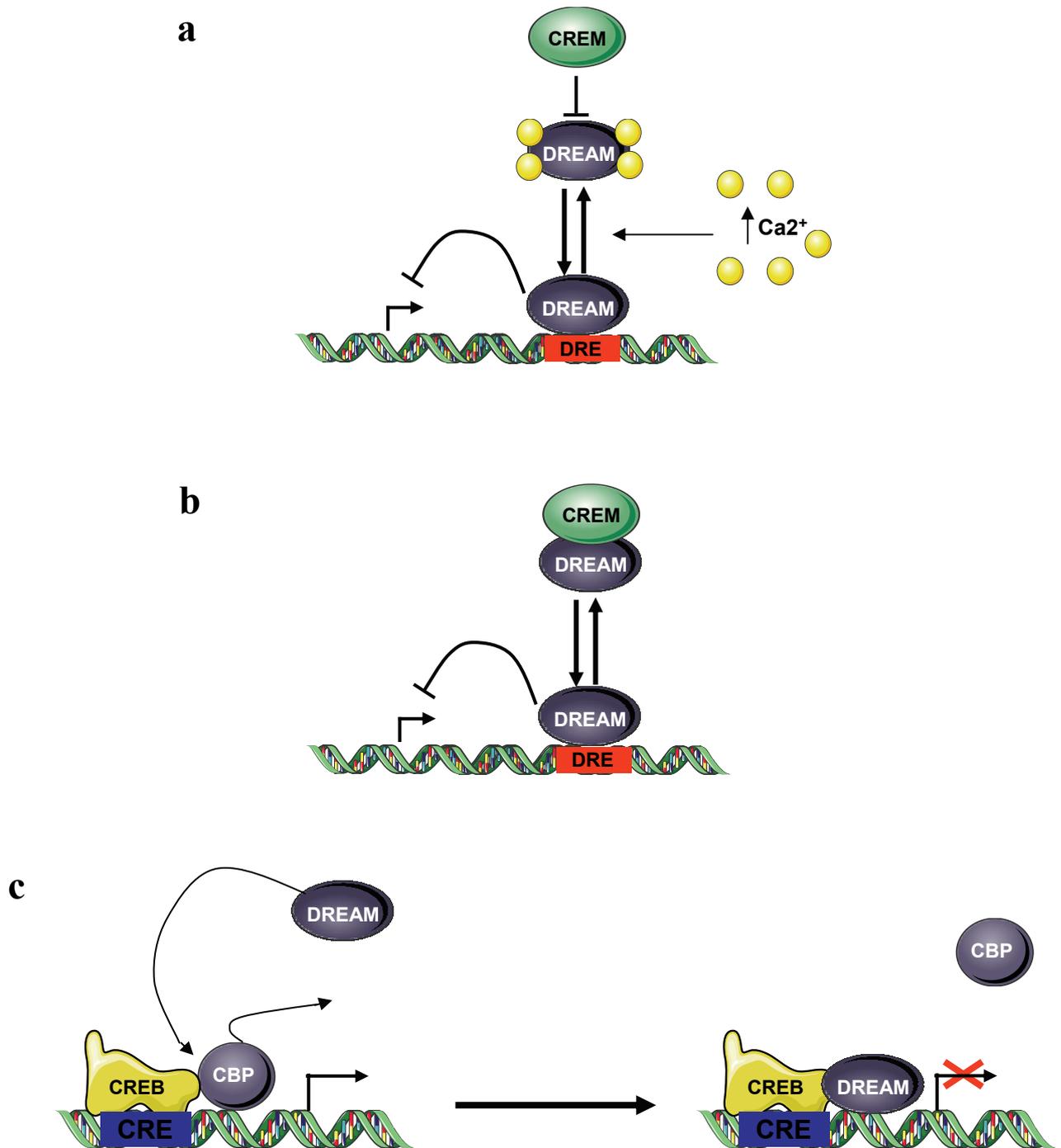
Ce régulateur transcriptionnel constitue un cas particulier puisqu'il possède des motif « EF hand » capables de lier le calcium (Mellstrom et Naranjo, 2001). Il s'agit d'un répresseur de la transcription qui a été identifié initialement dans les neurones. DREAM est aussi connu sous le nom de KChIP-3 (K Channel interacting protein 3) ou encore de calseniline car il appartient à une famille de protéines connue pour interagir avec des canaux potassiques et les presenilines (Berridge, 2002; Lilliehook et al., 2002; Rhodes et al., 2004; Savignac et al.,

2007). Les quatre membres de cette famille sont co-exprimés dans beaucoup de tissus au niveau du cytosol, de la membrane plasmique mais aussi du noyau où ils se comportent comme des régulateurs de la transcription. Les quatre formes de DREAM peuvent se fixer en homo ou hétérotétramères sur l'ADN au niveau d'une séquence DRE (DREAM Response Element). Cette séquence située en aval du site d'initiation de la transcription est entre autre présente dans le promoteur du gène c-fos, de la prodynorphine (impliquée dans la nociception), d'un échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> neuronal (Carrion et al., 1999; Gomez-Villafuertes et al., 2005). Dans le cerveau, l'étude de l'expression de cette protéine montre qu'elle est fortement exprimée au niveau des cellules granulaires du cervelet mais aussi dans l'hippocampe et dans les structures d'élaboration et de relais de l'information sensorielle telles que le bulbe olfactif, le tractus optique le colliculus supérieur, certains relais thalamiques, etc... (Hammond et al., 2003). La liaison du calcium par DREAM (figure 7a) provoque sa dissociation du DRE et lève ainsi la répression qu'il exerce sur l'expression des gènes cibles (Carrion et al., 1999). DREAM est aussi régulé indirectement par la PKA qui phosphoryle la protéine CREM (figure 7b). CREM est capable d'interagir avec DREAM (lorsqu'il n'est pas lié au calcium) pour provoquer sa dissociation du domaine DRE et son affinité pour DREAM est augmentée lorsqu'il est phosphorylé par la PKA (Ledo et al., 2000) Outre sa capacité à interagir avec CREM, DREAM peut aussi en l'absence de calcium, se lier à son homologue CREB et gêner son interaction avec le coactivateur CBP (figure 7c) empêchant ainsi l'activation de la transcription par CREB (Ledo et al., 2002). DREAM apparaît donc comme un nouvel acteur contrôlant la transcription et pour lequel l'augmentation de la concentration calcique au sein du noyau s'avère un élément essentiel.

Les mécanismes permettant d'aboutir aux réponses cellulaires via l'activation de facteurs de transcription et déclenchés par les variations de calcium au sein de la cellule sont complexes. Leur compréhension s'est basée sur l'étude des différents effecteurs activés par le calcium. Ces études ont permis de mettre à jour des cascades biochimiques permettant notamment de coder et d'acheminer le signal déclenché par le calcium jusqu'au noyau.

## **2) Les voies de transduction du signal activées par le calcium**

Ces cascades de transduction mettent en jeu de multiples kinases et phosphatases, dont la régulation constitue la base du codage du signal calcique. Un phénomène surprenant est que la cellule, avec un nombre limité d'acteurs protéiques, est capable de détecter et d'encoder une diversité impressionnante de stimuli afin d'obtenir une réponse cellulaire spécifique à chacun.



**Figure 7. L'activation du facteur de transcription DREAM par le calcium.** DREAM est fixé sur l'ADN au niveau d'une séquence DRE (DREAM Response Element). Cette séquence est située en aval du site d'initiation inhibe la transcription. L'augmentation de la concentration calcique dans le noyau permet la liaison du calcium par DREAM. Ceci provoque sa dissociation du DRE et lève ainsi la répression (a). La protéine CREM est capable d'interagir avec DREAM, lorsqu'il n'est pas lié au calcium et provoque sa dissociation du domaine DRE (b). DREAM peut aussi en l'absence de calcium, se lier à son homologue CREB et gêner son interaction avec le coactivateur CBP empêchant ainsi l'activation de la transcription par CREB (c).

Ceci est lié au fait que les différentes cascades sollicitées ou non en fonction du stimulus sont capables d'interagir et de se moduler entre elles. Ainsi, les nombreux « cross-talk » entre les voies effectrices des signaux calciques rendent leur compréhension difficile et leur modélisation complexe. Ces mécanismes permettent qu'à chaque stimulus correspondent des signatures moléculaires différentes qui vont dépendre d'une multitude de paramètres caractérisant le signal calcique qui les aura déclenchées.

## **2.1) La calmoduline**

Il s'agit d'une petite protéine de 16 kDa exprimée dans tous les types cellulaires. Elle est constituée de deux domaines globulaires reliés par une hélice- $\alpha$ . Chacun de ces domaines de type « EF hand » peut lier un calcium, induisant l'exposition d'un domaine hydrophobe capable d'interagir avec une multitude de protéines. Cette calmoduline constitue ainsi le premier maillon de la régulation de nombreuses cascades moléculaires qui interagissent entre elles pour aboutir à des réponses cellulaires complexes (Xia et Storm, 2005). Elle est trouvée aussi bien dans le cytosol que dans le noyau. Dans les neurones, la calmoduline est entre autre ancrée aux canaux de type L et, une fois activée par le calcium suite à la dépolarisation, elle est capable de migrer dans le noyau pour y activer des effecteurs (Deisseroth et al., 1998). Elle peut donc se comporter comme un senseur local de calcium et ensuite aller activer sélectivement des cibles éloignées.

## **2.2) Les kinases activée par le calcium**

### **2.2.1) Les CaMkinases**

Elles constituent une famille de kinases ubiquitaires activées directement par le complexe calcium-calmoduline. Une de leurs caractéristiques est qu'elles ne sont pas spécialisées dans la phosphorylation d'un substrat particulier mais possèdent une large gamme de cibles cytosoliques et nucléaires. Ces kinases sont notamment capables de phosphoryler des facteurs de transcription et ainsi d'avoir une action directe sur la régulation de l'expression de certains gènes. Il en existe trois la CaMKinase II, la CaMKinase I et la CaMKinase IV.

#### **2.2.1.1) La CaMKinase II**

Cette kinase possède un rôle primordial dans le système nerveux (Yamauchi, 2005). Elle est trouvée dans tous les tissus mais en concentration particulièrement importante dans les cellules nerveuses. Les 4 gènes de CaMKinases ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) ont été clonés à partir du cerveau de rat. Chaque forme peut donner plusieurs variants d'épissage alternatif et possède un

domaine catalytique, un domaine d'association et un domaine de régulation (Bennett et Kennedy, 1987; Hudmon et Schulman, 2002; Lin et al., 1987; Tobimatsu et Fujisawa, 1989). Les formes  $\alpha$  et  $\beta$  sont présentes uniquement dans le système nerveux alors que les formes  $\gamma$  et  $\delta$  se retrouvent dans tous les tissus. En fonction de la structure observée, le ratio entre les formes  $\alpha$  et  $\beta$  est différent avec par exemple 3:1 dans le cerveau antérieur adulte et 1:4 dans le cervelet. De plus, au sein de ces mêmes structures, certains types cellulaires vont exprimer majoritairement l'une ou l'autre forme (Ichikawa et al., 1992; McGuinness et al., 1985; Miller et Kennedy, 1985). La particularité de cette CaMkinase II par rapport aux deux autres est qu'elle se trouve sous forme de complexes multimériques réunissant 8 à 12 unités, ce qui donne une masse moléculaire totale de 400 à 600 kDa (Kanaseki et al., 1991; Kolodziej et al., 2000). Ces multimères ne sont donc pas capables de transiter librement du cytosol vers le noyau. Pourtant la CaMkinase II a été détectée dans de nombreux types cellulaires aussi bien au sein du noyau que dans le cytosol. Sur les nombreuses isoformes existantes, deux semblent adressées spécifiquement au noyau : la CaMkinase II  $\alpha_B$  et la CaMkinase II  $\delta_B$ . L'analyse de séquences des différents variants d'épissage a montré que ces deux isoformes possèdent une séquence de localisation nucléaire (NLS) dans le « domaine d'association ». Ainsi, l'adressage nucléaire va dépendre de la composition des multimères et de la proportion des sous unités possédant des NLS (Srinivasan et al., 1994). De plus, il semble aussi que la phosphorylation de la CaMKinase II sur la sérine suivant son NLS puisse bloquer sa translocation nucléaire. Cette phosphorylation est accomplie spécifiquement par les CaMKinases I et IV (Heist et al., 1998).

### L'activation de la CaMkinase II

En dehors de toute stimulation induisant une augmentation du calcium intracellulaire, la CaMkinase II est maintenue à l'état inactif grâce à son domaine autoinhibiteur qui empêche la fixation des substrats et de l'ATP au niveau du site actif. La fixation du complexe calcium-calmoduline au niveau d'une séquence comprise dans le domaine inhibiteur lève l'interaction entre ce dernier et le site catalytique qui est alors accessible aux substrats. La kinase peut alors phosphoryler ses cibles mais aussi s'autophosphoryler sur la Thr286 (pour les formes  $\alpha$  et  $\delta$ ) ou Thr287 (pour les formes  $\beta$  et  $\delta$ ). Cette autophosphorylation est une réaction inter sous unités et une sous unité ne peut être phosphorylée par sa voisine que si elle a fixé elle aussi le complexe calcium-calmoduline (Hanson et al., 1994; Mukherji et Soderling, 1994). Cette phosphorylation a deux conséquences sur l'activation de la CaMKinase II. D'une part, celle-ci devient partiellement active de manière prolongée, indépendamment du calcium

intracellulaire. D'autre part, son affinité pour le complexe calcium-calmoduline est grandement augmentée (passage de 45nM à 0,06nM), permettant de prolonger l'interaction entre ces deux acteurs même lorsque la concentration calcique retrouve son niveau de base. En effet, lors du retour à la concentration calcique de repos (100nM), la dissociation complète du complexe calcium-calmoduline et de la kinase n'est observée qu'au terme de 10 secondes. Dans le cas d'un pic calcique transitoire suivi d'un plateau d'amplitude plus modeste, la dissociation peut alors prendre plusieurs dizaines de secondes et l'activité kinase sera d'autant maintenue (Meyer et al., 1992). Ou encore, si on considère qu'après un premier pic, le complexe calcium-calmoduline n'est disponible qu'en quantité limitante par rapport à la kinase. Ceci ne permet alors qu'une occupation partielle des sites de la kinase et une activation submaximale de celle-ci. Cependant les associations formées sont prolongées durant quelques secondes après retour à la concentration calcique de base grâce à la phosphorylation sur la Thr286. Si pendant ces quelques secondes survient un nouveau pic calcique, la calmoduline n'a pas le temps de se dissocier et la kinase va pouvoir recruter au niveau des sites encore libres de la calmoduline additionnelle. Ceci permet par pallier, à chaque pic calcique d'augmenter l'activation afin d'atteindre un seuil critique d'activité permettant la phosphorylation des cibles. La CaMKII a donc été proposée grâce à ce mécanisme comme un décodeur sensible à la fréquence des oscillations calciques.

### **2.2.1.2) Les CaMKinases I et IV**

La CaMkinases I semble ubiquitaire, et dans les nombreux tissus où elle a été trouvée, c'est dans le cerveau au niveau duquel son expression est homogène, que son activité est la plus importante. La CaMkinase IV, contrairement aux deux autres ne semble pas ubiquitaire. Elle est surtout exprimée dans le cerveau et les lymphocytes T. Cependant, bien que son expression dans le cerveau ne soit pas homogène, elle est présente en quantité importante dans les cellules granulaires du cervelet, le cortex cerebelleux, l'hippocampe, le striatum, etc... (Frangakis et al., 1991; Jensen et al., 1991; Miyano et al., 1992; Nairn et Greengard, 1987; Nakamura et al., 1995; Picciotto et al., 1995). Ces CaMkinases sont capables de phosphoryler de nombreux substrats incluant des facteurs de transcription tels que CREB et ATF-1. Il existe 4 isoformes pour la CaMkinase I (certaines donnent plusieurs variant d'épissage (Nishimura et al., 2003)) et deux seulement pour la IV. Contrairement à la CaMkinase II, les I et IV ne forment pas de multimères et ne comportent pas de NLS, leur poids moléculaire respectif (40 et 61 kDa) devrait donc leur permettre de transiter librement du cytosol vers le noyau. Les études concernant leur localisation ont montré que dans des neurones en culture, la

CaMkinase IV est trouvée majoritairement dans le noyau alors que la CaMkinase I semble plutôt cytoplasmique (Bito et al., 1996; Jensen et al., 1991; Nairn et Greengard, 1987; Nakamura et al., 1995). Cependant, le mécanisme régissant leur distribution n'a pas encore été clairement élucidé et reste très mal compris. Par exemple, la CaMkinaseI  $\delta$  peut être transloquée du cytosol vers le noyau suite à une dépolarisation par le KCl et cette translocation semble dépendre de son activation par les CaMKkinases (Sakagami et al., 2005). D'autre part, celle-ci possède un signal d'export nucléaire de type LRNES reconnue par le complexe CRM1 dont le rôle est de transporter les protéines du nucléoplasme vers le cytoplasme (Komeili et O'Shea, 2001). L'affinité de la CaMKinase I pour CRM1 est augmentée lorsqu'elle est liée au complexe calcium-calmoduline (Stedman et al., 2004).

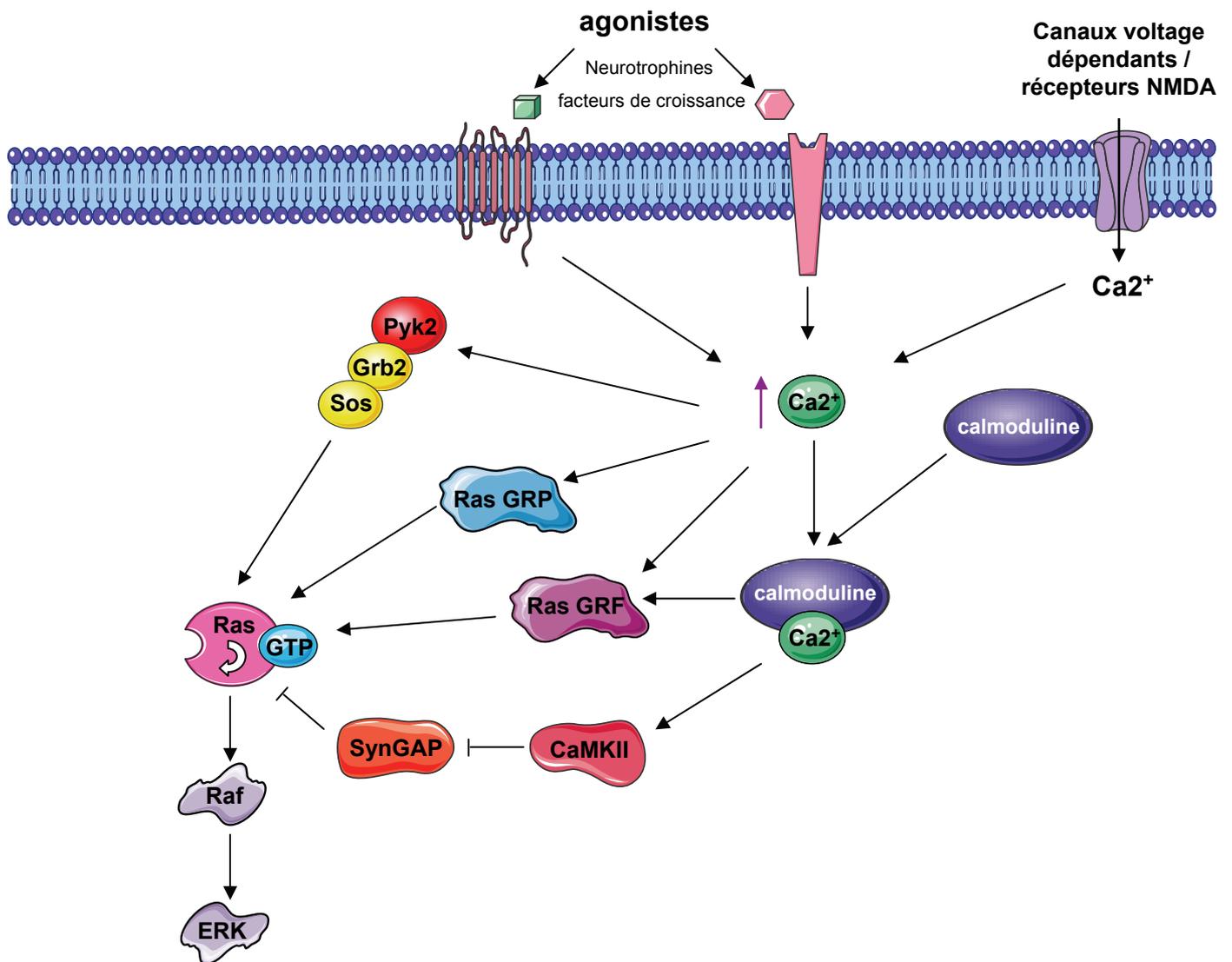
Les CaMkinases I et IV sont comme la II, activées par le complexe calcium-calmoduline pour lequel elles présentent une faible affinité, avant d'être phosphorylées sur les Thr-177 et Thr-196 respectivement. Cette phosphorylation est accomplie par des CaMkinases kinases, elles aussi dépendantes d'une activation par le complexe calcium-calmoduline. Deux CaMK kinases ont été purifiées à partir de cerveau de rat et appelées CaMK kinases  $\alpha$  et  $\beta$ . La phosphorylation par les CaMK kinases exige que les deux partenaires (CaMK kinase et CaM kinase) aient fixé le complexe calcium-calmoduline (Tokumitsu et Soderling, 1996). Il s'avère intéressant que la régulation des CaM kinases IV et I puissent être mise en parallèle avec celle observée pour la CaMkinaseII. Celles-ci ne s'autophosphorylent pas mais le sont par les CaMK kinases sur leurs résidus Thr-177 et Thr-196 (équivalents à la Thr-286 de la CaMkinaseII (Edelman et al., 1996)). Les CaM kinases I et IV possèdent un domaine catalytique et un domaine régulateur homologue à la CaMkinase II. Le domaine régulateur possède un segment inhibiteur qui interagit avec le domaine catalytique qui contient les Thr-177 et Thr-196 et dont la phosphorylation lève l'inhibition, tout comme la fixation du complexe calcium-calmoduline dans la région régulatrice (Cruzalegui et Means, 1993; Goldberg et al., 1996). La CaMkinase IV suite à cette phosphorylation sur la Thr-196 devient partiellement autonome (Selbert et al., 1995; Tokumitsu et al., 1994). De manière homologue à la CaMkinaseII elle contiendrait un domaine autoinhibiteur bloquant le site catalytique et déplacé par la fixation du complexe calcium-calmoduline (Cruzalegui et Means, 1993). Outre toutes les analogies avec l'activation de la CaMkinase II, la CaMkinase IV présente quelques caractéristiques structurales différentes. Notamment, elle comporte un domaine C-terminal qui exercerait une autoinhibition levée par une autophosphorylation sur les Ser 11 et 12 suite à la fixation du complexe calcium-calmoduline. La CaMkinase IV montrerait alors une

activation en trois étapes : la fixation de la calmoduline, la phosphorylation par les CaMK kinases sur la Thr-196 et l'autophosphorylation sur les Ser-11 et 12 (Chatila et al., 1996).

### **2.2.2) Les MAPKinases ( Mitogen-activated protein kinases)**

La voie des MAPkinases est à l'origine de la régulation de nombreux processus dans tous les types cellulaires. En aboutissant à la modulation de l'expression de nombreux gènes, son activation peut avoir des effets opposés en fonction du type cellulaire et de l'intensité de stimulation de la voie. Ainsi, elle est impliquée à la fois dans le contrôle de la prolifération, la différenciation, la survie, l'apoptose, la plasticité synaptique (Miyamoto, 2006). La réponse cellulaire dépend donc de la balance régulatrice (activation/inhibition) qui s'exerce sur cette voie de transduction du signal et de la présence des acteurs participant à cette régulation. Ici, je m'intéresserai donc à la régulation de la voie des MAP kinases par le calcium dans les neurones, qui constitue l'une des multiples facettes de la modulation de cette cascade de signalisation (Mao et al., 2004; Wang et al., 2007).

L'activation des MAP kinases passe par les protéines Ras (figure 8) qui constituent une famille de petites protéines G. Les protéines Ras hydrolysent le GTP selon un cycle où le complexe Ras-GTP constitue la forme active et le complexe Ras-GDP la forme inactive. Ce cycle est régulé d'une part par des GEFs (Guanine-Nucleotide exchange Factors), favorisant la liaison de Ras au GTP et donc la transition vers la forme active. D'autre part, des GAPs (GTPase activating proteins) favorisent l'hydrolyse du GTP et mènent à l'inactivation de Ras. La forme active de Ras (liée au GTP) active ensuite la sérine/thréonine kinase Raf qui mène à l'activation des kinases ERKs (Extracellular Regulated Kinases) qui vont finalement phosphoryler la kinase RSK2 (Ribosomal S6 kinase II). Dans les neurones d'hippocampe celle-ci a été montrée avec la CaMKIV comme la principale kinase responsable de la phosphorylation de CREB sur la Ser-133 suite à l'entrée de calcium par les canaux de type L et l'activation des récepteurs NMDA (Bito et al., 1996; Hardingham et al., 2001a; Hardingham et al., 2001b; Hardingham et al., 1999). Dans les neurones, Ras peut être activée indépendamment du complexe calcium-calmoduline par PYK2, une kinase calcium dépendante capable de recruter Grb2-SOS qui a son tour recrute Ras (Dikic et al., 1996; Lev et al., 1995). Le calcium est aussi capable de recruter des GEFs spécifiques aux neurones. La première, Ras-GRP est activée par le calcium directement et le diacyl glycérol (Ebinu et al., 1998) et la seconde Ras-GRF est activée directement par le calcium et par la fixation du complexe calcium calmoduline (Farnsworth et al., 1995; Wang et al., 2007). D'autre part, la



**Figure 8. L'activation de la voie des MAPkinases dans les neurones par le calcium.** L'augmentation du calcium intracellulaire est lié à la dépolarisation, l'activation des récepteurs NMDA, l'activation récepteurs à tyrosine kinase ou couplés à des protéines G. Le calcium active directement PYK2, capable de recruter Grb2-SOS qui a son tour recrute Ras. Le calcium est aussi capable de recruter des GEFs comme Ras-GRP et Ras-GRF. De plus Ras-GRF est activée par la fixation du complexe calcium calmoduline. D'autre part, la GAP SynGAP (régulateur négative de Ras) est phopshorylable par la CaMKII, ce qui vient inhiber son activité et finalement, activer les MAP kinases ERKs.

GAP SynGAP (régulateur négative de Ras) est phopshorylable par la CaMKII, ce qui vient inhiber son activité et donc, activer les MAP kinases ERKs (Chen et al., 1998).

### **2.3) Les phosphatases**

Nous avons vu précédemment à quel point le rôle des kinases activées par le calcium est déterminant pour l'activation de l'expression génique dans le noyau des neurones. La cinétique de phosphorylation des protéines impliquées dans la régulation de l'expression génique constitue un point critique qui va déterminer l'engagement ou non de la cellule dans une réponse physiologique en adéquation avec son environnement. Ainsi pour contrebalancer l'action de ces kinases, la cellule dispose de phosphatases, elles aussi activées par le calcium qui lui permettent d'intégrer précisément les paramètres des signaux calciques générés. C'est la balance kinase/phosphatase qui va être garante de la production de la réponse adaptée au contexte. Dans les neurones, la calcineurine (PP2B) représente plus de 1% de la quantité de protéines cellulaires (Klee et al., 1998). Cette phosphatase est composée de 2 sous unités. La CnA constitue la sous unité catalytique dont deux isoformes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) sont exprimées dans le cerveau (Kuno et al., 1992) et la CnB une sous unité régulatrice. La pleine activité de la calcineurine nécessite la fixation du complexe calcium-calmoduline par CnA et la fixation de calcium par CnB (Stemmer et Klee, 1994; Stewart et al., 1982 ). La calcineurine possède une plus forte affinité pour le calcium que les kinases et par conséquent, de faibles élévations du calcium vont activer préférentiellement la phosphatase (Bito et al., 1997; Quintana et al., 2005). Lors de stimulations plus prolongées la calcineurine s'inactive et l'activité des kinases surpasse celle des phosphatases (Bito et al., 1996; Deisseroth et al., 2003). Dans les neurones, la calcineurine a été impliquée dans la régulation de l'expression de nombreux gènes en réponse au calcium (Kramer et al., 2003). Cette régulation a lieu de manière directe via l'activation de NF-AT ou de NF- $\kappa$ B mais aussi de façon indirecte par l'activation d'une autre phosphatase présente dans le cerveau : la phosphatase 1 (PP1). La calcineurine en déphosphorylant l'inhibiteur I1 qui lui est associé, libère et désinhibe la PP1 (King et al., 1984; Munton et al., 2004). La PP1 a été impliquée dans la dépression synaptique par sa capacité à déphosphoryler les récepteurs au glutamate de type AMPA post synaptiques. Mais la PP1 est aussi capable d'agir au niveau du noyau et son rôle dans la régulation de l'expression génique calcium dépendante semble important dans le cadre de la plasticité synaptique à long terme, l'apprentissage et la mémoire (Genoux et al., 2002). La PP1 est capable de déphosphoryler CREB sur la Ser-133. Ainsi, une brève activité provoque un pic transitoire de phosphorylation de CREB. Lorsque la PP1 est inactivée, le maintien de cette

phosphorylation qui nécessite normalement une activité plus soutenue a lieu. Ainsi, il a été suggéré que l'activation de la PP1 pourrait constituer un filtre afin d'éviter une activation anarchique de la transcription calcium dépendante. Ou encore, elle pourrait permettre d'activer uniquement certains pools de gènes pour lesquels, une activation transitoire de CREB suffit à initier la transcription (Bito et al., 1996). Chez la souris, l'inactivation de la PP1 juste après un apprentissage serait à l'origine d'une plus grande efficacité de la mémorisation en corrélation avec la phosphorylation pour une durée plus longue de CREB ainsi que de la CaMkinase II (Genoux et al., 2002).

## **PARTIE II**

### **Les variations de la concentration du calcium intracellulaire dans les neurones : les différentes sources de l'augmentation du calcium intracellulaire**

#### **1) L'entrée de calcium extracellulaire**

Le neurone possède au niveau de sa membrane une diversité impressionnante de canaux qui laissent entrer le calcium dans la cellule. Le gradient électrochimique pour le calcium tend à laisser entrer ce dernier lorsque des canaux qui lui sont perméables s'ouvrent au niveau de la membrane. La communication entre les neurones repose sur une transmission chimique de l'influx nerveux au niveau de points critiques: les synapses. Ce sont elles qui constituent la jonction entre les différents neurones du réseau. La base de cette communication repose sur la libération par le neurone présynaptique d'un neurotransmetteur. Ce neurotransmetteur vient se fixer au niveau du neurone postsynaptique sur des récepteurs canaux perméables à certains ions en activant alors leurs conductances.

#### **1.1) Les récepteurs canaux perméables au calcium**

Certains neurotransmetteurs sont capables de promouvoir l'entrée de calcium dans la cellule neuronale en activant le plus souvent des canaux dont la perméabilité au calcium n'est pas exclusive. Le glutamate, neurotransmetteur excitateur peut activer les récepteurs NMDA ou encore les récepteurs AMPA/kaïnate. Le récepteur NMDA présente une propriété intéressante : même si il est activé par la fixation du glutamate, il nécessite cependant une dépolarisation membranaire conjointe afin de lever un blocage exercé par le magnésium. Celui-ci verrouille son activité au potentiel membranaire de repos.

L'acétylcholine agissant sur le récepteur nicotinique et aussi certains récepteurs purinergiques comme le P2X sensible à l'ATP laissent entrer du calcium.

L'ouverture de conductances excitatrices au niveau synaptique permet de dépolariser la membrane cellulaire et ainsi d'activer certains canaux sensibles aux variations de potentiel et qui vont laisser entrer du calcium : les canaux calciques voltage dépendants.

#### **1.2) Les canaux calciques sensibles au potentiel : VOC « Voltage Operated Channels »**

Il existe sur la membrane des neurones des canaux qui nécessitent uniquement pour leur activation une variation du potentiel de membrane dans le sens d'une dépolarisation. Ces canaux sont dits voltage dépendants (VOCs). Ils constituent une voie majeure pour l'entrée de

calcium extracellulaire et sont donc couplés à la dépolarisation et donc à l'activité neuronale. Il en existe plusieurs types qui diffèrent par les 5 sous unités ( $\alpha 1$  sous unité canal et  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  sous unités régulatrices) qui les constituent. Ils ont été dénommés type L, T, N, P/Q, R. Ces différentes formes ne présentent pas la même sensibilité aux variations du potentiel de membrane et possèdent ainsi des cinétiques d'activation et d'inactivation différentes. Leur pharmacologie a été bien étudiée et plusieurs inhibiteurs spécifiques de chaque type ont été caractérisés. La nifédipine et la nimodipine par exemple inhibent sélectivement les canaux de type L alors que différentes conotoxines inhibent sélectivement les canaux N, P/Q ou R. Outre leur sensibilité au potentiel et leur pharmacologie ces canaux diffèrent aussi par leur localisation subcellulaire et les voies de signalisation intracellulaire auxquelles ils vont se trouver couplés. Dans de nombreux types de neurones, on trouve plutôt au niveau de la terminaison présynaptique une forte densité des canaux de type P/Q, N, et R. Par contre, au niveau du corps cellulaire et des dendrites proximales, on trouve en majorité des canaux de type L (Herlitze et al., 2003).

### **1.3) Les canaux SOC, CRAC et SMOC**

Ces canaux ubiquitaires ont été mis en évidence à la fois dans les cellules excitables et non excitables (Parekh et Putney, 2005). Ils permettent une entrée capacitive de calcium dans la cellule (SOCE pour « Store Operated Calcium Entry ») grâce à leur activité déclenchée par la vidange des stocks intracellulaires de calcium, d'où leur nom de « Store Operated Channels » (SOCs). L'entrée de calcium via les SOCs semble impliquée dans le contrôle de différentes réponses cellulaires allant de la sécrétion à l'expression génique mais permettrait aussi de faciliter le remplissage des stocks suite à leur vidange. Cependant, la façon dont s'exerce le couplage entre la déplétion des stocks calciques et l'activation des conductances SOC fait encore l'objet de nombreuses investigations et ce mécanisme reste à élucider même si plusieurs hypothèses ont été émises. Certains suggèrent l'existence du CIF (« Calcium Influx Factor »), facteur encore non identifié et provenant du réticulum lorsqu'il se vidange, qui serait l'activateur des SOCs (Bolotina et Csutora, 2005). D'autres proposent l'existence d'un couplage mécanique avec le réticulum endoplasmique (Berridge, 2002; Ma et Pan, 2003) .

De plus, l'identité moléculaire de ces SOCs reste encore débattue. En particulier, il existe un SOC qui a été bien caractérisé sur le plan électrophysiologique et dénommé  $I_{CRAC}$  pour « Calcium Release Activated Current ». Celui-ci montre un ratio de perméabilité  $Ca^{2+}/Na^{+}$  de l'ordre de 1000 et a été bien caractérisé même si son identité moléculaire reste encore indéfinie. Une protéine appelée STIM1, de 77 kDa et résidente de la membrane du réticulum a

été suggérée comme le senseur de calcium à l'origine du couplage vidange des stocks/activation du  $I_{CRAC}$  (Baba et al., 2006; Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Cette protéine suite à la déplétion du réticulum seraient relocalisée juste sous la membrane (Liou et al., 2005) voir même à la membrane plasmique (Zhang et al., 2005) et viendrait activer les  $I_{CRACS}$ .

D'autres canaux membranaires perméables au calcium, les SMOCs (Second Messenger Operated Channels) seraient activés par des seconds messagers intracellulaires. On peut par exemple citer les ARCs (Arachidonate activated channels) (Shuttleworth et al., 2004) activés par l'acide arachidonique produit par la phospholipase A2 lors de la stimulation cellulaire par un agoniste (Mignen et al., 2005).

#### **1.4) Les TRP (Transient Receptor Potential)**

Les TRP constituent une superfamille de canaux trouvés dans tous les types cellulaires et assez vaste puisqu'elle rassemble 22 membres regroupés en 7 grandes familles : les TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPA, TRPM (Melastatin) très proches au niveau structural, les TRPP (Polycystin) et TRPML (Mucolipin) plus éloignés des 3 précédentes et les TRPN uniquement exprimés chez des invertébrés. Ces canaux se composent tous de 6 domaines transmembranaires et sont impliqués dans une variété importante de processus cellulaires allant des différents types de perception sensorielle au développement. La plupart sont perméables au calcium et au sodium de façon non sélective. Cependant, les TRPV5 et TRPV6 ont une perméabilité calcique plus de cent fois supérieure à leur perméabilité sodique. Ces canaux peuvent s'associer entre eux et former des multi-hétéromères.

Les différents TRP peuvent être activés par une variété importante de stimuli extracellulaires mais aussi intracellulaires. Certains sont sensibles aux variations du volume cellulaire (Grimm et al., 2003), à la température et au menthol (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002) ou encore aux variations de potentiel (Nilius et al., 2003).

De plus de nombreux TRP possèdent des domaines de phosphorylation par des serine/threonine et tyrosine kinases dont la fonction reste à découvrir. Ces canaux se composent d'une pléiade de sites d'interaction avec diverses protéines suggérant leur couplage à différentes voies de transduction du signal intracellulaire (calmoduline, récepteurs à l' $IP_3$  et ryanodine, protéines synaptiques variées...) spécifiques selon la nature du TRP. Ceci laisse apparaître une régulation complexe à la fois de leur propre activité mais aussi des cascades de signalisation sur lesquelles ils pourraient agir en aval.

Depuis quelques temps, un rapprochement a été fait entre des TRP et les canaux de type SOC et CRAC (Ambudkar et al., 2006; Desai et Clapham, 2005; Montell, 2005; Parekh et Putney, 2005; Wes et al., 1995) avec de plus en plus d'évidences laissant penser que certains TRP se comportent comme des SOC ou même des SMOC (Bolotina et Csutora, 2005; Vanden Abeele et al., 2004). Il est évident aujourd'hui que la déplétion des stocks calciques intracellulaires est à l'origine de la modulation de nombreux TRP. Certains possèdent un motif CIRB (Calmoduline/ IP<sub>3</sub> Binding Domain) (Tang et al., 2001), des domaines de liaison aux protéines Homer, qui interagissent notamment avec les IP<sub>3</sub>Rs et les RyRs (Salanova et al., 2002; Ward et al., 2004).

Les TRPC peuvent aussi être modulés par des messagers secondaires, comme le DAG, le PIP<sub>2</sub> (Hardie, 2004) qui sont respectivement produit et substrat de la PLC, et être inhibés par le calcium (Wooten, 1999)). Le TRPC2 possède une propriété inhabituelle : il est capable de se lier à l'ADP ribose (Adenosine Diphosphoribose) et de l'hydrolyser en AMP et ribose phosphate (Perraud et al., 2001; Perraud et al., 2003). D'autres comme le TRPM2 sont activés par le NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) (Sano et al., 2001) ou par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il a été aussi proposé comme un senseur du statut redox de la cellule et impliqué dans l'influx calcique menant à la mort cellulaire lors de stress oxydatif (Hara et al., 2002). Plus récemment, ce TRPM2 a été montré modulable par deux second messagers connus pour libérer du calcium des réserves intracellulaires : le cADPR (Adenosine Diphosphoribose Cyclique) et le NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucléotide Phosphate) (Beck et al., 2006). Récemment, un autre TRP été montré modulé de façon directe ou indirecte par le NAADP (Zhang et Li, 2007). Il s'agit de la Mucilipine1 (TRPML1). Contrairement au TRPM2 fortement exprimé dans le cerveau par la microglie et les macrophages (Kraft et Harteneck, 2005) ainsi que la plupart des TRP qui sont exprimés de façon sélective par certains tissus, le TRPML1 semble ubiquitaire. De plus, celui-ci n'est pas localisé au niveau de la membrane plasmique mais sur les lysosomes. La mutation de ce TRPML1 est à l'origine de pathologies telles que les mucopolipidoses. En particulier, les patients atteints de la mucopolipidose IV présentent une anomalie du trafic des lysosomes régulé par le calcium ce qui entraîne des désordres neurologiques importants (LaPlante et al., 2002; LaPlante et al., 2004).

### **1.5) De l'activation de certains canaux membranaires à la modulation de l'expression génique**

Certains travaux ont permis de mettre en évidence l'importance de la voie d'entrée du calcium dans la cellule pour la modulation de l'expression génique dans les neurones.

Dès lors, les canaux voltages dépendants et les récepteurs canaux NMDA sont apparus comme des composants clés permettant de lier la dépolarisation (l'activité neuronale) qui est un phénomène membranaire, aux voies de transduction du signal intracellulaire acheminant ce signal jusqu'au noyau. L'information membranaire va dans certains cas être codée par l'activation préférentielle de certains effecteurs et l'activation spécifique de cascades moléculaires en fonction du chemin d'entrée du calcium (Bading et al., 1993). Mais depuis peu, les études montrant le couplage direct et physique de certains effecteurs aux canaux commencent à émerger. D'abord, la majorité des études se sont attachées à montrer que ce sont les canaux de type L qui participent à la plupart de l'influx calcique à l'origine de la modulation de l'expression génique dépendante de l'activité (Bading et al., 1993). Ces canaux s'inactivent lentement et sont couplés directement à des effecteurs calciques tels que la calmoduline et la CaMKinaseII. Suite à une dépolarisation par le KCl, l'influx de calcium par les canaux de type L permet la phosphorylation activatrice sur le long terme du facteur de transcription CREB et déclenche la transcription du gène c-fos (Bading et al., 1993; Dolmetsch et al., 2001). Ces auteurs se sont aussi intéressés à la cinétique de phosphorylation du facteur de transcription CREB suite à cette dépolarisation. Il a pu être observé que la dépolarisation passant par l'activation de canaux L permettait une phosphorylation de CREB observable à long terme alors que l'activation des autres canaux voltage dépendants ne permet pas de maintenir cet état phosphorylé (Brosenitsch et Katz, 2001; Dolmetsch et al., 2001). Cette phosphorylation prolongée passe par le relais du signal membranaire par la calmoduline ancrée spécifiquement au canal L et qui interagit avec une partie du domaine C terminal de la sous unité  $\alpha$  du canal. Le signal est ensuite relayé au noyau par la voie des MAP Kinases Erk1 et 2.

Cependant l'entrée de calcium par les types L n'apparaît pas comme la seule importante pour la modulation de l'expression génique.

En fonction du profil de la stimulation neuronale (par exemple, la fréquence de stimulation), ce sont des voies différentes qui vont être recrutées pour relayer le signal vers le noyau. En effet, les canaux voltage dépendants possèdent des propriétés d'activation et d'inactivation qui leur sont spécifiques. Ainsi, différents profils d'activité des neurones vont solliciter différentes voies d'entrée du calcium dans la cellule et mener à la régulation de l'expression génique. Une dépolarisation chronique par une forte concentration en  $K^+$  extracellulaire induit l'expression dépendante de l'entrée de calcium par les canaux de types L, alors qu'une augmentation de l'expression de certains gènes peut aussi être obtenue en réponse cette fois à

une stimulation électrique par des trains de dépolarisation. Celle-ci passerait alors par les canaux de type N et plus par les L (Brosenitsch et Katz, 2001). Il semble d'ailleurs que, dans les deux cas les voies de transduction du signal sollicitées soient différentes puisque la dépolarisation au  $K^+$  met en jeu la voie des MAPK alors que le protocole de stimulation par trains de dépolarisation recrute la voie PKA/PKC.

D'autre part, une étude portant cette fois sur les canaux de type P/Q a montré que ces canaux étaient nécessaires à la régulation de l'expression du gène de la syntaxine 1A (Sutton et al., 1999). Dans ce cas, ce mécanisme passerait par la communication entre le canal et les réserves intracellulaires sensibles à la thapsigargine.

En plus des canaux voltage dépendants, le récepteur NMDA est lui aussi lié à la signalisation portant le signal jusqu'au noyau. Dans les neurones, le récepteur NMDA est présent à la fois au niveau du corps cellulaire et dans les régions synaptiques. Il s'avère qu'en fonction du type de récepteur NMDA sollicité (synaptique ou extrasynaptique) les effets sur la transcription vont être différents. L'activation des récepteur NMDA synaptiques induit une activation robuste de la transcription dépendante de CREB alors que l'activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques inhibe la transcription dépendante de CREB et conduit à la mort cellulaire (Hardingham et al., 2002). Les auteurs attribuent la différence observée entre ces deux populations de récepteurs à leur composition moléculaire différente, leur permettant d'être couplés à des voies de signalisations différentes. Les récepteurs NMDA synaptiques sont couplés à l'activation de la voie des MAPkinases ERKs alors que les extrasynaptiques activent au contraire une voie qui régule négativement les ERKs (Ivanov et al., 2006).

Chaque type de canal semble donc spécialisé dans des fonctions différentes et toutes ces expériences montrent comment la cellule est capable de lier l'activation de cascades de signalisation spécifiques à des activités électriques ou des stimuli chimiques données qui vont activer un type particulier de canal.

## **2) La libération de calcium à partir des réserves intracellulaires**

La membrane plasmique avec tous les canaux perméables au calcium dont elle se trouve équipée constitue donc un système dynamique dont le rôle ne se limite pas uniquement à réguler les échanges ioniques et particulièrement calciques avec le milieu extracellulaire. Il s'agit d'un système beaucoup plus complexe, siège d'interactions réciproques et permanentes avec les autres compartiments cellulaires. Dans ces compartiments, on dénote notamment, les

organites intracellulaires avec lesquels les interactions perpétuelles constituent un point clé en vue de l'élaboration des signaux calciques complexes nécessaires au codage pour la régulation des différentes fonctions cellulaires.

Dans les cellules nerveuses, c'est principalement l'entrée de calcium par les canaux membranaires qui a été étudiée et mise en avant pour la régulation des processus cellulaires liés au calcium. Cependant les réserves intracellulaires, leur organisation et leurs interactions pour la génération du signal constituent un élément primordial pour toute cellule de l'organisme et en particulier pour le neurone. Les cellules disposent de nombreuses réserves calciques internes constituées par la plupart de leurs organites (réticulum endoplasmique, mitochondries, enveloppe nucléaire, lysosomes, appareil de Golgi...) même si dans les neurones c'est surtout le rôle du réticulum et des mitochondries qui a été beaucoup étudié. Ces différents systèmes membranaires ne doivent pas être considérés comme des éléments isolés jouant chacun un rôle distinct dans la génération du signal calcique. En effet, il apparaît de plus en plus évident que ces organites sont en étroite collaboration et en perpétuelle interaction pour la gestion du signal calcique au sein de la cellule. Ces phénomènes d'interaction sont en grande partie responsables des caractéristiques non homogènes et tridimensionnelles (caractéristiques temporelles, spatiales et d'amplitude) du signal calcique.

### **2.1) Le réticulum endoplasmique**

Il s'agit du système membranaire qui constitue la réserve calcique principale, la plus étudiée et donc la plus connue jusqu' alors. Il représente une réserve sous forme d'un réseau qui s'étend pour les neurones jusque dans les prolongements les plus éloignés du corps cellulaire. Il va ainsi permettre de libérer du calcium de manière localisée aussi bien au niveau somatique que synaptique en vue de moduler des processus distincts. Dans l'espace luminal du réticulum, on trouve différentes « calcium binding proteins » (CaBPs) capables de séquestrer le calcium telles que la calréticuline et la calséquestrine. La concentration interne de calcium peut alors atteindre jusqu'à 500 $\mu$ M. Le remplissage de cette réserve est assuré en grande partie par des pompes de type « Sarco-Endoplasmique Reticulum Calcium ATPases » (SERCA), utilisant l'ATP. Ces pompes sont connues pour être sensibles à la thapsigargine et au 2,5-Di-tert-butylhydroquinone (DBHQ).

La libération de calcium par le réticulum est provoquée par différents messagers pour lesquelles il possède des récepteurs spécifiques.

### **2.1.1) Le récepteur à l'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R)**

Le premier des messagers libérant du calcium à avoir été découvert est l'IP<sub>3</sub> (Inositol Tri Phosphate), produit par la phospholipase C en réponse à certains stimuli extracellulaires. Cette synthèse résulte de l'activation par différentes hormones ou neurotransmetteurs de récepteurs couplés aux protéines G à 7 domaines transmembranaires ou à activité tyrosine kinase. Les récepteurs menant à la synthèse d'IP<sub>3</sub> sont généralement couplés à des protéines de type Gq. La protéine Gq active la phospholipase C qui provoque la synthèse d'IP<sub>3</sub> et de DAG à partir d'un lipide membranaire, le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate. L'IP<sub>3</sub> produit peut alors activer le récepteur à l'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) situé sur le réticulum endoplasmique, l'IP<sub>3</sub>R qui est composé de 4 sous unités et se présente sous 3 isoformes différentes : IP<sub>3</sub>R1, IP<sub>3</sub>R2, IP<sub>3</sub>R3. Chaque isoforme possède différents variants résultant d'épissage alternatif et montre des propriétés d'activation différentes.

La particularité de l'IP<sub>3</sub>R est qu'il nécessite pour son ouverture la présence d'IP<sub>3</sub> mais aussi du calcium qui agit comme un co-agoniste. L'activation par le calcium se définit par une courbe en cloche. Avec une certaine variabilité qui dépend de l'isoforme considérée, il apparaît qu'à concentration saturante d'IP<sub>3</sub>, le récepteur présente une activité faible à la concentration calcique cytoplasmique de repos (de l'ordre de 100nM). Sa probabilité d'ouverture augmente pour des concentrations en calcium cytosolique allant jusqu'à 1 µM, où elle semble maximale. Au-delà de 10 à quelques dizaines de micromolaires, cette probabilité d'ouverture chute (Foskett et al., 2007).

Récemment, un mécanisme permettant l'ouverture du récepteur à l'IP<sub>3</sub> par le calcium en l'absence d'IP<sub>3</sub> a été mis en évidence sur des noyaux d'ovocytes de xénope. Cette activation dépend d'une famille de protéines : les CaBPs (Calcium Binding Proteins), qui a d'abord été découverte dans les neurones mais qui semble être présente dans les autres types cellulaires. La CaBP1 est liée avec une forte affinité à l'IP<sub>3</sub>R. Cette protéine possède des motifs EF capables de lier le calcium en présence duquel elle est capable d'activer l'ouverture du récepteur en absence d'IP<sub>3</sub> (Kasri et al., 2004; Yang et al., 2002).

D'autre part, certains auteurs rapportent l'existence d'une régulation de l'IP<sub>3</sub>R par la quantité de calcium contenue dans le réticulum. Il semble que pour les concentrations calciques luminales importantes, la probabilité d'ouverture du récepteur se réduise (Bezprozvanny et Ehrlich, 1994). De plus, le récepteur s'inactiverait bien plus vite lorsque la concentration calcique luminale est importante (Thrower et al., 2000).

### **2.1.1) Le récepteur à la ryanodine (RyR)**

Le second récepteur présent au niveau réticulaire est défini par sa sensibilité à la ryanodine, un alcaloïde d'origine végétale. Il s'agit du Récepteur à la ryanodine (RyR) (pour revue (Fill et Copello, 2002; Rossi et Sorrentino, 2002)). Il en existe 3 isoformes : RyR1, RyR2, RyR3, composées chacune de 4 sous unités tout comme le récepteur à l'IP<sub>3</sub>. Cependant cet autre type de récepteur se distingue de l'IP<sub>3</sub>R par des mécanismes de régulation très différents. Il est modulé par la ryanodine, souvent utilisée lors des études pharmacologiques, qui l'active en provoquant de longue période d'ouverture du canal à des concentrations de l'ordre de 1 à quelques dizaines de micromolaires (Buck et al., 1992). Mais la ryanodine a aussi un effet inhibiteur pour des concentrations plus importantes de 100 à plusieurs centaines de micromolaires en bloquant le canal en configuration fermée (Pessah et Zimanyi, 1991). D'autre part, le RyR peut aussi être modulé par l'ADP ribose cyclique, un second messenger produit par des ADP ribosyl cyclases que nous évoquerons par la suite.

Les RyRs sont sensibles aux variations de calcium cytosolique mais aussi aux variations de la concentration calcique dans le compartiment luminal du réticulum. Ainsi, l'état de remplissage de la réserve serait aussi capable de réguler la libération de calcium vers le cytosol avec une sensibilisation à certains agonistes lorsque le réticulum est fortement chargé en calcium (Sitsapesan et Williams, 1997). Cette modulation pourrait avoir lieu directement par fixation du calcium sur des sites activateurs ou inactivateurs (Ching et al., 2000). Il aussi été proposé que le calcium luminal pouvait moduler le RyR indirectement en se fixant sur des protéines telles que la calséquestrine ou la junctine qui interagissent directement avec le RyR au niveau luminal (Beard et al., 2002; Szegedi et al., 1999; Zhang et al., 2001).

Du côté cytoplasmique les RyRs sont activés par de légères augmentations de la concentration calcique (1 à 10µM) à leur voisinage cytosolique. Les études concernant la régulation du RyR2 par le calcium sont abondantes, elles sont moins nombreuses pour le RyR1 et pratiquement inexistantes pour le RyR3. Celles-ci ont permis de déterminer que le RyR1 s'active pour des concentrations cytosolique de calcium allant jusqu'à 1mM au maximum, au-delà de celle-ci, il s'inactive (Meissner, 1994; Rios et Pizarro, 1991). Cette inactivation du RyR1 est dépendante du calcium mais elle serait aussi strictement liée à l'ouverture préalable du canal (Pizarro et al., 1997). Concernant le RyR2, le canal s'inactive pour des concentrations de calcium beaucoup plus importantes allant de 5 à 10 mM et qui ne sont probablement jamais atteintes dans le contexte cellulaire. Ainsi, dans les conditions physiologiques, les études montrent que celui-ci n'est pas soumis à un phénomène d'inactivation par le calcium (Lukyanenko et Gyorke, 1999). En effet, les récepteurs du type

RyR2 montrent un phénomène original qui a été qualifié d'adaptation au calcium (Fill et al., 2000; Györke et Fill, 1993; Orlova et al., 1996). Après une première stimulation la probabilité d'ouverture du canal diminue mais il ne s'agit pas d'une inactivation. Le canal ne se trouve pas dans un état réfractaire puisque si la concentration calcium augmente encore à son voisinage, celui-ci est capable de se ré-ouvrir.

### **2.1.3) La sensibilité au calcium des IP<sub>3</sub>Rs et des RyRs ainsi que leur organisation permet de générer des signaux complexes.**

Une des propriétés importantes et communes à ces deux types de récepteurs est leur sensibilité au calcium qui agit avec les messagers comme un modulateur contrôlant sa propre libération. Le calcium cytosolique selon sa concentration au voisinage des récepteurs module positivement ou négativement la libération de calcium par les IP<sub>3</sub>Rs et RyRs. Ces concentrations varient en fonction des isoformes considérées et certains mécanismes concernant cette modulation font encore l'objet de débats. La modulation par le calcium de sa propre libération confère une propriété intéressante et importante au réticulum : le CICR (Calcium Induced Calcium Release) qui va permettre à des libérations calciques localisées de se trouver amplifiées et d'être propagées à travers la cellule. Le pouvoir tampon pour le calcium du cytosol étant très élevé, il a été montré que la capacité du calcium à diffuser dans l'espace cytosolique était limitée. Le calcium ne peut donc pas se propager par simple diffusion dans le contexte cellulaire et les vagues calciques progressent de façon régénérative par CICR.

Les IP<sub>3</sub>Rs et les RyR sont organisés sous forme de groupes restreints de récepteurs appelés « cluster ». Ainsi, au niveau de ces clusters, des événements calciques élémentaires très localisés sont produits par l'ouverture des récepteurs. Ces événements calciques élémentaires, étudiés en imagerie calcique sont de deux types :

- Les « sparks », qui correspondent à l'ouverture d'un cluster de RyR, et qui ont été décrits dans le muscle cardiaque (Cannell et Soeller, 1999; Cheng et al., 1993). L'augmentation de Ca<sup>2+</sup> des sparks s'étend sur environ 2 µm et est très brève puisqu'elle met 10 ms à atteindre son maximum, puis 20 ms à diminuer de moitié. Cet événement peut s'arrêter de lui-même, grâce au pouvoir tampon du cytoplasme (Berridge, 2006; Bootman et al., 2001).
- Les « puffs » sont provoqués par l'ouverture d'un cluster d'IP<sub>3</sub>R (Berridge, 2006; Parker et al., 1996; Reber et Schindelholz, 1996; Yao et al., 1995). Ce sont des événements plus longs que les sparks, qui mettent 50 ms à atteindre leur maximum, et 2 à 300 ms à disparaître (Rizzuto et Pozzan, 2006).

La genèse d'évènements calciques élémentaires pourrait impliquer les RyR et les IP<sub>3</sub>R dans un même cluster (Boittin et al., 1998; Cancela et al., 2000; Cancela et al., 1998).

A partir de ces signaux calciques élémentaires se forment les signaux complexes donnant lieu à des élévations de Ca<sup>2+</sup> globales par transmission du signal d'un cluster de récepteurs à ses voisins. Les vagues calciques se propagent ainsi par un mécanisme « régénératif ». Ceci permet à un signal calcique de se propager à travers la cellule tout en limitant la quantité de calcium libérée dans l'espace cytosolique et en restant localisé sous forme de domaines de taille plus ou moins importante mais toujours finement contrôlés et correspondant à l'activation successive de pools restreints de récepteurs.

## **2.2) L'enveloppe nucléaire**

L'enveloppe nucléaire est un prolongement direct du réticulum endoplasmique. Ces deux compartiments sont donc en continuité au niveau luminal. Cette enveloppe nucléaire s'avère importante puisqu'elle délimite un espace particulièrement sensible aux variations de la concentration calcique. En effet dans le nucléoplasme, siège de la transcription génique, la concentration calcique doit être finement régulée puisque de nombreux facteurs de régulation de la transcription se trouvent être des effecteurs directement ou indirectement contrôlés par les variations du calcium.

L'enveloppe nucléaire est composée de deux membranes (externe et interne) qui délimitent un compartiment luminal. Cette lumière contient du calcium et pourrait constituer une réserve calcique qui, comme le réticulum endoplasmique serait mobilisée pour venir augmenter la concentration calcique nucléoplasmique. L'espace nucléoplasmique est en continuité avec le cytosol grâce aux pores nucléaires qui constituent des points d'interruption de la double enveloppe. Ces pores sont constitués d'un ensemble complexe de protéines qui délimitent à ce niveau un espace de transit entre le cytosol et l'espace interne du noyau. En effet, la membrane nucléaire constitue une barrière qui isole l'espace intranucléaire du reste de la cellule et le transit des molécules à travers les pores constitue un processus régulé. Il a été rapporté que les molécules de moins de 40 kDa étaient capables de passer passivement à travers les pores, alors que les autres faisaient l'objet d'un transport actif et régulé par des signaux de localisation nucléaire particuliers. Dans cette optique, l'enveloppe nucléaire était totalement perméable aux petites particules ioniques et notamment au calcium qui pouvait donc diffuser librement via les pores. Ainsi les variations de la concentration calcique dans le nucléoplasme devraient être le reflet de celles ayant lieu au niveau cytosolique (Brini et al., 1993; Nakazawa et Murphy, 1999; Shirakawa et Miyazaki, 1996). Cependant, il a été rapporté

par de nombreux auteurs, que tel n'était pas le cas. De nombreuses évidences montrent bien que la régulation de la concentration calcique au sein du noyau peut être régulée, ce qui n'est pas étonnant en regard de l'importance de ce cation pour la régulation de nombreuses fonctions nucléaires. Ainsi, en fonction de la situation et de l'état de la cellule, la perméabilité au calcium de l'enveloppe nucléaire pourrait être plus ou moins importante. Dans certains cas, l'augmentation du calcium nucléaire aurait une origine cytoplasmique (Carroll et al., 1994; Shirakawa et Miyazaki, 1996) et résulterait de la propagation au noyau de vagues calciques cytoplasmiques globales. Mais la question d'une diffusion passive aux travers des pores nucléaires a fait l'objet d'un important débat (Badminton et al., 1996; Badminton et al., 1995). En effet, les variations de la concentration calcique au sein du nucléoplasme ne seraient pas simplement le reflet des événements calciques cytosoliques par simple diffusion ionique mais l'enveloppe nucléaire pourrait constituer une barrière significative (Badminton et al., 1996; Badminton et al., 1998; Chamero et al., 2002; Lui et al., 1998a). Dès lors, certains sont en faveur d'une régulation de l'homéostasie calcique propre au noyau (Malviya et Rogue, 1998). De plus, il semble qu'en régulant le diamètre de ses pores, le noyau soit en mesure de moduler sa perméabilité aux ions et autres molécules (Bustamante et al., 2000; Greber et Gerace, 1995; Stehno-Bittel et al., 1995b). Les pores possèderaient au sein de leur structure un élément senseur de l'état de remplissage des réserves calciques, de sorte qu'une faible concentration intraluminaire causerait une diminution du diamètre des pores, et inversement (Greber et Gerace, 1992; Pante et Aebi, 1996; Perez-Terzic et al., 1996). Lorsque la réserve calcique nucléaire se vide, les pores peuvent devenir imperméables aux petites molécules et ne plus laisser transiter librement que les protéines de poids moléculaire inférieur à 3 kDa (Perez-Terzic et al., 1999; Stehno-Bittel et al., 1995b). Ainsi, la vidange de ces réserves par l'activation des récepteurs aux second messagers (IP<sub>3</sub>Rs ou RyRs) pourrait avoir un rôle dans la régulation du transport des molécules de 10 à 40 kDa à travers l'enveloppe nucléaire (Allen et al., 2000; Erickson et al., 2004; Lee et al., 1998), dans la rétention de certains facteurs comme la calmoduline dans le noyau ou encore pourrait s'opposer à l'entrée de composés provenant du cytosol (Carafoli, 2002; Craske et al., 1999). Afin de comprendre comment la concentration calcique dans l'enveloppe pouvait être régulée mais aussi son implication dans l'homéostasie calcique nucléoplasmique, de nombreux auteurs se sont attachés à explorer la biochimie de l'enveloppe nucléaire des cellules non excitables. Ils ont ainsi démontré la présence de la Sarco-Endoplasmique Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA), sensible à la thapsigargine, mais pas au DBHQ (2,5-Di-tert-butylhydroquinone), localisées sur la face externe de l'enveloppe (Gerasimenko et al., 1995;

Humbert et al., 1996; Nicotera et al., 1989), alors que leur présence sur la face interne reste débattue. D'autre part, des récepteurs de l'IP<sub>3</sub> (Cardenas et al., 2005; Echevarria et al., 2003; Humbert et al., 1996; Malviya et al., 1990) et de la ryanodine sensibles au cADPR (Adebanjo et al., 1999; Gerasimenko et al., 1995; Khoo et al., 2000; Marius et al., 2006) ont été identifiés sur la membrane interne. Les systèmes enzymatiques permettant la synthèse de ces second messagers tels que l'antigène de surface CD38 à activité ADP ribosyl cyclase pour le cADPR, la phospholipase C pour l'IP<sub>3</sub> ont également été mis en évidence sur cette même face interne (Adebanjo et al., 1999; Divecha et al., 1993; Khoo et al., 2000). Finalement, la libération du Ca<sup>2+</sup> nucléaire a été montrée sur des noyaux isolés de cellules telles que les hépatocytes, les ovocytes de xénope et la cellule acineuse pancréatique (Adebanjo et al., 1999; Gerasimenko et al., 2003; Gerasimenko et al., 1995; Khoo et al., 2000; Malviya et Rogue, 1998; Stehno-Bittel et al., 1995a). Tous ces éléments plaident en faveur de l'hypothèse d'une régulation en partie autonome de l'homéostasie calcique nucléaire. Des études effectuées dans des lignées cellulaires telles que les cellules HELA, les 3T3 ou les SKHep1 rapportent l'existence d'invaginations de l'enveloppe nucléaire dans l'espace nucléoplasmique. Ce « réticulum nucléoplasmique » serait la cible de la libération par les IP<sub>3</sub>Rs et les RyRs du calcium nucléaire (Clubb et Locke, 1998; Echevarria et al., 2003; Lui et al., 2003; Marius et al., 2006). De manière étonnante, dans les cellules excitables, encore peu d'études relatent une telle autonomie du noyau pour la régulation du signal calcique nucléaire. Dans les cellules musculaires, des IP<sub>3</sub>Rs et des RyR sont présents au niveau de la membrane interne de l'enveloppe et l'IP<sub>3</sub> est capable de mobiliser le calcium de l'enveloppe nucléaire (Cardenas et al., 2005). Concernant les neurones, la présence de récepteurs à l'IP<sub>3</sub> fonctionnels sur la membrane interne de l'enveloppe a pu être récemment démontrée dans les cellules de Purkinje (Marchenko et al., 2005).

Ainsi, cette régulation autonome par le noyau du calcium nucléoplasmique apparaît commune à tous les types cellulaires. Ce mécanisme semble donc de première importance pour la physiologie cellulaire en général, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. En effet, chez les plantes, l'enveloppe nucléaire constitue une barrière qui peut isoler le noyau des variations calciques cytosoliques. Elle peut, comme dans les cellules animales, capter le calcium via un mécanisme dépendant de l'ATP (Bunney et al., 2000). Dans les cellules de tabac, le noyau est capable de générer un profil calcique différent du cytosol et pouvant varier en fonction du stimulus que la cellule doit encoder (Pauly et al., 2001; Pauly et al., 2000). Finalement, des expériences sur des noyaux isolés à partir de ce même type cellulaire montrent que le noyau est capable de réagir par une libération de calcium dans le

nucléoplasme. Les noyaux sont sensibles à la température uniquement à pH alcalin et à une stimulation mécanique uniquement à pH acide (Xiong et al., 2004).

### **2.3) Les mitochondries**

Les mitochondries sont capables d'accumuler le calcium. Et si au repos la concentration calcique dans la matrice mitochondriale est voisine de celle trouvée dans le cytosol, elle peut atteindre 50 à 100 $\mu$ M en période d'activité cellulaire lorsque la mitochondrie capte le calcium cytosolique (Arnaudeau et al., 2001). L'augmentation calcique mitochondriale est impliquée dans des processus particuliers assurés par la mitochondrie tels que la production d'ATP ou la mort cellulaire. Mais les mitochondries ont un autre rôle d'une importance majeure pour la physiologie cellulaire. Elles apparaissent comme des acteurs qui, en interagissant avec les autres organites, participent à l'élaboration du profil spatiotemporel du signal calcique (Rizzuto et al., 2004; Rizzuto et al., 1998). Les mitochondries échangent du calcium avec le milieu cytosolique grâce à trois types de transporteurs calciques. Le premier est un uniport activé par le potentiel membranaire mitochondrial, lui permettant d'incorporer le calcium. Il est caractérisé par sa faible affinité ( $K_{1/2}$  = 20 à 50 $\mu$ M) pour le calcium (Chad et Eckert, 1984), qui confère à la mitochondrie son pouvoir tampon pour des augmentations fortes du calcium cytosolique rencontrées au niveau de certains microdomaines. Son activation débute pour des concentration de 2 à 5 $\mu$ M et il se trouve saturé à environ 100 $\mu$ M de calcium (Villalobos et al., 2002). La question de la modulation de cet uniport, de première importance pour la physiologie cellulaire se pose encore. Des composés tels que des flavonoïdes végétaux, des oestrogènes de synthèse, ou l'inhibiteur de la MAP kinase P38 (le SB202190) (Lobaton et al., 2005; Montero et al., 2004; Montero et al., 2002) qui ont des propriétés structurales communes sont capables d'activer l'uniport en augmentant son affinité pour le calcium. Il est étonnant qu'aucun modulateur endogène n'ait encore pu être mis en évidence étant donné que l'uniport semble constituer un élément clé de la physiologie cellulaire en tamponnant les microdomaines calciques dans la cellule. En effet, dans les hépatocytes, il a été montré que les mitochondries étroitement associées au réticulum captent le calcium au voisinage de l' $IP_3R$ , et suppriment le feedback positif (CICR) exercé par le calcium, limitant ainsi le calcium libéré par des concentration submaximales d' $IP_3$  (Hajnoczky et al., 1999; Rizzuto et Pozzan, 2006). Ceci permettrait de limiter la vitesse de propagation des vagues calciques, comme cela a été montré dans les astrocytes (Boitier et al., 1999). Dans la cellule acineuse pancréatique, les mitochondries ont un rôle important puisqu'elles permettent de limiter la diffusion du calcium dont la concentration augmente au pôle apical de la cellule lors de la sécrétion des

granules. Sans cette barrière qui confine le calcium au niveau apical l'augmentation de calcium induite par la stimulation hormonale se propage jusqu'au pôle basal et envahit le noyau (Collins et al., 2002; Park et al., 2001; Tinel et al., 1999)

A l'inverse, dans d'autres systèmes cellulaires tels que l'ovocyte de xénope, le pompage du calcium par les mitochondries a pour effet d'augmenter la fréquence des oscillations calciques en réduisant l'inactivation par le calcium de l'IP<sub>3</sub>R (Jouaville et al., 1995).

Récemment, il a été montré dans les cellules Hela que la navette calcique entre mitochondries et réticulum peut être à la base d'une activité de type pacemaker (Ishii et al., 2006). Lors de la première oscillation générée par le réticulum, le calcium est capté par les mitochondries. Lors de sa restitution vers le réticulum par les échangeurs 3Na<sup>+</sup>/1Ca<sup>2+</sup>, il active les récepteurs à l'IP<sub>3</sub>, provoquant une vague régénérative et ainsi une seconde oscillation. Le mécanisme semble capable de s'auto entretenir jusqu'à ce que le calcium mitochondrial soit épuisé.

Outre, cette communication avec le réticulum, les mitochondries viennent aussi interagir avec les canaux calciques de la membrane plasmique pour réguler leur activité. Elles sont capables de réguler le courant capacitif I<sub>CRAC</sub> à deux niveaux. D'une part, en captant le calcium à proximité de la membrane, elles empêchent l'inactivation lente par le calcium de ce courant (Gilabert et Parekh, 2000; Hoth et al., 2000; Malli et al., 2003a; Malli et al., 2003b). D'autre part, elles entrent en compétition avec les pompes SERCA du réticulum et s'opposent au recaptage du calcium vers cette réserve. Ceci permet d'atteindre plus facilement le seuil critique de déplétion de la réserve réticulaire en dessous duquel l'IC<sub>CRAC</sub> est activé (Gilabert et al., 2001; Gilabert et Parekh, 2000).

L'inactivation des canaux voltage dépendants de type L, N, P/Q de la membrane de cellules excitables telles que les cellules chromaffines ou les cardiomyocytes pourrait aussi être régulée par les mitochondries qui en captant le calcium semblent permettre une plus large activation de ces canaux (Hernandez-Guijo et al., 2001; Sanchez et al., 2001).

En plus de capter le calcium cytosolique, une autre propriété intéressante des mitochondries est qu'elles peuvent restituer le calcium qu'elles capturent vers le cytosol. On y trouve deux autres transporteurs constituant des systèmes d'extrusion du calcium. Le premier est un antiport électrogénique 3Na<sup>+</sup>/1Ca<sup>2+</sup> et le second un antiport H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (Bernardi, 1999). Ainsi, les mitochondries permettent le recyclage du calcium libéré par le réticulum et qu'elles ont accumulé (Rizzuto et Pozzan, 2006). Elle permettraient aussi de remplir le réticulum en captant le calcium entrant à proximité de la membrane plasmique et en le transférant au réticulum (Arnaudeau et al., 2001). Cette restitution se fait via les échangeurs 3Na<sup>+</sup>/1Ca<sup>2+</sup>

capables de relarguer le calcium à proximité des ATPases du réticulum (Malli et al., 2003b; Malli et al., 2005).

#### **2.4) Les autres réserves**

D'autres systèmes membranaires cellulaires constituent des réserves calciques. C'est le cas des réserves acides pour lesquelles cet aspect est de plus en plus étudié. Chez les invertébrés tels que l'oursin, les granules de sécrétion, équivalents des lysosomes des mammifères ont été caractérisés en tant que réserves calciques mobilisables par le NAADP (Churchill et al., 2002). D'autre part, dans le pancréas de mammifère, les granules de sécrétion d'insuline et les lysosomes constituent des réserves calciques mobilisables par l'activation de RyRs sensibles au cADPR et au NAADP (Mitchell et al., 2003; Mitchell et al., 2001; Yamasaki et al., 2004). Au niveau du pancréas exocrine, ce sont les granules de zymogènes et les lysosomes, riches en calcium, qui peuvent être mobilisés via l'IP<sub>3</sub>R et le RyR et dont le mode de remplissage a été caractérisé comme insensible à la thapsigargine (Gerasimenko et al., 1996; Menteyne et al., 2006; Yamasaki et al., 2005). Concernant les neurones, il est intéressant de noter que les vésicules synaptiques sont capables de stocker du calcium. Cependant le rôle de cette réserve potentielle reste encore peu connu (Pinton et al., 1998). Les neurones comme les astrocytes possèdent aussi des réserves calciques acides de type lysosomale, remplies grâce au gradient de proton créé par la V-ATPases, sensibles à la bafilomycine. Ces réserves sont mobilisables par le NAADP (Brailoiu et al., 2005; Heidemann et al., 2005).

Les cellules contiennent un autre système membranaire au sein duquel la quantité totale de calcium peut atteindre jusqu'à 0,3mM (Pinton et al., 1998). Il s'agit de l'appareil de Golgi (Rizzuto et Pozzan, 2006). Cependant son rôle dans la régulation du signal calcique cellulaire a été très peu exploré. Celui-ci possède un système de pompage actif du calcium cytosolique constitué par deux composantes : l'une de type SERCA (sensible à la thapsigargine) et l'autre insensible à la thapsigargine dont l'identité reste inconnue (Pinton et al., 1998). De plus, dans les cellules HELA, l'ATP et l'histamine, deux agonistes provoquant une synthèse d'IP<sub>3</sub> mobilisent du calcium à la fois du réticulum endoplasmique mais aussi de l'appareil de Golgi. Les auteurs proposent donc l'appareil de Golgi comme une autre réserve sensible aux messagers intracellulaires tels que l'IP<sub>3</sub> et pour laquelle la cinétique de libération du calcium semble différente de celle du réticulum (Missiaen et al., 2004).

## **PARTIE III**

### **Le NAADP, nouvel acteur pour la transduction du signal calcique**

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la libération de calcium de la réserve nucléaire induite par les trois second messagers (IP<sub>3</sub>, cADPRibose et NAADP) et plus particulièrement à celle induite par le NAADP. Finalement, dans le travail initié au cours de la dernière partie de ma thèse, c'est de manière plus générale à l'exploration de son rôle dans les cellules nerveuses que je me suis intéressée. Dans les neurones ainsi que dans d'autres types cellulaires, les variations de la concentration de calcium sont impliquées dans de nombreux mécanismes. Ainsi, le NAADP un second messenger, au mécanisme d'action encore peu connu apparaît de plus en plus comme un acteur majeur de la signalisation calcique cellulaire dans les autres types cellulaires. Même si le calcium a une importance cruciale dans la physiologie neuronale, jusqu'à présent, la plupart des travaux concernant le NAADP ont été effectués sur d'autres modèles cellulaires plus simples pour tenter de caractériser, le mode de fonctionnement de ce messenger.

#### **1) Le NAADP, un messenger récemment découvert**

Le premier article relatant du NAADP, ainsi que du cADPR comme agents capables de libérer du calcium date de 1987. Les auteurs montrent que certains nucléotides pyrimidiques tels que le NAD (Nicotinic Adenine Dinucléotide) et le NADP (Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate), utilisés à plusieurs dizaines de  $\mu\text{M}$ , sont capables de libérer du Calcium à partir de microsomes d'oursins (Clapper et al., 1987). Les molécules actives sont selon eux, des métabolites résultant de la transformation de ces deux composés. Ils mettent notamment en évidence que le dérivé obtenu suite à l'alcalinisation du NADP (le A-NADP) possède un pouvoir libérateur de  $\text{Ca}^{2+}$  30 fois supérieur à celui du NADP lui-même. De plus la réserve mobilisée dans ce cas est physiquement différente de celle mobilisée par l'IP<sub>3</sub> et le cADPR.

Plus tard, ils parviennent à purifier et identifier cet agent : il s'agit du NAADP (Lee et Aarhus, 1995), qui avec une concentration efficace de l'ordre de quelques dizaines de nanomolaires, apparaît alors comme le messenger le plus puissant pour la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Cancela, 2001; Cancela et al., 2003; Galione et Churchill, 2002; Patel et al., 2001).

Le cADPR a été lui aussi découvert en 1987 en tant que messenger dérivé du NAD et également capable de mobiliser du calcium des réserves intracellulaires (Clapper et al., 1987).

Quelques années plus tard, sa structure a pu être déterminée (Lee et al., 1994; Lee et al., 1989). De plus, sa cible (le RyR) et son action (mobilisation du calcium du réticulum endoplasmique) ont pu être caractérisées bien plus rapidement (Galione et al., 1991; Noguchi et al., 1997; Walseth et al., 1993) que celle du NAADP pour lequel de nombreuses questions, concernant notamment son site de fixation et son mode de fonctionnement, restent encore sans réponse.

### **1.1) Rôles physiologiques du NAADP**

Dans un premier temps, la question de savoir si le NAADP pouvait être considéré comme un second messenger est restée en suspens. En effet, pour cela, la molécule doit répondre à un certain nombre de critères. Elle doit être impliquée dans des processus physiologiques, un stimulus extérieur doit être à l'origine d'une synthèse endogène du composé et celui-ci doit se fixer sur un récepteur défini.

Le NAADP, depuis sa découverte a été impliqué dans un nombre de processus physiologiques croissant. Chez le mammifère, l'action du NAADP a été montrée pour la première fois dans les cellules acineuses pancréatiques dans lesquelles son rôle essentiel, dans la génération des pics calciques générés par l'hormone CCK, a été mis en évidence (Cancela, 2001; Cancela et al., 1999; Cancela et al., 2000; Cancela et al., 2002).

Depuis ce travail, l'effet du NAADP comme générateur de signaux calciques a été rapporté dans un nombre croissant de processus tels que la fécondation chez l'étoile de mer (Santella et al., 2000), la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas (Johnson et Mislér, 2002; Mitchell et al., 2003), l'activation lymphocytaire (Berg et al., 2000). Le NAADP a aussi une action sur les microsomes de cerveau et de cœur de rat (Bak et al., 2001).

Cependant, la question de savoir si le NAADP pouvait être considéré comme un second messenger s'est longtemps posée. En effet, même si son action avait été démontrée dans de multiples types cellulaires, il restait à prouver que la production de NAADP pouvait résulter d'une stimulation physiologique.

C'est dans l'œuf d'oursin, qu'il a d'abord été montré que l'activation de l'œuf résultant du contact avec le spermatozoïde induit une multiplication par 5 de la quantité de NAADP dans le gamète mâle (Churchill et al., 2003).

En plus des études consacrées à la mesure de l'activité de l'enzyme de synthèse du NAADP, des techniques permettant la mesure des taux endogènes de NAADP sont apparues. Dès lors, les études montrant une augmentation in vivo du taux endogène de NAADP après stimulation de la cellule par des agonistes se sont multipliées dans les divers types cellulaires où l'action

du NAADP avait pu être caractérisée. Depuis, la liste des agonistes recrutant la voie du NAADP grandit régulièrement. En 2003, Masgrau et ses collaborateurs (Masgrau et al., 2003) montrent pour la première fois dans une cellule de mammifère qu'un stimulus extérieur est à l'origine d'une stimulation de la synthèse endogène du NAADP. Ils mettent en évidence que la stimulation par le glucose de cellules MIN-6 (une lignée de cellules  $\beta$  pancréatiques) est à l'origine d'une augmentation du NAADP associée à une libération de calcium permettant la libération d'insuline.

Il a ensuite été mis en évidence que la cholecystokinine (CCK) provoque une synthèse rapide et transitoire de NAADP à l'origine de la libération de calcium nécessaire à la sécrétion des enzymes digestives par le pancréas (Yamasaki et al., 2005).

Dans un tout autre type cellulaire, le lymphocyte T, le NAADP est capable d'induire un signal calcique nécessaire à l'activation lymphocytaire. Cette activation est consécutive à la stimulation du complexe TCR/CD3 qui est capable d'induire une augmentation du taux endogène de NAADP (Gasser et al., 2006). L'élévation de calcium intracellulaire qui suit est essentielle à la prolifération et à l'expansion clonale et passe aussi par l'action de l' $IP_3$  et du cADPR. Cependant, une concentration auto désensibilisante de NAADP bloque cette élévation du calcium, soulignant ainsi le caractère essentiel du NAADP dans ce mécanisme (Berg et al., 2000).

Le NAADP semble aussi avoir un rôle important dans la régulation de la concentration calcique au sein du muscle lisse. Ainsi, dans le muscle lisse de la paroi artérielle, le taux de NAADP intracellulaire augmente suite à l'exposition de la cellule à l'endothéline (Kinnear et al., 2004) et dans le myomètre, le signal calcique induit par l'histamine est dépendant du NAADP (Soares et al., 2007).

Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur l'implication du NAADP dans le signal calcique au sein d'un type cellulaire bien particulier: le neurone.

L'effet du NAADP dans les neurones a été observé pour la première fois dans notre laboratoire (Chameau et al., 2001) sur le modèle que j'ai choisi en vue de mon travail de thèse: la cellule neuronale d'aplysie. Les auteurs montraient que le NAADP augmentait le nombre de quanta d'acétylcholine libérés par un potentiel d'action évoqué dans un neurone présynaptique du ganglion buccal (Chameau et al., 2001).

Depuis, certains ont tenté d'explorer les mécanismes dans lesquels le NAADP pouvait jouer un rôle dans les neurones. Suite à l'ajout de NAADP contenu dans des liposomes ajouté au milieu extracellulaire, il pourrait être impliqué dans le contrôle de la croissance neuritique des

neurones néocorticaux de rat en réponse au sérum et au NGF (Brailoiu et al., 2005). Selon ce groupe, l'addition exogène de NAADP serait capable de produire un signal calcique suffisant pour orienter la différenciation des cellules de la lignée PC12 vers un phénotype neuronal (Brailoiu et al., 2006). Cependant, aucune étude n'a encore permis de montrer que le NAADP pourrait être impliqué dans une fonction physiologique neuronale précise et comment son action pourrait être déterminante pour une fonction neuronale particulière. De plus, aucun stimulus extérieur n'a pu être relié à une synthèse de NAADP par les cellules neuronales. Dans le cadre plus large du système nerveux central, il a même été récemment rapporté que le NAADP ajouté dans le milieu extracellulaire libérait du calcium dans les astrocytes, bien que son mode d'action reste inconnu (Heidemann et al., 2005; Singaravelu et Deitmer, 2006).

**Dans les cellules nerveuses, le NAADP pourrait être un acteur important puisque le calcium est connu depuis longtemps pour son rôle décisif dans la régulation de la plupart des fonctions neuronales. Même si les enzymes impliquées dans sa synthèse ne sont pas encore toutes connues, le NAADP pourrait donc constituer un nouvel élément dont l'importance et le rôle au sein de ce type cellulaire bien particulier restent à démontrer.**

## **1.2) Mécanisme d'action du NAADP : quelles réserves et quel récepteur ?**

### **1.2.1) Le récepteur au NAADP**

La première évidence ayant laissé penser que le NAADP pourrait activer un récepteur distinct de l'IP<sub>3</sub>R ou du RyR est la pharmacologie de la libération de Ca<sup>2+</sup> induite par le NAADP qui dans de nombreux types cellulaires est différente de celle de l'IP<sub>3</sub> ou du cADPR (Chini et al., 1995; Genazzani et al., 1997; Lee et Aarhus, 1995; Perez-Terzic et al., 1995). Cependant la nature du récepteur au NAADP reste encore un sujet de débat. Le NAADP active-t-il un récepteur encore non purifié, qui lui est spécifique et qui pourrait être la mucopolysaccharide 1 (Zhang et Li, 2007) ? Ou, est-il un modulateur supplémentaire du récepteur à la ryanodine comme le prétendent toujours certains?

En plus d'activer un récepteur qui lui serait propre, des auteurs suggèrent que le NAADP peut moduler le récepteur à la ryanodine de type I du muscle squelettique chez le lapin lorsqu'il est placé en bicouche lipidique (Hohenegger et al., 2002) ou le RyRII dans des microsomes de tissu cardiaque chez le chien (Mojzisoava et al., 2001). Il reste à savoir si cette modulation est directe ou indirecte?

La difficulté liée à ce sujet provient du fait que selon le type cellulaire étudié, et selon le choix expérimental (travail sur cellules intactes ou sur des microsomes) la pharmacologie semble être un peu différente. **Il ressort cependant de toutes ces études que le récepteur du NAADP possède des propriétés bien différentes de celles des RyRs ou des l'IP<sub>3</sub>Rs.**

#### Autodésensibilisation du récepteur

Le premier agent rapporté comme inhibiteur du récepteur au NAADP est le NAADP lui-même. Chez l'oursin, le NAADP est capable d'auto désensibiliser son récepteur à des doses faibles, infraliminaires. Ceci est en accord avec les études montrant qu'il existe au niveau du récepteur un site spécifique (Patel et al., 2001) auquel le NAADP se fixe de façon irréversible. De manière étonnante, dans la cellule de mammifère, les mécanismes de désensibilisation sont différents de ceux rencontrés chez l'oursin: ce sont les concentrations fortes de NAADP de l'ordre du  $\mu\text{M}$  qui permettent d'obtenir une désensibilisation du récepteur dans les cellules intactes (Cancela et al., 2003). Cette propriété d'auto désensibilisation du récepteur au NAADP a d'ailleurs été utilisée pour montrer le rôle du NAADP en tant que messenger calcique dans la cellule acineuse pancréatique (Cancela et al., 1999). Ceci suggère qu'il pourrait exister différentes isoformes du récepteur au NAADP qui aurait donc évolué de l'oursin au mammifère.

#### Insensibilité au calcium

Par opposition aux IP<sub>3</sub>Rs ou aux RyRs dont une propriété importante est leur sensibilité au calcium, le récepteur au NAADP semble y être insensible. Celui-ci ne peut donc pas être recruté par CICR, ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur d'un récepteur indépendant (Chini et Dousa, 1996; Patel et al., 2000a).

#### Insensibilité aux antagonistes des IP<sub>3</sub>Rs et RyRs

Toutes ces données sont renforcées par le fait qu'il a été montré sur des microsomes d'œufs d'oursins que des doses désensibilisantes d'IP<sub>3</sub> et de cADPR ainsi que les antagonistes spécifiques de leurs récepteurs (IP<sub>3</sub>R et RyR) n'ont pas d'effet sur la réponse au NAADP (Chini et al., 1995; Lee et Aarhus, 1995; Perez-Terzic et al., 1995). Cette insensibilité aux antagonistes des IP<sub>3</sub>Rs ou RyRs se retrouve dans les microsomes de cerveau et de cœur (Bak et al., 2001; Bak et al., 1999). Cependant, lorsque les études pharmacologiques se basent sur des modèles de cellules intactes, la pharmacologie diffère de celle obtenue avec les microsomes. Dans l'œuf d'oursin intact, les oscillations induites par le NAADP sont

partiellement inhibées par le 8-NH<sub>2</sub>-cADPR ou l'héparine (antagonistes respectifs des RyRs et des IP<sub>3</sub>Rs). Les deux antagonistes utilisés en combinaison inhibent complètement la réponse au NAADP, indiquant que celui-ci recrute les RyRs et les IP<sub>3</sub>Rs (Churchill et Galione, 2001a). Dans les lymphocytes T l'injection de NAADP provoque des oscillations calciques et l'inactivation de sa voie par auto-désensibilisation bloque la réponse à la formation du complexe TCR/CD3. Ici, la réponse au NAADP est maintenue en présence d'héparine, un antagoniste des l'IP<sub>3</sub>Rs même si le profil de cette réponse est légèrement modifié. L'utilisation du 8-NH<sub>2</sub>-cADPR, un antagoniste de la fixation du cADPR sur les RyRs mais qui ne bloque pas le CICR n'a pas d'incidence sur la réponse (Berg et al., 2000). Les auteurs en déduisent donc que dans ce type cellulaire, la libération de calcium induite par le NAADP possède une composante purement NAADPR et une composante IP<sub>3</sub>Rs, alors que les RyRs ne sont pas recrutés. Cependant des expériences utilisant des combinaisons de ruthénium red et de ryanodine (d'autres antagonistes du RyR) ou encore des siRNA montrent que la réponse au NAADP requiert des RyRs fonctionnels (Dammermann et Guse, 2005; Hohenegger et al., 2002). Ces études soulignent alors bien l'implication des RyRs dans l'élaboration de la réponse au NAADP. Ainsi, même si dans un premier temps, les données pharmacologiques ont été difficiles à interpréter il en ressort l'existence d'un récepteur au NAADP bien différent des IP<sub>3</sub>Rs ou des RyRs.

#### Sensibilité à certains inhibiteurs déjà connus

Selon certaines études, la réponse au NAADP se trouve affectée par les antagonistes de canaux calciques de type L alors que ceux-ci n'ont pas d'effet sur les récepteurs à la ryanodine ou à l'IP<sub>3</sub> (Bak et al., 2001; Bak et al., 1999; Cancela et al., 2003; Galione et Petersen, 2005; Genazzani et Galione, 1997). Un autre composé: le SKF&96365, plus connu comme un inhibiteur de l'entrée de calcium extracellulaire bloquerait la réponse au NAADP dans les cellules intactes. Celui-ci pourrait inhiber une entrée secondaire de calcium induite par la réponse au NAADP (Langhorst et al., 2004; Moccia et al., 2003).

#### Caractérisation du récepteur au NAADP

Même si les nombreuses données pharmacologiques plaident en faveur de l'hypothèse d'un récepteur propre au NAADP, ce dernier n'est pas encore clairement identifié. Il a été déterminé par des expériences de binding avec du P<sup>32</sup>-NAADP dans des microsomes d'oeuf d'oursin que le NAADP avait un site de fixation spécifique avec un K<sub>d</sub> de 300 pM (Berridge et al., 2002; Patel et al., 2000b).

La protéine ou le complexe protéique liant le NAADP a pour l'instant été solubilisé à partir d'homogénats d'œufs d'oursins. Son poids moléculaire estimé à 470 kDa confirme qu'il s'agit d'un récepteur distinct des IP<sub>3</sub>Rs et RyRs pesant respectivement 1000 et 2000 kDa (Berridge et al., 2002; Bezin et al., 2006; Galione et Petersen, 2005).

Un article publié récemment apporte l'évidence que le canal TRP-like Mucolipine 1, principalement localisé au niveau des lysosomes serait un médiateur de la réponse au NAADP (Zhang et Li, 2007). Les auteurs caractérisent, au niveau pharmacologique, l'activité d'un canal provenant d'extraits de lysosomes. Ils montrent que ce canal est modulé directement ou indirectement par le NAADP, après son insertion en bicouche lipidique artificielle. La pharmacologie correspond bien à celle rapportée dans la littérature (inhibition par les antagonistes des canaux de type L et effet biphasique avec désensibilisation par de fortes concentrations de NAADP). Cependant, les auteurs insistent bien sur le fait qu'ils n'apportent aucune preuve directe que le TRP-like Mucolipine 1 soit le récepteur du NAADP. La question de son identité reste donc ouverte.

### **1.2.2) La réserve**

La première cellule où la libération de calcium par le NAADP a été mise en évidence est l'œuf d'oursin dans lequel le NAADP mobilise une réserve physiquement distincte de celle sensible à l'IP<sub>3</sub> et au cADPR et qui correspond aux granules de sécrétion. Ces granules constituent un compartiment acide, qui s'apparente aux lysosomes des cellules de mammifères. Depuis, il a été suggéré chez le mammifère que la réserve principale mobilisée de façon directe par le NAADP n'est pas le réticulum endoplasmique, comme cela peut être le cas pour l'IP<sub>3</sub> et le cADPR (Cancela et al., 1999; Lee, 2001; Lee et Aarhus, 1995). **Il s'agit plutôt d'une réserve acide de type lysosomal, non sensible à la thapsigargine** (Genazzani et Galione, 1997; Kinnear et al., 2004; Lee, 2001; Menteyne et al., 2006; Patel et al., 2001; Yamasaki et al., 2004) et assimilable aux granules de réserve de l'œuf d'oursin (Churchill et al., 2002).

Le pompage du calcium au niveau de cette réserve est dépendant d'un gradient de protons et s'effectuerait grâce à l'action de la V-H<sup>+</sup>-ATPase (sensible à la bafilomycine A) permettant l'acidification des lysosomes et granules de sécrétion, puis l'accumulation du calcium dans ces derniers par le biais d'un échangeur H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (Christensen et al., 2002).

Mais il semble de plus en plus évident que le lysosome, même s'il représente la réserve principale directement mobilisable par le NAADP, n'est néanmoins pas la seule. Les endosomes contiennent du calcium mobilisable par le NAADP (Menteyne et al., 2006). Le NAADP semble aussi capable de mobiliser directement mais de façon modérée, du calcium provenant du réticulum endoplasmique et des granules de sécrétion du pôle apical de la cellule acineuse pancréatique exocrine (Gerasimenko et al., 2006). De plus, dans ce modèle, la réserve sensible à la thapsigargine constituée par l'enveloppe nucléaire, prolongement du réticulum endoplasmique, est elle aussi mobilisable par le NAADP. (Gerasimenko et al., 2003). Dans des microsomes d'hépatocytes, le NAADP provoque là encore, une libération de calcium à partir d'un pool de réserve sensible à la thapsigargine et pas à la bafilomycine (Mandi et al., 2006). **Toutes ces expériences ont permis de montrer qu'en plus d'activer directement son propre récepteur, le NAADP mobilise de façon indirecte par « Calcium Induced Calcium Release » (CICR), les réserves sensibles à l'IP<sub>3</sub> et au cADPR. Celles-ci apparaissent alors comme une composante essentielle du signal calcique provoqué par le NAADP (Cancela, 2001; Cancela et al., 1999; Cancela et al., 2000; Churchill et al., 2002; Yamasaki et al., 2004).**

### **1.2.3) La libération de calcium induite par le NAADP**

Avec la découverte du NAADP, la diversité des messagers libérant du calcium des réserves intracellulaires ne cesse d'augmenter. Jusqu'alors, cette libération par l'IP<sub>3</sub> ou le cADPR était modélisée de façon très simple. Mais depuis peu, en réaction à la complexité apparente du signal calcique évoqué par le NAADP et de sa pharmacologie en cellules intactes, différents modèles ont été proposés afin de comprendre son mécanisme d'action au niveau cellulaire.

#### Apparition de la notion de coopération entre les messagers (figure 9).

Les études portant sur le mode d'action du NAADP dans les cellules intactes sont pour la plupart des études pharmacologiques. La difficulté dans la caractérisation de ce mode d'action a résulté du fait que la pharmacologie liée à ce messager semblait variable d'un type cellulaire à l'autre. Dans certains modèles tels que l'élément pré-synaptique de neurone d'Aplysie la réponse au NAADP est insensible à l'héparine et à la ryanodine (Chameau et al., 2001). Dans ce cas, le signal en réponse au NAADP semble purement composé du calcium induit par la libération initiée de façon directe par le NAADP se fixant sur son récepteur.

Dans la cellule acineuse pancréatique, la pharmacologie est bien différente puisque les antagonistes des IP<sub>3</sub>Rs et des RyRs bloquent chacun la réponse au NAADP. Cependant, le blocage du récepteur au NAADP n'affecte pas les réponses à l'IP<sub>3</sub> et au cADPR (Cancela et al., 1999). Ainsi, à la vue de ces données, il apparaît clairement que ce récepteur se distingue des IP<sub>3</sub>Rs ou des RyRs mais qu'il existe une interdépendance des réponses aux messagers. Ceci conduit à la notion de coopération entre ces messagers.

Une donnée importante est que le récepteur au NAADP présente un caractère réfractaire au mécanisme de CICR (Chini et Dousa, 1996). Ainsi, le NAADP aurait un rôle spécifique pour l'initiation du signal calcique en agissant en tant que déclencheur et produisant les étincelles nécessaires au recrutement consécutif des éléments amplificateurs constitués par les IP<sub>3</sub>Rs et/ou les RyRs du réticulum (Cancela et al., 1999; Cancela et al., 2000; Lee, 2000). Suite à ces études, un modèle plus détaillé a pu être proposé pour la cellule acineuse pancréatique selon lequel, le signal NAADP est initié dans la zone apicale de la cellule où coexistent les réserves sensibles au NAADP, les IP<sub>3</sub>Rs et des RyRs (Cancela, 2001; Cancela et al., 1999; Lee et al., 1997; Nathanson et al., 1994). Le signal NAADP est alors localement amplifié puis propagé par CICR à toute la zone basale de la cellule grâce au réticulum particulièrement riche en RyRs (Cancela, 2001; Cancela et al., 1999; Cancela et Petersen, 1998; Cancela et al., 2002; Lee et al., 1997; Leite et al., 1999; Nathanson et al., 1994).

Avec les premières études sur le NAADP est né un nouveau concept basé sur l'interaction et la coopération entre les différents messagers pour un contrôle fin du signal calcique intracellulaire. Ce nouveau concept de coopération peut expliquer les différences observées pour la pharmacologie de la réponse au NAADP en cellules intactes selon les modèles. En effet, dans le pancréas ou les lymphocytes T, les NAADPR, RyRs et IP<sub>3</sub>Rs semblent en coopération très étroite pour générer la réponse cellulaire. Cependant, dans les lymphocytes T la coopération se traduit différemment du pancréas où le blocage du récepteur au NAADP n'empêche pas la réponse à l'IP<sub>3</sub> et au cADPR et l'héparine affecte peu la réponse au NAADP. Ici, le blocage de la libération de calcium liée au NAADP (en l'utilisant à des concentrations désensibilisantes) bloque totalement les réponses à l'IP<sub>3</sub> et au cADPR (Berg et al., 2000). La réponse à l'IP<sub>3</sub> et au cADPR nécessite donc que le système de libération de calcium par le NAADP soit entièrement fonctionnel. Pour les auteurs, le rôle du NAADP serait de permettre le maintien d'une concentration calcique suffisante à proximité des récepteurs IP<sub>3</sub> et RyRs, pour lesquels le calcium agit en tant que co-agoniste. Le système serait ainsi maintenu dans un état « sensible » à ces messagers en leur permettant de déclencher un signal.

Les dernières années de recherche dans le domaine de la signalisation calcique ont permis de mettre en lumière ce concept important de coopération des récepteurs aux second messagers. Plus récemment est venu s'ajouter une autre notion, elle aussi apparue suite à l'étude du mécanisme d'action des différents messagers libérant du calcium: celle de la coordination des différentes réserves calcique cellulaires.

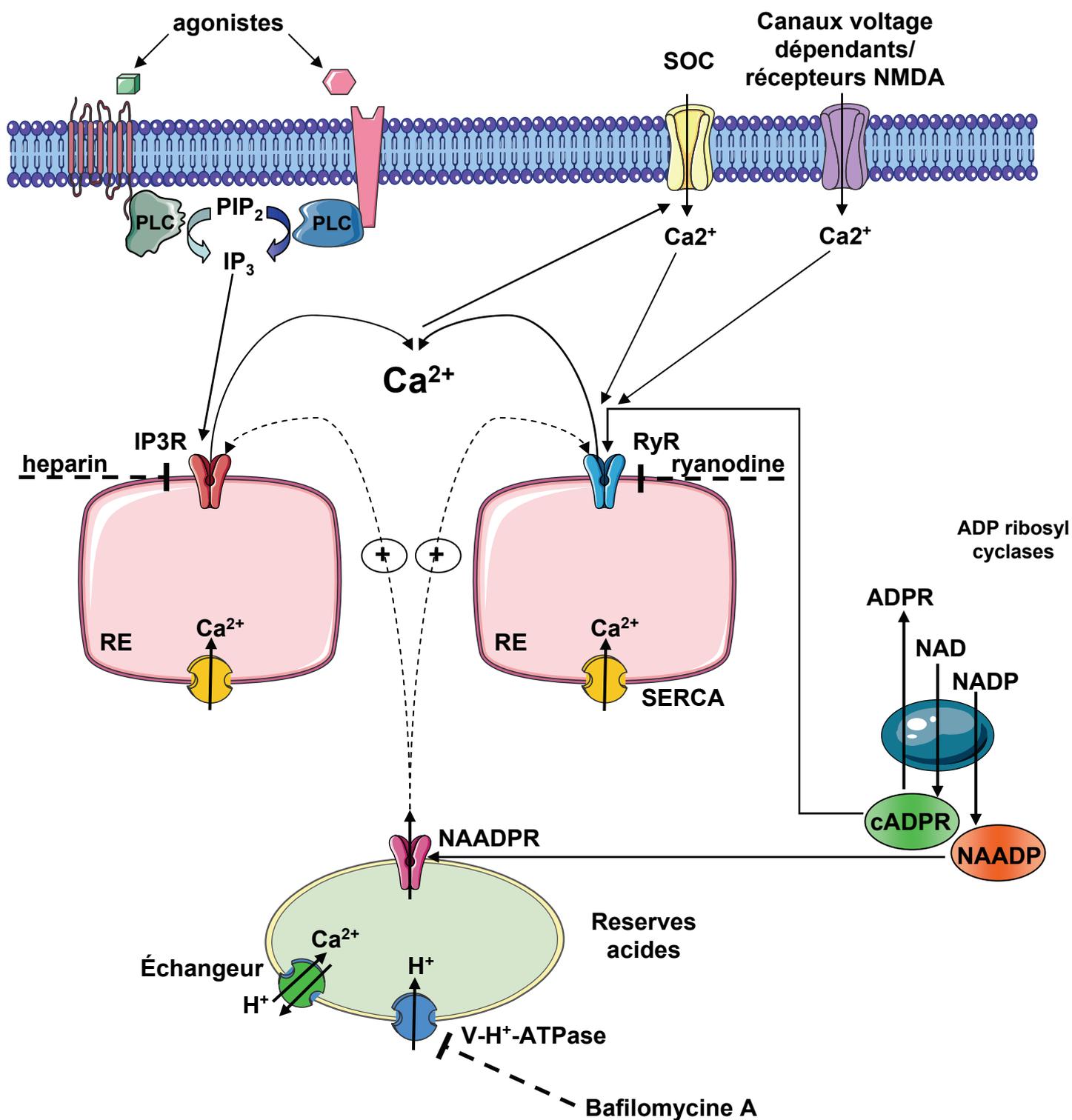
#### Le concept de coordination des différentes réserves (figure 9).

Dans un premier temps, un modèle simple dit « one pool model » a été proposé. Selon ce modèle, le NAADP libèrerait du  $Ca^{2+}$  du réticulum endoplasmique au même titre que l' $IP_3$  ou le cADPR (Cancela et al., 2000). Ce modèle donnait donc le rôle central à un seul organite contenant les récepteurs aux différents messagers pour l'élaboration du signal calcique par la cellule.

Cependant les auteurs se sont rendus compte que le mode d'action du NAADP semble être plus complexe et solliciter plusieurs réserves directement et indirectement. Un nouveau concept allant au-delà de la coopération des messagers et impliquant la coordination de différentes réserves intracellulaires par ces messagers est apparu. Selon ce dernier, appelé le « two pools model », le NAADP mobiliserait des réserves de type acide permettant ensuite le recrutement par CICR des récepteurs à l' $IP_3$  et à la ryanodine du réticulum endoplasmique, plus ou moins sensibilisés par leurs agonistes respectifs, pour provoquer une libération de calcium massive (Cancela et al., 2003; Churchill et Galione, 2001a; Gerasimenko et al., 2006; Menteyne et al., 2006; Yamasaki et al., 2004). Les réserves calciques acides mobilisées de façon directe par le NAADP seraient les granules de sécrétion et les lysosomes, voire même les endosomes. Ce sont donc eux qui représenteraient la composante initiatrice du signal. Le réticulum jouerait le rôle d'organite amplificateur en permettant la propagation du signal calcique. Finalement, il apparaît que l'entrée de calcium extracellulaire pourrait aussi être une autre composante amplificatrice du signal initié par le NAADP (Churchill et al., 2003; Langhorst et al., 2004; Lim et al., 2001; Moccia et al., 2006).

**Ce type de fonctionnement dépend étroitement de l'architecture cellulaire et d'un agencement spatial bien précis des différents acteurs du signal calcique que sont les réserves et les récepteurs qu'elles contiennent au sein de la cellule.**

**Ainsi, selon son type, chaque cellule est susceptible de présenter des caractéristiques organisationnelles différentes qui conduiront alors à des réponses calciques avec des**



**Figure 9. Les messagers intracellulaires libérant du Ca<sup>2+</sup>** Le Ca<sup>2+</sup> et l'IP<sub>3</sub> sont deux seconds messagers capables d'activer les RyRs et IP<sub>3</sub>Rs. La libération de Ca<sup>2+</sup> des réserves intracellulaires peut être provoquée par l'entrée de Ca<sup>2+</sup> au travers des canaux de la membrane plasmique. L'IP<sub>3</sub> est produit par des PLCs couplées à différents récepteurs membranaires. Le cADPR et le NAADP sont des seconds messagers découverts plus récemment. Ils sont synthétisés par l'ADP ribosyl cyclase, qui peut aussi hydrolyser le cADPR en ADPR. Le cADPR est un modulateur de la libération de Ca<sup>2+</sup> par les RyRs. Le NAADP provoque la libération de Ca<sup>2+</sup> des réserves acides en activant des récepteurs spécifiques qui n'ont pas été identifiés à ce jour. Le NAADP active indirectement les RyRs et les IP<sub>3</sub>Rs par CICR.

**caractéristiques distinctes. Ceci constituerait pour les cellules un moyen supplémentaire de parfaire et de spécifier un signal avec le nombre limité de composants dont elles disposent. Ce phénomène pourrait être à l'origine de la pharmacologie différente de la réponse au NAADP observée sur les divers types cellulaires étudiés et expliquer par exemple la sensibilité plus ou moins importante à la ryanodine ou à l'IP<sub>3</sub> de la réponse au NAADP (Cancela et al., 1999; Cancela et al., 2000; Churchill et Galione, 2001b; Dammermann et Guse, 2005).**

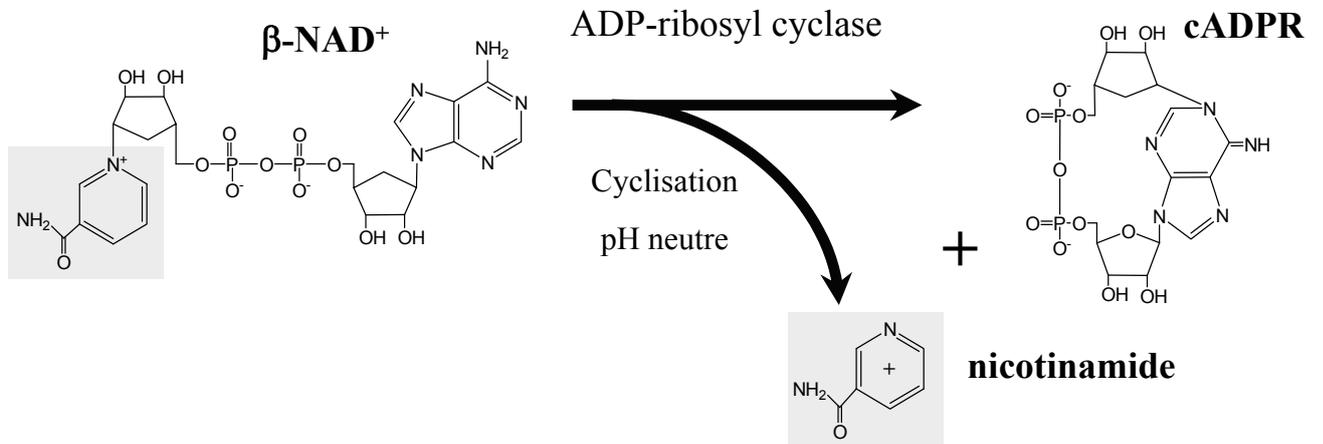
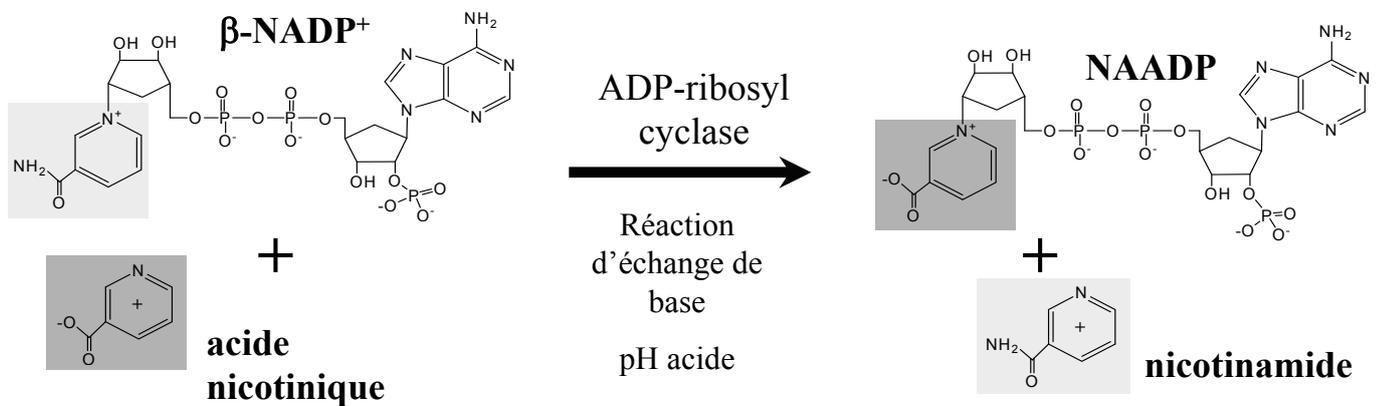
L'hypothèse d'un fonctionnement selon le type « two pool model » a été confirmée au sein de nombreux types cellulaires. Cependant, le NAADP peut être aussi à l'origine de libérations selon le mode « simple, one pool » par action directe sur une réserve de type réticulum. Cela a été démontré dans le cas particulier d'une préparation de noyaux isolés de cellules acineuses pancréatiques où le NAADP pouvait agir sur l'enveloppe nucléaire et libérer le calcium contenu dans cette réserve (Gerasimenko et al., 2003).

**Ainsi, même si l'élaboration de la réponse au NAADP et le recrutement des réserves calciques restent encore mal identifiés, il apparaît comme certain que la réponse au NAADP est basée sur une coopération étroite entre les différents récepteurs pouvant libérer du calcium au sein de la cellule (Cancela et al., 1999; Cancela et al., 2000).**

## **2) Les voies de synthèse du NAADP et leurs régulations**

### **2.1) Des enzymes pouvant synthétiser à la fois le NAADP et le cADPR**

Une découverte surprenante a été que les enzymes pouvant produire le cADPR sont aussi des enzymes capables de synthétiser un autre messager libérant du calcium : le NAADP (figure 10). Le NAADP et le cADPR sont ainsi les produits d'enzymes multi fonctionnelles appartenant à la famille des cyclases (Lee, 2001). Trois types de réactions peuvent être catalysées par ces dernières: la cyclisation, l'hydrolyse et l'échange de base. Par exemple, la cyclisation permet de produire le cADPR et le nicotinamide à partir du  $\beta$ -NAD. L'hydrolyse du  $\beta$ -NAD donne de l'ADPR (ADP ribose phosphate). La réaction d'échange de base entre le  $\beta$ -NADP et le NA (acide nicotinique) est à l'origine du NAADP et du nicotinamide. Une propriété étonnante des cyclases est que les produits générés par ces différentes réactions sont très variés. Ces cyclases sont qualifiées de « multifonctionnelles », il semble que selon leur type et les conditions cellulaires où elles se trouvent, chacune soit capable de synthétiser

**a****b**

**Figure 10. Synthèse du cADPR et du NAADP par l'ADP ribosyl cyclase.** A pH neutre, et en présence de NAD<sup>+</sup>, l'ADPribosyl cyclase produit par cyclisation de l'ADPribose cyclique. (a). A pH acide, et en présence de NADP et d'acide nicotinique, l'ADPribosyl cyclase produit par échange de bases du NAADP (b). Les deux voies ont comme sous-produit le nicotinamide.

préférentiellement certains produits et ce, dans des proportions différentes selon la forme considérée.

Les cyclases sont connues chez les espèces les plus simples telles que les invertébrés avec la cyclase d'éponge *Axinella polypoides*, du Plathelminthes *Schistosoma mansoni* et de l'Aplysie. Chez les mammifères, certains de ces enzymes ont été purifiés et clonés tels que les ectoenzymes CD38 et CD157 (aussi appelé BST1). En dépit de leurs 30% d'homologie, les trois cyclases purifiées sur lesquelles les chercheurs se sont focalisés: l'Aplysia cyclase, et les antigènes de surface CD38 et CD157, présentent des caractéristiques bien différentes. CD38 et CD157 sont aujourd'hui les seules identifiées chez le mammifère et leur rôle a surtout été souligné pour la synthèse du cADPR. Cependant, l'existence chez les mammifères d'une ou d'autres cyclases apparaît de plus en plus évidente.

### **2.1.1) L'Aplysia cyclase (Aplysia ADP ribosyl cyclase)**

Au cours de la partie de ma thèse effectuée sur les neurones d'Aplysie, c'est particulièrement sur une autre cyclase bien connue: l'*Aplysia* cyclase, que j'ai travaillé. L'Aplysie est un invertébré marin sur lequel des études pionnières portant notamment sur le rôle des microdomaines calciques dans la libération de neuromédiateurs et dans la plasticité synaptique ont été effectuées au laboratoire (Chameau et al., 2001; Fossier et al., 1999). Chez l'Aplysie, la cyclase a été bien étudiée et caractérisée. Il s'agit de la seule forme de cyclase soluble connue par opposition à CD38 et CD157 qui sont deux formes membranaires. Son poids moléculaire est de 29 kDa et elle est couramment appelée l'ADP-ribosyl cyclase (Lee, 2001).

### **2.1.2) CD38 (antigène de surface CD38)**

Le CD38 est une glycoprotéine membranaire de 42 kDa et est composée d'un seul segment transmembranaire. A l'origine, cette protéine, exprimée de façon importante dans les lymphocytes B et T, était surtout connue en tant que marqueur de différenciation. Il a ensuite été montré que cet antigène de surface CD38 possédait une activité ADP ribosyl cyclase et qu'il était exprimé dans d'autres types cellulaires et organes tels que le cerveau, le foie, la rétine ou encore le pancréas (Lee, 2001). Cependant, il s'avère que la synthèse du NAADP par CD38 a été observée uniquement *in vitro* et aucune évidence n'existe à l'heure actuelle prouvant qu'*in vivo*, cette cyclase soit capable de synthétiser le NAADP.

### **2.1.3) CD157 (antigène de surface CD157)**

Chez le mammifère une autre cyclase membranaire a été découverte, il s'agit de l'antigène de surface CD157 encore appelé BST-1 (Lee, 2001). Cette protéine possède un motif d'ancrage à la membrane de type glycosylphosphatidylinositol et est exprimée par les cellules stromales de la moelle osseuse. Son expression a été montrée dans d'autres types cellulaires comme les cellules du placenta, des poumons, du foie, des reins. Cependant, l'activité de CD157 pour la synthèse de cADPR est bien moins importante que celle de l'Aplysia cyclase et de CD38 (Hirata et al., 1994; Hussain et al., 1998) et son implication dans la synthèse de NAADP n'a pas été montrée.

### **2.1.4) D'autres cyclases à découvrir ?**

Pendant longtemps, CD38 était apparue pour la synthèse de cADPR, comme la principale cyclase présente dans le cerveau chez l'homme et le rat (Mizuguchi et al., 1995; Yamada et al., 1997) alors qu'aucun transcrite codant pour le CD157 n'avait été trouvé. Mais une étude menée chez des souris CD38 KO a montré l'existence dans le cerveau d'une activité permettant la synthèse de cADPR au niveau des membranes intracellulaires. Indépendante de CD38 et CD157, particulièrement active dans le cerveau en développement cette activité ADPribosyl cyclase, régulée par un mécanisme dépendant d'une protéine G, suggère l'existence d'une nouvelle cyclase (Ceni et al., 2003; Ceni et al., 2006) . Ainsi, dans les neurones, l'existence d'une cyclase s'apparentant pour son activité et sa régulation à celle trouvée chez l'Aplysie et pouvant synthétiser le NAADP est donc à considérer. En effet, dans d'autres modèles comme l'oursin, une forme soluble cohabite avec la forme membranaire et ne semble pas soumise à la même régulation (Graeff et al., 1998). Dans la cellule acineuse pancréatique, il apparaît aussi qu'en plus de CD38, un autre enzyme, soluble, encore non identifié présente une activité cyclase (Sternfeld et al., 2003). De même, la production de NAADP suite à la stimulation cellulaire dans le myomètre chez la souris s'avère être totalement indépendante de CD38 (Soares et al., 2007). Ainsi, l'activité cyclase trouvée au niveau du cytosol, et des organites intracellulaires correspond à l'activité de différents enzymes.

**Ceci laisse apparaître une certaine complexité, liée aux multiples formes que semble regrouper la famille des cyclases, et suggère une variété certainement importante des mécanismes et des fonctions cellulaires contrôlées par ces enzymes et leurs produits. Il ressort néanmoins que l'Aplysia cyclase est pour l'instant, la seule forme soluble de cyclase connue et clairement identifiée. Elle constitue dès lors le prototype sur lequel j'ai**

**basé mes travaux et qui a fait de la cellule nerveuse d'Aplysie un modèle de choix pour mon étude de la voie du NAADP dans les neurones.**

## **2.2) Quelles sont les réactions catalysées par ces cyclases ?**

Le type de réaction catalysée dépend du pH.

A pH neutre ou alcalin, la cyclisation du  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> et l'hydrolyse ont lieu préférentiellement.

La réaction de cyclisation permet la production de cADPR à partir du  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, alors que l'hydrolyse du  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> ou encore du cADPR donne de l'ADPR. Toutes les cyclases semblent produire le cADPR sauf celle de l'espèce *Schistosoma mansoni*, synthétisant seulement de l'ADPribose (Goodrich et al., 2005).

Les deux seules cyclases capables d'hydrolyser le cADPR sont la CD38 et la CD157 (ce qui n'est pas le cas de l'Aplysia cyclase). CD38 a été rapportée comme la seule capable de produire l'ADPR en quantité significative. Celui-ci constitue d'ailleurs son produit majeur puisqu'elle le synthétise en bien plus grande quantité que le cADPR qu'elle dégrade rapidement. CD38 produirait seulement 1 molécule de cADPR pour 100 molécules d'ADP ribose (Ceni et al., 2003) alors que CD157 produit 2 molécules de cADPR pour 1 molécule d'ADP ribose (Hirata et al., 1994). Cet ADPR constitue, un modulateur avec le cADPR des canaux TRPM2 (Schuber et Lund, 2004). L'Aplysia cyclase quant à elle synthétise exclusivement le cADPR (Schuber et Lund, 2004).

La réaction d'échange de base, permettant de produire du NAADP à partir du  $\beta$ -NADP et de l'acide nicotinique, ainsi que l'hydrolyse du NAADP ont lieu préférentiellement à pH acide.

Trois enzymes de la famille des cyclases sont connues pour catalyser la réaction d'échange de base et donc produire le NAADP in vitro: l'Aplysia cyclase soluble, l'antigène de surface CD38 et un enzyme catabolisant le NAD(P)<sup>+</sup> chez les Platyhelminthes trematodes tels que *Schistosoma mansoni* (Goodrich et al., 2005).

Les deux ADPriboyl cyclases décrites dans l'oeuf d'oursin mais encore inconnues sont aussi capables de synthétiser le NAADP par échange de bases à pH acide (Graeff et al., 1998), mais l'enzyme cytoplasmique synthétiserait plutôt du cADPR, tandis que l'autre enzyme ancrée à la membrane plasmique synthétiserait plutôt le NAADP (Wilson et Galione, 1998). Concernant CD157, il n'y a pas de données à l'heure actuelle montrant qu'elle soit capable de synthétiser le NAADP.

### **2.3) Paradoxe topologique et biochimique**

Comme nous l'avons vu, en opposition à l'Aplysia cyclase qui a une localisation cytosolique, le domaine catalytique de CD38 et CD157 est exposé à la surface de la cellule, suggérant une production des messagers à l'extérieur de la cellule. Cependant, les messagers produits par ces cyclases ont une activité intracellulaire, et la manière dont ces messagers accèdent au domaine cytosolique n'est pas encore déterminée. La même question se pose pour la façon dont les substrats produits dans le domaine intracellulaire accèdent au site catalytique de ces ectoenzymes. Ceci a été qualifié de « paradoxe topologique » par les auteurs (De Flora et al., 2000; De Flora et al., 1997) qui proposent deux mécanismes. Le premier impliquerait un transit vers le domaine extracellulaire du  $\text{NAD}^+$  (substrat pour la synthèse de cADPR) via la connexine 43 de la membrane plasmique. Le substrat serait alors en contact avec le domaine catalytique de CD38 situé du côté extracellulaire. Il se pourrait aussi que la réaction de synthèse ait lieu dans la cellule, au niveau des membranes des vésicules d'endocytose : le  $\text{NAD}^+$  entrerait dans ces vésicules par les connexines 43, y serait converti en cADPR par CD38 (Bruzzone et al., 2001). Le cADPR ainsi produit serait rapatrié à l'intérieur de la cellule par CD38 lui-même ou via des transporteurs de nucléotides (Zocchi et al., 1999). Une autre hypothèse propose plutôt un rôle paracrine du cADPR produit par CD38 et CD157 (De Flora et al., 2004). L'exemple d'un tel fonctionnement a été démontré pour CD157 qui, dans les cellules stromales de la moelle osseuse, via la synthèse extracellulaire et l'action paracrine du cADPR stimule l'expansion clonale des progéniteurs des cellules hématopoïétiques humaines possédant des transporteurs de nucléotides membranaires (Podesta et al., 2005).

Un autre point remarquable est que les conditions de pH acide nécessaires à la synthèse du NAADP par CD38 ne semblent pas compatibles avec les conditions de pH extracellulaire et cytosolique. Une hypothèse plausible serait que CD38 pourrait, suite à l'endocytose, se retrouver dans les endosomes et être soumis à l'acidification progressive de ces vésicules progressant vers un destin lysosomal. L'enzyme pourrait alors se trouver dans les conditions adéquates pour synthétiser le NAADP. Mais ceci ne reste qu'hypothétique et n'exclue pas l'existence d'autres cyclases à l'origine de la synthèse du NAADP. En effet, pour d'autres enzymes telles que l'Aplysia cyclase, la « pH dépendance » pour la synthèse de NAADP ne semble pas si stricte puisqu'elle serait capable de synthétiser le NAADP dans des conditions de pH compatibles avec celles trouvée au sein du milieu cytosolique (Aarhus et al., 1995). Finalement, le NA un des substrats nécessaires à la synthèse du NAADP par CD38 na jamais

pu être dosé dans les cellules et semble difficiles à atteindre, voir indisponible pour l'enzyme (Graeff et al., 1998).

#### **2.4) Finalement : CD38, un acteur important mais pas essentiel ?**

CD38 est capable de synthétiser *in vitro* le NAADP. Cependant, aucune évidence ne montre que cette synthèse puisse se produire dans les conditions physiologiques. CD38 est aussi capable de dégrader rapidement le NAADP en ADPRP (ADP ribose phosphate) ce qui constituerait pour la cellule, le moyen de réguler finement le signal calcique lié au NAADP (Graeff et al., 2006). Il apparaît, en rapport avec son caractère multifonctionnel, que le CD38, n'est sans doute pas la seule cyclase à l'origine de la synthèse du NAADP voir du cADPR dans la cellule de mammifère, mais il constituerait néanmoins un carrefour important dans la signalisation calcique cellulaire. Cette hypothèse semble confirmée par l'arrivée de modèles animaux dépourvus du gène codant pour CD38 (Cockayne et al., 1998; Kato et al., 1999). L'absence de cette enzyme que l'on suggérait de première importance pour la synthèse de cADPR et de NAADP ne semble pas provoquer de phénotype très marqué: les souris homozygotes CD38<sup>-/-</sup> sont viables, avec cependant quelques faiblesses spécifiques. C'est d'ailleurs grâce à ce modèle qu'ont pu être décrites des cyclases autres que CD38 dans le cerveau, les muscles et le pancréas.

Ces souris ont une immunité humorale réduite (Cockayne et al., 1998) et sont plus sensibles aux infections (Partida-Sanchez et al., 2001; Partida-Sanchez et al., 2004). Les souris CD38<sup>-/-</sup> présentent des taux réduits de cADPR dans le cerveau, et une augmentation des taux de NAD<sup>+</sup> (Young et al., 2006). Le comportement maternel et social de ces animaux CD38<sup>-/-</sup> est altéré, ce qui serait dû à une réduction de la sécrétion d'ocytocine par la neuro-hypophyse (qui semble dépendre de CD38 (Jin et al., 2007)). Les souris CD38<sup>-/-</sup> sont aussi plus sujettes au diabète (Kato et al., 1999), ce qui se rapproche de certains diabètes insulino-dépendants chez l'homme déclenchés par une auto-immunité contre CD38 (Antonelli et Ferrannini, 2004; Mallone et al., 2002). Ces cas de diabète peuvent s'expliquer par le fait que la voie du cADPR et du NAADP est impliquée dans la libération d'insuline par les cellules Bêta du pancréas endocrine (Kato et al., 1999; Masgrau et al., 2003; Mitchell et al., 2003). Les souris CD38<sup>-/-</sup> mâles présentent aussi une hypertrophie cardiaque, qui n'existe pas chez les femelles (Takahashi et al., 2003).

## **2.5) La modulation de la synthèse des messagers, produits par les cyclases.**

L'enjeu est désormais de comprendre de quelle façon les processus cellulaires dans lesquels le NAADP est impliqué sont régulés. Il apparaît que l'augmentation du taux endogène du NAADP ou de cADPR suite à la stimulation cellulaire peuvent être contrôlés de deux façons :

- une modulation directe de l'activité enzymatique conduisant à la synthèse des messagers
- une régulation de l'expression des enzymes de synthèse

### **2.5.1) Régulation de l'activité par les nucléotides cycliques**

L'activité des cyclases dont dépend la production du cADPR et du NAADP, est modulable par les nucléotides cycliques.

#### **Cas de la synthèse du cADPR**

Dans l'œuf d'oursin, l'activité de la cyclase membranaire est indépendante d'une régulation par le cGMP, alors que le cGMP régule positivement la synthèse de cADPR par la forme soluble (Galione et al., 1993; Graeff et al., 1998). Cette régulation nécessite la présence d'ATP et d'une protéine kinase G. Elle se produit en réponse à une stimulation des œuf d'oursin par le monoxyde d'azote (NO) (Willmott et al., 1996). Ce même mécanisme a été mis en évidence dans les cellules PC12 où le NO stimule la synthèse de cADPR via le GMPc (Clementi et al., 1996).

Cette régulation par le cGMP serait également applicable à la cellule acineuse pancréatique de mammifère. Dans ce type cellulaire le cGMP produit une augmentation de la production de cADPR au même titre qu'une stimulation par la CCK ou l'ACh (Sternfeld et al., 2003). Comme chez l'oursin c'est encore une forme soluble qui semble être exclusivement activée par le cGMP (Sternfeld et al., 2003). En effet, CD38 ne semble pas être sensible au cGMP en dépit du fait qu'elle présente au niveau de son domaine cytoplasmique, un site consensus de phosphorylation par des kinases dépendantes du cGMP (Shubinsky et Schlesinger, 1997). Finalement, on sait que dans l'hippocampe, la LTD implique le NO synthétisé suite à l'élévation du calcium dans l'élément post-synaptique. Celui-ci agit comme messager antérograde sur l'élément pré-synaptique en y activant des guanylate cyclases. Le GMPc produit stimule une protéine kinase régulant positivement une ADPribosyl cyclase pour la synthèse du cADPR. Le calcium libéré au niveau pré-synaptique en réponse à ce cADPR participe à la réduction de la quantité de neurotransmetteur libérée (Reyes-Harde et al., 1999a; Reyes-Harde et al., 1999b).

En opposition avec ces observations, dans les muscles lisses, le NO inhiberait la synthèse de cADPR (Yu et al., 2000), et cette inhibition serait indépendante du GMPc (White et al., 2002).

Dans d'autres modèles, une augmentation du cADPR a aussi été décrite en réponse cette fois à l'AMPc. C'est le cas dans les cardiomyocytes où cette synthèse serait toutefois indépendante de CD38 (Xie et al., 2005) et dans les cellules chromaffines où la synthèse de cADPR est stimulée par l'ACh via l'AMPc (Morita et al., 1997).

#### Cas de la synthèse du NAADP

Les études concernant la régulation de la synthèse du NAADP par les nucléotides cycliques sont beaucoup moins nombreuses. Une seule étude a montré que dans l'œuf d'oursin, elle se trouve potentialisée par le cAMP mais de façon indépendante de la PKA (Wilson et Galione, 1998).

#### **2.5.2) Régulation par l'ATP**

L'ATP est capable d'inhiber l'activité d'hydrolyse du cADPR par CD38 (Okamoto et al., 1997). Cette inhibition serait de type compétitive, l'ATP entrant en compétition avec le cADPR pour la fixation sur le site nucléotidique de l'enzyme (Tohgo et al., 1997). Par contre, l'ATP ne semble pas avoir d'effets sur la synthèse et l'hydrolyse du cADPR par l'ADPribosyl cyclase des membranes de cerveau décrite dans les souris CD38 -/- (Ceni et al., 2003).

#### **2.5.3) Effets du zinc et du cuivre sur l'activité de l'ADPribosyl cyclase**

Le Zinc augmente l'activité de synthèse de cADPR par l'enzyme CD38 humaine (Kukimoto et al., 1996), ainsi que par BST1 chez l'homme (Hirata et al., 1994) et chez la souris (Hussain et al., 1998). A l'inverse, il réduit fortement la synthèse de cADPR par une ADPribosyl cyclase non-CD38 présente dans les membranes de cerveau de souris CD38-/- (Ceni et al., 2003).

Le cuivre a été rapporté comme capable de stimuler la synthèse de cADPR par CD38, et d'en inhiber la synthèse par BST1 (Hirata et al., 1994).

#### **2.5.4) Régulation de l'expression des enzymes**

Dans les neurones, CD38 est localisée dans le corps cellulaire, l'enveloppe nucléaire, et les dendrites, mais aussi dans les vésicules synaptiques et les densités post synaptiques, ce qui suggère un rôle de CD38 dans la transduction du signal (Adebanjo et al., 1999; Mizuguchi et

al., 1995; Yamada et al., 1997). Une augmentation de l'expression de CD38, et par conséquent de la synthèse de cADPR a été décrite dans les astrocytes stimulés par le glutamate (Bruzzone et al., 2004). Dans le myomètre, une stimulation par les œstrogènes provoque une augmentation de l'expression de CD38 de l'ordre de 2,5 fois. Il s'en suit une augmentation de l'activité cyclase au sein de la cellule à peu près équivalente. Ce phénomène d'activation de l'expression est inhibé par la progestérone qui en revanche ne provoque pas une diminution du taux d'expression de CD38 sur une cellule non stimulée par les oestrogènes (Dogan et al., 2004).

Le même type de balance régulatrice a lieu dans les cellules de muscle lisse respiratoire avec cette fois une augmentation de l'expression de CD38 par l'action du TNF- $\alpha$  via l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, agissant sur le promoteur de CD38. Le TNF- $\alpha$ , cytokine inflammatoire provoque une augmentation de la réponse calcique suite à la stimulation par les agonistes du muscle lisse respiratoire tels que la bradykinine, la thrombine et l'histamine. L'augmentation de la sensibilité cellulaire à ces agonistes se traduit par un dérèglement du signal calcique qu'ils génèrent, entraînant des anomalies de la contractilité des muscles respiratoires. Ce phénomène pourrait être à l'origine de pathologies telles que l'asthme (Deshpande et al., 2005). Cet effet positif sur l'expression de CD38 a d'ailleurs été montré pour d'autres cytokines inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-13 (Deshpande et al., 2004). Cette augmentation de l'expression de CD38 peut être contrebalancée par l'addition de dexaméthasone (un glucocorticoïde anti-inflammatoire) qui vient augmenter le taux d'expression de I $\kappa$ B (inhibiteur du facteur NF- $\kappa$ B), atténuant ainsi l'augmentation de l'activité cyclase observée au sein de la cellule (Kang et al., 2006)

Dans les cellules myéloïdes, l'acide rétinoïque provoque une augmentation de l'expression de CD38 en relation directe avec la différenciation et la perte de la capacité d'auto renouvellement (Munshi et al., 2002). CD38 constitue d'ailleurs une cible thérapeutique des leucémies myéloïdes par le traitement à l'acide rétinoïque qui induit son expression. La sensibilité du gène CD38 s'explique par la présence dans l'intron 1 d'un RARE (Rétinoïc Acid Response Element). Cet élément est capable d'interagir avec des hétérodimères composés par l'association d'un récepteur à l'acide rétinoïque (RAR) et d'un récepteur au rétinoïde X (RXR).

**Il ressort de toute la littérature, que la cellule est capable de moduler l'activité des cyclases soit par régulation directe de l'activité de la protéine, soit par la modulation de son expression. Ceci n'a pu être étudié que dans le cadre d'une cyclase connue telle que**

**CD38 et les études mettent en relation ces modulations de l'expression avec la synthèse de cADPR uniquement. Les données concernant la régulation des autres cyclases chez les mammifères sont pratiquement inexistantes.**

Il apparaît que ces processus de régulation varient selon le modèle étudié, et donc la cyclase considérée. Ceci instaure une importante variété des processus de régulation observés et rend encore plus complexe l'étude et la compréhension des voies de signalisation liées à ces enzymes. Cette complexité apparaît pour la synthèse du cADPR qui a fait l'objet de la plupart des expériences, alors que très peu de données sont disponibles concernant la synthèse de NAADP.

## Travail de thèse

Dans les neurones, suite à un stimulus membranaire, le calcium pourrait constituer un intermédiaire capable de recruter différents effecteurs au niveau nucléaire selon les caractéristiques du signal calcique. La mobilisation du calcium de l'enveloppe nucléaire par des second messagers a été montrée dans quelques types cellulaires comme le pancréas. Cependant, dans les neurones, nous disposons de peu de connaissances sur le rôle du calcium nucléaire et sur les mécanismes de la signalisation calcique nucléaire. Les neurones sont bien caractérisés sur le plan électrophysiologique et l'augmentation de la concentration calcique sous membranaire suite à la dépolarisation par l'activation des canaux calciques voltage dépendants est un phénomène bien connu, impliqué par exemple dans la libération de neurotransmetteurs. Cependant, les liens par lesquels les événements calciques sous membranaires sont couplés aux voies de transduction du signal qui aboutissent à des réponses nucléaires menant par exemple à la LTD ou la LTP, restent mal connus. Dans certains cas, le couplage d'un signal membranaire aux cascades biochimiques intracellulaires met en jeu la translocation d'enzymes. Ceci a été montré dans les cellules endothéliales où un stimulus extracellulaire entraîne le ciblage de la NO synthase cytoplasmique au noyau. Son activité provoque une augmentation de la concentration calcique nucléoplasmique qui active la transcription en passant par les MAP kinases et NF- $\kappa$ B (Gobeil et al., 2006).

Pour étudier la question au niveau des neurones, il nous fallait disposer d'un modèle cellulaire permettant d'observer facilement des réponses calciques nucléaires. Les neurones d'aplysie répondaient aux critères de tailles compatibles avec l'observation de signaux calciques nucléaires. De plus, l'unique forme soluble identifiée de l'ADP ribosyl cyclase (enzyme de synthèse du cADPR et du NAADP) a été purifiée chez l'Aplysie et les ARN messagers codant pour cette cyclase sont présents dans les neurones (Mothet et al., 1998). Enfin, nous disposons d'un anticorps spécifiquement dirigé contre cette cyclase. Nous avons voulu voir si cette enzyme pouvait constituer un lien entre l'activité membranaire neuronale et la signalisation calcique nucléaire par le suivi de sa localisation au cours de l'activité neuronale. D'autre part, dans les neurones, aucune étude relatant de l'autonomie du noyau pour générer un signal calcique n'avait été entreprise. Il était donc particulièrement important de déterminer sur notre modèle expérimental, si la réserve calcique constituée par l'enveloppe nucléaire neuronale était sensible au cADPR et au NAADP, produits par l'Aplysia cyclase. Sur une préparation de noyaux isolés à partir des neurones, je me suis donc attachée à montrer dans quelle mesure ces deux messagers, ainsi que l'IP<sub>3</sub> étaient capables de libérer du calcium

de l'enveloppe nucléaire vers le nucléoplasme. Etant donnée la diversité des messagers provoquant la libération du calcium, je me suis donc demandée si ces derniers ne pouvaient pas générer des signatures calciques à la base d'un codage conduisant à l'activation de chemins transcriptionnels particuliers.

# **MATERIEL ET METHODES**

# MATERIEL ET METHODES

## **1) Préparation de noyaux isolés**

### **1.1) Préparation des noyaux de neurones d'aplysie**

Le système nerveux de l'aplysie compte environ 20 000 gros neurones localisés au sein de ganglions. Différents ganglions sont identifiés : le ganglion buccal, les ganglions du collier contenant les ganglions pleuraux, pédieux et cérébroïdes et le ganglion abdominal. La densité de neurones et la teneur en tissu conjonctif des différents ganglions varient fortement, c'est la raison pour laquelle, seul les noyaux issus des ganglions pleuraux, pédieux et abdominal ont été utilisés.

L'aplysie est d'abord anesthésiée selon les règles d'éthique en vigueur, c'est à dire par injection d'une solution isotonique de  $MgCl_2$ . L'animal est ensuite disséqué ; puis le collier et le ganglion abdominal sont prélevés. Ceux-ci sont immédiatement déposés dans de l'eau de mer artificielle ( $NaCl$  460 mM ;  $KCl$  10 mM ;  $CaCl_2$  11 mM ;  $MgCl_2$  25 mM ;  $MgSO_4$  28 mM ; tampon Tris  $HCl$  10 mM, pH 7,8).

Les ganglions sont alors débarrassés de l'épaisse enveloppe de tissu conjonctif qui les englobe par une dissection fine et délicate. Celle-ci est effectuée sous loupe binoculaire, dans une chambre perfusée avec de l'eau de mer artificielle et à l'aide de pinces fines.

A l'issue de la dissection, les ganglions sont déposés dans un polybroyeur avec un tampon intracellulaire d'une concentration en  $Ca^{2+}$  libre de 400 nM ( $KCl$  450 mM ;  $K_2HPO_4$  2 mM ; HEPES 50 mM ;  $MgCl_2$  4 mM ;  $CaCl_2$  1,445 mM ; EGTA 2 mM ; pH 7,2 avec  $KOH$  5N). Les ganglions sont broyés ; les noyaux sont ensuite prélevés à la pipette et répartis dans des tubes Eppendorf par aliquots de 100  $\mu$ l.

### **1.2) Préparation des noyaux de cellules pancréatiques acineuses de souris**

Après dislocation cervicale de l'animal, le pancréas est prélevé et placé dans un tampon extracellulaire ( $NaCl$  140 mM ;  $KCl$  4,7 mM ;  $MgCl_2$  1,3 mM ; glucose 10 mM ;  $CaCl_2$  1 mM ; HEPES 10 mM, pH 7,2 avec  $NaOH$  5N) réfrigéré au préalable. Un millilitre de collagénase (200 U/ml) est injecté dans le pancréas. Le tout est incubé 15 minutes à 37°C dans un tube Eppendorf. La collagénase est éliminée et le pancréas rincé avec 1 ml de tampon. Il est alors placé dans un tube contenant 14 ml de tampon extracellulaire. Après agitation jusqu'à dispersion, le surnageant contenant les cellules est récupéré.

Les cellules sont centrifugées 2 minutes à 800 g. Le surnageant est éliminé, remplacé par 3 ml de tampon et les cellules sont dispersées par 100 allers-retours avec une pipette. Après 30 secondes nécessaires à la décantation des éléments non digérés, le surnageant contenant les cellules est prélevé et le volume ajusté à 6 ml avec du tampon. Les cellules sont ensuite centrifugées 2 minutes à 800g et lavées trois fois.

Le dernier de ces trois lavages doit être effectué dans une solution hypotonique (Tris-HCl 50 mM; KCl 25 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; pH 7,2 avec KOH 5N). Le dernier culot est repris dans 2 ml de cette même solution. Les cellules sont placées dans un polybroyeur et 20 allers-retours sont effectués avec le piston. La solution résultante est ensuite filtrée sous vide avec deux épaisseurs de filtre de porosité de 10 µm de diamètre afin de ne récupérer que les noyaux et d'écarter les débris cellulaires.

L'échantillon récupéré est centrifugé 5 minutes à 800g et le culot repris dans 5 ml de solution intracellulaire à 200 nM de Ca<sup>2+</sup> libre (KCl 125 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM; HEPES 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 4 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM; EGTA 2 mM; pH 7,2 avec KOH 5N). Les noyaux isolés subissent finalement un dernier lavage 5 minutes à 800g. Le culot obtenu est repris dans 1 ml de tampon intracellulaire et séparé en 2 fois 500 µl.

## **2) Culture primaire des neurones spinaux ventraux d'embryon de souris**

### **2.1) Coating des lamelles**

Des lamelles rondes stériles en verre destinées à recevoir les cellules sont déposées dans des plaques plastiques de 12 puits. Sur les lamelles est déposée pendant 2 heures de la polyornithine (sigma) spéciale culture. Après 2 heures, celle-ci est enlevée et les lamelles rincées par du PBS. Finalement, les lamelles sont incubées à 37°C pendant 3 heures en présence de laminine (invitrogen) 10µg/ml dans du PBS. Avant de déposer les cellules, la laminine est retirée des puits et ces derniers ne sont pas rincés.

### **2.2) Dissection des moelles épinières**

Les embryons de souris sont disséqués à E12,5. La procédure de dissection des embryons est la même que celle décrite pour les moelles épinières de rat par Henderson et collaborateur en 1995.

Après dislocation cervicale, on procède à l'ouverture de l'abdomen de la mère et au prélèvement de l'utérus pouvant contenir jusqu'à 10 voir 15 embryons. Les embryons sont extraits par découpage de l'utérus et retrait de la poche amiotique avant d'être disséqués dans une solution Calcium Magnésium Free (NaCl 115 mM ; KCl 2,6 mM ; Hepes 10 mM EDTA

0,4mM, pH 7,6 au NaOH). La moelle épinière est extraite, les méninges enlevées ainsi que la partie dorsale de la moelle contenant des neurones sensoriels. Seule la moelle ventrale contenant les interneurons et les motoneurons est gardée. Elle est alors coupée en morceaux avec un scalpel et les fragments sont transférés dans un milieu nutritif L15 (Gibco) complété de composition : à mettre avec du glucose, de la progestérone, du serum, IPCS mix, and antibiotics.

### **2.3) Préparation de la suspension de neurones spinaux ventraux**

Les fragments de moelle ventrale sont ensuite incubés en milieu trypsine EDTA (1 ml) pendant 8 minutes à 37°C. L'action de la trypsine est bloquée à l'issue de ces 8 minutes par ajout de 1ml de solution L15 complet (0,8ml), BSA (4%w/v) (0,1ml) et Dnase1 à 1mg/ml (0,1ml). Les fragments sont vigoureusement agités jusqu'à leur dissociation partielle. Après sédimentation, le surnageant est récupéré dans un tube falcon 15ml.

1ml de milieu L15 (0,9ml), BSA (4%w/v) (0,1ml) et Dnase1 à 1mg/ml (0,02ml) est ajouté sur les fragments restants. Ces derniers sont agités, dissociés à la P1000 et le surnageant récupéré dans le falcon 15ml. Cette opération peut être renouvelée une troisième fois jusqu'à dissociation complète des morceaux de moelle.

La fraction de surnageant récupérée est ensuite centrifugée 5 min à 469g sur un cousin de BSA (4%w/v) déposé au fond du falcon grâce à une pipette pasteur

Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot re-suspendu par 1ml de milieu Neurobasal (Gibco) complété. Les cellules sont ensuite comptées etensemencées à  $10^5$  cellules par puits avant d'être placées à l'incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Lors de la préparation des neurones, quelques cellules gliales sont elles aussi extraites etensemencées. Ces cellules peuvent se multiplier rapidement et coloniser les lamelles qui deviennent inexploitable au niveau expérimental. Ainsi, 24h environ après la mise en culture, un agent inhibiteur de la synthèse d'ADN est ajouté pour bloquer la multiplication des astrocytes. Il s'agit du 2,2'-Anhydro-(1-β-D-arabinofuranosyl) cytosine hydrochloride (sigma) à la concentration de 5μM.

## **3) L'imagerie**

### **3.1) Généralités sur la fluorescence**

Lorsqu'une molécule fluorescente est illuminée par une source d'excitation dont la longueur d'onde ou la gamme de longueurs d'ondes se situe dans le spectre d'absorption de la sonde, celle-ci passe à un niveau excité en absorbant l'énergie apportée par les photons. Le retour à

l'état d'énergie fondamental initial s'effectue en restituant la majorité de l'énergie absorbée sous forme lumineuse. L'énergie émise par fluorescence étant toujours inférieure à l'énergie absorbée, l'émission lumineuse se situe dans une gamme de longueurs d'ondes plus importantes que celles de l'excitation. Le décalage entre les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission (loi de Stokes) permet de séparer les lumières d'excitation et d'émission à l'aide de filtres appropriés.

### **3.2) Marquage des acides nucléiques des noyaux de neurones d'Aplysie**

Pour visualiser le contenu des noyaux, la sonde SYTO 13 Green a été utilisée. Le SYTO 13 Green est un marqueur capable de se fixer aux acides nucléiques, ce qui le rend fluorescent. Au moment de l'emploi, la sonde, dissoute dans le DMSO, est ajoutée dans la chambre d'incubation à la concentration finale de 25  $\mu\text{M}$  sur un fragment de ganglion nerveux d'aplysie. Les noyaux sont visualisés en fluorescence avec un microscope confocal après excitation de la sonde à 488 nm et la fluorescence émise est recueillie à 509 nm.

### **3.3) Marquage des compartiments acides par le lysotracker red**

Afin de détecter la présence éventuelle de compartiments acides au niveau de l'enveloppe nucléaire, un marqueur spécifique de ces compartiments acide (le lysotracker red Molecular Probes,  $\lambda_{\text{ex}} = 577\text{nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 590\text{nm}$ ) a été utilisé à une concentration de 100nM. Pour cela, les noyaux après dépôt dans la chambre d'imagerie ont été incubés durant 5 minutes en présence du marqueur puis rincés par la solution de type intracellulaire décrite précédemment avant mesure de la fluorescence en microscopie confocale.

Ce même marqueur a été utilisé sur les neurones spinaux selon le même protocole avec rinçage par la solution extracellulaire.

### **3.4) Marquage par le DIOC<sub>6</sub>**

Le DIOC<sub>6</sub> (Sigma,  $\lambda_{\text{ex}} = 484\text{nm}$  et  $\lambda_{\text{em}} = 501\text{nm}$ ) est une molécule lipophile connue pour marquer les membranes intracellulaires et particulièrement le réticulum endoplasmique. J'ai utilisé celui-ci à 1 $\mu\text{g/ml}$  pendant 7 min d'incubation sur les noyaux avant de rincer avec la solution intracellulaire pour obtenir mes images en microscopie confocale.

### **3.5) Marquage par le Mitotracker green**

Le Mitotracker green (Moléculair Probes,  $\lambda_{ex}$ = 490nm et  $\lambda_{em}$  =516nm) est un marqueur spécifique des mitochondries. Le marquage des ganglions observé en microscopie confocale a été obtenu en utilisant celui-ci à 200nM dans l'eau de mer pendant 30 min d'incubation avant de rincer à l'eau de mer.

### **3.6) Imagerie calcique sur les noyaux**

Une partie des études a été réalisé en microscopie conventionnelle à fluorescence. Une grande partie de mes expériences a été effectuée en microscopie confocale, en particulier pour l'étude des variations de  $Ca^{2+}$  dans l'enveloppe nucléaire.

#### **3.6.1) Principe de l'imagerie calcique**

La technique d'imagerie calcique repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes qui se lient au  $Ca^{2+}$ . Cette technique permet d'observer les variations de concentration calcique nucléoplasmique ou luminale, en réponse aux divers messagers libérant du  $Ca^{2+}$  des réserves nucléaires.

##### **3.6.1.1) L'acquisition en microscopie champ large**

L'appareillage est constitué d'un microscope droit Olympus relié à une caméra CCD qui permet de visualiser la fluorescence émise après excitation de la sonde par une lampe Xénon. La lumière émise par la source traverse un filtre qui ne laisse passer que la longueur d'onde souhaitée, et est réfléchi sur l'échantillon par un miroir dichroïque (fig 6(a) A et B). la lumière émise par la sonde excitée est transmise vers le filtre d'émission à travers le miroir dichroïque puis est détectée par la caméra CCD. Les images sont transmises à l'ordinateur qui traite les données à l'aide du logiciel Axon Imaging Workbench (AIW).

##### **3.6.1.2) L'acquisition en microscopie confocale**

Les expériences ont été réalisées sur un microscope confocal de type SP2 RS Leica inversé et les données ont été analysées à l'aide du logiciel Leica confocal software 2.5. Lors de l'acquisition en microscopie confocale, la préparation se trouve balayée par une raie laser de longueur d'onde appropriée suite à sa réflexion par un miroir dichroïque (fig 6(b)). Ainsi à chaque instant une partie infime du spécimen est fortement illuminée. Les photons émis par le fluorochrome sont détectés point par point avec un photomultiplicateur et l'image recomposée point par point numériquement par un ordinateur. Un diaphragme est placé devant le

photomultiplicateur et centré sur le foyer arrière de l'objectif. Ce diaphragme ne laisse pas passer la lumière parasite située hors du plan focal, mais uniquement la lumière issue des points de l'échantillon situés dans le plan focal étudié. L'image ainsi obtenue correspond à un plan de coordonnée Z dont l'épaisseur sera d'autant plus faible que l'est le diamètre du diaphragme.

### **3.6.1.3) Traitement des données**

Les résultats de mes expériences concernant les variations de fluorescence au cours du temps sont représentés sous forme de courbes normalisées. En abscisse figure le temps en seconde et en ordonnée est représenté le rapport de fluorescence ( $F/F_0$ ), avec F la fluorescence au temps t, et  $F_0$  la fluorescence au temps  $t_0$ .

### **3.6.1.4) Chargement des différents compartiments nucléaires avec des sondes calciques fluorescentes**

Toutes les expériences d'imagerie sont réalisées à une température ambiante de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , les noyaux sont déposés sur le fond d'une chambre constituée d'une lamelle de verre recouverte de polylysine (0,01%). Le volume est ajusté à 1ml avec la solution tampon qui sera utilisée pendant les expériences. Différentes sondes ont été utilisées pour visualiser les variations de concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'enveloppe et dans le nucléoplasme.

### **3.6.1.5) Imagerie calcique de l'enveloppe nucléaire**

Pour l'observation des variations calciques dans l'enveloppe des noyaux d'aplysie et de pancréas de souris, j'ai utilisées la sonde calcique Mag-Fluo-4 AM ( $K_d=22 \mu\text{M}$ ). Le groupement (AM) ou acétoxy-méthyl-ester est lipophile et permet l'entrée dans l'espace luminal de l'enveloppe. Une fois la sonde à l'intérieur, le groupement AM peut être clivé par les estérases endogènes. Ceci confère à la sonde un caractère hydrosoluble permettant sa séquestration dans la lumière de l'enveloppe nucléaire. Ces deux sondes, préparées à 1 mM dans le DMSO, sont ajoutées aux noyaux à une concentration finale de  $30 \mu\text{M}$ .

Les noyaux de neurones d'aplysie sont incubés sur un lit de glace et à l'obscurité jusqu'à leur utilisation au moins 1h 30 après mise en présence de la sonde. Ceci permet, d'une part de ralentir la détérioration des noyaux et, d'autre part, d'éviter la dégradation de la sonde photosensible. De l'ATP (5 mM), est essentiel au chargement de l'enveloppe nucléaire en  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans ces expériences, j'ai utilisé le tampon intracellulaire, décrit précédemment,

contenant 400 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  libre ce qui permet un remplissage des réserves nucléaires en présence d'ATP. Après lavage de la préparation par un système de perfusion adapté afin d'enlever l'excès de sonde, de l'ATP est ajouté dans le milieu pour une concentration finale de 5 mM. Les noyaux sont visualisés en fluorescence après excitation de la sonde à 488 nm et la fluorescence émise est recueillie à 520 nm.

Les noyaux des cellules pancréatiques de souris sont incubés pendant 1 heure à 37°C et à l'obscurité en présence de Mag-Fluo-4 AM (30  $\mu\text{M}$ ) et d'ATP (5 mM) afin d'observer les variations calciques dans l'enveloppe. Après 1 heure, l'excès de sonde est lavé par une centrifugation de 10 minutes à 800g. Les noyaux sont remis en suspension dans 500  $\mu\text{l}$  de tampon, intracellulaire à 200 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (comme décrit précédemment). Les noyaux sont visualisés en fluorescence après excitation de la sonde à 488 nm et la fluorescence émise est recueillie à 525 nm.

#### **3.6.1.6) Imagerie calcique nucléoplasmique**

Pour l'observation des variations calciques dans le nucléoplasme des noyaux des neurones d'aplysie, le Fluo4 Dextran, conjugué à une molécule de dextran de 10 kDa ( $K_d=2 \mu\text{M}$ ) a été utilisé. Ce groupement de haut poids moléculaire permet une séquestration nucléoplasmique de la sonde. Celle-ci, préparée dans l'eau à une concentration de 1 mM, est ajoutée aux noyaux à une concentration finale de 20  $\mu\text{M}$ . Les noyaux sont visualisés en fluorescence après excitation des sondes à 488 nm et la fluorescence émise est recueillie à 530 nm. Dans les études avec la sonde Fluo4 dextran, j'ai utilisé pendant mes expériences, une solution intracellulaire à 100 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (KCl 450 mM ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 mM ; HEPES 50 mM ;  $\text{MgCl}_2$  4 mM ;  $\text{CaCl}_2$  20 $\mu\text{M}$ , EGTA 50  $\mu\text{M}$  ; pH 7,2 avec KOH 5N).

#### **3.6.1.7) Imagerie calcique sur les neurones spinaux**

Afin d'étudier les variations de la concentration de calcium cytosolique dans les neurones spinaux ventraux, j'ai utilisé le fluo4 AM (Molecular Probes  $K_d = 345 \text{ nM}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$ ). Pour leur chargement, les cellules étaient incubées 30 min à 37°C en présence de la sonde à la concentration de 10 $\mu\text{M}$ .

#### **4) Immunomarquages**

##### **4.1) Détection de l'ADP rybosyl cyclase dans les ganglions nerveux d'Aplysie**

Pour les marquages immunocytochimiques, les ganglions après dissection ont été déposés sur des lamelles puis fixé par du PFA 4% préparé dans de l'eau de mer artificielle. La durée de fixation est de 40 min.

Pour les stimulation, les neurones étaient dépolarisés avant fixation par perfusion d'une solution de KCl 110mM pendant 20 min.

Les conotoxines (CN VIIA et S VI B) ont été utilisées à 5 $\mu$ M pendant 30 min en eau de mer artificielle sans calcium. Les neurones ont été ensuite rincés par de l'eau de mer normale avant de subir la dépolarisation.

La nifedipine a été utilisée à 10 $\mu$ M pendant 30 min avant la dépolarisation et le BAPTA-AM à 50 $\mu$ M pendant 1heure.

Après stimulation et fixation les neurones ont été perméabilisés 10 min par une solution PBS/BSA (4%)/ triton (0,5%). Après rinçage, les ganglions ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante dans une solution PBS/BSA4% pour une saturation des sites non spécifiques. Puis, l'anticorps anti cyclase (fourni par HC Lee) dilué au 1/10<sup>ème</sup> à 4°C était appliqué toute la nuit à 4°C. Après rinçage en PBS, l'anticorps secondaire, anti lapin couplé à l'Alexa 488 ( $\lambda_{ex}$  = 495nm et  $\lambda_{em}$  =519nm) de chez Molecular Probes a été ajouté à 6 $\mu$ g/ml dans une solution PBS/BSA4% pendant 1heure à température ambiante. Finalement, après rinçage en PBS puis un dernier rinçage en H<sub>2</sub>O, les lamelles ont été montées dans du Vectaschiel Hardset contenant du DAPI (Vector).

##### **4.2) Marquage de CD38 dans neurones spinaux embryonnaires**

Les cellules ont été fixées par une solution extracellulaire contenant du PFA 4% pendant 15 min. Ensuite elles ont été perméabilisées 10 min par une solution PBS/BSA (4%)/ triton (0,5%). Après rinçage, les cellules ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante dans une solution PBS/BSA4% pour une saturation des sites non spécifiques. Puis, l'anticorps anti CD38 (sigma) dilué au 1/10<sup>ème</sup> 2 heures à température ambiante. Après rinçage en PBS, l'anticorps secondaire, anti chèvre couplé à l'Alexa 568 ( $\lambda_{ex}$  = 578nm et  $\lambda_{em}$  =603nm de chez molecular probes a été ajouté à 6 $\mu$ g/ml dans une solution PBS/BSA4% pendant 1heure à température ambiante. Finalement, après rinçage en PBS puis un dernier rinçage en H<sub>2</sub>O, les lamelles ont été montées dans du Vectaschiel Hardset contenant du DAPI (Vector).

#### **4.3) Marquage du facteur de transcription Islet1 dans les neurones spinaux embryonnaires**

Le protocole ci-dessus a été utilisé avec l'anticorps primaire anti Islet1 (ref 40.2D6 de la developmental studies Hybridoma Bank) incubé 2h à température ambiante. L'anticorps secondaire utilisé est l'anti souris couplé à l'Alexa 488 ( $\lambda_{ex} = 495\text{nm}$  et  $\lambda_{em} = 519\text{nm}$ , molecular probes)

#### **5) Dosage de la synthèse du NAADP par l'ADPribosyl cyclase en HPLC**

L'HPLC ou chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique d'analyse et de séparation de composés chimiques. Nous avons utilisé cette technique pour mettre en évidence l'activité de synthèse de NAADP par échange de base dans différents tissus.

##### **5.1) Principe de la technique**

La chromatographie en phase liquide sur une colonne échangeuse d'ions repose sur la fixation, puis l'éluion des composés testés par une colonne échangeuse d'ions. Cette colonne contient une résine constituée de polymères, qui est traversée par un éluant. Des ions sont échangés entre la résine et l'éluant selon la force acide ou basique de la résine, le pH de l'éluant, et les pKa (en particulier le pH isoélectrique) des composés à séparer.

Les oligonucléotides peuvent donc être séparés en faisant varier le pH de l'éluant.

##### **5.2) Dispositif expérimental et analyse en HPLC**

Nous avons utilisé une colonne échangeuse d'anions constituée de polyéthylène imine quaternaire (Poros HQ). L'éluant est constitué d'une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique (TFA) dont on fait varier la concentration.

Les composés à étudier sont injectés dans la colonne avec de l'eau. Comme on se trouve au dessus du pH isoélectrique des dérivés nucléotidiques, ils sont chargés négativement et se fixent par échange d'anions sur la résine de la colonne. Pour décrocher les composés, on accroît la concentration de TFA dans l'éluant, jusqu'à atteindre le point isoélectrique du composé. A ce moment là, le composé change de charge et se décroche de la résine.

Une fois élués, les composés sont entraînés jusqu'à un détecteur UV qui mesure leur absorbance. Les pics d'absorbance ainsi obtenus ont une surface proportionnelle à la concentration du composé, et il est possible, à partir d'une courbe étalon, et en intégrant la surface des pics, de déterminer la concentration de chaque molécule.

Nous utilisons un appareillage HPLC Beckman système Gold, piloté par le logiciel 32Karat. Ce système se compose d'une pompe, d'un injecteur automatique, et d'un détecteur UV, le tout sous contrôle d'un ordinateur. La pompe fournit un gradient de TFA qui va pouvoir traverser la colonne échangeuse d'ions. Les échantillons sont injectés par l'injecteur automatique, et en fin de chaîne, le détecteur UV détecte le passage des composés élués.

Le logiciel 32Karat permet de déterminer les gradients, et de tracer des chromatogrammes à partir des indications du détecteur UV.

Le gradient de TFA est produit par mélange du solvant A (eau distillée) et du solvant B (solution de 1% TFA) avec un débit constant de 2 ml/min. Le gradient à T0 est constitué de 0 % de solution B, puis la concentration de TFA est progressivement augmentée : il passe à 20 % de solvant B en 20 min, puis augmente encore à 32 % en 5 min, avant de revenir à 0 % en 3 min. Le volume d'échantillon injecté par l'injecteur automatique est de 30  $\mu$ l, et le détecteur UV mesure l'absorbance à une longueur d'onde de 254 nm, avec une fréquence d'acquisition de 1 Hertz.

Ce gradient nous a permis de séparer les composés en rapport avec la synthèse de NAADP, c'est à dire le NA et le NADP<sup>+</sup> (les substrats), et le NAADP et l'ADPribose Phosphate (ADPrP) (les produits). La méthode est précise, puisque les temps d'élution des différents composés sont séparés par au moins deux minutes, ce qui rend leur distinction et leur mesure simple et précise (Figure 13). Pour mesurer les produits synthétisés, nous avons utilisé des concentrations connues de NAADP et ADPrP. La surface des pics, obtenue par intégration, est proportionnelle à la concentration du composé, et peut donc être déterminée à partir d'une courbe étalon.

### **5.3) Prélèvement des tissus et protocole de dosage**

Cette méthode de dosage par HPLC nous permet de quantifier l'activité de synthèse de NAADP par la réaction d'échange de base. Je l'ai utilisée sur des extraits de tissus nerveux d'Aplysie.

Après sacrifice de l'animal les ganglions sont prélevés selon le protocole décrit et homogénéisés en présence d'une solution de composition (en mM) 140 KCl, 1,13 MgCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 HEPES; pH 7,2 ajusté par KOH dans un potter maintenu dans la glace.

L'homogénat ainsi obtenu subit un cycle de quatre congélations-décongélations dans de l'azote liquide.

On prélève alors un échantillon de chaque homogénat pour réaliser le dosage des protéines (cf. dosage des protéines dans les échantillons). Le reste de l'homogénat est alors mis en présence du substrat NA (7 mM), et d'HCl qui acidifie l'ensemble jusqu'à un pH de 4,5-5.

Les candidats agonistes ou modulateurs sont alors ajoutés et la réaction d'échange de base est lancée par ajout du second substrat, le NADP (0,3 mM), et le tout est incubé température ambiante.

A différents temps, la réaction enzymatique est arrêtée par prélèvement d'une fraction de volume réactionnel et addition d'acide perchlorique froid à 10 % (1 Volume d'acide pour 1 volume d'échantillon). Les échantillons sont alors laissés 30 minutes avec l'acide perchlorique dans de la glace pour laisser les protéines précipiter.

Les échantillons sont alors centrifugés 2 minutes à 12000 rpm et à 4°C, et le surnageant est collecté. Ce surnageant est alors neutralisé par ajout de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3,5 M (environ 18 µl pour 180 µl de surnageant). Les tubes sont à nouveau centrifugés 15 minutes à 13000 rpm pour précipiter les sels, et le surnageant collecté pour être congelé ou directement injecté dans l'HPLC.

#### **5.4) Dosage des protéines dans les échantillons**

La concentration de protéines des homogénats a été déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Pour cela, un réactif contenant 25 mg de bleu de Comassie, 12,5 ml d'éthanol 95°, 25 ml d'acide ortho-phosphorique complété à 250 ml par de l'eau distillée est mis à incuber 30 minutes avec les échantillons et une gamme de concentration connue (BSA). L'absorbance des échantillons est alors mesurée au spectromètre à une longueur d'onde de 595 nm. La comparaison des valeurs lues avec celles de la gamme permet de déterminer la concentration de protéines de la gamme.

### **6) Enregistrements électrophysiologiques par la technique de patch clamp**

La technique du patch-clamp est une technique d'électrophysiologie permettant l'enregistrement de signaux électriques à partir de cellules ou de portions de membrane (Hamill et al., 1981).

#### **6.1) principe du patch clamp**

Une microélectrode en verre est appliquée contre la membrane de la cellule et une légère succion lui permet de se coller contre celle-ci. Ce scellement très étroit correspond à la configuration « cellule attachée », et la résistance électrique à la jonction pipette-membrane

plasmique est de l'ordre du Giga-Ohm. Partant de cette configuration, on peut, par une succion brève, arracher la membrane située sous la microélectrode, sans perdre le scellement, et on passe ainsi en configuration « cellule entière ». La configuration cellule entière met en continuité la solution à l'intérieur de la microélectrode (appelé milieu intracellulaire ou intrapipette) avec le cytoplasme de la cellule, ce qui permet de mesurer des courants transmembranaires globaux résultant de l'activité de l'ensemble des canaux membranaires activés.

## **6.2) Dispositif expérimental**

Pour les expériences de patch clamp, les cellules sont patchées sous un microscope Leica D MIRE2. Les courants enregistrés par la technique du patch clamp en configuration cellule entière sont amplifiés par un amplificateur Biologic RK-300.

En plus du microscope inversé, le dispositif expérimental comprend :

- une table anti-vibrations et une cage de faraday
- un système de perfusion pour la solution extracellulaire et les drogues ou agonistes
- une électrode de référence située dans la chambre de perfusion
- une microélectrode de patch contenant la solution intracellulaire et un fil d'argent chloruré et qui est déplacée à l'aide d'un micromanipulateur
- un amplificateur
- un filtre B cell à 2kHz
- un convertisseur analogique/numérique (Axon instruments)
- Un ordinateur disposant du logiciel d'acquisition Clampex 9 (Axon instruments)

Les microélectrodes utilisées sont obtenues en étirant des capillaires de verre borosilicaté (Clark) avec une étireuse horizontale Sutter P97 de Philippe, et ont une résistance de 4 Méga-Ohms.

## **6.3) Protocole expérimental**

Les cellules, cultivées sur des lamelles rondes dans des plaques 12 puits sont sorties de la boîte. La lamelle est collée sous une chambre d'incubation dans laquelle est perfusée la solution extracellulaire, les agonistes et les agents pharmacologiques grâce à un système de perfusion par gravité et par une pompe péristaltique.

Une fois mises en place, la microélectrode est approchée de la cellule à l'aide du micromanipulateur. Après être passé en configuration cellule entière, l'enregistrement des courants peut commencer.

La solution intra pipette est composée 2 mM NaCl, 133 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, mM 0,5 EGTA, mM 10 HEPES, mM 4 ATP, pH 7,2 ajusté par KOH. On remarque que le KCl d'un milieu intracellulaire classique a été remplacé par du CsCl qui permet de s'affranchir des courants potassiques lors des enregistrements. Ce milieu intra-pipette a pu, selon les expériences, contenir les messagers intracellulaires comme le NAADP, afin de les diffuser dans les cellules.

Lors de mes expériences j'ai utilisé la méthode du potentiel imposé, qui permet de mesurer les courants ioniques transitant à travers les canaux de la membrane plasmique. Pour l'enregistrement des courant synaptiques des cellules, le protocole utilisé consiste à maintenir simplement le potentiel membranaire à -60 mV. La valeur de -60 mV correspond au potentiel transmembranaire de repos des neurones spinaux, mesuré au préalable.

### **7) RT PCR**

Les ARN ont été extraits par du Tri Reagent (sigma) selon le protocole d'extraction fourni avec le produit et les ARN stockés dans de l'eau DEPC à -80°C.

Pour la réaction de reverse transcription, le kit Invitrogen « Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit » a été utilisé selon le protocole décrit là encore dans la notice.

Les primers utilisés pour la PCR sont les suivants :

Primer gauche : CGAAGGAGCTTCCAGTAACG

Primer droit : TCTACACGATGGGTGCTCAG

Pour éviter l'amplification d'ADN génomique contaminant éventuel, le primer gauche a été choisi à cheval sur l'exon 6 et 7 du gène de CD38 de souris et le primer gauche dans l'exon 8. Le produit ainsi obtenu est de 154 paires de bases.

Pour la PCR, la « Taq DNA Polymerase recombinant » de chez invitrogen a été utilisée et tout les réactifs proviennent de chez invitrogen. Par tube de réaction, j'ai utilisé : 5 µl de cDNA, 1µM pour chaque primer, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, du tampon 10X dilué au 1/10ème et 2,5 U de Taq Polymérase.

L'appareil à PCR est un thermocycleur Eppendorf sur lequel le programme suivant a été utilisé :

- 5 min à 94°C
- 35 cycles (45 sec à 94°C, 30 sec à 60°C, 1 min à 72°C)
- 10 min à 72°C

# **RESULTATS**

# RESULTATS

## Article 1

### **The Ca<sup>2+</sup>-releasing messenger NAADP, a new player in the nervous system.**

**Stéphanie Bezin, Gilles Charpentier, Philippe Fossier and José M. Cancela**

**(J. Physiol. Paris)**

Un nombre important de processus physiologiques est régulé par des signaux calciques d'une grande diversité. Dans les cellules, l'augmentation de la concentration calcique cytosolique dépend de l'entrée de calcium via des canaux membranaires mais aussi de la mobilisation du calcium contenu dans les réserves intracellulaires. Le contrôle des réserves calciques est assuré par une famille de second messagers comportant l'IP<sub>3</sub>, l'ADP-ribose cyclique et l'acide nicotinique adenine dinucleotide phosphate (NAADP). Récemment, de nouveaux concepts ont émergé. Le codage fin des signaux calciques au sein du cytoplasme et du noyau serait lié à la coopération des différents messagers produits en réponse à divers stimuli extracellulaires. Dans cet article, nous présentons des résultats obtenus sur différentes préparations de noyaux isolés, concernant la régulation de l'homéostasie calcique nucléaire par les second messagers et insistons sur les avancées récentes concernant le signal calcique lié au NAADP dans les neurones.

## The Ca<sup>2+</sup>-releasing messenger NAADP, a new player in the nervous system

Stéphanie Bezin<sup>a</sup>, Gilles Charpentier<sup>a,b</sup>, Philippe Fossier<sup>a</sup>, José-Manuel Cancela<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS, UPR 9040, 1 Avenue de La Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Physiologie Animale, Faculté des Sciences, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, 80018 Amiens Cedex, France

### Abstract

Many physiological processes are controlled by a great diversity of Ca<sup>2+</sup> signals. Within cell, Ca<sup>2+</sup> signals depend upon Ca<sup>2+</sup> entry and/or Ca<sup>2+</sup> release from internal Ca<sup>2+</sup> stores. The control of Ca<sup>2+</sup>-store mobilization is ensured by a family of messengers comprising inositol 1,4,5 trisphosphate, cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). From recent works, new concepts have emerged where activation of the cells by outside stimuli, acting at the plasma membrane, results in the synthesis of multiple Ca<sup>2+</sup>-releasing messengers which may interact and shape complex Ca<sup>2+</sup> signals in the cytosol as well as in the nucleus. This contribution will cover the most recent advances on NAADP signalling with some emphasis on neurons.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** NAADP; Neurons; Nuclear Ca<sup>2+</sup>; Calcium signalling; Cyclic ADP-ribose; ADP-ribosyl cyclase

### 1. Introduction

Calcium is one of the most versatile and important intracellular messengers in living cells and organisms. Physiologists, cell biologists and biochemists have found that Ca<sup>2+</sup> is involved in the control of numerous biological processes (Berridge, 2005; Berridge et al., 2003; Knot et al., 2005). For example, Ca<sup>2+</sup> is essential for egg fertilization, synaptic plasticity, muscle cell contraction, gene expression, enzyme secretion and cell proliferation. Ca<sup>2+</sup> signals are intracellular relays of triggering events, such as depolarisation, hormone or neurotransmitter stimulations, in order to control cell functions (Berridge, 2005; Berridge et al., 2003; Knot et al., 2005). Ca<sup>2+</sup> signals are not all-or-none events; they vary greatly in amplitude, duration and localization. How such specific Ca<sup>2+</sup> signals, and thereby specific physiological responses, are generated is an intense area of research (Bootman et al., 2002; Cancela, 2001). Some of the key events governing Ca<sup>2+</sup> signalling

are now elucidated. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals can be generated by activation of Ca<sup>2+</sup> entry and/or by mobilization of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores. At the level of plasma membrane, Ca<sup>2+</sup> influx occurs through several types of channels, such as voltage-gated channels, ligand-gated channels and transient receptor potential ion channels (Trp) (Bootman et al., 2002; Clapham, 2003; Parekh and Putney, 2005; Verkhratsky, 2005). Interestingly, some Trp channels are modulated by second messengers such as TRPM2 activated by NAD<sup>+</sup>, ADP-ribose (ADPR) and cyclic ADP-ribose (cADPR) (Kolisek et al., 2005). Within the cells, in addition to the endoplasmic reticulum (ER), the store traditionally associated with messenger-mediated Ca<sup>2+</sup> signalling, Ca<sup>2+</sup> is also stored in most organelles, including the mitochondria, lysosomes, secretory granules, Golgi apparatus and the nuclear envelope (Rizzuto et al., 2004; Rudolf et al., 2003). Moreover, Ca<sup>2+</sup> release from some of these stores can be triggered by intracellular second messengers. The first molecule discovered to exhibit such a property was inositol 1,4,5 trisphosphate (IP<sub>3</sub>) (Berridge, 2005). Binding of IP<sub>3</sub> to intracellular receptors (Bosanac et al., 2004), primarily found on the ER and

\* Corresponding author.

E-mail address: [cancela@nbcn.cnrs-gif.fr](mailto:cancela@nbcn.cnrs-gif.fr) (J.-M. Cancela).

nuclear envelope, activates  $\text{Ca}^{2+}$  release. We now know that in addition to  $\text{IP}_3$ , other messengers participate in the shaping of  $\text{Ca}^{2+}$  signals (Berridge et al., 2003; Cancela, 2001; Cancela et al., 2003; Galione and Churchill, 2002; Lee, 1997, 2005). The discovery of two other  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing messengers: cADPR and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) helps our understanding of the complexity of  $\text{Ca}^{2+}$  signalling (Cancela et al., 2003; Galione et al., 1991; Galione and Petersen, 2005; Lee, 1997, 2005). It is generally accepted that the receptor targeted by physiological concentration of cADPR is known as the ryanodine receptor (RyR), localized on the ER, nuclear envelope and the secretory granules. RyR activation by cADPR, either directly or via an accessory protein, results in  $\text{Ca}^{2+}$  release.  $\text{IP}_3$  and ryanodine receptors are the main intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channels known today. They share some common properties, amongst which is their sensitivity to the cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, described as the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release (CICR) mechanism (Berridge et al., 2003). Even though, in the case of the  $\text{IP}_3$  receptor, the sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  requires the binding of  $\text{IP}_3$ . In the present review, we will focus on recent studies on the  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing messenger NAADP, with some new insight on its role in neurons.

### 1.1. NAADP a new potent and ubiquitous $\text{Ca}^{2+}$ -releasing messenger

NAADP was initially discovered to evoke  $\text{Ca}^{2+}$  release in sea urchin eggs (Lee and Aarhus, 1995). The first demonstration of NAADP action in a mammalian tissue was provided in pancreatic acinar cells, in which NAADP was shown to be essential for the  $\text{Ca}^{2+}$  spiking evoked by the hormone cholecystokinin (CCK) (Cancela et al., 1999). This has proved to be an interesting model since the two most important secretagogues controlling pancreatic acinar cell functions, acetylcholine (ACh) and CCK, use different combinations of second messengers. Thus, ACh action requires  $\text{IP}_3$  and cADPR receptors, whereas CCK requires NAADP, cADPR and  $\text{IP}_3$  receptors (Cancela, 2001; Cancela et al., 1999, 2000, 2002; Yamasaki et al., 2005). Two peculiarities of NAADP signalling are worth mentioning. First, NAADP is one of the most potent  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing messengers found so far, efficient in the nanomolar range (Cancela et al., 2003; Galione and Petersen, 2005; Lee, 2005; Patel et al., 2001). The second property is the self-desensitization of the putative NAADP receptor by NAADP. The concentration of NAADP required to desensitize the receptor varies with the cell model. For example, in sea urchin eggs, sub-threshold NAADP concentrations desensitize the receptor to further NAADP stimulation (Genazzani et al., 1996; Lee, 2000), whereas in mammalian cells, application of supra-threshold concentrations of NAADP desensitizes the pathway to further NAADP stimulation (see Fig. 1Aa and b) (Cancela et al., 2003, 1999; Galione and Petersen, 2005; Masgrau et al., 2003; Patel et al., 2001). In the absence of specific antagonists of

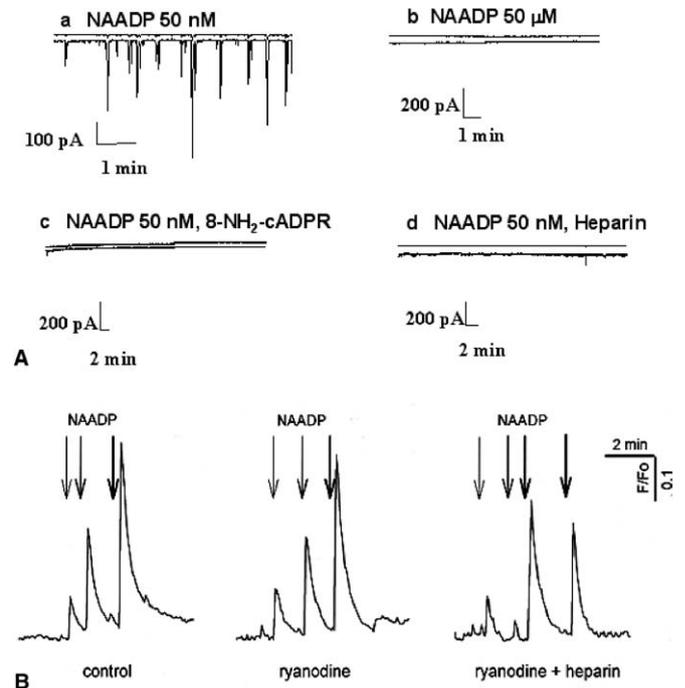


Fig. 1. The pharmacology of NAADP-evoked calcium release depends on the cellular model. (A) Patch-clamp recordings in isolated mouse pancreatic acinar cells of  $\text{Ca}^{2+}$  dependent  $\text{Cl}^-$  currents, used as an index of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  variations. (a) Typical  $\text{Ca}^{2+}$  spiking response evoked by NAADP (50 nM). (b) At 50  $\mu\text{M}$ , a desensitizing concentration, NAADP failed to evoke calcium release. (c and d) Added in the pipette, intracellular 8- $\text{NH}_2$ -cADPR (a cADPR antagonist) or heparin, (an  $\text{IP}_3$ R antagonist), inhibit calcium release evoked by NAADP at 50 nM. The traces are reproduced and modified from Cancela et al. (1999) (with author's permissions and with permission from Nature Publishing Group). (B) In *Aplysia*, NAADP-induced relative increases in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of the presynaptic neuron, monitored with the fluorescent dye rhod-2. The effect of NAADP (10  $\mu\text{M}$  final concentration) was not blocked by bath application of ryanodine (100  $\mu\text{M}$ ) or by combining bath application of ryanodine and injection of heparin (final concentration 10–50  $\mu\text{M}$ ) into the presynaptic neuron. The traces are reproduced and modified from Chameau et al. (2001) (with the author's permissions and with kind permission of Springer Science and Business Media).

NAADP signalling, this property of the NAADP receptor is thus far the best tool available to assess the role of NAADP in cells. Indeed, this unique property was exploited to provide the first evidence for a messenger role for NAADP in pancreatic acinar cells (Cancela et al., 1999).

A plethora of reports now exist indicating a role for NAADP in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. NAADP is a  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing molecule in a diverse array of cell types, in plants as well as in animals (Cancela et al., 2003; Galione and Petersen, 2005; Lee, 2005). Moreover, NAADP has been reported to be involved in physiological processes (Cancela, 2001; Lee, 2001). For example, NAADP plays a role in fertilization in ascidian eggs (Albrieux et al., 1998) and in insulin release in human  $\beta$ -cells (Johnson and Mislis, 2002). In addition, the levels of endogenous NAADP have been shown to increase in vivo after cell stimulation in some cell

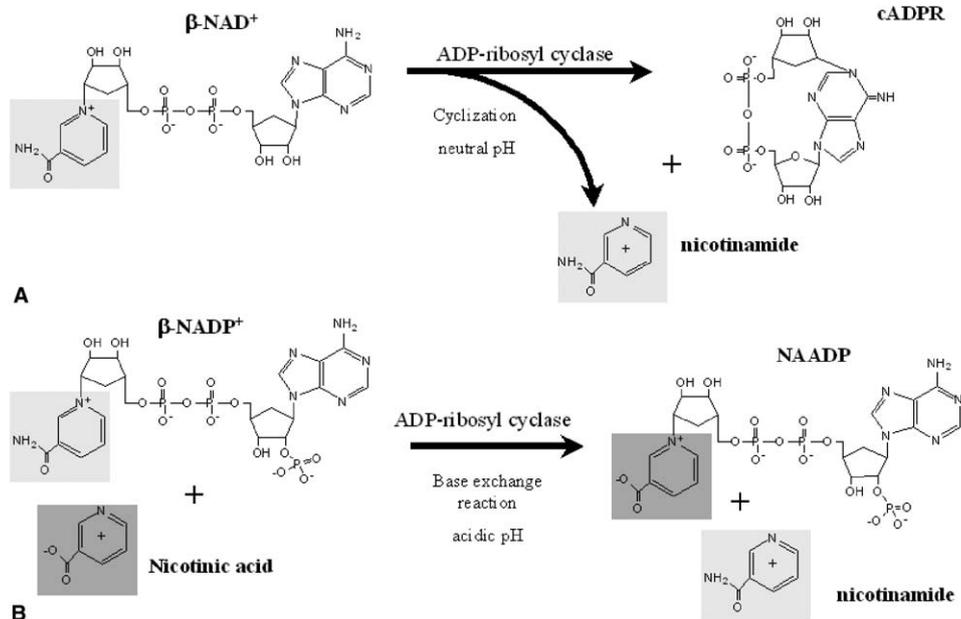


Fig. 2. cADPR and NAADP synthesis by ADP-ribosyl cyclase. NAADP and cADPR are synthesized by the same enzyme, ADP-ribosyl cyclase. The differential production of each depends on the pH. (A) In neutral conditions, the enzyme preferentially synthesizes cADPR by promoting a cyclization reaction. (B) In acidic conditions, the cyclase mostly produces NAADP the result of a base-exchange reaction.

models. In the sea urchin, the activation of sperm after contact with the egg jelly results in a 5-fold increase in NAADP levels in the spermatozoa (Churchill et al., 2003). Augmented NAADP levels were also reported in pancreatic  $\beta$ -cells after glucose stimulation, in pancreatic acinar cells after CCK stimulation and in smooth muscle cells following exposure to endothelin (Kinnear et al., 2004; Masgrau et al., 2003; Yamasaki et al., 2005). These data show that, in response to triggering events, NAADP is synthesized de novo, although the endogenous enzymes involved have not yet been identified.

In the mammalian nervous system, the presence of specific NAADP binding sites was reported in the brain and medulla, apparently in both neuronal and non-neuronal cells (Patel et al., 2000). Nonetheless, the first studies describing NAADP as an active messenger in neurons were performed on the sea mollusk *Aplysia californica* and the frog (see Fig. 1B) (Brailoiu et al., 2001; Chameau et al., 2001). It was shown that presynaptic injections of NAADP enhance the evoked release of ACh in the synaptic cleft of an identified cholinergic synapse in the *Aplysia* nervous buccal ganglion (Chameau et al., 2001). Similar data were obtained in the frog neuromuscular junction (Brailoiu et al., 2001). In the mammalian brain, NAADP releases Ca<sup>2+</sup> from microsomes and is involved in the control of neurite outgrowth in rat neocortical neurons (Bak et al., 1999; Brailoiu et al., 2005). Interestingly, in mouse cultured astrocytes and cerebellar neurons, extracellularly applied NAADP evokes transient intracellular Ca<sup>2+</sup> increases (Heidemann et al., 2005). However, thus far an increase of NAADP endogenous level in neither neuronal nor glial cells has been reported.

## 1.2. NAADP synthesis

NAADP and cADPR are the products of multifunctional enzymes belonging to the cyclase family (Fig. 2). Several of these enzymes have been purified and cloned, such as the ectoenzymes CD38 and CD157, the *Aplysia* cyclase, the cyclases from the marine sponge *Axinella polypoides* (Basile et al., 2005) and from the Platyhelminthes *Schistosoma mansoni* (Goodrich et al., 2005). Three classes of reactions may be catalyzed by the cyclases: cyclization, hydrolysis and base-exchange (Lee et al., 2002). These reactions depend on the pH; thus, at neutral or alkaline pH, cyclization and hydrolysis are the preferred reactions. Cyclization produces cADPR from  $\beta$ -NAD, whereas hydrolysis of either  $\beta$ -NAD or cADPR yields ADPR. The base-exchange reaction occurs preferentially at acidic pH, producing NAADP from  $\beta$ -NADP and nicotinic acid. To date, three enzymes of the cyclase family are known to catalyze the base-exchange reaction and are therefore capable of NAADP synthesis in vitro: a cyclase found in *Aplysia*, the human surface antigen CD38 and a NAD(P)<sup>+</sup> catabolizing enzyme expressed in the Platyhelminthes trematodes (Goodrich et al., 2005). To our knowledge, there are no data yet indicating that CD157 could synthesize NAADP.

The *Aplysia* cyclase was first discovered in the ovotestis (Hellmich and Strumwasser, 1991; Lee and Aarhus, 1991). This enzyme is a soluble protein of 29 kDa and was named ADP-ribosyl cyclase (Lee and Aarhus, 1991). CD38 is a membrane glycoprotein of 42 kDa, with a single transmembrane domain, extensively expressed on B- and T-lymphocytes, as well as on other cell types (Ferrero and Malavasi,

2002). Studies have revealed that CD38 has an ADP-ribosyl cyclase activity (Howard et al., 1993). In mammals, another enzyme has been shown to have a cyclase activity: the surface antigen CD157 (BST-1) (Hirata et al., 1994). This protein is a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule mainly expressed on bone marrow stromal cells, but has also been detected on other cell types (placenta, lung, liver and kidney). Although they share about 30% homology, the three purified enzymes: the *Aplysia* cyclase, CD38 and CD157, display distinct features. In contrast to the cytosolic *Aplysia* cyclase, the catalytic domain of both CD38 and CD157 is exposed at the surface of the cells; therefore enzymatic activity may produce messengers extracellularly. Paradoxically, the known activity of these messengers is intracellular, and the way they reach the intracellular compartment is still being debated. However, two mechanisms have been proposed: one requires membrane transport through nucleotide transporters, the other involves intracellular synthesis following endocytosis of CD38 (Guida et al., 2002).

To date, CD38 has been regarded as the principal cyclase in the brain, since no transcripts of CD157 have been detected (Itoh et al., 1994; Kaisho et al., 1994). However, a recent study in brain from CD38 deficient mice revealed an intracellular ADP-ribosyl cyclase activity independent of CD38 and CD157, suggesting the existence of a novel enzyme (Ceni et al., 2003). Therefore, the ADP-ribosyl cyclase activity found in the cytosol, mitochondria and nucleus (Ferrero and Malavasi, 2002; Liang et al., 1999) may result from the activity of different enzymes (Ceni et al., 2003).

### 1.3. The NAADP receptor and selective activation of $Ca^{2+}$ sources

Although the identity of the NAADP receptor is still a matter of debate, since it has not yet been purified, biochemical and physiological evidences support the existence of a novel intracellular receptor (Galione and Ruas, 2005).  $^{32}P$ -NAADP binding on sea urchin microsomes revealed a specific binding site with a  $K_d$ -value of 10 nM (Genazzani et al., 1996; Lee, 2000; Patel et al., 2001). In addition, the recent solubilization of a receptor binding NAADP with a high affinity revealed a protein of a substantially smaller molecular weight than that of the subunit size of  $IP_3$  receptors (~300 kDa) and RyR (~560 kDa) (Berridge et al., 2002). From the available data, the putative NAADP receptor does not behave as a  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$ -release channel in sea urchin eggs (Ceni et al., 2003; Genazzani et al., 1996). Besides data supporting the existence of a NAADP receptor, electrophysiological experiments supporting that NAADP may also activate the RyR directly or through an accessory protein, have also been presented (Hohenegger et al., 2002; Mojzisova et al., 2001). Importantly, the interaction of NAADP with the RyR does not rule out the existence of a genuine NAADP receptor but rather outlines the complexity of NAADP action.

In the majority of intact cell studies, NAADP has been shown to evoke cytosolic  $Ca^{2+}$  signals by mobilizing  $Ca^{2+}$  from its own  $Ca^{2+}$  store, then this primary  $Ca^{2+}$  release acts as a trigger to further release  $Ca^{2+}$  from ryanodine- and  $IP_3$ -sensitive stores via CICR (Fig. 1Ac and d) (Cancela et al., 1999, 2002; Galione and Petersen, 2005). The identity of the organelle(s) directly targeted by NAADP is currently the object of numerous studies. However, several experimental data reveal that more than one NAADP-sensitive  $Ca^{2+}$  store could exist. Indeed, NAADP-sensitive  $Ca^{2+}$  stores can be physically separated from those mobilized by  $IP_3$  or cADPR, and NAADP can release  $Ca^{2+}$  from acidic, thapsigargin-insensitive  $Ca^{2+}$  stores (Brailoiu et al., 2003; Genazzani and Galione, 1996; Lee, 2000; Patel et al., 2001). The organelles targeted by NAADP have been suggested to be lysosomes in various cell types (sea urchin eggs; smooth muscle cells; glial cells; mouse pancreatic acinar cells) (Churchill et al., 2002; Heidemann et al., 2005; Kinnear et al., 2004; Yamasaki et al., 2005) and identified as insulin containing secretory granules in pancreatic  $\beta$ -cells (Mitchell et al., 2003). In addition to acidic organelles, there are data showing that the NAADP  $Ca^{2+}$  response requires both  $Ca^{2+}$  mobilization via RyRs and/or  $Ca^{2+}$  entry (Cancela et al., 2003; Galione and Petersen, 2005; Lee, 2005). In pancreatic acinar cells,  $Ca^{2+}$  increases activated by NAADP are shaped by release from different sources: from the acidic stores (Yamasaki et al., 2004), from the ER via RyR activation through CICR (Cancela et al., 2002) and from the nuclear envelope, possibly through direct activation of RyRs (Gerasimenko et al., 2003). In T-lymphocytes, NAADP evokes initial sub cellular  $Ca^{2+}$  signals from ryanodine-sensitive stores amplified by a massive  $Ca^{2+}$  entry (Berg et al., 2000; Langhorst et al., 2004). Similarly, in starfish oocytes, NAADP first triggers a sub-membranous localized  $Ca^{2+}$  response from thapsigargin-, NAADP-,  $IP_3$ - and ryanodine-sensitive stores, that is followed by a  $Ca^{2+}$  entry which generates the fertilization  $Ca^{2+}$  wave (Moccia et al., 2004). A simpler model for NAADP action has emerged from studies on neurons. In *Aplysia* nervous buccal ganglion, rat neocortical neurons and frog neuromuscular junction, NAADP evokes cytosolic  $Ca^{2+}$  responses which are insensitive to blockade of RyR and  $IP_3R$  (see Fig. 1B) (Brailoiu et al., 2005, 2001; Chameau et al., 2001). In rat cortical neurons, NAADP releases  $Ca^{2+}$  from an acidic store (Brailoiu et al., 2005). The possibility that additional  $Ca^{2+}$  stores could be sensitive to NAADP in neurons, such as the nuclear envelope, is under current investigation in our laboratory.

### 1.4. Homeostasis of nuclear $Ca^{2+}$ stores

Several studies have shown that cytosolic and nucleoplasmic  $Ca^{2+}$  levels can be independently regulated. Indeed, the presence of  $IP_3$  and/or ryanodine receptors on the inner nuclear membrane is well documented (Adebanjo et al., 1999; Cardenas et al., 2005; Gerasimenko et al., 1995; Humbert et al., 1996; Khoo et al., 2000;

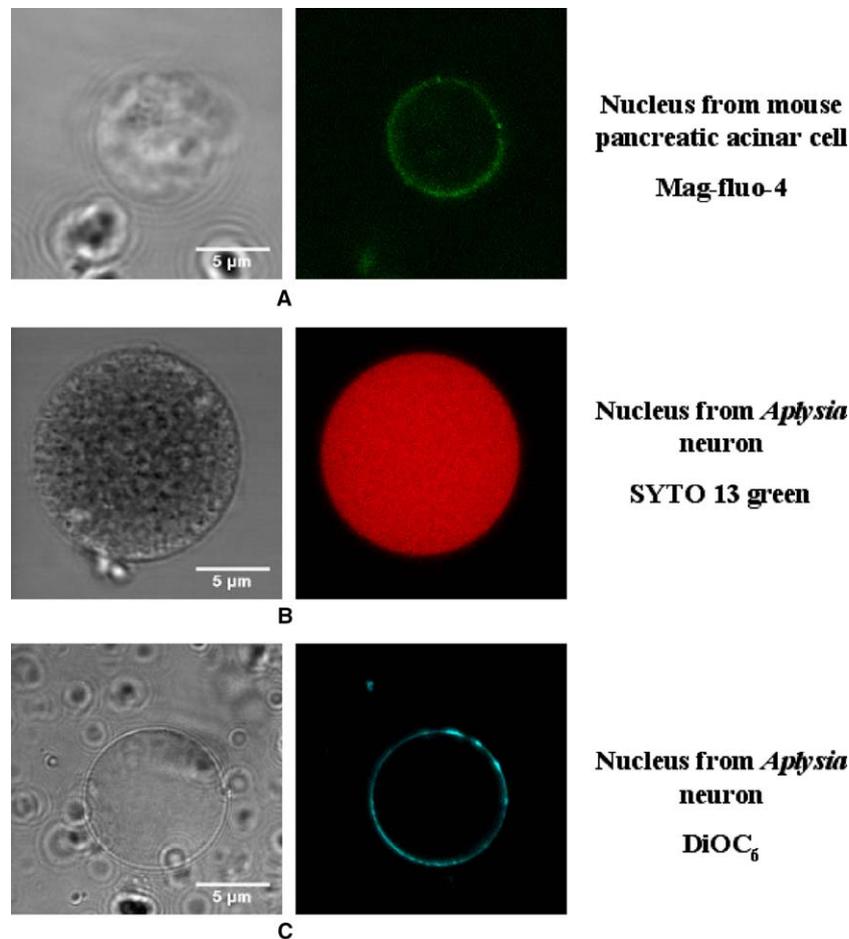


Fig. 3. Single isolated nuclei from mouse pancreatic acinar cells and *Aplysia* neurons labelled with different fluorescent markers. (A) Transmitted light picture of a single isolated nucleus of mouse pancreatic exocrine acinar cell. This nucleus was loaded with the membrane permeant calcium sensitive dye MagFluo4 AM. The fluorescence ring corresponds to the nuclear envelope which is a calcium store. (B) Transmitted light image of a single isolated nucleus from *Aplysia* neuron. This nucleus was labelled with the nucleic acid fluorescent marker SYTO 13 green. (C) Transmitted light image of another *Aplysia* neuron nucleus, stained with the ER specific dye DiOC<sub>6</sub>. The thin fluorescent ring corresponds to the nuclear envelope.

Malviya et al., 1990). In addition, the enzymes responsible for the synthesis of cADPR and IP<sub>3</sub> (the surface antigen ADP-ribosyl cyclase CD38 and phospholipase C, respectively) have also been located on the inner nuclear membrane (Adebanjo et al., 1999; Divecha et al., 1993; Khoo et al., 2000). Finally, Ca<sup>2+</sup> release from isolated nuclear preparations has been demonstrated in hepatocytes, oocytes, skeletal muscle and pancreatic acinar cells (Adebanjo et al., 1999; Cardenas et al., 2005; Gerasimenko et al., 2003, 1995; Khoo et al., 2000; Malviya and Rogue, 1998; Stehno-Bittel et al., 1995). Nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling is known to be essential for the control of gene transcription, enzyme activation and nucleocytoplasmic transport (Bustamante et al., 2000; Shahin et al., 2001). Thus, the mechanisms involved in the control of nuclear Ca<sup>2+</sup> homeostasis are an important area of research.

We have investigated the possible role of three intracellular messengers, known to trigger Ca<sup>2+</sup> release from the intracellular stores, IP<sub>3</sub>, cADPR and the most recent messenger NAADP, on Ca<sup>2+</sup> homeostasis from isolated nuclei of mouse pancreatic acinar cells and of *Aplysia* neurons

(Figs. 3 and 4). Emphasis was placed on the *Aplysia* model since it presents several advantages. First, RT-PCR experiments showed that the cyclase synthesizing cADPR and NAADP is present in the neurons of the buccal ganglion (Mothet et al., 1998) and that NAADP increases the evoked neurotransmitter release at an identified cholinergic synapse (Chameau et al., 2001). We also found that after addition of the substrates (nicotinic acid and NADP) to *Aplysia* neuron homogenates, NAADP production could be detected by HPLC, thus confirming the existence of an ADP-ribosyl cyclase activity in neuronal tissue (data not shown). Second, several studies have demonstrated the crucial role of Ca<sup>2+</sup> in the regulation of plasticity and in the regulation of the transcription factor CREB (Pittenger and Kandel, 2003). Third, the *Aplysia* neurons are giant cells with large nuclei, which are easily isolated and perfectly adapted to high resolution imaging experiments (Fig. 3B and C).

Ca<sup>2+</sup> concentration changes were monitored by confocal microscopy in the nuclear envelope, using a permeant dye (see Fig. 3A), as well as in the nucleoplasm, using a dye

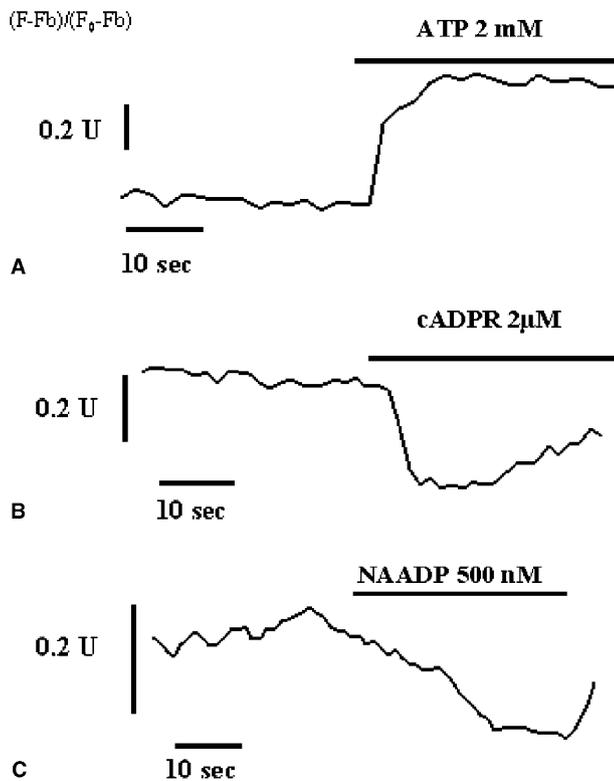


Fig. 4. Effect of ATP and second messengers' application on the nuclear envelope calcium concentration. (A) A single isolated nucleus of mouse pancreatic exocrine acinar cell was loaded with the membrane permeant calcium sensitive dye Fluo3 AM. Addition of ATP (2 mM) increases the calcium concentration into the envelope, through an activation of nuclear calcium ATPases. (B and C) The second messengers cADPR (2  $\mu$ M) and NAADP (500 nM) caused a  $\text{Ca}^{2+}$  release from the isolated nuclear envelope of the pancreatic acinar cell. The fluorescence is expressed in arbitrary units and normalized with  $F_0$  corresponding to the fluorescence value at the beginning of the experiment,  $F$  the fluorescence intensity during the experiment and  $F_b$  the background fluorescence.

coupled to a high molecular weight molecule. Our unpublished data indicate that addition of  $\text{IP}_3$ , cADPR and NAADP induces a release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the envelope of pancreatic acinar cells and neurons. As shown in Fig. 4 for pancreatic acinar cell isolated nuclei,  $\text{Ca}^{2+}$  storage in the nuclear envelope requires ATP (Fig. 4A) and the  $\text{Ca}^{2+}$  pumps involved are sensitive to thapsigargin (not shown). Thus, the nuclear envelope is a calcium store sensitive to several intracellular messengers (Fig. 4B and C). These data raise the possibility that multiple mechanisms control  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent nuclear functions. We know that in some non-neuronal cells, NAADP interacts with  $\text{IP}_3$  and cADPR to generate complex  $\text{Ca}^{2+}$  signals. Therefore, it would be crucial to investigate such a possibility in the control of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in neurons.

To understand the physiological roles of NAADP signalling in neurons, several questions remain to be resolved. We do not yet know which physiological stimuli may control endogenous levels of NAADP in neurons. The molecular nature of the NAADP receptor is not

elucidated and advance in this area will provide crucial information. In the near future, it would be extremely valuable to characterize the different  $\text{Ca}^{2+}$  stores recruited by NAADP, such as lysosomes, secretory granules, ER and the nuclear envelope in neurons. One important concept, which may emerge from the multiplicity of  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing messengers, is that selective recruitment of a  $\text{Ca}^{2+}$  store by a specific messenger may select a specific neuronal function. Finally, recruitment of multiple  $\text{Ca}^{2+}$  stores by combining different messengers may select other specific neuronal functions. In this view, the identity of the  $\text{Ca}^{2+}$  stores activated would be crucial in the fine tuning of neuronal functions.

### Acknowledgments

We thank Nathalie Cheviron for technical help and Kathryn Mitchell for her comments on the manuscript. The authors' laboratory is supported by grants from the AFM, the ARC and the FRM.

### References

- Adebanjo, O.A., Anandatheerthavarada, H.K., Koval, A.P., Moonga, B.S., Biswas, G., Sun, L., Sodam, B.R., Bevis, P.J., Huang, C.L., Epstein, S., Lai, F.A., Avadhani, N.G., Zaidi, M., 1999. A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 1 (7), 409–414.
- Albrieux, M., Lee, H.C., Villaz, M., 1998. Calcium signaling by cyclic ADP-ribose, NAADP, and inositol trisphosphate are involved in distinct functions in ascidian oocytes. *J. Biol. Chem.* 273 (23), 14566–14574.
- Bak, J., White, P., Timar, G., Missiaen, L., Genazzani, A.A., Galione, A., 1999. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate triggers  $\text{Ca}^{2+}$  release from brain microsomes. *Curr. Biol.* 9 (14), 751–754.
- Basile, G., Tagliatalata-Scafati, O., Damonte, G., Armirotti, A., Bruzzone, S., Guida, L., Franco, L., Usai, C., Fattorusso, E., De Flora, A., Zocchi, E., 2005. ADP-ribosyl cyclases generate two unusual adenine homodinucleotides with cytotoxic activity on mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (41), 14509–14514.
- Berg, I., Potter, B.V., Mayr, G.W., Guse, A.H., 2000. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP(+)) is an essential regulator of T-lymphocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling. *J. Cell Biol.* 150 (3), 581–588.
- Berridge, M.J., 2005. Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 1–21.
- Berridge, G., Dickinson, G., Parrington, J., Galione, A., Patel, S., 2002. Solubilization of receptors for the novel  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J. Biol. Chem.* 277 (46), 43717–43723.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (7), 517–529.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J., Roderick, H.L., 2002. Calcium signaling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr. Biol.* 12 (16), R563–R565.
- Bosanac, I., Michikawa, T., Mikoshiba, K., Ikura, M., 2004. Structural insights into the regulatory mechanism of  $\text{IP}_3$  receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1742 (1–3), 89–102.

- Brailoiu, E., Miyamoto, M.D., Dun, N.J., 2001. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate enhances quantal neurosecretion at the frog neuromuscular junction: possible action on synaptic vesicles in the releasable pool. *Mol. Pharmacol.* 60 (4), 718–724.
- Brailoiu, E., Patel, S., Dun, N.J., 2003. Modulation of spontaneous transmitter release from the frog neuromuscular junction by interacting intracellular Ca(2+) stores: critical role for nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP). *Biochem. J.* 373 (pt 2), 313–318.
- Brailoiu, E., Hoard, J.L., Filipeanu, C.M., Brailoiu, G.C., Dun, S.L., Patel, S., Dun, N.J., 2005. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate potentiates neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 280 (7), 5646–5650.
- Bustamante, J.O., Michelette, E.R., Geibel, J.P., Dean, D.A., Hanover, J.A., McDonnell, T.J., 2000. Calcium, ATP and nuclear pore channel gating. *Pflügers Arch.* 439 (4), 433–444.
- Cancela, J.M., 2001. Specific Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP<sub>3</sub>. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 99–117.
- Cancela, J.M., Churchill, G.C., Galione, A., 1999. Coordination of agonist-induced Ca<sup>2+</sup>-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* 398 (6722), 74–76.
- Cancela, J.M., Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., 2000. Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca(2+) release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *EMBO J.* 19 (11), 2549–2557.
- Cancela, J.M., Van Coppenolle, F., Galione, A., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., 2002. Transformation of local Ca<sup>2+</sup> spikes to global Ca<sup>2+</sup> transients: the combinatorial roles of multiple Ca<sup>2+</sup> releasing messengers. *EMBO J.* 21 (5), 909–919.
- Cancela, J.M., Charpentier, G., Petersen, O.H., 2003. Co-ordination of Ca(2+) signalling in mammalian cells by the new Ca(2+)-releasing messenger NAADP. *Pflügers Arch.* 446 (3), 322–327.
- Cardenas, C., Liberona, J.L., Molgo, J., Colasante, C., Mignery, G.A., Jaimovich, E., 2005. Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptors regulate local Ca<sup>2+</sup> transients and modulate cAMP response element binding protein phosphorylation. *J. Cell Sci.* 118 (Pt 14), 3131–3140.
- Ceni, C., Muller-Steffner, H., Lund, F., Pochon, N., Schweitzer, A., De Waard, M., Schuber, F., Villaz, M., Moutin, M.J., 2003. Evidence for an intracellular ADP-ribosyl cyclase/NAD<sup>+</sup>-glycohydrolase in brain from CD38-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 278 (42), 40670–40678.
- Chameau, P., Van de Vrede, Y., Fossier, P., Baux, G., 2001. Ryanodine-, IP<sub>3</sub>- and NAADP-dependent calcium stores control acetylcholine release. *Pflügers Arch.* 443 (2), 289–296.
- Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S., Galione, A., 2002. NAADP mobilizes Ca(2+) from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* 111 (5), 703–708.
- Churchill, G.C., O'Neill, J.S., Masgrau, R., Patel, S., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Galione, A., 2003. Sperm deliver a new second messenger: NAADP. *Curr. Biol.* 13 (2), 125–128.
- Clapham, D.E., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426 (6966), 517–524.
- Divecha, N., Rhee, S.G., Letcher, A.J., Irvine, R.F., 1993. Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: phosphoinositidase C isoform beta 1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. *Biochem. J.* 289 (Pt 3), 617–620.
- Ferrero, E., Malavasi, F., 2002. A natural history of the human CD38 gene. In: Lee, E.H. (Ed.), *Cyclic ADP-Ribose and NAADP Structures, Metabolism and Functions*. Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, pp. 281–304.
- Galione, A., Churchill, G.C., 2002. Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* 32 (5–6), 343–354.
- Galione, A., Petersen, O.H., 2005. The NAADP receptor: New receptors or new regulation. *Mol. Interv.* 5 (2), 73–79.
- Galione, A., Ruas, M., 2005. NAADP receptors. *Cell Calcium* 38 (3–4), 273–280.
- Galione, A., Lee, H.C., Busa, W.B., 1991. Ca(2+)-induced Ca(2+) release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* 253 (5024), 1143–1146.
- Genazzani, A.A., Galione, A., 1996. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate mobilizes Ca<sup>2+</sup> from a thapsigargin-insensitive pool. *Biochem. J.* 315 (Pt 3), 721–725.
- Genazzani, A.A., Empson, R.M., Galione, A., 1996. Unique inactivation properties of NAADP-sensitive Ca<sup>2+</sup> release. *J. Biol. Chem.* 271 (20), 11599–11602.
- Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., 1995. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from the nuclear envelope. *Cell* 80 (3), 439–444.
- Gerasimenko, J.V., Maruyama, Y., Yano, K., Dolman, N.J., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., Gerasimenko, O.V., 2003. NAADP mobilizes Ca<sup>2+</sup> from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J. Cell Biol.* 163 (2), 271–282.
- Goodrich, S.P., Muller-Steffner, H., Osman, A., Moutin, M.J., Kusser, K., Roberts, A., Woodland, D.L., Randall, T.D., Kellenberger, E., LoVerde, P.T., Schuber, F., Lund, F.E., 2005. Production of calcium-mobilizing metabolites by a novel member of the ADP-ribosyl cyclase family expressed in *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry* 44 (33), 11082–11097.
- Guida, L., Bruzzese, S., Sturla, L., Franco, L., Zocchi, E., De Flora, A., 2002. Equilibrative and concentrative nucleoside transporters mediate influx of extracellular cyclic ADP-ribose into 3T3 murine fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 277 (49), 47097–47105.
- Heidemann, A.C., Schipke, C.G., Kettenmann, H., 2005. Extracellular application of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate induces Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes in situ. *J. Biol. Chem.* 280 (42), 35630–35640.
- Hellmich, M.R., Strumwasser, F., 1991. Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul.* 2 (3), 193–202.
- Hirata, Y., Kimura, N., Sato, K., Ohsugi, Y., Takasawa, S., Okamoto, H., Ishikawa, J., Kaisho, T., Ishihara, K., Hirano, T., 1994. ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1. *FEBS Lett.* 356 (2–3), 244–248.
- Hohenegger, M., Suko, J., Gscheidlinger, R., Drobny, H., Zidar, A., 2002. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem. J.* 367 (Pt 2), 423–431.
- Howard, M., Grimaldi, J.C., Bazan, J.F., Lund, F.E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R.M., Walseth, T.F., Lee, H.C., 1993. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* 262 (5136), 1056–1059.
- Humbert, J.P., Matter, N., Artault, J.C., Koppler, P., Malviya, A.N., 1996. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J. Biol. Chem.* 271 (1), 478–485.
- Itoh, M., Ishihara, K., Tomizawa, H., Tanaka, H., Kobune, Y., Ishikawa, J., Kaisho, T., Hirano, T., 1994. Molecular cloning of murine BST-1 having homology with CD38 and Aplysia ADP-ribosyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203 (2), 1309–1317.
- Johnson, J.D., Míslar, S., 2002. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate-sensitive calcium stores initiate insulin signaling in human beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (22), 14566–14571.
- Kaisho, T., Ishikawa, J., Oritani, K., Inazawa, J., Tomizawa, H., Muraoka, O., Ochi, T., Hirano, T., 1994. BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (12), 5325–5329.
- Khoo, K.M., Han, M.K., Park, J.B., Chae, S.W., Kim, U.H., Lee, H.C., Bay, B.H., Chang, C.F., 2000. Localization of the cyclic ADP-ribose-dependent calcium signaling pathway in hepatocyte nucleus. *J. Biol. Chem.* 275 (32), 24807–24817.

- Kinncar, N.P., Boittin, F.X., Thomas, J.M., Galione, A., Evans, A.M., 2004. Lysosome-sarcoplasmic reticulum junctions. A trigger zone for calcium signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and endothelin-1. *J. Biol. Chem.* 279 (52), 54319–54326.
- Knot, H.J., Laher, I., Sobie, E.A., Guatimosim, S., Gomez-Viquez, L., Hartmann, H., Song, L.S., Lederer, W.J., Graier, W.F., Malli, R., Frieden, M., Petersen, O.H., 2005. Twenty years of calcium imaging: cell physiology to dye for. *Mol. Interv.* 5 (2), 112–127.
- Kolisek, M., Beck, A., Fleig, A., Penner, R., 2005. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol. Cell.* 18 (1), 61–69.
- Langhorst, M.F., Schwarzmann, N., Guse, A.H., 2004. Ca<sup>2+</sup> release via ryanodine receptors and Ca<sup>2+</sup> entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in T-lymphocytes. *Cell Signal.* 16 (11), 1283–1289.
- Lee, H.C., 1997. Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol. Rev.* 77 (4), 1133–1164.
- Lee, H.C., 2000. NAADP: An emerging calcium signaling molecule. *J. Membr. Biol.* 173 (1), 1–8.
- Lee, H.C., 2001. Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 317–345.
- Lee, H.C., 2005. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-mediated calcium signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 33693–33696.
- Lee, H.C., Aarhus, R., 1991. ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD<sup>+</sup> into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul.* 2 (3), 203–209.
- Lee, H.C., Aarhus, R., 1995. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 270 (5), 2152–2157.
- Lee, H.C., Munshi, C.B., Graeff, R., 2002. ADP-ribosyl cyclases—A family of cAPR and NAADP metabolizing enzymes. In: Lee, E.H. (Ed.), *Cyclic ADP-Ribose and NAADP Structures, Metabolism and Functions*. Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, pp. 23–43.
- Liang, M., Chini, E.N., Cheng, J., Dousa, T.P., 1999. Synthesis of NAADP and CADPR in mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 371 (2), 317–325.
- Malviya, A.N., Rogue, P., Vincendon, G., 1990. Stereospecific inositol 1,4,5-[<sup>32</sup>P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (23), 9270–9274.
- Malviya, A.N., Rogue, P.J., 1998. Tell me where is calcium bred: clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell* 92 (1), 17–23.
- Masgrau, R., Churchill, G.C., Morgan, A.J., Ashcroft, S.J., Galione, A., 2003. NAADP: a new second messenger for glucose-induced Ca<sup>2+</sup> responses in clonal pancreatic beta cells. *Curr. Biol.* 13 (3), 247–251.
- Mitchell, K.J., Lai, F.A., Rutter, G.A., 2003. Ryanodine receptor type I and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate receptors mediate Ca<sup>2+</sup> release from insulin-containing vesicles in living pancreatic beta-cells (MIN6). *J. Biol. Chem.* 278 (13), 11057–11064.
- Moccia, F., Lim, D., Kyojuka, K., Santella, L., 2004. NAADP triggers the fertilization potential in starfish oocytes. *Cell Calcium* 36 (6), 515–524.
- Mojzisova, A., Krizanova, O., Zacikova, L., Kominkova, V., Ondrias, K., 2001. Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart. *Pflugers Arch.* 441 (5), 674–677.
- Mothet, J.P., Fossier, P., Meunier, F.M., Stinnakre, J., Tauc, L., Baux, G., 1998. Cyclic ADP-ribose and calcium-induced calcium release regulate neurotransmitter release at a cholinergic synapse of *Aplysia*. *J. Physiol.* 507 (Pt 2), 405–414.
- Parekh, A.B., Putney Jr., J.W., 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* 85 (2), 757–810.
- Patel, S., Churchill, G.C., Sharp, T., Galione, A., 2000. Widespread distribution of binding sites for the novel Ca<sup>2+</sup>-mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, in the brain. *J. Biol. Chem.* 275 (47), 36495–36497.
- Patel, S., Churchill, G.C., Galione, A., 2001. Coordination of Ca<sup>2+</sup> signalling by NAADP. *Trends Biochem. Sci.* 26 (8), 482–489.
- Pittenger, C., Kandel, E.R., 2003. In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: *Aplysia* and the hippocampus. *Philos. Trans. R. Soc. London, B Biol. Sci.* 358 (1432), 757–763.
- Rizzuto, R., Duchen, M.R., Pozzan, T., 2004. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca<sup>2+</sup> liaison. *Sci STKE* 2004 (215) re1.
- Rudolf, R., Mongillo, M., Rizzuto, R., Pozzan, T., 2003. Looking forward to seeing calcium. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4 (7), 579–586.
- Shahin, V., Danker, T., Enss, K., Ossig, R., Oberleithner, H., 2001. Evidence for Ca<sup>2+</sup>- and ATP-sensitive peripheral channels in nuclear pore complexes. *FASEB J.* 15 (11), 1895–1901.
- Stehno-Bittel, L., Luckhoff, A., Clapham, D.E., 1995. Calcium release from the nucleus by InsP3 receptor channels. *Neuron* 14 (1), 163–167.
- Verkhatsky, A., 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol. Rev.* 85 (1), 201–279.
- Yamasaki, M., Masgrau, R., Morgan, A.J., Churchill, G.C., Patel, S., Ashcroft, S.J., Galione, A., 2004. Organelle selection determines agonist-specific Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic acinar and beta cells. *J. Biol. Chem.* 279 (8), 7234–7240.
- Yamasaki, M., Thomas, J.M., Churchill, G.C., Garnham, C., Lewis, A.M., Cancela, J.M., Patel, S., Galione, A., 2005. Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca<sup>2+</sup> spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr. Biol.* 15 (9), 874–878.

## Article 2

# **Nucleoplasmic reticulum is not essential in nuclear calcium signalling mediated by cyclic ADP ribose in primary neurons**

S Bezin, P Fossier and J-M Cancela

(soumis)

L'augmentation de la concentration calcique dans le compartiment nucléaire est un élément essentiel pour activer l'expression de certains gènes. Certaines études sur les cellules intactes se focalisant sur le compartiment nucléaire on rapporté l'existence d'une structure correspondant à des invaginations de l'enveloppe nucléaire que les auteurs ont dénommée «réticulum nucléoplasmique». Les auteurs attribuent au «réticulum nucléoplasmique» un rôle important dans la régulation du calcium nucléaire. Ces études ont été effectuées sur des lignées cellulaires cancéreuses telles que les cellules Hela, les 3T3, les SKHep1, les cellules de Gliome C6 et dans la lignée de cellules myoblastiques C2C12. L'observation de noyaux isolés de neurones d'aplysie primaires en microscopie confocale couplée à l'utilisation de marqueurs fluorescents, montre que ces derniers ne contiennent pas de réticulum nucléoplasmique. De plus, l'observation des noyaux en microscopie électronique n'a pas révélé non plus la présence d'une telle structure. Finalement, avec des sondes fluorescentes sensibles au calcium, j'ai observé que l'ADP ribose cyclique active le récepteur à la ryanodine situé sur l'enveloppe nucléaire et mobilise le calcium stocké dans l'enveloppe. Parallèlement, les noyaux isolés génèrent des signaux calciques nucléoplasmiques en réponse l'ADP ribose cyclique. Nos données montrent donc que le réticulum nucléoplasmique n'est pas essentiel à la régulation de l'homéostasie calcique nucléoplasmique puisqu'un signal calcique a pu être généré. Ainsi, il sera important de déterminer dans le futur si la présence ou l'absence d'un réticulum nucléoplasmique peut être reliée à une fonction cellulaire ou nucléaire spécifique.

# **Nucleoplasmic reticulum is not essential in nuclear calcium signalling mediated by cyclic ADPribose in primary neurons**

S Bezin, P Fossier and J-M Cancela\*

Laboratoire de Neurobiologie cellulaire et moléculaire, CNRS, UPR 9040, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

\* To whom correspondence should be addressed.

[jose.cancela@nbcn.cnrs-gif.fr](mailto:jose.cancela@nbcn.cnrs-gif.fr)

Tel: + 33 (0)1 69 82 41 69

Fax : +33 (0)1 69 82 41 41

## **Abstract**

**Nuclear calcium regulation is essential for regulating nuclear process like gene expression. Recent studies mostly performed on immortalized or transformed cell lines reported the presence of a nucleoplasmic reticulum (NR). It has been suggested that NR acts as a storage organelle having an important role in nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. However whether NR is present and necessary in primary neurons for generation of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signalling have never been investigated. Here we show by confocal microscopy and by electronic microscopy that nuclei in intact neurons or isolated nuclei are not endowed with NR. Finally, our experiments performed on isolated nuclei from Aplysia giant neurons show that the nuclear envelope acts as a functional  $\text{Ca}^{2+}$  store which can be mobilized by the second messenger cyclic ADPribose (cADPR) to elicit a nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  elevation. Our study provides evidence that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals could be independent of the presence of NR in neurons.**

## **Key words**

Neuron, Isolated nucleus, Nuclear calcium, Nucleoplasmic reticulum, Cyclic ADP ribose

## Introduction

In neuron, nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  regulation is involved in numerous physiological processes such as gene expression modulation or neuronal plasticity. The nucleus autonomy for the control of nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signals is still a controversial issue. The nuclear compartment is delimited by a double membrane and several studies showed that the outer and inner membranes are endowed with all the necessary machinery to generate a  $\text{Ca}^{2+}$  signal [1]. For example, recent studies performed on isolated nuclei from non neuronal cells showed that nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  transient can be evoked by mobilisation of  $\text{Ca}^{2+}$  from the envelope by three second messengers, namely  $\text{IP}_3$ , cADPR and more recently by NAADP [1-3]. Most of these studies suggested the presence of  $\text{IP}_3$  and ryanodine receptors at the inner face of the nuclear envelope such as in Purkinje neuron, where patch-clamp recordings showed that the inner nuclear membrane possess functional  $\text{IP}_3$  receptors [1, 4]. However in parallel, experiments on intact cells have recently showed the presence in many cell lines of a nuclear tubular structure named “nucleoplasmic reticulum” (NR) consisting in nucleoplasmic invaginations of the endoplasmic reticulum (ER) and of the nuclear envelope (NE) [1, 5-10]. This structure has been suggested to have a key role in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and to constitute the  $\text{Ca}^{2+}$  storage organelle recruited to evoke a nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signal in response to second messengers [1, 6, 8-10].

In order to investigate the possible existence of such a structure in neuronal nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, we looked at nuclei from intact neurons and at freshly isolated nuclei from Aplysia neurons. We use electronic microscopy, confocal and conventional microscopy coupled to endoplasmic reticulum marker and fluorescent sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  dyes to visualise nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  store. In our study, we have never observed any structure resembling to any invagination of the ER and of the NE deep within the nucleus as described above. Finally, we have assessed the ability of the isolated nuclei from primary neurons to generate nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals. Here we show that cADPR, an endogenous modulator of the ryanodine receptors evoked nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  rise by mobilising  $\text{Ca}^{2+}$  from the nuclear envelope.

## Material and methods

### *Isolated nuclei preparation*

Experiments were done on nuclei isolated from ganglia of adult *Aplysia californica*. The connective tissue packing the neurons was removed with fine forceps. Then the neurons were gently broken in a homogeniser to extract the nuclei. The nuclei isolated were

suspended into an intracellular buffer (KCl 450 mM ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM ; HEPES 50 mM ; MgCl<sub>2</sub> 4 mM ; CaCl<sub>2</sub>/EGTA (depending of the experiments); pH 7.2 adjusted with 5N KOH.

### *Confocal imaging*

Nuclei preparations were incubated with different fluorescent Ca<sup>2+</sup> probes. For the experiments performed on the nuclear envelope, Mag Fluo4 AM was used ( $\lambda_{ex}$  = 494 nm and  $\lambda_{em}$  =516 nm) (K<sub>d</sub>=22  $\mu$ M). The free Ca<sup>2+</sup> concentration of the intracellular medium was buffered to 400 nM using 1.4 mM Ca<sup>2+</sup> and 2 mM EGTA. Nuclei were loaded by incubation with 30  $\mu$ M Mag-Fluo4 AM and 5 mM ATP for 1 hr in the intracellular medium.

To measure Ca<sup>2+</sup> changes in the nucleoplasmic space, we loaded the nuclei with Calcium Green dextran 70 kDa ( $\lambda_{ex}$ = 494 nm and  $\lambda_{em}$  =516 nm) (K<sub>d</sub> = 90nM) at a concentration of 20  $\mu$ M together with 3 mM ATP for 1 hr. The intracellular medium was buffered to a free Ca<sup>2+</sup> concentration of 100 nM. Ca<sup>2+</sup> changes in the lumen of the nuclear envelope and nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> levels were measured using an inverted Leica SP2 RS confocal microscope (obj X40, X20) and the data analysed with a 2.5 Leica confocal software. Some of the experiments were also performed using an up-right Olympus microscope (obj X40) coupled with a CCD camera and a xenon lamp. Images were analysed with the Axon Imaging Workbench software. Ca<sup>2+</sup> concentration changes are expressed in fluorescence ratio as  $f/f_0$  (fluorescence/fluorescence at the beginning of the experiment).

To visualise DNA in *Aplysia* ganglia and in isolated nuclei, we used the cell-permeant nucleic acid marker, SYTO 13 Green from Molecular Probes at a concentration of 5  $\mu$ M ( $\lambda_{ex}$ = 488nm and  $\lambda_{em}$  =509 nm). Staining of the nuclear envelop was performed with DIOC<sub>6</sub> (from Sigma,  $\lambda_{ex}$ = 484 nm and  $\lambda_{em}$  =501 nm). The staining was done using 1.75  $\mu$ M DIOC<sub>6</sub> for 7 min.

## **Results**

To visualise the nuclei from the *Aplysia* nervous ganglia, we have removed the conjonctive tissue packing them and then the nuclei were stained with a nucleic acid probe SYTO 13 Green. We have observed that the nuclei occupy most of the soma without any evidence for cytoplasmic invagination within the nuclei (**Fig 1.A.a**). Visualisation by optical microscopy of thin sections of intact cells stained with toluidin blue revealed a uniform nucleus with no evidence for any invagination of the ER or the NE within the nucleus (**Fig 1.A.b**).

We have then decided to look at isolated nuclei from *Aplysia* neurons. Following the isolation procedure, the nuclei were stained with a nucleic acid marker (SYTO 13 green, 1  $\mu$ M). The staining was homogeneously distributed in the nucleoplasm (**Fig 1.B**).

Studies performed on cell lines, which have reported intranuclear invaginations of the envelope also called NR, used DiOC<sub>6</sub>. This marker is a lipophilic dye that stains intracellular membranes, such as reticulum endoplasmic [7, 9]. We used DiOC<sub>6</sub> to look at the possible existence of such reticulum network in the nucleoplasm. Labelling of isolated *Aplysia* nuclei with DiOC<sub>6</sub> (1.75  $\mu$ M) was bright, continuous and restricted to the ring formed by the nuclear envelope (n=8) (**Fig 1.C**). No NR within the nucleoplasm was observed in our preparations. We have further examined our isolated nuclei by electronic microscopy (**Fig 1.D**). Electron micrographs confirmed that our nuclei were free from any endoplasmic reticulum contamination and have no tubular structures appearing in the transversal sections of the nuclei such as the one observed in the cell lines studied [7, 9].

We next have investigated whether the nuclear envelope of nuclei showing no NR could act as functional Ca<sup>2+</sup> stores sensitive to the second messenger cADPR. Nuclei of the *Aplysia* neurons were isolated and the luminal Ca<sup>2+</sup> content of the nuclear envelope was measured using Mag-Fluo-4 AM a Ca<sup>2+</sup>-sensitive dye of low affinity (**Fig 2.A**). The NR has been qualified of a Ca<sup>2+</sup> storage organelle in regard to its ability to be loaded by fluorescent sensitive Ca<sup>2+</sup> dyes and its potential role in the generation of nuclear Ca<sup>2+</sup> elevation [6]. In our preparation, the labelling pattern was similar to the one observed with DiOC<sub>6</sub>, confirming again the absence of NR. Fluorimetric Ca<sup>2+</sup> measurements using confocal microscopy showed that the Ca<sup>2+</sup> content in the nuclear lumen of the envelope decreased after addition of cADPR (5  $\mu$ M) (**Fig 2.B**) (n=3). The same decrease was observed with caffeine stimulation at 10 mM (**Fig 2.C**), a well known modulator of ryanodine receptors. After application of ryanodine at 500  $\mu$ M, the responsiveness of the nuclei to caffeine and cADPR was mostly abolished (n=3/3) (**Fig 2.D and E**). Finally, we have loaded the nucleoplasm of isolated nuclei with the Ca<sup>2+</sup> sensitive probe Calcium Green dextran conjugated 70 kDa (**Fig 2.F**). In our experiment, the nucleoplasm was loaded homogeneously with no apparent invagination of the nuclear envelope. Short application of cADPR at 5  $\mu$ M elicited a transient nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> rise (**Fig 2.G**).

## Discussion

Our study performed on isolated neuronal nuclei provides fresh evidence for the neuronal nucleus as a fully functional Ca<sup>2+</sup> store. Previous results on Purkinje cell nuclei suggested the

presence on the inner nuclear membrane of functional IP<sub>3</sub> receptors [4]. Here we bring pharmacological evidences suggesting that the neuronal nuclear membrane is endowed with functional ryanodine receptors activated by the Ca<sup>2+</sup> releasing messenger cADPR. This messenger is produced by ADP ribosyl cyclase which has been first discovered in *Aplysia ovotestis* and present in *Aplysia* neurons [11, 12]. Our data are in agreement with previous reports obtained from isolated nuclei from hepatocytes and pancreatic acinar cells [1-3, 13, 14]. In neurons, nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> elevation is of particular interest in regard to the importance of nuclear Ca<sup>2+</sup> signal for regulating the activity of some transcription factor like CREB or DREAM [1, 15]. In overall our data contrast with those obtained from cells lines such HeLa, Glioma C6 cells, C2C12 or SKHep1 where a NR has been described as a storage Ca<sup>2+</sup> organelle which could have a significant role in nuclear Ca<sup>2+</sup> homeostasis regulation [6, 7, 9, 10]. Other experiments on freshly isolated nuclei from primary hepatocytes or primary pancreatic acinar cells did not mention neither the presence nor the absence of NR [3, 13]. Our study brings rather evidence for the nucleus autonomy with the main role played by the nuclear envelope without requirement for a NR at least in primary neurons. Although our data clearly showed that NR is not essential for nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling, it will be nevertheless very important in a near future to look at whether the presence of the NR structure could be a dynamic process related to a specific cellular or nuclear function.

**Aknowledgements:**

The authors are indebted to Mr Cantou from the Station Méditerranéenne de l'Environnement et du Littoral, Sète (France) and to the Syndicat Mixte d'Équipement Littoral (Mr O. Richard), Blainville-sur-Mer (France) for collecting *Aplysia*. The work was supported by grants from AFM and ARC to J-M C. We thank the platform d'imagerie RIO de Gif-sur-Yvette.

## Legends

### **Fig.1. Images of intact *Aplysia* neurons and isolated nuclei labelled with different markers**

Labelling of an *Aplysia* giant neuron (**Aa**) with the nucleic acid marker SYTO 13 green (1 $\mu$ M). Semi-thin section of a neuron stained with toluidin blue observed by optical microscopy (**Ab**). Nucleic acids of isolated nuclei were labelled with SYTO 13 green and the nuclear envelope with the endoplasmic reticulum marker DiOC<sub>6</sub> (**B and C**). Electron micrograph of an isolated neuronal nucleus (**D**).

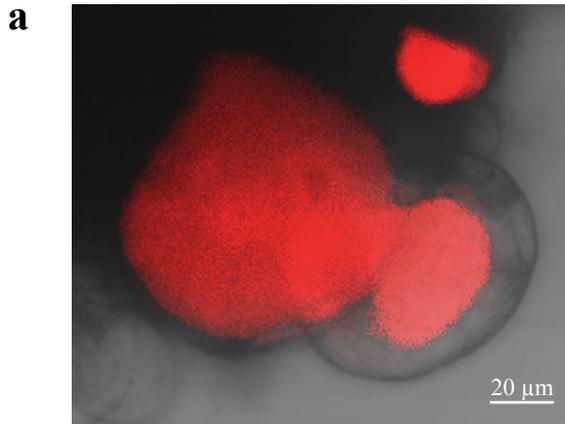
### **Fig.2. Effect of cADPR and caffeine on isolated nuclei**

Fluorescence image of the nuclear envelope after incubation with Mag-fluo-4AM (30 $\mu$ M) (**A**). The fluorescent ring corresponds to the Ca<sup>2+</sup> sensitive probe Mag-Fluo-4 sequestered in the lumen of the nuclear envelope. On nuclei loaded with Mag-fluo-4AM, cADPR (5 $\mu$ M) depletes the envelope Ca<sup>2+</sup> content (**B**). Caffeine, another agonist of ryanodine receptors (10 mM) promotes a decrease in the nuclear envelope Ca<sup>2+</sup> concentration (**C**). The cADPR and caffeine evoked Ca<sup>2+</sup> release are abolished by ryanodine (500 $\mu$ M) (**D and E**). Nucleoplasm of isolated *Aplysia* neuron nuclei were loaded with the Ca<sup>2+</sup> sensitive calcium Green dextran (**F**). Applications of cADPR (5  $\mu$ M) (**G**) produce a transient increase of the Ca<sup>2+</sup> concentration in the nucleoplasm.

## References

1. Alonso MT, Villalobos C, Chamero P, Alvarez J, Garcia-Sancho J (2006) Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium* 40:513-25
2. Adebajo OA, Anandatheerthavarada HK, Koval AP, Moonga BS, Biswas G, Sun L, Sodam BR, Bevis PJ, Huang CL, Epstein S, Lai FA, Avadhani NG, Zaidi M (1999) A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Nat Cell Biol* 1:409-14
3. Gerasimenko JV, Maruyama Y, Yano K, Dolman NJ, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV (2003) NAADP mobilizes Ca<sup>2+</sup> from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol* 163:271-82
4. Marchenko SM, Yarotsky VV, Kovalenko TN, Kostyuk PG, Thomas RC (2005) Spontaneously active and InsP<sub>3</sub>-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *J Physiol* 565:897-910
5. Clubb BH, Locke M (1998) 3T3 cells have nuclear invaginations containing F-actin. *Tissue Cell* 30:684-91
6. Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 5:440-6
7. Fricker M, Hollinshead M, White N, Vaux D (1997) Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *J Cell Biol* 136:531-44
8. Lui PP, Chan FL, Suen YK, Kwok TT, Kong SK (2003) The nucleus of HeLa cells contains tubular structures for Ca<sup>2+</sup> signaling with the involvement of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 308:826-33
9. Lui PP, Lee CY, Tsang D, Kong SK (1998) Ca<sup>2+</sup> is released from the nuclear tubular structure into nucleoplasm in C6 glioma cells after stimulation with phorbol ester. *FEBS Lett* 432:82-7
10. Marius P, Guerra MT, Nathanson MH, Ehrlich BE, Leite MF (2006) Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 39:65-73
11. Lee HC, Aarhus R (1991) ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD<sup>+</sup> into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul* 2:203-9
12. Mothet JP, Fossier P, Meunier FM, Stinnakre J, Tauc L, Baux G (1998) Cyclic ADP-ribose and calcium-induced calcium release regulate neurotransmitter release at a cholinergic synapse of *Aplysia*. *J Physiol* 507 ( Pt 2):405-14
13. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH (1995) ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from the nuclear envelope. *Cell* 80:439-44
14. Khoo KM, Han MK, Park JB, Chae SW, Kim UH, Lee HC, Bay BH, Chang CF (2000) Localization of the cyclic ADP-ribose-dependent calcium signaling pathway in hepatocyte nucleus. *J Biol Chem* 275:24807-17
15. Bading H (2000) Transcription-dependent neuronal plasticity the nuclear calcium hypothesis. *Eur J Biochem* 267:5280-3

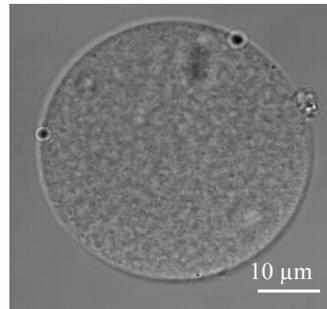
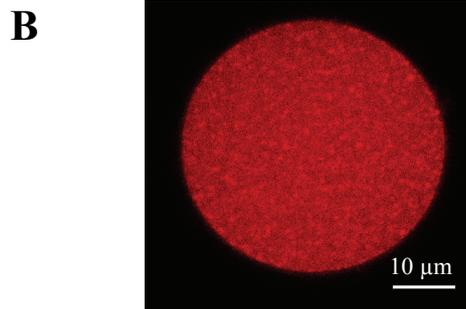
**A** Intact nervous ganglia loaded with SYTO 13 green



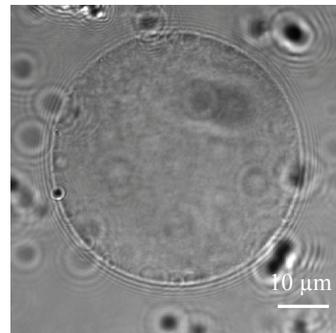
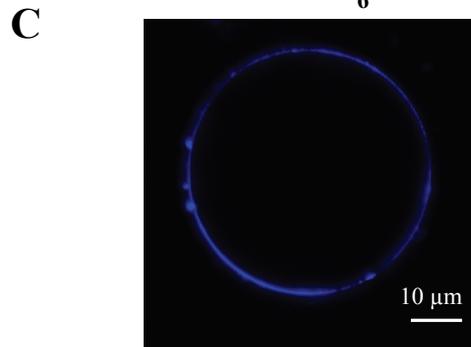
Intact cell colored with toluidin blue



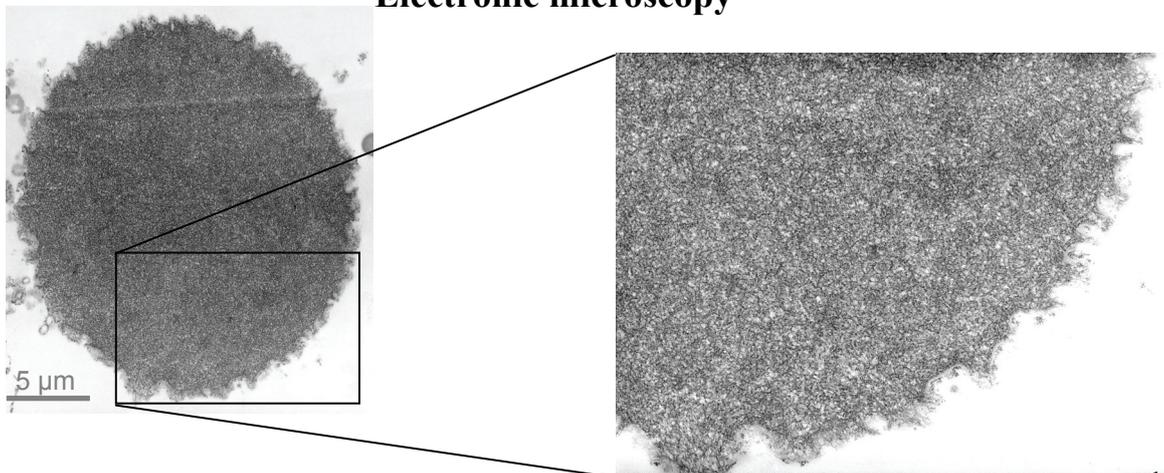
SYTO 13 green

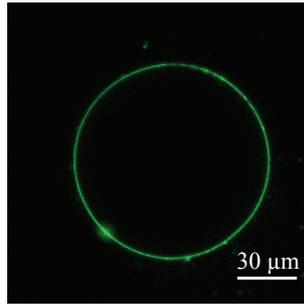


DiOC<sub>6</sub>



**D** Electronic microscopy

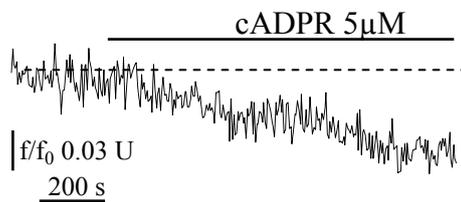


**A**

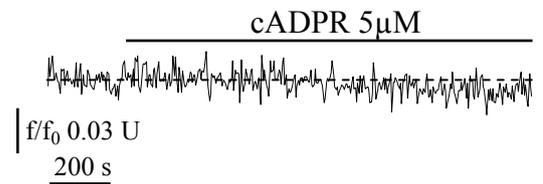
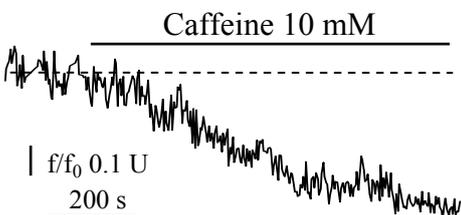
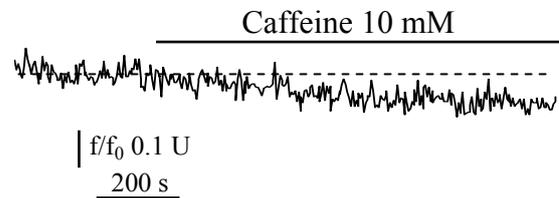
**Nuclear  
enveloppe  
labelling with  
Mag-fluo-4**

### Nuclear envelope $Ca^{2+}$ responses to agonists

**Nuclei Control responses**

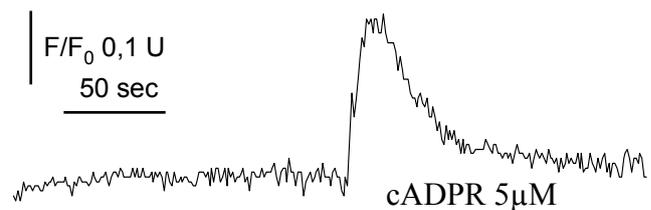
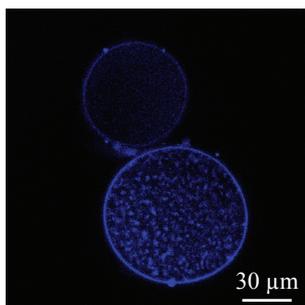
**B**

**Nuclei responses after 500  $\mu$ M ryanodine treatment**

**D****C****E**

### Mesurement of nucleoplamic calcium elevation

**Nucleus loaded with Calcium  
green dextran 70 kDa**

**G****F**

### Article 3

## **Regulation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling by translocation of the Ca<sup>2+</sup> messenger synthesizing enzyme ADP-ribosyl cyclase during neuronal depolarization**

S Bezin, G Charpentier, HC Lee, G Baux, P Fossier and J-M Cancela

(soumis)

Dans les neurones, de nombreuses fonctions cellulaires sont régulées par le calcium. La spécificité des réponses dépend de l'amplitude, de la fréquence et de la localisation du signal calcique. L'augmentation de la concentration calcique au sein du noyau est nécessaire pour l'expression de nombreux gènes. Cependant, les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'homéostasie calcique nucléaire, tel que le rôle des second messagers dans la mobilisation du calcium nucléaire, sont encore mal connus. L'ADP ribosyl cyclase est un enzyme à l'origine de la synthèse de deux second messagers libérant du calcium : le cyclic ADP-ribose (cADPR) et l'acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate (NAADP). Dans un premier temps, nous avons montré que suite à la dépolarisation des neurones de ganglions nerveux d'aplysie, il se produit une translocation de l'ADP ribosyl cyclase du cytoplasme vers le noyau. Cette translocation est dépendante de l'entrée de calcium par les canaux voltage dépendants de type L. Sur une préparation de noyaux isolés de neurones, nous avons ensuite observé que les second messagers : inositol 1,4,5 trisphosphate (IP<sub>3</sub>), cADPR et NAADP, libéraient du calcium de l'enveloppe nucléaire vers le nucléoplasme en générant des oscillations calciques spécifiques aux messagers. De plus, nous avons effectué une étude pharmacologique qui montre que le NAADP active son propre récepteur. Ce dernier coopère avec les récepteurs à la ryanodine et à l'IP<sub>3</sub> pour produire le signal calcique nucléoplasmique. Nos données nous ont donc permis de proposer un nouveau un modèle selon lequel la translocation de la cyclase dans le noyau ainsi que la coopération intranucléaire des récepteurs canaux libérant du

calcium sont des éléments importants pour la régulation fine de la concentration calcique dans le noyau des neurones.

# **Regulation of nuclear $\text{Ca}^{2+}$ signalling by translocation of the $\text{Ca}^{2+}$ messenger synthesizing enzyme ADP-ribosyl cyclase during neuronal depolarization**

S Bezin<sup>1</sup>, G Charpentier<sup>1,2</sup>, HC Lee<sup>3</sup>, G Baux<sup>1</sup>, P Fossier<sup>1</sup> and J-M Cancela<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Neurobiologie cellulaire et moléculaire, CNRS, UPR 9040, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

<sup>2</sup> Université Bordeaux 1 laboratoire DMPFCS, IECB. 2, Rue Robert Escarpit, 33607 PESSAC, France

<sup>3</sup> Department of Physiology, University of Hong Kong, 4/F Lab Block, Faculty of Medicine Building, 21 Sassoon Road, Hong Kong

## **Number of characters: 48 911**

Running Title: Nuclear translocation of the ADP-ribosyl cyclase

Key words: ADPribosyl cyclase, NAADP, oscillations, cADPR,  $\text{IP}_3$

\* To whom correspondence should be addressed.

jose.cancela@nbcn.cnrs-gif.fr

Tel: + 33 (01) 69 82 41 69

Fax : +33 (01) 69 82 41 41

**In neurons, voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels and nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signalling play a key role in the regulation of gene expression. However, the link between electrical activity and biochemical cascades activation involved in the generation of the nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signalling is poorly understood. Here we show that depolarization of *Aplysia* neurons induces the translocation of ADP-ribosyl cyclase, a  $\text{Ca}^{2+}$  messenger synthesizing enzyme, from the cytosol into the nucleus. The translocation is dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  influx through mainly the voltage dependent L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. We report also that specific nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signals can be induced by three different calcium messengers, cyclic ADP-ribose (cADPR), nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP), both produced by the ADP-ribosyl cyclase, and inositol 1,4,5 trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ). Moreover, our pharmacological data show that NAADP acts on its own receptor, which cooperates with the  $\text{IP}_3$ - and the ryanodine- receptors to generate nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. We propose a new model where voltage dependent L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels-induced nuclear translocation of the cytosolic cyclase is a crucial step in the fine tuning of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals in neurons.**

## Introduction

$\text{Ca}^{2+}$  is one of the most important intracellular messengers in living cells and is involved in many cellular functions such as egg fertilization, synaptic plasticity, muscle cell contraction, gene expression, enzyme secretion and cell proliferation (Berridge et al., 2003; Carrion et al., 1999; Knot et al., 2005; Ledo et al., 2002; Parekh and Putney, 2005).  $\text{Ca}^{2+}$  signals are not all-or-none events; they vary greatly in amplitude, duration and localization (Berridge et al., 2003; Cancela, 2001). In neurons,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulation of gene expression has been mostly investigated in regard to  $\text{Ca}^{2+}$  entry through voltage-dependent L type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and NMDA receptors (Gomez-Ospina et al., 2006; Hawkins et al., 2006). Although  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in the nucleus has been shown to be a key element in the regulation of numerous neuronal functions such as gene transcription and synaptic plasticity, the mechanism involved in its generation remains largely unexplored (Berridge et al., 2003; Hong et al., 2005; Verkhratsky, 2005).

Nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  changes can result either from passive diffusion through the nuclear pore following cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increases or from mobilization of  $\text{Ca}^{2+}$  sequestered into the nuclear envelope by various intracellular messengers (Alonso et al., 2006; Gerasimenko et al., 2003). In the latter process, cytosolic and nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  can be independently regulated (Alonso et al., 2006; Chamero et al., 2002; Leite et al., 2003). The differential control of the cytosolic and nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  involves, in principle, several factors including cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  buffering and  $\text{Ca}^{2+}$  sequestration by the endoplasmic reticulum and the mitochondria (Alonso et al., 2006; Chamero et al., 2002; Gomes et al., 2006; Leite et al., 2003; Park et al., 2001; Rizzuto and Pozzan, 2006). The nucleus is equipped with all the necessary machinery for generating nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, including  $\text{Ca}^{2+}$  pumps and release channels (Alonso et al., 2006). Several groups have identified functional inositol 1,4,5 trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) and/or ryanodine receptors in the inner membrane of the nuclear envelope (Adebanjo et al., 1999;

Cardenas et al., 2005; Gerasimenko et al., 1995; Khoo et al., 2000; Malviya et al., 1990) or in the outer membrane of the contiguous nucleoplasmic reticulum (Echevarria et al., 2003; Marius et al., 2006).

NAADP and cADPR, two  $\text{Ca}^{2+}$  releasing messengers are produced by multifunctional enzymes of the ADP-ribosyl cyclase family (Aarhus et al., 1995; Howard et al., 1993; Lee and Aarhus, 1991). Several of these enzymes have been purified and cloned, including the ectoenzymes CD38 and CD157, and a soluble cyclase from the sea mollusk *Aplysia* (Lee and Aarhus, 1991). The surface antigen CD38 has been mostly found at the plasma membrane with the catalytic site exposed to the extracellular space (Malavasi et al., 2006). To solve this topological paradox, several authors have proposed that CD38 could generate the synthesis of extracellular cADPR which then may enter into the cell interior possibly through nucleoside transporters (De Flora et al., 2004). In addition intracellular locations of CD38 have been reported such as in nucleus where no links with physiological stimuli were reported and no evidence for a nuclear role for NAADP (Adebanjo et al., 1999; Khoo et al., 2000). The synthesis of NAADP through the base-exchange reaction by this enzyme requires exclusive acidic conditions. In the case of the *Aplysia* cyclase, although the base-exchange reaction depends critically on the pH, it appears that NAADP synthesis is possible at more neutral pH (Aarhus et al., 1995). In mammals, additional enzymes exist and CD38 may not be regarded as the principal cyclase (Ceni et al., 2003; Lee, 2005; Walseth, 2005). For example, a novel ADP-ribosyl cyclase for cADPR synthesis has recently been detected in the brain (Ceni et al., 2003) and one for NAADP synthesis in myometrial cells (Soares et al., 2007). Recently a soluble form has been purified in sea urchin (Churamani et al., 2007). Clearly, our understanding of the physiological role of the expanding ADPribosyl cyclase family remains poor and the cyclase from *Aplysia* remains the only prototypical form for the soluble enzyme characterized in neurons so far.

Pioneering work on the Neurobiology of learning has been performed on *Aplysia californica*. For example, It has been found that synaptic potentiation at sensory-motor neuron synapses require  $\text{Ca}^{2+}$  entry through L type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and/or  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation from intracellular stores sensitive to  $\text{IP}_3$  and ryanodine depending of the potentiation type (Antonov et al., 2003; Barco et al., 2006; Hawkins et al., 2006; Jin and Hawkins, 2003). Our previous studies have shown that the soluble ADP-ribosyl cyclase is not only present in the neurons of the *Aplysia* buccal ganglion, but that its product cADPR, an endogenous modulator of the ryanodine receptors, can enhance the evoked-synaptic transmission (Mothet et al., 1998). More recently, we showed that NAADP, the other product of the cyclase, can increase neurotransmitter release at well identified cholinergic synapses (Chameau et al., 2001). To further delineate the  $\text{Ca}^{2+}$  signalling pathway mediated by the *Aplysia* cyclase, we looked at its distribution in the *Aplysia* nervous system which has not been characterized.

In this study, we have revealed for the first time that in resting conditions, the soluble *Aplysia* ADPribosyl cyclase is localized in the cytosol of the soma of neurons. Importantly, we have found that depolarization of *Aplysia* neurons induces the translocation of ADP-ribosyl cyclase from the cytosol into the nucleus. The translocation is dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the voltage dependent L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. We also show that the neuronal nucleus is a  $\text{Ca}^{2+}$  stores which could generate specific nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signals in response to three different calcium messengers, cADPR, NAADP, both produced by the ADP-ribosyl cyclase, and  $\text{IP}_3$ . Finally, we propose that the translocation of the  $\text{Ca}^{2+}$  signalling enzyme to nucleus following neuronal depolarisation may provide a new link between the electrical activity and the biochemical cascades leading to nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals generation.

## **Results**

### *Localization of the Aplysia cyclase in intact nervous ganglia*

The *Aplysia* cyclase was first discovered in the ovotestis (Hellmich and Strumwasser, 1991; Lee and Aarhus, 1991), but its distribution in the nervous system of *Aplysia* has not been characterized. Typical *Aplysia* neurons contain a large nucleus surrounded by a thin cytoplasm (**Fig 1A**). The localization of the enzyme was revealed by confocal microscopy using a specific antibody raised against the cyclase (Munshi et al., 1999). In resting conditions, the cyclase was almost exclusively localized in the thin cytosol surrounding the nucleus of the soma (**Fig 1B**, n= 75/81). To investigate whether the cyclase distribution could change during neuronal activities, the neurons were depolarized for 20 min by the addition of 110 mM KCl. Under this condition, the nuclear localization of the enzyme was dramatically enhanced (**Fig 1C**, n=35/42). This depolarization-induced translocation of the cyclase was prevented by prior incubation of the ganglia with the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA-AM (50  $\mu\text{M}$ , 30 min, n=28/29) (**Fig 2A**). Extracellular addition of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitor (nifedipine 10  $\mu\text{M}$ , sigma, n=33/33) likewise prevented the translocation (**Fig 2B**). In contrast, extracellular application of  $\omega$ -conotoxins (CN VIIA and S VI B, 5  $\mu\text{M}$ ), which block the N- and P-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, did not affect the depolarization-induced translocation of the cyclase (**Fig 2C**, n=15/20). These data indicate the translocation of the cyclase to the nucleus is a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent process triggered by  $\text{Ca}^{2+}$  entry through the L-type voltage-dependent channels, which, in turn, are activated by membrane depolarization.

*The nuclear envelope is a  $\text{Ca}^{2+}$  store sensitive to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  releasing messengers*

Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  buffering by the endoplasmic reticulum and the mitochondria (Rizzuto and Pozzan, 2006) could insulate the nucleus (Park et al., 2001). Although it is poorly known in neurons, the nucleus could be autonomous by mobilization of  $\text{Ca}^{2+}$  sequestered into the nuclear envelope. To test whether the nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  stores are responsive to cADPR and NAADP, the two  $\text{Ca}^{2+}$  messengers produced by the *Aplysia* cyclase, the large nuclei of the *Aplysia* neurons were isolated. The luminal  $\text{Ca}^{2+}$  of the nuclear envelope was measured by

loading Mag-Fluo-4 (30  $\mu\text{M}$ ) into the lumen, using a membrane permeant AM-form of the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dye of low affinity (**Fig 3A**). Fluorimetric measurements using confocal microscopy showed that the  $\text{Ca}^{2+}$  content in the luminal space increased following the addition of ATP (5 mM) (**Fig 3B**) (n=3). More importantly, addition of the second messengers  $\text{IP}_3$  (5 to 10  $\mu\text{M}$ ; n= 8) or cADPR (5 to 10  $\mu\text{M}$ ; n= 8) (**Fig 3C, D**) likewise decreased the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the nuclear envelope, indicating that it is a fully functional  $\text{Ca}^{2+}$  store.

NAADP is known to produce biphasic response, releasing  $\text{Ca}^{2+}$  from the sensitive stores at low concentrations while desensitizing its own receptor at high concentrations (Cancela et al., 1999). Various NAADP concentrations, ranging from 10 nM to 100  $\mu\text{M}$ , were thus tested on the isolated nuclei (**Fig 3E, F, G**). With NAADP in the nanomolar range (10 to 500 nM), all nuclei examined responded with decreases in  $\text{Ca}^{2+}$  contents (n=3 for each concentration) (**Fig 3E, F**). In stark contrast, at 1 and 10  $\mu\text{M}$ , NAADP failed to evoke a  $\text{Ca}^{2+}$  response in 2 out of 3 nuclei tested for each concentration and at 100  $\mu\text{M}$  NAADP, 5 out of 6 nuclei, showed no response (**Fig 3G**). Finally, if the nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  stores were first depleted by thapsigargin (5  $\mu\text{M}$ ), a widely used inhibitor of the sarco(endoplasmic)  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA), neither  $\text{IP}_3$  nor NAADP could release any more  $\text{Ca}^{2+}$ , indicating that both messengers release  $\text{Ca}^{2+}$  from the same thapsigargin-sensitive stores (**Fig 3H**, n=8, n=10, respectively).

To determine whether the  $\text{Ca}^{2+}$  release from the nuclear envelope would result in an increase of  $\text{Ca}^{2+}$  in the nucleoplasm, a fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  probe, Fluo-4 dextran (10 kDa, 20  $\mu\text{M}$ ) was loaded into the nucleoplasm (**Fig 4A**). Addition of  $\text{IP}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ; n= 21), cADPR (5  $\mu\text{M}$ ; n= 14) or NAADP (500 nM; n= 37) at the optimal concentrations determined above, indeed evoked a modest (**sup data Fig A**) but significant increase of the nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$

concentration (**Fig 4B, C, D**). In many nuclei, intra-nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations were observed following the application of the second messengers (**Fig 4B, C, D**). In 64% of the investigated nuclei, NAADP evoked  $0.7 \pm 0.06$  oscillations/min for  $1340 \pm 140$  s ( $n=18/28$ ), whereas  $\text{IP}_3$  evoked  $1.1 \pm 0.14$  oscillations/min for  $1300 \pm 150$  s in 55 % of the nuclei ( $n=5/9$ ). The difference in the mean frequency evoked by  $\text{IP}_3$  and by NAADP was statistically significant ( $P = 0.012$ ). The mean frequency of cADPR evoked  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations was  $0.9 \pm 0.13$ /min, for  $1075 \pm 290$  s, in 75% of the nuclei ( $n=6/8$ ), which was not significantly different from either of the two means listed above.

The nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations suggest that the release mechanisms involved are capable of self-limiting by feed-back. Indeed, none of the three  $\text{Ca}^{2+}$  messengers were able to totally discharge the nuclear stores. Addition of a  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore (ionomycin, 5  $\mu\text{M}$ ) elicited a much larger increase. Also consistent with feed-back is the transient nature of the  $\text{Ca}^{2+}$  increase (**sup data Fig 1 B**). The decline is most likely due to diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  out of the nuclei through the nuclear pores, following the cessation of  $\text{Ca}^{2+}$  release. As shown in (**sup data Fig 1 A**), after the release induced by  $\text{IP}_3$  had reached the peak and started to decline, addition of  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mM) elicited a rapid and large increase in the nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, which could be buffered back by EGTA, indicating that the nuclear pores are permeant to  $\text{Ca}^{2+}$ , in agreement with previous work (Brini et al., 1993; Gerasimenko et al., 2003; Gerasimenko et al., 1995; Lipp et al., 1997; Rizzuto and Pozzan, 2006). Similar results were obtained after the NAADP- or cADPR- induced release ( $n= 6$ ).

In contrast to nanomolar concentrations (**Fig. 5A**), 100  $\mu\text{M}$  NAADP failed to induce an increase of the nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n = 9$ ), consistent with the biphasic behaviour described above (**Fig. 3**). However, subsequent addition of cADPR (5  $\mu\text{M}$ ) still resulted in a nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  increase ( $n = 5$ ) (**Fig 5A**). Thus, self-desensitisation of the NAADP-release mechanism did not impair the effect of cADPR on these nuclei, indicating that cADPR

and NAADP target different release mechanisms in the nuclear envelope. The specificity of NAADP-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  release was verified by testing two inactive analogs of NAADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP, 500 nM) and nicotinic acid adenine dinucleotide (NAAD, 500 nM). Both were ineffective; either applied alone or in combination ( $n = 5$ ) (**Fig 5B**).

*The nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  store supports  $\text{Ca}^{2+}$  releasing receptor interactions*

Previous studies showed that NAADP targets acidic  $\text{Ca}^{2+}$  stores, such as lysosomes and endosomes, (Churchill et al., 2002; Menteyne et al., 2006). The isolated nuclei we used appeared to be free of these acidic compartments (**Sup Data Fig 1 C**).

As shown in Fig. 3H, blocking the endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -pump with thapsigargin (30 min, 5  $\mu\text{M}$ ) can deplete the nuclear stores even in the presence of ATP. After the store depletion, none of the three messengers,  $\text{IP}_3$ , cADPR nor NAADP, were able to evoke any changes of nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in 16 out of 20 nuclei tested ( $\text{IP}_3$   $n=6$ ; cADPR  $n=4$ ; NAADP:  $n=10$ ) (**Fig 5D-H**).

Our previous study has shown that in intact *Aplysia* neurons the NAADP receptor itself is not sensitive to heparin or ryanodine (Chameau et al., 2001) but in some intact cells, the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signals evoked by NAADP require the activation of adjacent  $\text{IP}_3$  and/or ryanodine receptors through a  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) mechanism (Cancela JM, 2003; Cancela et al., 2000; Cancela et al., 2002; Dammermann and Guse, 2005; Fliegert et al., 2007; Galione and Petersen, 2005; Lee, 2005). Heparin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used to block the  $\text{IP}_3$ -receptor, which indeed inhibited or drastically reduced the  $\text{IP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (**Fig 6D**) in 19 nuclei tested. The heparin treatment had no or very little effect on cADPR-elicited  $\text{Ca}^{2+}$  responses ( $n = 8$ ) (**Fig 6E**), but did block NAADP (500nM) from evoking  $\text{Ca}^{2+}$  release (**Fig 6F**) ( $n = 22/26$ ). This suggests there was a strong cooperation between the  $\text{IP}_3$ - and the NAADP- receptors in the nuclear envelope, amplifying the  $\text{Ca}^{2+}$  signals induced by NAADP.

Treatment of the *Aplysia* nuclei with 500  $\mu$ M ryanodine did not block the  $\text{Ca}^{2+}$ -release elicited by  $\text{IP}_3$  (10  $\mu$ M) ( $n = 7$ ) (**Fig 6G**), but strongly inhibited both the cADPR (5-10  $\mu$ M) evoked (**Fig 6H**,  $n=8$ ) and the NAADP (500 nM) evoked responses (**Fig 6I**). In the presence of ryanodine, NAADP failed to induce a  $\text{Ca}^{2+}$  release in 22 nuclei out of 33, whereas in the 11 responding nuclei the release was drastically reduced in amplitude ( $n=11$ ). These data indicate that full NAADP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses require functioning ryanodine-receptors. Another drug that has been reported to be effective in inhibiting NAADP signalling in intact cells is SKF 96365 (Langhorst et al., 2004; Moccia et al., 2003). The drug (10  $\mu$ M) had no significant effect on the  $\text{IP}_3$  or cADPR-evoked  $\text{Ca}^{2+}$ -release ( $n = 4$  for  $\text{IP}_3$ ;  $n = 5$  for cADPR) (**Fig 6J, K**) but blocked the NAADP-evoked response (**Fig 6L**) ( $n=16$ ). Our data contrast with what has been described in nuclei preparations isolated from pancreatic acinar cells, where NAADP was suggested to target the ryanodine receptor (Gerasimenko et al., 2003).

## Discussion

NAADP is a  $\text{Ca}^{2+}$  releasing molecule that has recently been added to the list of second messengers for  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization (Lee, 2003). The  $\text{Ca}^{2+}$  releasing property of NAADP was first discovered in sea urchin eggs (Lee and Aarhus, 1995) and has since been found in other living organisms including plants and mammals (Bezin et al., 2006; Galione and Petersen, 2005; Lee, 2005). It is known to be involved in regulating a wide range of physiological processes (Albrieux et al., 1998; Cancela, 2001; Masgrau et al., 2003; Yamasaki et al., 2005). Evidence suggests it targets a distinct, but yet uncharacterized, receptor in the thapsigargin-insensitive stores, such as lysosomes or secretory granules (Churchill et al., 2002; Gerasimenko et al., 2006; Menteyne et al., 2006; Yamasaki et al., 2004). Interestingly, it has been recently suggested that the lysosomal trp-like channel mucolipin I could be the target of NAADP (Zhang and Li, 2007). In the same way, the differential effects of SK&F 96365 we observed in our nuclear experiments indicate that the release mechanisms activated by the

three  $\text{Ca}^{2+}$  messengers have different pharmacology, suggesting separate and distinct receptors are involved (**Fig. 7**). Our experiments provide evidence for the nuclear envelope as a new  $\text{Ca}^{2+}$  stores-sensitive to NAADP in neurons through the activation of its own receptor. This nuclear NAADP sensitivity could in principle correlates well with the trp-like channel mucolipin I distribution since it has a putative nuclear localisation sequence (Bach, 2001). The density of the NAADP receptor in the nucleus, however, would appear to be low, and its full effect requires the amplification of nearby  $\text{IP}_3$ - and ryanodine- receptors (**Fig. 6, 7**). The  $\text{Ca}^{2+}$  store distribution can be entirely different in the synapses. Indeed, electrophysiological experiments have shown that neurotransmitter release in response to  $\text{IP}_3$ , cADPR or NAADP injections into the intact *Aplysia* neurons are all comparable and independent (Chameau et al., 2001). Thus, the NAADP-induced release is shown to be unaffected by blockage of either the  $\text{IP}_3$ - or the ryanodine- receptor, indicating the density of the NAADP receptor would be high enough in the synapses that further amplification by  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release is not necessary.

In neurons, nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations are particularly important for transcription factors activation. Calcium has been shown to directly bind transcription factors like DREAM (Carrion et al., 1999) or activate the nuclear CaMkinases pathways to regulate gene expression (Chawla, 2002). In spite of its crucial importance, in neurons, the mechanism involved in the generation of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals is poorly known. In our experiments, we have shown that the neuronal nucleus is able to generate calcium oscillations in response to second messengers. Nuclear oscillations have been observed in the nucleus of intact starfish oocytes in response to injection of cADPR (Santella and Kyojuka, 1997). Similar oscillations have also been seen in mammalian neurons in response to activation of metabotropic glutamate receptors (Jong et al., 2005). They are likely to be the result of opening and closing of clusters of the release channels, as proposed for the  $\text{Ca}^{2+}$  sparks seen in the myocytes. In

nuclei from pancreatic acinar cells, no nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations were reported for none of the three messengers tested (Gerasimenko et al., 2003). Our study is the first to report that the three well known second messengers evoke nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations with distinct frequencies within a single target nucleus.  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, especially when occurs in the nucleoplasm, are more efficient in activating transcription factors than a sustained  $\text{Ca}^{2+}$  elevation (Berridge et al., 2003). Interestingly, previous studies established that optimal activation of transcription factors like NF-AT is achieved when oscillations frequency is comprised in a window from 0.66/min to 2/min (Li et al., 1998; Tomida et al., 2003) which fits with the second messengers-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequencies obtained in our study. The well known calcium effector CaMkinase II is particularly sensitive to calcium oscillations and has been characterised as a frequency decoder able to transduce these frequencies in different amounts of activity (De Koninck and Schulman, 1998). Finally, the frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations is of first importance in the physiology of neurons. For example, it has been found that a three fold variation of the frequency of the spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  spikes activity in embryonic spinal neuronal regulates the neurotransmitter phenotype expression (Borodinsky et al., 2004). In this respect, the various  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequencies observed in our study can provide a mean to discriminate among differential transcription pathways (Dolmetsch et al., 1998; Li et al., 1998).

The presence of three different and functional  $\text{Ca}^{2+}$  release mechanisms in a cell provides high degree of versatility for  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. These release mechanisms do not need to be distributed uniformly inside the cells. The nuclear translocation of the cyclase in the *Aplysia* neurons described in this study documents yet a novel way for selective and specific activation of the nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  stores, which are the main stores in the neurons, which have very little cytoplasm (**Fig. 1**). In non neuronal cells, the phospholipase C and PKC, which resulted in nuclear synthesis of  $\text{IP}_3$  and DAG have also been reported to translocate to the

nucleus in response to physiological stimuli (Alonso et al., 2006; Cardenas et al., 2005; Cardenas et al., 2004; Divecha et al., 1993; Echevarria et al., 2003). Here we provide the first evidence showing that the soluble ADP-ribosyl cyclase, the enzyme responsible for the synthesis of the other two  $\text{Ca}^{2+}$  messengers, cADPR and NAADP, can specifically be induced to translocate into the nucleus. The exact mechanism involved in such translocation is not elucidated yet. This translocation occurs in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner and through the specific L-type voltage-dependent channels activation. We have a primary analysis of its amino acid sequence which revealed the presence of putative consensus motifs (**sup data Fig 2**). Indeed myristoylation and phosphorylation sites for PKC and for Casein kinase II are present. The myristoylation is a post-translational modification which allows protein attachment to the cytoplasmic face of intracellular membrane. Very recently, a new concept called “calcium/myristoyl switch” has been reported for targeting protein to different organelles (O’Callaghan and Burgoyne, 2003; O’Callaghan et al., 2005; O’Callaghan et al., 2002). This mechanism implies protein conformational change which exposes the myristoyl group following calcium entry. This new mechanism could be highly relevant to the regulation of the cellular localisation of the Aplysia cyclase and opens new perspectives for future investigation.

Two main mechanisms have been suggested for explaining the nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  dependent transcriptional cascade involving L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. One involves  $\text{Ca}^{2+}$  entry and diffusion to the nucleus and the other one involves activation of calcium dependent signalling protein at the mouth of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Dolmetsch et al., 2001). Our study, clearly bring evidence that a synthesizing messenger enzyme could be recruited by  $\text{Ca}^{2+}$  entering specifically through the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and then convey the information directly to the nucleus by a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent translocation mechanism. Finally our novel observation that the presence of coordinated  $\text{Ca}^{2+}$  release mechanisms are able to produce nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations together

with the translocation of  $\text{Ca}^{2+}$  signalling enzyme, provide the necessary versatility for the neurons to respond to a wide range of stimuli.

## **Materials and methods**

### **Isolated nuclei preparation**

Most of the experiments were done on nuclei isolated from abdominal, pedal and pleural ganglia of adult *Aplysia californica* and *Aplysia punctata*. The animals were first perfused with an isotonic MgCl<sub>2</sub> solution and the ganglia, after extraction, were pinned in a chamber bathed with artificial sea water (ASW) (NaCl 460mM; KCl 10mM; CaCl<sub>2</sub> 11mM; MgCl<sub>2</sub> 25mM; MgSO<sub>4</sub> 28mM; Tris-HCl buffer 10mM; pH 7.8). The connective tissue packing the neurons was sharply removed with fine forceps. Then the neurons were gently broken in a homogeniser to extract the nuclei in an intracellular buffer with the following composition: KCl 450 mM ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM ; HEPES 50 mM ; MgCl<sub>2</sub> 4 mM ; CaCl<sub>2</sub>/EGTA (depending of the experiments); pH 7.2 adjusted with 5N KOH. Some experiments were done on nuclei from the ganglia of *Aplysia punctata*. No species differences were observed.

### **Confocal imaging.**

Nuclei preparations were incubated with the different fluorescent Ca<sup>2+</sup> probes. For the experiments performed on the nuclear envelope, Mag Fluo4 AM was used ( $\lambda_{ex} = 494$  nm and  $\lambda_{em} = 516$  nm) ( $K_d = 22$   $\mu$ M). The free Ca<sup>2+</sup> concentration of the intracellular medium was strongly buffered to 400 nM using 1.4 mM Ca<sup>2+</sup> and 2 mM EGTA. During loading, nuclei were incubated with 30  $\mu$ M Mag Fluo4 AM and 5 mM ATP for 1 hr in the intracellular medium.

To measure Ca<sup>2+</sup> changes in the nucleoplasmic space, we loaded the nuclei with Fluo4 dextran 10 kDa ( $\lambda_{ex} = 494$  nm and  $\lambda_{em} = 516$  nm) ( $K_d = 3$   $\mu$ M) at a concentration of 20  $\mu$ M together with 3 mM ATP for 1 hr. The intracellular medium was buffered to 100 nM free Ca<sup>2+</sup>. All experiments were performed at room temperature in the same Ca<sup>2+</sup>/EGTA buffers used for loading of the probe with a final ATP concentration of 3 mM. The loaded nuclei were placed on a polylysine coated coverslip in a chamber. Ca<sup>2+</sup> changes in the lumen of the

nuclear envelope were measured using an inverted Leica SP2 RS confocal microscope (obj X40, X20) and the data analysed with the 2.5 Leica confocal software.

Most of the nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  measurements were done using the same confocal imaging system. But some were also performed using a right Olympus microscope (obj X40) coupled with a CCD camera and a xenon lamp. Images were analysed with the Axon Imaging Workbench software.

For all experiments,  $\text{Ca}^{2+}$  concentration changes are expressed in fluorescence ratio as  $f/f_0$  (fluorescence/fluorescence at the beginning of the experiment).

For immunocytochemistry, buccal or pleural ganglia were dissected and incubated with KCl to induce depolarization. They were then fixed with paraformaldehyde (4%) in ASW for 40 minutes. Neurons were then permeabilized for 10 min with a solution containing 4% BSA and 0.5% Triton in PBS. Ganglia were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (1/10 dilution) raised against the *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase (Munshi et al., 1999). Secondary antibodies (Alexa488, Molecular Probes) were applied for 1 hr at room temperature. Before mounting in Vectashield Hardset (Vector), ganglia were bathed with DAPI (100 ng/mL) for 15 min ( $\lambda_{\text{ex}} = 405\text{nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 461\text{ nm}$ ).

Neuron depolarization was achieved by the addition of KCl (110 mM) for 20 min. Ganglia were incubated for at least 30 min in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  chelator (BAPTA-AM, 50  $\mu\text{M}$ , Molecular Probes) or  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitors (nifedipin, 10  $\mu\text{M}$  from Sigma and  $\omega$ -conotoxins CN VIIA and S VI B, 5  $\mu\text{M}$ , kind gift of Dr J Molgo) before KCl depolarization. In the case of conotoxins, the ganglia were incubated in  $\text{Ca}^{2+}$ -free ASW for 30 min and then reperfused with standard ASW before KCl stimulation.

To visualised DNA in the *Aplysia* ganglia, we used the cell-permeant SYTO 13 Green from Molecular Probes at a concentration of 5  $\mu\text{M}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 488\text{nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 509\text{ nm}$ ).

### **Sequence analysis**

The sequence of the *Aplysia* ADP ribosyl cyclase was scanned for consensus motifs homologies, using the Prosite Database on the ExPASy Proteomic server.

### **Aknowledgements:**

The authors are indebted to Mr Cantou from the Station Méditerranéenne de l'Environnement et du Littoral, Sète (France) and to the Syndicat Mixte d'Équipement Littoral (Mr O. Richard), Blainville-sur-Mer (France) for collecting *Aplysia*. We thank Jordi Molgo who provided us CN VIIA and S VI B. The work was supported by grants from AFM and ARC to J-M C. We thank N. Cheviron for the technical assistance and the platform d'imagerie RIO de Gif-sur-Yvette.

## Legends

### **Fig 1. Localization of the *Aplysia* cyclase in intact nervous ganglia**

To visualize the nucleus of the giant neurons, dissected ganglia of *Aplysia* were stained with a specific nucleic acid marker (SYTO 13 Green or DAPI, A, B respectively). In resting conditions, the *Aplysia* cyclase (green) was localized in the cytosol of the neuron soma (B). After depolarization of the neurons by addition of KCl, the cyclase translocated into the nucleus (C).

### **Fig 2. Pharmacology of the *Aplysia* cyclase translocation *Aplysia* neurons**

Addition of BAPTA-AM prevented the translocation of the enzyme (A). Nifedipine similarly inhibited the nuclear translocation of the cyclase in response to KCl depolarization (B). Application of  $\omega$ -conotoxins had no effect on the depolarization-induced translocation (C).

### **Fig 3. Isolated nuclei and the effect of messengers on the $\text{Ca}^{2+}$ concentration inside the nuclear envelope**

Loading of giant *Aplysia* neuron nuclear envelope with Mag-fluo-4 AM (30  $\mu\text{M}$ ) (A). The fluorescent ring corresponded to the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive Mag-Fluo-4 sequestered in the perinuclear space and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the nuclear envelope was an ATP-dependent mechanism (B). The second messengers  $\text{IP}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ) (C) and cADPR(5  $\mu\text{M}$ ) (D) decreased the  $\text{Ca}^{2+}$  content in the nuclear envelope. Nanomolar concentrations of NAADP (10 and 500 nM) elicited a decrease of the  $\text{Ca}^{2+}$  content in the envelope (E, F). Micromolar concentration of NAADP (100  $\mu\text{M}$ ) had no effect (G). Depletion of the nuclear envelope  $\text{Ca}^{2+}$  content with thapsigargin (5 $\mu\text{M}$ ) inhibited the  $\text{IP}_3$ - (10  $\mu\text{M}$ ) and the NAADP- evoked  $\text{Ca}^{2+}$  release (500 nM) (H).

### **Fig 4. Second messengers-evoked nucleoplasmic $\text{Ca}^{2+}$ oscillations**

An isolated *Aplysia* neuron nucleus is shown in transmission and in fluorescence after loading with the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive dye Fluo 4 dextran (A). Applications of  $\text{IP}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ) (B), cADPR (5  $\mu\text{M}$ ) (C) or NAADP (500 nM) (D) produced an increase of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the nucleoplasm showing original oscillatory profiles.

**Fig 5. Blockade of second messenger-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  release by thapsigargin**

(A) Self-desensitisation of NAADP receptor by NAADP 100  $\mu\text{M}$  did not impair the effect of cADPR (5  $\mu\text{M}$ ). A mixture of inactive NAADP analogs, NAAD (500 nM) and NADP (500 nM) failed to increase the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the nucleoplasm (B). Stimulation of the nuclei with  $\text{IP}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ), cADPR (5  $\mu\text{M}$ ), or NAADP (500 nM) elicited a nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  increase (C, E and G) whereas messenger stimulation of nuclei pre-treated by thapsigargin (5  $\mu\text{M}$ ) failed to evoke a nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  response (D, F and H).

**Fig 6. Effect of ryanodine, heparin and of SK&F96365 on messenger-evoked nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  responses**

Top panel shows elevations of nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  recorded after addition of  $\text{IP}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ) (A), cADPR (5  $\mu\text{M}$ ) (B) or NAADP (500 nM) (C). Pre-treatment of the nuclei with heparin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inhibited the NAADP- and  $\text{IP}_3$ - induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses but had little or no effect on cADPR-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  changes (D, E and F). Pre-treatment of the nuclei with ryanodine (500  $\mu\text{M}$ ) reduced drastically the NAADP- and cADPR- induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses, but not the  $\text{IP}_3$ - evoked  $\text{Ca}^{2+}$  changes (G, H and I). Incubation of the nuclei with SKF96365 (10  $\mu\text{M}$ ) inhibited the NAADP-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  changes (L), but did not impair the  $\text{IP}_3$ - and the cADPR- induced nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  changes (J and K).

**Fig 7. Nuclear translocation of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and specific of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations generated by the three messengers**

In resting conditions, the soluble Aplysia ADP-ribosyl cyclase is localized in the thin cytosol surrounding the nucleus of the soma (A). Depolarization of *Aplysia* neurons induces the translocation of ADP-ribosyl cyclase from the cytosol into the nucleus. The translocation is dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  influx through mainly the voltage dependent L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (B). (C) Specific nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signals can be induced by three different calcium messengers, cADPR, NAADP, both produced by the ADP-ribosyl cyclase, and  $\text{IP}_3$ . We show that NAADP acts on its own receptor, which cooperates with the  $\text{IP}_3$ - and the ryanodine- receptors to generate nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations.

## References

- Aarhus, R., Graeff, R.M., Dickey, D.M., Walseth, T.F. and Lee, H.C. (1995) ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem*, 270, 30327-30333.
- Adebanjo, O.A., Anandatheerthavarada, H.K., Koval, A.P., Moonga, B.S., Biswas, G., Sun, L., Sodam, B.R., Bevis, P.J., Huang, C.L., Epstein, S., Lai, F.A., Avadhani, N.G. and Zaidi, M. (1999) A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Nat Cell Biol*, 1, 409-414.
- Albrieux, M., Lee, H.C. and Villaz, M. (1998) Calcium signaling by cyclic ADP-ribose, NAADP, and inositol trisphosphate are involved in distinct functions in ascidian oocytes. *J Biol Chem*, 273, 14566-14574.
- Alonso, M.T., Villalobos, C., Chamero, P., Alvarez, J. and Garcia-Sancho, J. (2006) Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium*, 40, 513-525.
- Antonov, I., Antonova, I., Kandel, E.R. and Hawkins, R.D. (2003) Activity-dependent presynaptic facilitation and hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in Aplysia. *Neuron*, 37, 135-147.
- Bach, G. (2001) Mucopolidosis type IV. *Mol Genet Metab*, 73, 197-203.
- Barco, A., Bailey, C.H. and Kandel, E.R. (2006) Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem*, 97, 1520-1533.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517-529.
- Bezin, S., Charpentier, G., Fossier, P. and Cancela, J.M. (2006) The Ca<sup>(2+)</sup>-releasing messenger NAADP, a new player in the nervous system. *J Physiol Paris*.
- Borodinsky, L.N., Root, C.M., Cronin, J.A., Sann, S.B., Gu, X. and Spitzer, N.C. (2004) Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature*, 429, 523-530.
- Brini, M., Murgia, M., Pasti, L., Picard, D., Pozzan, T. and Rizzuto, R. (1993) Nuclear Ca<sup>2+</sup> concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *Embo J*, 12, 4813-4819.
- Cancela, J.M. (2001) Specific Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP<sub>3</sub>. *Annu Rev Physiol*, 63, 99-117.
- Cancela JM, Charpentier G., Petersen OH. (2003) Co-ordination of Ca<sup>(2+)</sup> signalling in mammalian cells by the new Ca<sup>(2+)</sup>-releasing messenger NAADP. *Pflugers Arch.*, 446, 322-327.
- Cancela, J.M., Churchill, G.C. and Galione, A. (1999) Coordination of agonist-induced Ca<sup>2+</sup>-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature*, 398, 74-76.
- Cancela, J.M., Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V. and Petersen, O.H. (2000) Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca<sup>(2+)</sup> release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *Embo J*, 19, 2549-2557.
- Cancela, J.M., Van Coppenolle, F., Galione, A., Tepikin, A.V. and Petersen, O.H. (2002) Transformation of local Ca<sup>2+</sup> spikes to global Ca<sup>2+</sup> transients: the combinatorial roles of multiple Ca<sup>2+</sup> releasing messengers. *Embo J*, 21, 909-919.
- Cardenas, C., Liberona, J.L., Molgo, J., Colasante, C., Mignery, G.A. and Jaimovich, E. (2005) Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptors regulate local Ca<sup>2+</sup> transients and modulate cAMP response element binding protein phosphorylation. *J Cell Sci*, 118, 3131-3140.
- Cardenas, C., Muller, M., Jaimovich, E., Perez, F., Buchuk, D., Quest, A.F. and Carrasco, M.A. (2004) Depolarization of skeletal muscle cells induces phosphorylation of cAMP

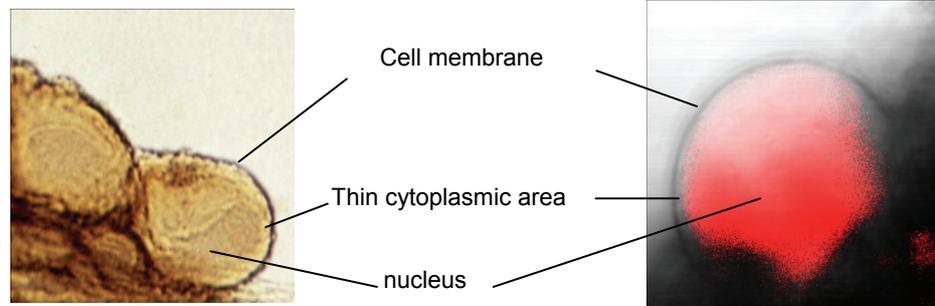
- response element binding protein via calcium and protein kinase Calpha. *J Biol Chem*, 279, 39122-39131.
- Carrion, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellstrom, B. and Naranjo, J.R. (1999) DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. *Nature*, 398, 80-84.
- Ceni, C., Muller-Steffner, H., Lund, F., Pochon, N., Schweitzer, A., De Waard, M., Schuber, F., Villaz, M. and Moutin, M.J. (2003) Evidence for an intracellular ADP-ribosyl cyclase/NAD<sup>+</sup>-glycohydrolase in brain from CD38-deficient mice. *J Biol Chem*, 278, 40670-40678.
- Chameau, P., Van de Vrede, Y., Fossier, P. and Baux, G. (2001) Ryanodine-, IP3- and NAADP-dependent calcium stores control acetylcholine release. *Pflugers Arch*, 443, 289-296.
- Chamero, P., Villalobos, C., Alonso, M.T. and Garcia-Sancho, J. (2002) Dampening of cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations on propagation to nucleus. *J Biol Chem*, 277, 50226-50229.
- Chawla, S. (2002) Regulation of gene expression by Ca<sup>2+</sup> signals in neuronal cells. *Eur J Pharmacol*, 447, 131-140.
- Churamani, D., Boulware, M.J., Geach, T.J., Martin, A.C., Moy, G.W., Su, Y.H., Vacquier, V.D., Marchant, J.S., Dale, L. and Patel, S. (2007) Molecular characterization of a novel intracellular ADP-ribosyl cyclase. *PLoS ONE*, 2, e797.
- Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S. and Galione, A. (2002) NAADP mobilizes Ca(2+) from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell*, 111, 703-708.
- Dammermann, W. and Guse, A.H. (2005) Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local Ca<sup>2+</sup> signaling in T-lymphocytes. *J Biol Chem*, 280, 21394-21399.
- De Flora, A., Zocchi, E., Guida, L., Franco, L. and Bruzzone, S. (2004) Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD<sup>+</sup>/cyclic ADP-ribose system. *Ann N Y Acad Sci*, 1028, 176-191.
- De Koninck, P. and Schulman, H. (1998) Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science*, 279, 227-230.
- Divecha, N., Banfic, H. and Irvine, R.F. (1993) Inositides and the nucleus and inositides in the nucleus. *Cell*, 74, 405-407.
- Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M. and Greenberg, M.E. (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*, 294, 333-339.
- Dolmetsch, R.E., Xu, K. and Lewis, R.S. (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392, 933-936.
- Echevarria, W., Leite, M.F., Guerra, M.T., Zipfel, W.R. and Nathanson, M.H. (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol*, 5, 440-446.
- Fliegert, R., Gasser, A. and Guse, A.H. (2007) Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem Soc Trans*, 35, 109-114.
- Galione, A. and Petersen, O.H. (2005) The NAADP Receptor: New Receptors or New Regulation? *Mol Interv*, 5, 73-79.
- Gerasimenko, J.V., Maruyama, Y., Yano, K., Dolman, N.J., Tepikin, A.V., Petersen, O.H. and Gerasimenko, O.V. (2003) NAADP mobilizes Ca<sup>2+</sup> from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol*, 163, 271-282.

- Gerasimenko, J.V., Sherwood, M., Tepikin, A.V., Petersen, O.H. and Gerasimenko, O.V. (2006) NAADP, cADPR and IP<sub>3</sub> all release Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci*, 119, 226-238.
- Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V. and Petersen, O.H. (1995) ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from the nuclear envelope. *Cell*, 80, 439-444.
- Gomes, D.A., Leite, M.F., Bennett, A.M. and Nathanson, M.H. (2006) Calcium signaling in the nucleus. *Can J Physiol Pharmacol*, 84, 325-332.
- Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L. and Dolmetsch, R. (2006) The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)<sub>1.2</sub> encodes a transcription factor. *Cell*, 127, 591-606.
- Hawkins, R.D., Kandel, E.R. and Bailey, C.H. (2006) Molecular mechanisms of memory storage in Aplysia. *Biol Bull*, 210, 174-191.
- Hellmich, M.R. and Strumwasser, F. (1991) Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul*, 2, 193-202.
- Hong, E.J., West, A.E. and Greenberg, M.E. (2005) Transcriptional control of cognitive development. *Curr Opin Neurobiol*, 15, 21-28.
- Howard, M., Grimaldi, J.C., Bazan, J.F., Lund, F.E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R.M., Walseth, T.F. and Lee, H.C. (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*, 262, 1056-1059.
- Jin, I. and Hawkins, R.D. (2003) Presynaptic and postsynaptic mechanisms of a novel form of homosynaptic potentiation at aplysia sensory-motor neuron synapses. *J Neurosci*, 23, 7288-7297.
- Jong, Y.J., Kumar, V., Kingston, A.E., Romano, C. and O'Malley, K.L. (2005) Functional metabotropic glutamate receptors on nuclei from brain and primary cultured striatal neurons. Role of transporters in delivering ligand. *J Biol Chem*, 280, 30469-30480.
- Khoo, K.M., Han, M.K., Park, J.B., Chae, S.W., Kim, U.H., Lee, H.C., Bay, B.H. and Chang, C.F. (2000) Localization of the cyclic ADP-ribose-dependent calcium signaling pathway in hepatocyte nucleus. *J Biol Chem*, 275, 24807-24817.
- Knot, H.J., Laher, I., Sobie, E.A., Guatimosim, S., Gomez-Viquez, L., Hartmann, H., Song, L.S., Lederer, W.J., Graier, W.F., Malli, R., Frieden, M. and Petersen, O.H. (2005) Twenty years of calcium imaging: cell physiology to dye for. *Mol Interv*, 5, 112-127.
- Langhorst, M.F., Schwarzmann, N. and Guse, A.H. (2004) Ca<sup>2+</sup> release via ryanodine receptors and Ca<sup>2+</sup> entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in T-lymphocytes. *Cell Signal*, 16, 1283-1289.
- Ledo, F., Kremer, L., Mellstrom, B. and Naranjo, J.R. (2002) Ca<sup>2+</sup>-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM. *Embo J*, 21, 4583-4592.
- Lee, H.C. (2003) Calcium signaling: NAADP ascends as a new messenger. *Curr Biol*, 13, R186-188.
- Lee, H.C. (2005) NAADP-mediated calcium signaling. *J Biol Chem*.
- Lee, H.C. and Aarhus, R. (1991) ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD<sup>+</sup> into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul*, 2, 203-209.
- Lee, H.C. and Aarhus, R. (1995) A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem*, 270, 2152-2157.
- Leite, M.F., Thrower, E.C., Echevarria, W., Koulen, P., Hirata, K., Bennett, A.M., Ehrlich, B.E. and Nathanson, M.H. (2003) Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2975-2980.
- Li, W., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G. and Tsien, R.Y. (1998) Cell-permeant caged InsP<sub>3</sub> ester shows that Ca<sup>2+</sup> spike frequency can optimize gene expression. *Nature*, 392, 936-941.

- Lipp, P., Thomas, D., Berridge, M.J. and Bootman, M.D. (1997) Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *Embo J*, 16, 7166-7173.
- Malavasi, F., Deaglio, S., Ferrero, E., Funaro, A., Sancho, J., Ausiello, C.M., Ortolan, E., Vaisitti, T., Zubiaur, M., Fedele, G., Aydin, S., Tibaldi, E.V., Durelli, I., Lusso, R., Cozno, F. and Horenstein, A.L. (2006) CD38 and CD157 as receptors of the immune system: a bridge between innate and adaptive immunity. *Mol Med*, 12, 334-341.
- Malviya, A.N., Rogue, P. and Vincendon, G. (1990) Stereospecific inositol 1,4,5-[<sup>32</sup>P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9270-9274.
- Marius, P., Guerra, M.T., Nathanson, M.H., Ehrlich, B.E. and Leite, M.F. (2006) Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 39, 65-73.
- Masgrau, R., Churchill, G.C., Morgan, A.J., Ashcroft, S.J. and Galione, A. (2003) NAADP: a new second messenger for glucose-induced Ca<sup>2+</sup> responses in clonal pancreatic beta cells. *Curr Biol*, 13, 247-251.
- Menteyne, A., Burdakov, A., Charpentier, G., Petersen, O.H. and Cancela, J.M. (2006) Generation of specific Ca(2+) signals from Ca(2+) stores and endocytosis by differential coupling to messengers. *Curr Biol*, 16, 1931-1937.
- Moccia, F., Lim, D., Nusco, G.A., Ercolano, E. and Santella, L. (2003) NAADP activates a Ca<sup>2+</sup> current that is dependent on F-actin cytoskeleton. *Faseb J*, 17, 1907-1909.
- Mothet, J.P., Fossier, P., Meunier, F.M., Stinnakre, J., Tauc, L. and Baux, G. (1998) Cyclic ADP-ribose and calcium-induced calcium release regulate neurotransmitter release at a cholinergic synapse of Aplysia. *J Physiol*, 507 ( Pt 2), 405-414.
- Munshi, C., Thiel, D.J., Mathews, II, Aarhus, R., Walseth, T.F. and Lee, H.C. (1999) Characterization of the active site of ADP-ribosyl cyclase. *J Biol Chem*, 274, 30770-30777.
- O'Callaghan, D.W. and Burgoyne, R.D. (2003) Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins. *Biochem Soc Trans*, 31, 963-965.
- O'Callaghan, D.W., Haynes, L.P. and Burgoyne, R.D. (2005) High-affinity interaction of the N-terminal myristoylation motif of the neuronal calcium sensor protein hippocalcin with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochem J*, 391, 231-238.
- O'Callaghan, D.W., Ivings, L., Weiss, J.L., Ashby, M.C., Tepikin, A.V. and Burgoyne, R.D. (2002) Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a determinant of spatio-temporal aspects of Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *J Biol Chem*, 277, 14227-14237.
- Parekh, A.B. and Putney, J.W., Jr. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 85, 757-810.
- Park, M.K., Ashby, M.C., Erdemli, G., Petersen, O.H. and Tepikin, A.V. (2001) Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *Embo J*, 20, 1863-1874.
- Rizzuto, R. and Pozzan, T. (2006) Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*, 86, 369-408.
- Santella, L. and Kyozuka, K. (1997) Effects of 1-methyladenine on nuclear Ca<sup>2+</sup> transients and meiosis resumption in starfish oocytes are mimicked by the nuclear injection of inositol 1,4,5-trisphosphate and cADP-ribose. *Cell Calcium*, 22, 11-20.
- Soares, S., Thompson, M., White, T., Isbell, A., Yamasaki, M., Prakash, Y., Lund, F.E., Galione, A. and Chini, E.N. (2007) NAADP as a second messenger: neither CD38 nor base-exchange reaction are necessary for in vivo generation of NAADP in myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C227-239.

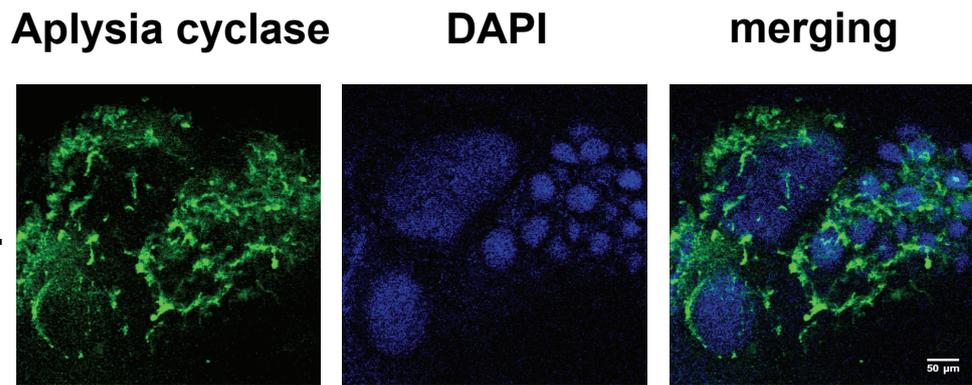
- Tomida, T., Hirose, K., Takizawa, A., Shibasaki, F. and Iino, M. (2003) NFAT functions as a working memory of Ca<sup>2+</sup> signals in decoding Ca<sup>2+</sup> oscillation. *Embo J*, 22, 3825-3832.
- Verkhatsky, A. (2005) Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev*, 85, 201-279.
- Walseth, T.F. (2005) A multifunctional enzyme adds to its repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 14941-14942.
- Yamasaki, M., Churchill, G.C. and Galione, A. (2005) Calcium signalling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). *Febs J*, 272, 4598-4606.
- Yamasaki, M., Masgrau, R., Morgan, A.J., Churchill, G.C., Patel, S., Ashcroft, S.J. and Galione, A. (2004) Organelle selection determines agonist-specific Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic acinar and beta cells. *J Biol Chem*, 279, 7234-7240.
- Zhang, F. and Li, P.L. (2007) Reconstitution and characterization of an NAADP-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channel from liver lysosomes of rats. *J Biol Chem*.

**A**



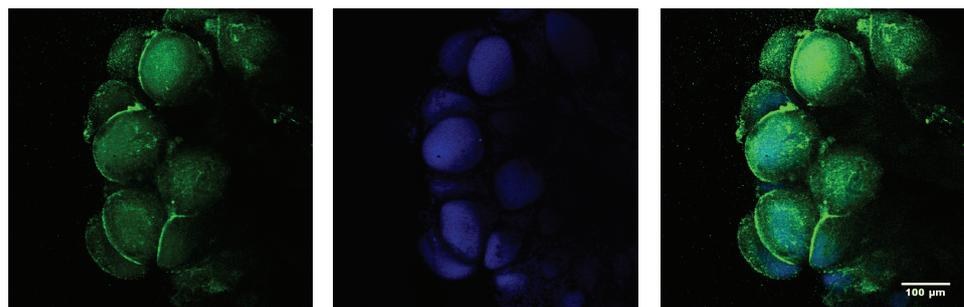
**B**

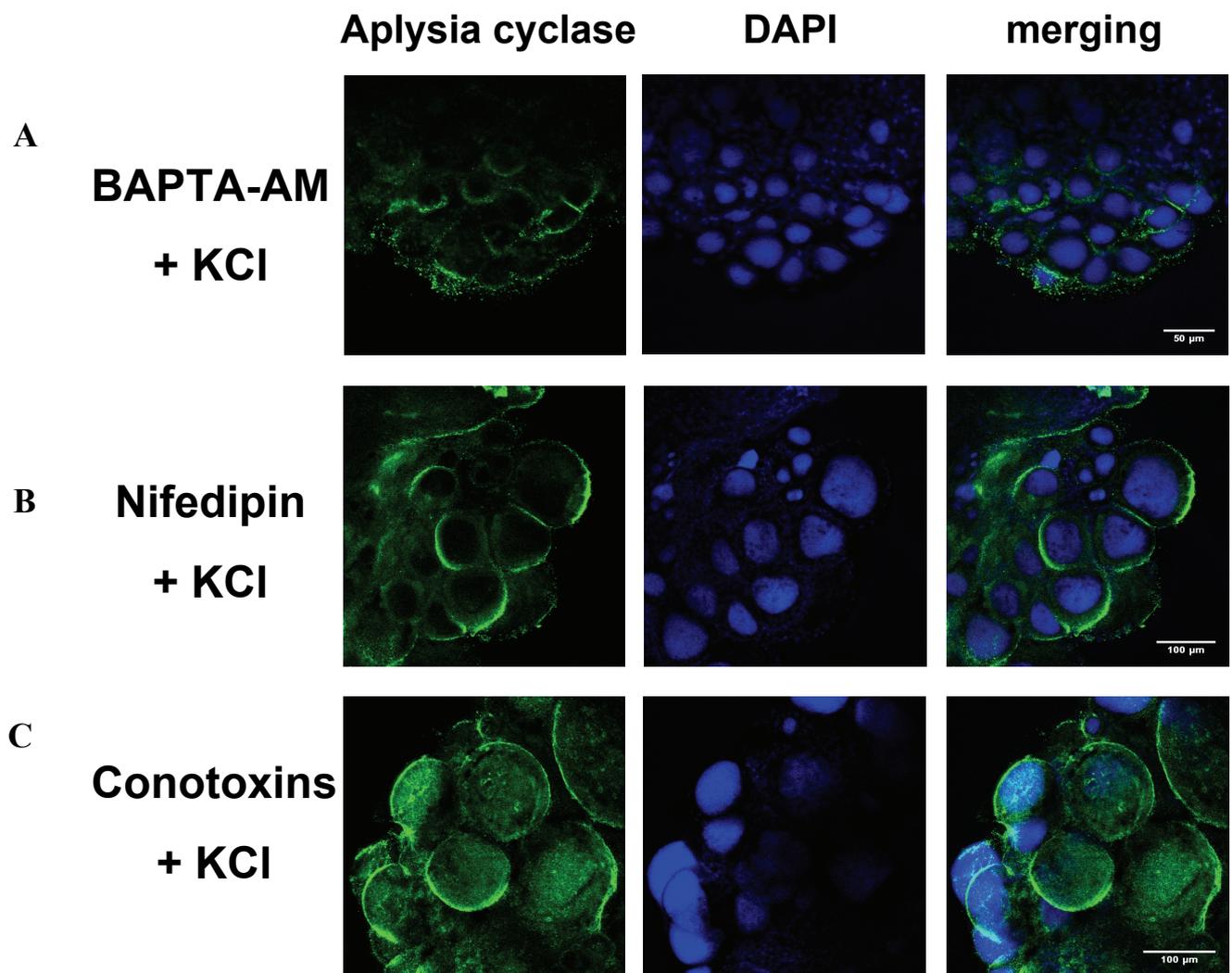
**CONTROL**



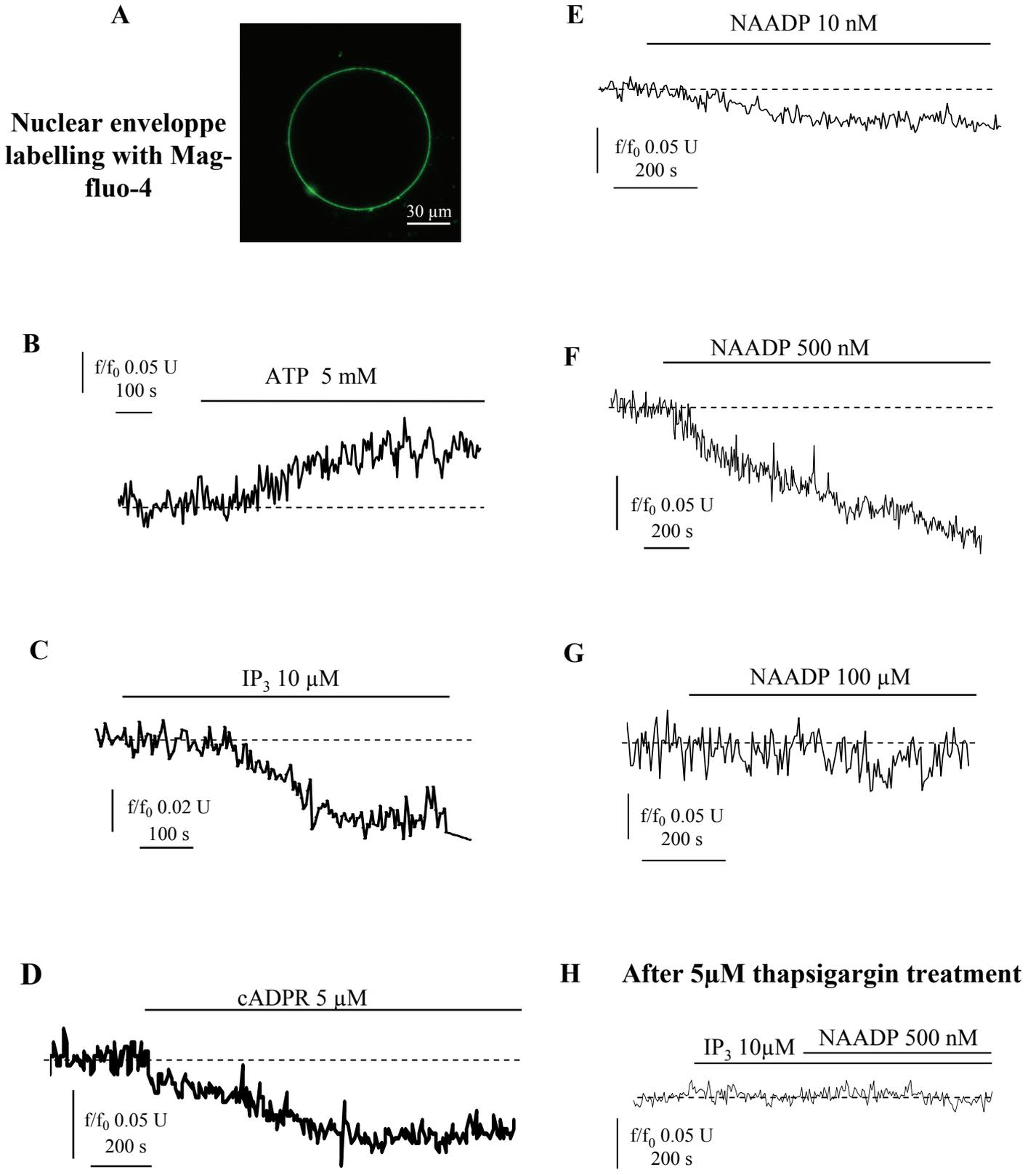
**C**

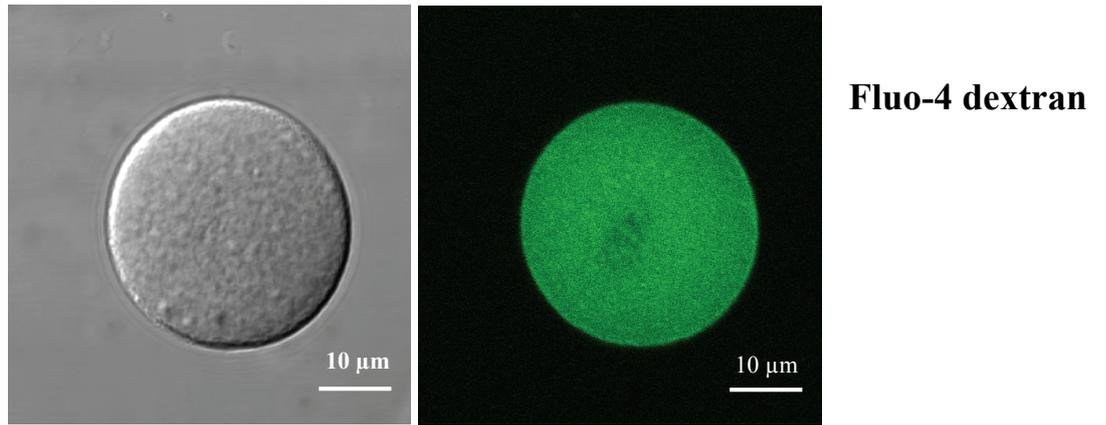
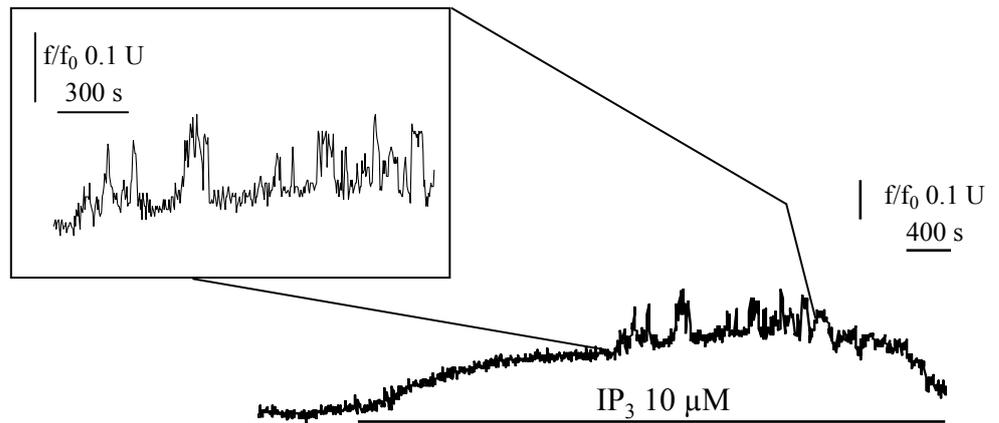
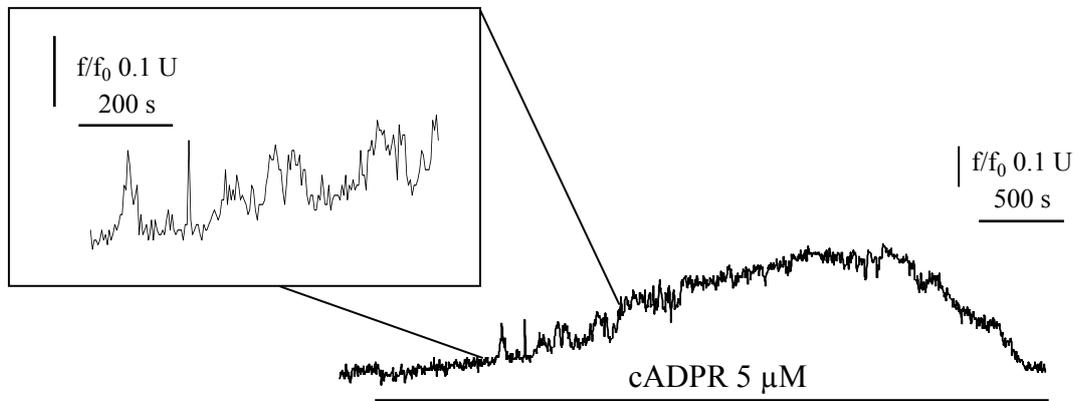
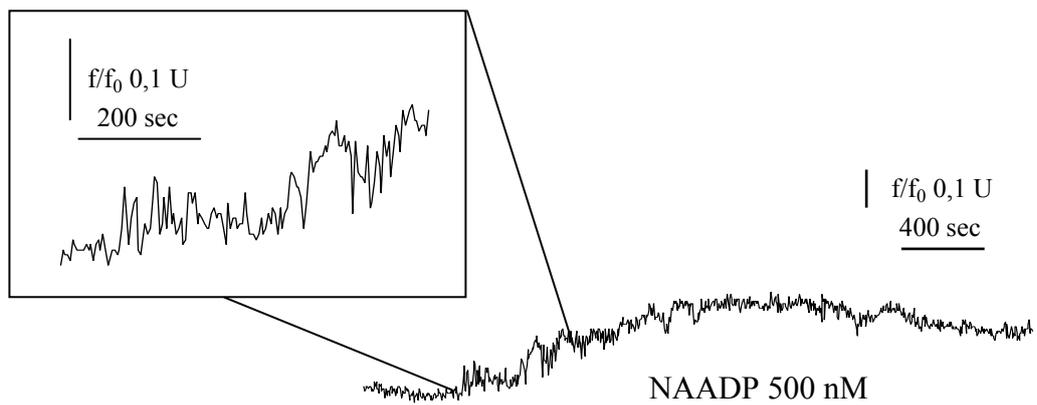
**KCl**

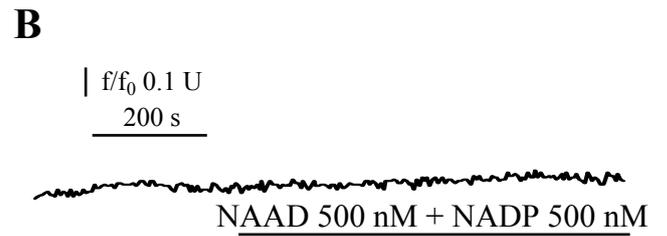
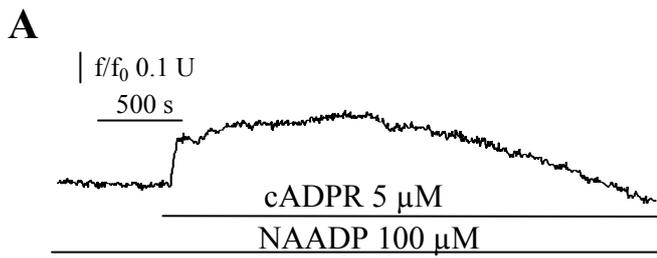




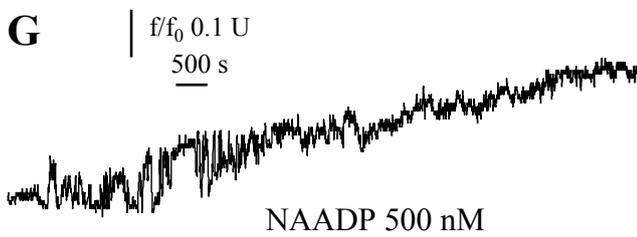
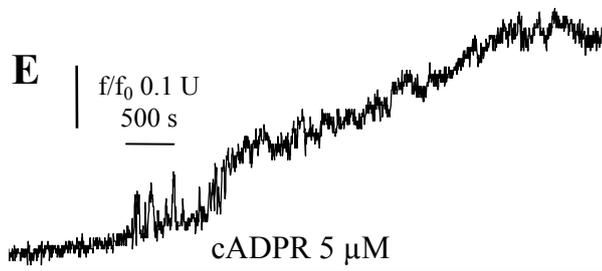
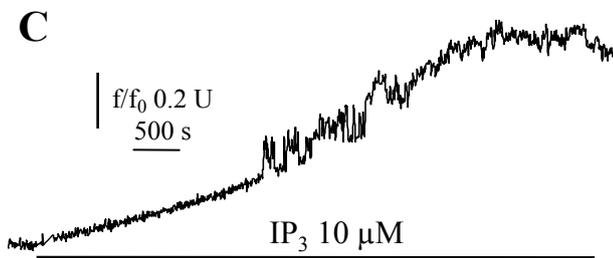
Bezin et al Fig 2



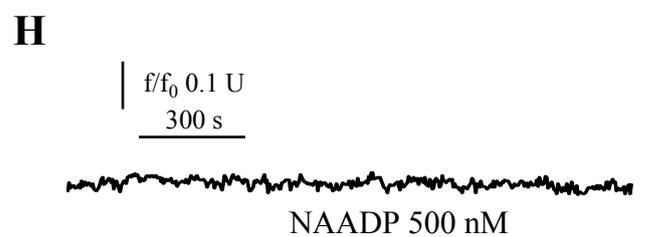
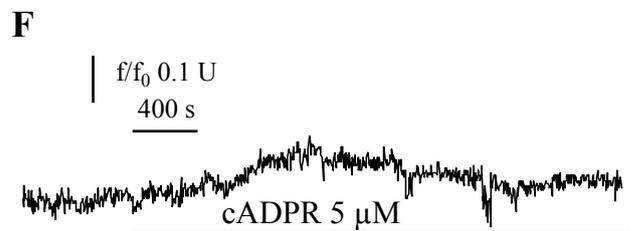
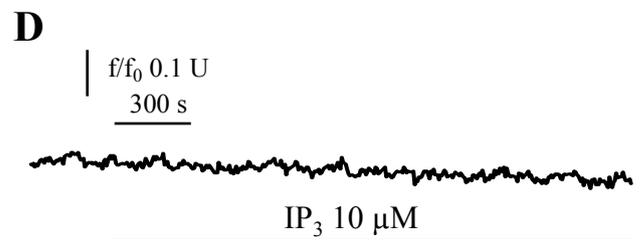
**A****B****C****D**



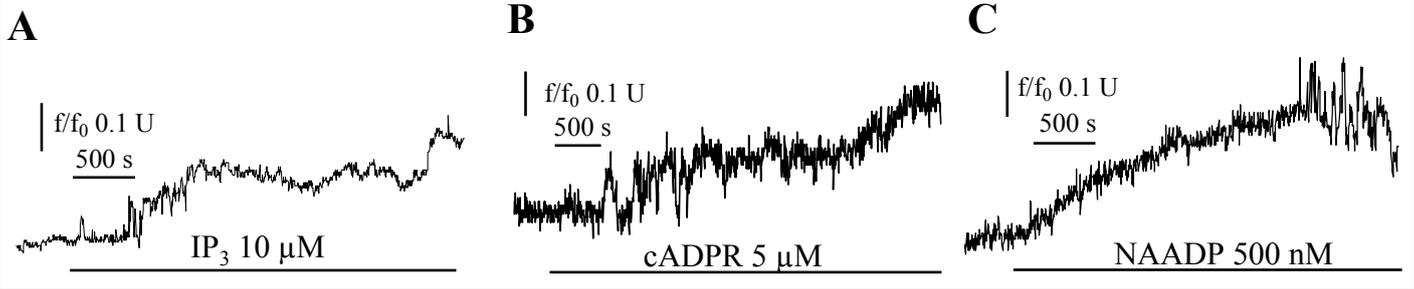
**Control responses**



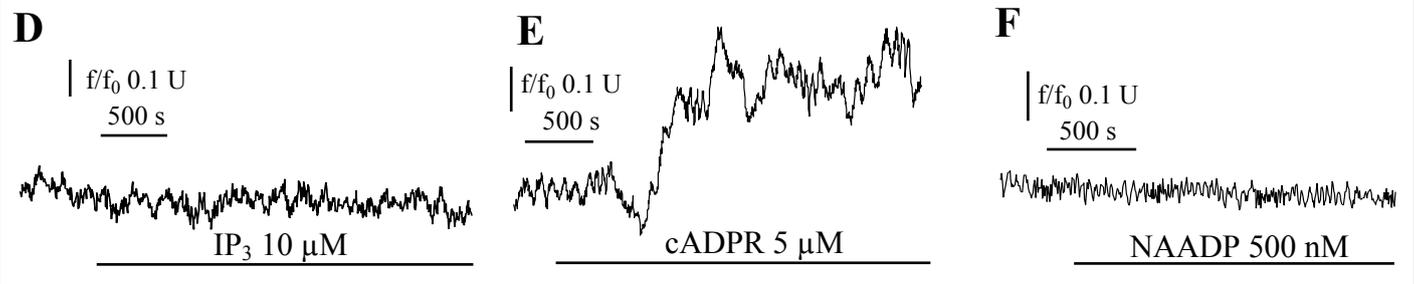
**After 5  $\mu$ M thapsigargin treatment**



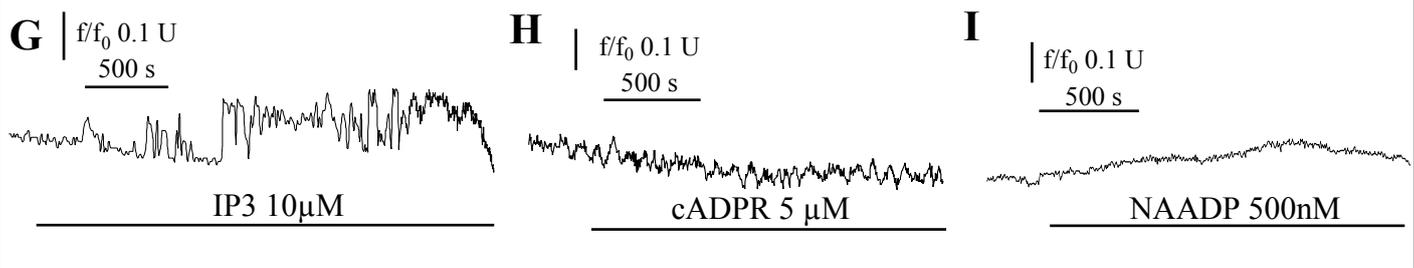
### Nuclei Control responses to messengers



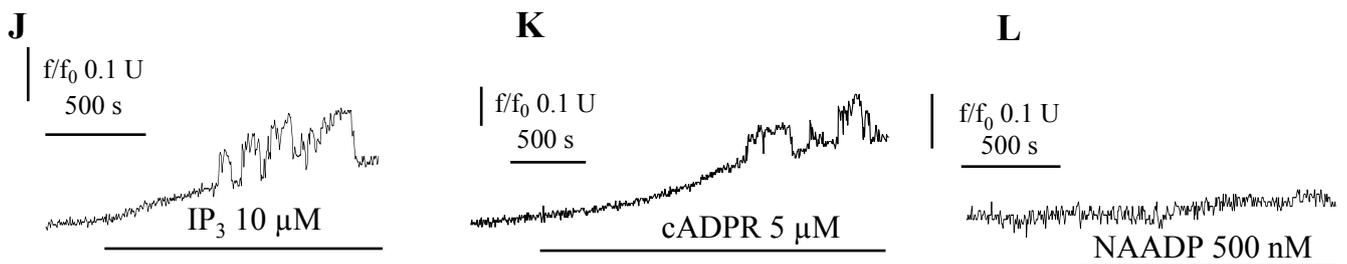
### Nuclei responses to messengers after 50 $\mu$ g/ml heparin treatment



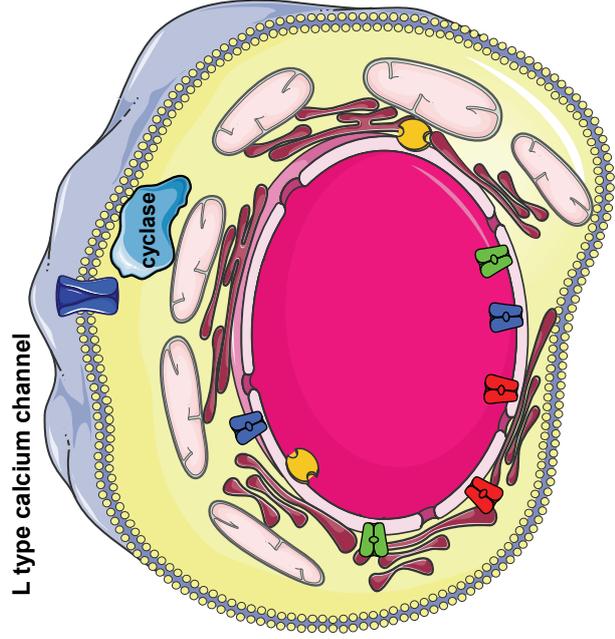
### Nuclei responses to messengers after 500 $\mu$ M ryanodine treatment



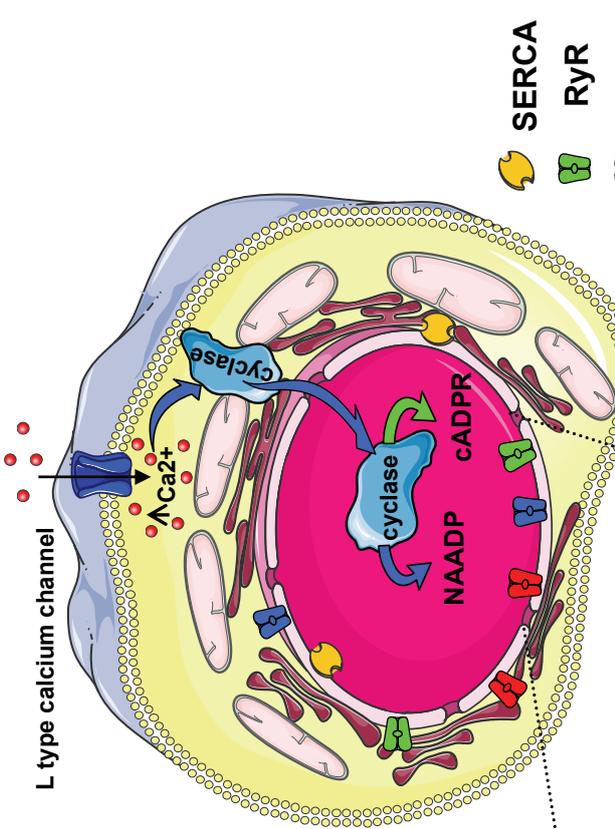
### Nuclei responses to messengers after 10 $\mu$ M SKF96365 treatment



**A** Cytoplasmic localization of the Aplysia cyclase



**B** Nuclear translocation of the Aplysia cyclase



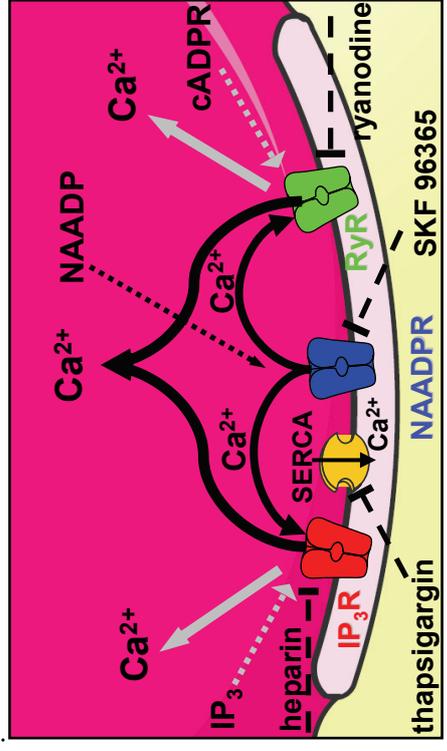
**NAADP:**  
Ca<sup>2+</sup> oscillations of low frequency

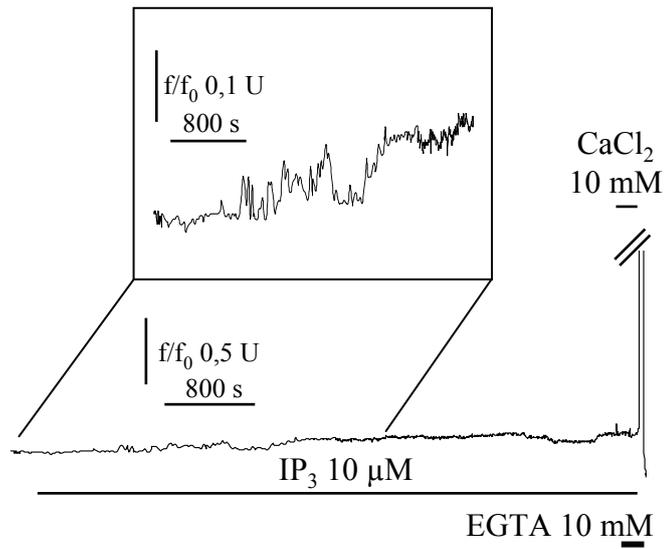
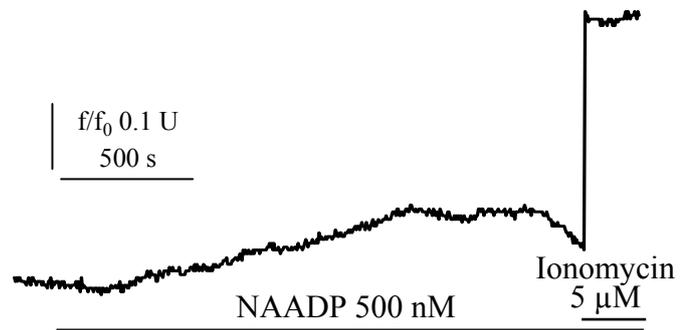
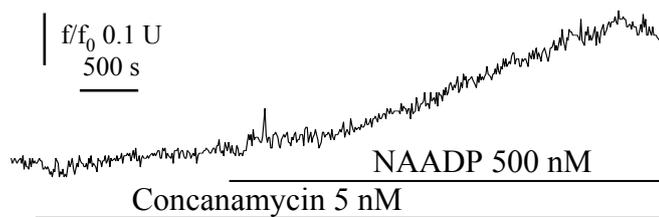


**IP<sub>3</sub>:**  
Ca<sup>2+</sup> oscillations of high frequency



**cADPR:**  
Ca<sup>2+</sup> oscillations of intermediate frequency



**A****B****C**

## A **Aplysia ADP-ribosyl cyclase amino acids sequence**

IVPTRELENVFLGRCKDYEITRYLDILPRVRSDCSALWKDFFKAFSFKNPCDLDLGSYKDFE  
TSAQQQLPKNKVMFWSGVYDEAHDYANTGRKYITLEDTLPGYMLNSLVWCGQRANPGFNEKV  
CPDFKTCPVQARESFWMASSTYAHSAEGETYTMVDGSDNPVKVPAYRPDSFFGKYELPNLTNK  
VTRVKVIVLHRLGEKIIKCGAGSLLDLEKLVKAKHFADFDCVENPRAVLFLLCSDNPNAREC  
RLAKRFYRIA

## B

### **N-myristoylation site**

G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}

Site : 141 to 146 GMASST

### **Protein kinase C phosphorylation site**

[ST]-x-[RK].

Site : 46 to 48 SFK

Site : 57 to 59 SYK

Site : 90 to 92 TGR

Site : 184 to 186 TNK

### **Casein kinase II phosphorylation site**

[ST]-x(2)-[DE]

Site : 57 to 60 SYKD

Site : 96 to 99 TLED

Site : 210 to 213 SLLD

### **Tyrosine kinase phosphorylation site.**

[RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y

Site : 16 to 23 KDYEITRY

### **N-glycosylation site**

N-{P}-[ST]-{P}

Site : 182 to 185 NLTN

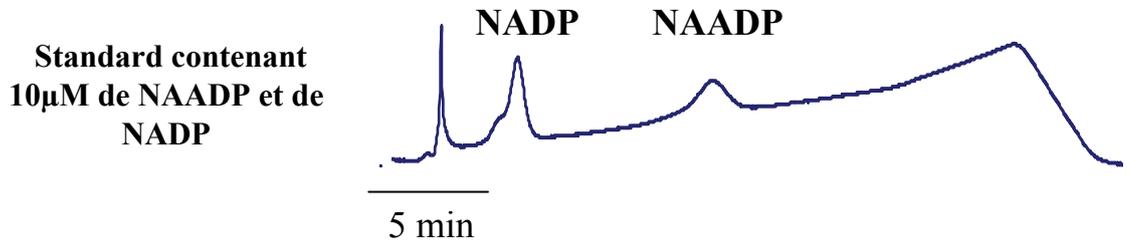
### **Amidation site**

x-G-[RK]-[RK].

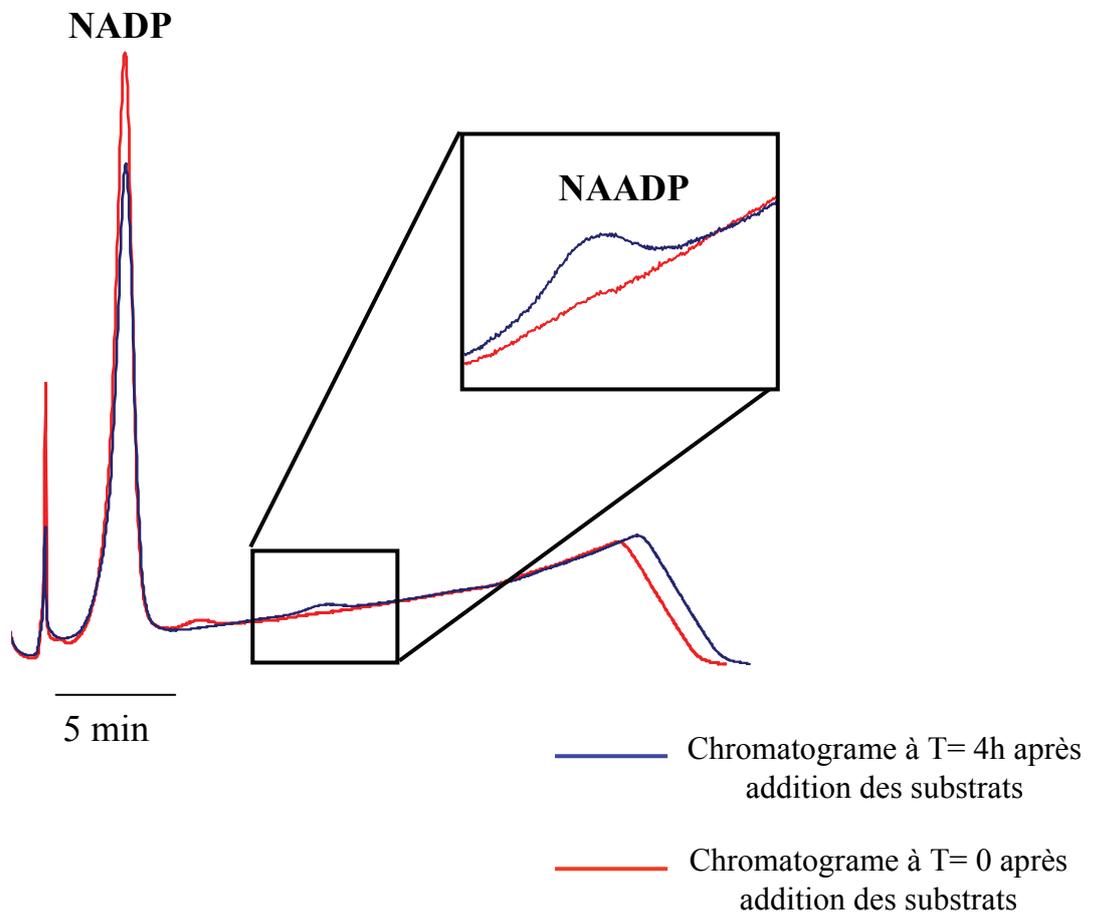
Site : 90 to 93 TGRK

## RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

**a**

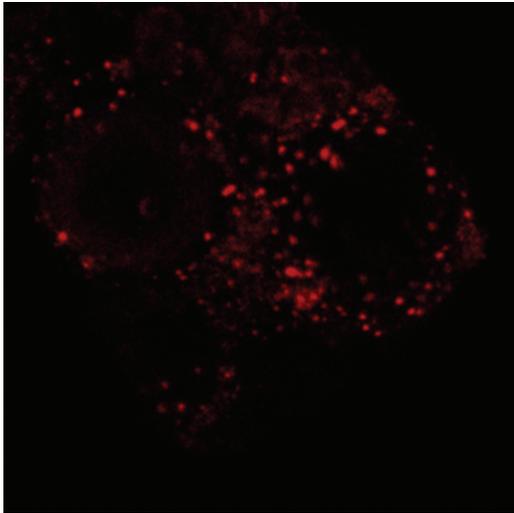


**b**

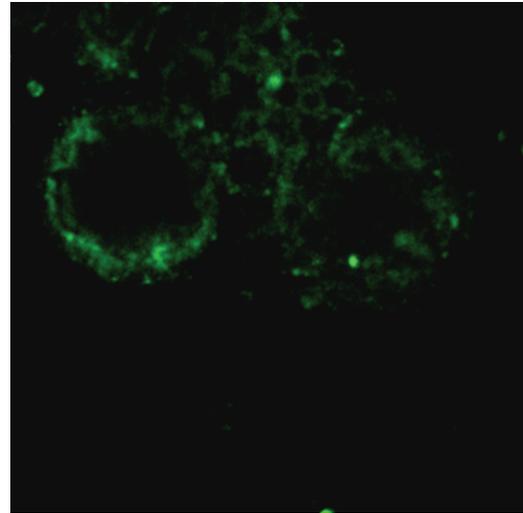


**Figure supplémentaire 2. Mise en évidence de l'activité de l'Aplysia ADP ribosyl cyclase pour la production de NAADP dans les cellules neuronales d'Aplysie.** Après addition des substrat de la cyclase (Acide nicotinique et NADP) à l'homogénat de neurones d'Aplysie, la production de NAADP a été détectée par HPLC(b)

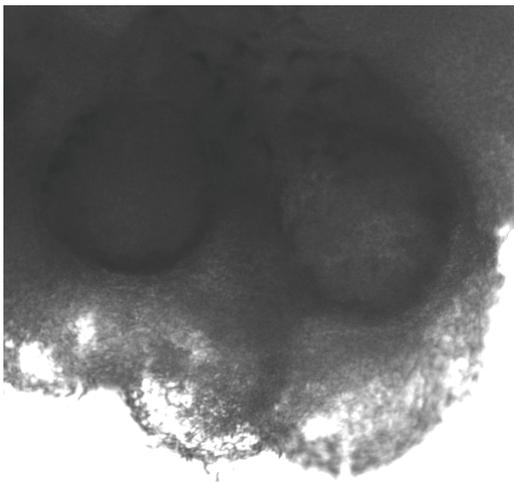
**Marquage par le lysotracker red**



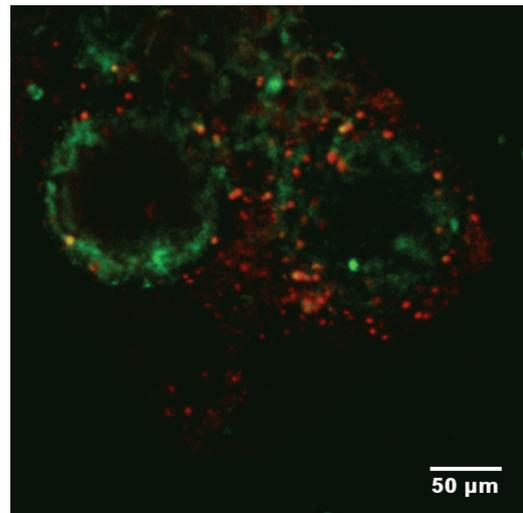
**Marquage par le mitotracker green**



**Image en transmission**



**Superposition des deux marqueurs**



**Figure supplémentaire 1. Double marquage d'un ganglion nerveux d'Aplysie avec le lysotracker red et le mitotracker green observé au microscope confocal. Les lysosomes apparaissent en rouge et les mitochondries en vert. Les mitochondries forment une ceinture entourant le noyau. Les lysosomes sont répartis de façon homogène dans l'espace cytosolique et l'espace nucléaire apparaît dépourvu de compartiments acides.**

# **DISCUSSION**

## DISCUSSION

Le rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la physiologie est connu depuis les travaux pionniers de Ringer en 1883 sur le cœur. On sait aujourd'hui que le  $\text{Ca}^{2+}$  est essentiel au contrôle de nombreux processus cellulaires (cytoplasmiques et nucléaires) tels que le contrôle de l'activité de certaines enzymes ou l'expression génique (Berridge et al., 1998; Carrasco et Hidalgo, 2006; Hardingham et al., 1997; West et al., 2001). Le rôle de l'enveloppe nucléaire en tant que réserve de  $\text{Ca}^{2+}$  a longtemps été débattu. Au cours des années 90, de nombreux mécanismes impliqués dans la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  nucléaire ont été formellement établis (Alonso et al., 2006). Il a été montré que l'ATP stimulait l'incorporation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'enveloppe via des pompes de type SERCA (Humbert et al., 1996; Malviya et Rogue, 1998; Nicotera et al., 1989). Il a été montré également que les agonistes de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique tels que l' $\text{IP}_3$ , le cADPR et un messager plus récemment découvert, le NAADP mobilisaient du  $\text{Ca}^{2+}$  de l'enveloppe nucléaire (Adebanjo et al., 1999; Bezin et al., 2006; Gerasimenko et al., 2003; Gerasimenko et al., 1995; Humbert et al., 1996; Khoo et al., 2000; Malviya et Rogue, 1998; Marchenko et al., 2005; Nicotera et al., 1990). Ces données ont donc permis de penser que le calcium nucléaire pouvait être régulé indépendamment des variations du calcium cytosolique. Ceci a d'ailleurs été démontré dans un premier temps sur des lignées cellulaires telles que les HepG2 ou les cellules Hela, dans lesquelles les variations du calcium nucléaire sont découplées des variations du calcium cytoplasmiques (Chamero et al., 2002; Leite et al., 2003; Lui et al., 1998a). Cependant, dans les neurones, aucune étude relatant de l'autonomie de l'enveloppe nucléaire pour générer un signal calcique n'avait été entreprise.

Durant ma thèse, j'ai donc exploré dans les cellules neuronales d'Aplysie, un modèle de référence en neurobiologie, les mécanismes impliqués dans la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  nucléaire par les messagers intracellulaires libérant du  $\text{Ca}^{2+}$ . J'ai porté une attention particulière au rôle du NAADP, un messager récemment découvert (Cancela, 2001; Cancela et al., 2003; Lee, 2005), ainsi qu'à l'implication de son enzyme de synthèse, l'Aplysia cyclase soluble dans l'homéostasie calcique nucléaire. Nos résultats indiquent que l'Aplysia cyclase suite à la stimulation neuronale par une dépolarisation au KCl, est capable de migrer dans le compartiment nucléaire. De plus l'enveloppe nucléaire neuronale constitue une réserve de  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisable par l' $\text{IP}_3$ , ainsi que par les deux messagers synthétisés par cette enzyme, le cADPR et le NAADP. De manière très surprenante, nos données indiquent que chaque messager pourrait évoquer des signaux calciques sous forme d'oscillations ayant des

cinétiques différentes. Ces signaux calciques évoqués par les messagers pourraient constituer les bases d'un codage du signal calcique nécessaire au contrôle des nombreuses molécules activées par le  $\text{Ca}^{2+}$  nucléaire.

#### *Le noyau de cellule neuronale ne possède pas de réticulum nucléoplasmique*

Les noyaux isolés à partir des ganglions nerveux sont d'une taille très importante comprise entre 10 et 300  $\mu\text{m}$ . Cette propriété des noyaux des neurones d'Aplysie s'est avérée avantageuse pour observer avec une très bonne résolution spatio-temporelle la cinétique des signaux calciques nucléaires ainsi que la morphologie de l'enveloppe. L'utilisation de la sonde SYTO 13 green, un marqueur des acides nucléiques, a permis de montrer que les noyaux isolés ont conservé leur ADN et que l'intégrité de l'enveloppe a été respectée par le traitement mécanique. Ceci a pu être confirmé par les images produites en microscopie électronique et en fluorescence avec le DIOC6, un marqueur membranaire du réticulum endoplasmique. Certaines études sur les cellules intactes se focalisant sur le compartiment nucléaire on rapporté l'existence d'une structure correspondant à des invaginations de l'enveloppe nucléaire que les auteurs ont dénommées «réticulum nucléoplasmique». Ces études ont été effectuées sur des lignées cellulaires cancéreuses telles que les cellules Hela, les 3T3, les SKHep1, les cellules de Gliome C6 et dans la lignée de cellules myoblastiques C2C12 (Clubb et Locke, 1998; Echevarria et al., 2003; Lui et al., 2003; Lui et al., 1998b; Marius et al., 2006). Avec l'utilisation de la microscopie confocale, en aucun cas dans les noyaux de neurones fraîchement isolés je n'ai pu observer la présence de telles structures. De plus, l'observation des noyaux en microscopie électronique n'a pas révélé de structure de type réticulum nucléoplasmique dans les noyaux de neurones primaires. Finalement, j'ai pu vérifier que, même si les auteurs attribuent au «réticulum nucléoplasmique» le rôle du régulateur de l'homéostasie calcique nucléaire (Echevarria et al., 2003; Marius et al., 2006), les noyaux de neurones que j'ai utilisés sont parfaitement capables de générer des signaux calciques nucléoplasmiques. Cette observation est à rapprocher de l'étude des signaux calciques générés par des second messagers dans des noyaux isolés de cellules acineuses pancréatiques primaires dans lesquelles la présence d'un réticulum nucléoplasmique n'a pas été décrite (Gerasimenko et al., 2003). Dans notre cas, la réserve calcique mobilisée et impliquée dans la régulation du calcium nucléoplasmique n'est pas liée à une structure de ce type.

### L'enveloppe nucléaire comme réserve de $Ca^{2+}$

L'aspect fonctionnel de l'enveloppe nucléaire a été étudié grâce à la sonde Mag-fluo-4 qui a un  $K_d$  de 22  $\mu M$ . Nos expériences montrent que les noyaux des neurones des ganglions nerveux d'aplysie possèdent des pompes  $Ca^{2+}$  ATPase qui sont sensibles à la thapsigargine, un inhibiteur des pompes de type SERCA. Ce résultat est en accord avec d'autres études, sur des modèles différents, tels que des noyaux d'hépatocytes dans lesquels des pompes SERCA ont été localisées sur l'enveloppe nucléaire et plus particulièrement au niveau de la membrane externe (Humbert et al., 1996; Lanini et al., 1992). Cette pompe SERCA présente des propriétés pharmacologiques différentes de celles du réticulum car il a été montré qu'elle n'est pas inhibée par la DBHQ, un inhibiteur des pompes SERCA du réticulum endoplasmique. Ceci suggère qu'un type spécifique de pompe SERCA serait exprimé dans la membrane externe de l'enveloppe nucléaire (Malviya et Klein, 2006; Malviya et Rogue, 1998). En revanche, la présence de pompes SERCA au niveau de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire n'a pas encore été démontrée et reste débattue (Carafoli, 2002; Petersen et al., 1998).

Afin d'explorer le rôle des messagers intracellulaires sur les noyaux de neurones, nous avons préparé des noyaux dont l'enveloppe nucléaire a été chargée avec la sonde Mag-fluo-4 et des noyaux où le nucléoplasme a été chargé avec la sonde Calcium Green Dextran 70 Kda dans un premier temps. Le chargement des noyaux avec cette sonde dextran montre que dans les conditions utilisées pour les expériences, les pores nucléaires sont en configuration ouverte et sont capable de laisser transiter de façon non spécifique des molécules d'un poids moléculaire allant jusqu'à de 70 kDa. Nous savons que les messagers ainsi que les autres agents pharmacologiques ajoutés à la préparation et de poids moléculaire inférieur transitent librement vers l'espace intranucléaire. L'état d'ouverture des pores nucléaires a été montré en relation étroite avec l'état de remplissage des réserves. Ainsi, lorsque la réserve calcique constituée par l'enveloppe nucléaire est remplie, les pores sont en configuration ouverte. Ceci indique que les conditions et notamment, la concentration en ATP, utilisées au cours de mes expériences sont optimales pour le chargement de l'enveloppe nucléaire par les ATPases.

### Le $Ca^{2+}$ de l'enveloppe nucléaire peut être mobilisé par des second messagers

Nos résultats montrent que l'addition d' $IP_3$ , de cADPR et de NAADP mobilise le  $Ca^{2+}$  de l'enveloppe nucléaire, ce qui se traduit par une augmentation du  $Ca^{2+}$  nucléoplasmique.

Les concentrations d' $IP_3$  et de cADPR de 5 à 10  $\mu M$  utilisées ainsi que les durées des signaux calciques observés sur l'enveloppe et avec le calcium green dextran, de l'ordre de 200 à 400

secondes sont comparables à celles publiées sur d'autres préparations nucléaires d'hépatocytes, d'ovocytes de xénope ou d'étoile de mer (Adebanjo et al., 1999; Gerasimenko et al., 2003; Gerasimenko et al., 1995; Khoo et al., 2000; Nicotera et al., 1990; Santella et Carafoli, 1997; Stehno-Bittel et al., 1995a). Nos résultats suggèrent que les trois messagers utilisés peuvent passer à travers les pores nucléaires pour se fixer sur leurs récepteurs localisés au niveau de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire. Les données bibliographiques, en accord avec nos résultats, indiquent que la libération de  $Ca^{2+}$  produite par l' $IP_3$  et le cADPR s'accompagne également d'une augmentation du  $Ca^{2+}$  dans le nucléoplasme (Adebanjo et al., 1999; Gerasimenko et al., 2003; Gerasimenko et al., 1995; Khoo et al., 2000). Récemment, l'existence de récepteurs à l' $IP_3$  fonctionnels a été montrée sur les membranes internes des noyaux de neurones de Purkinje et de neurones granulaires du cervelet (Marchenko et al., 2005). En outre, la présence des enzymes impliquées dans la synthèse de l' $IP_3$  et du cADPR (phospholipase C et l'ADP-ribosyl cyclase CD38) a été relatée sur la face interne de l'enveloppe nucléaire (Adebanjo et al., 1999; Divecha et al., 1993; Hennager et al., 1995; Khoo et al., 2000; Malviya et Klein, 2006; Malviya et Rogue, 1998). Ces données sont donc en faveur d'une localisation sur la membrane interne de l'enveloppe nucléaire des récepteurs de l' $IP_3$  et de la ryanodine (Adebanjo et al., 1999; Cardenas et al., 2005; Humbert et al., 1996; Khoo et al., 2000; Malviya et Klein, 2006; Marchenko et al., 2005; Marius et al., 2006).

La fonction du NAADP comme agoniste de la libération de  $Ca^{2+}$  a été découverte dans les œufs d'oursin (Lee et Aarhus, 1995). Celui-ci est à ce jour le messenger le plus efficace pour libérer du  $Ca^{2+}$  (Cancela et al., 1999; Genazzani et Galione, 1997; Lee, 2001). Toutefois, son récepteur n'a pas encore été purifié (Lee, 2001; Patel et al., 2001). La seule étude montrant une libération de calcium de l'enveloppe nucléaire par les trois messagers a été effectuée sur une préparation de noyaux isolés à partir de cellules acineuses pancréatiques. Les auteurs présentent le NAADP comme un modulateur supplémentaire du récepteur à la ryanodine (Gerasimenko et al., 2003). Cependant, une propriété très importante du récepteur au NAADP est sa capacité d'auto-désensibilisation (Cancela et al., 2003; Genazzani et Galione, 1997; Lee, 2001) qui a d'ailleurs été utilisée pour apporter la première évidence que le NAADP a un rôle de second messenger dans la réponse à une hormone (Cancela et al., 1999). Nos résultats montrent que l'addition de NAADP à des concentrations de l'ordre de quelques centaines de nanomolaires libère du  $Ca^{2+}$  à partir de l'enveloppe nucléaire. Notre étude des effets de différentes concentrations de NAADP montre que la concentration la plus efficace est de 500 nM. Nous avons également observé que l'addition de NAADP à des concentrations de 1 à 100  $\mu$ M ne libère pas ou peu de  $Ca^{2+}$ . L'action du NAADP sur l'enveloppe nucléaire serait donc

biphasique. Cet effet biphasique du NAADP est tout à fait comparable à celui observé dans des cellules intactes de pancréas exocrine ou endocrine et dans les lymphocytes (Cancela et al., 2003; Cancela et al., 2002; Johnson et Misler, 2002). Il n'y a pas, à l'heure actuelle, d'étude équivalente sur des préparations de noyaux isolés de neurones. Il existe des évidences pour un récepteur propre au NAADP dans les neurones au niveau d'une synapse identifiée du ganglion buccal de l'*Aplysia californica*. En effet, le NAADP agirait sur des réserves calciques insensibles à la ryanodine ou à l'héparine (un inhibiteur des récepteurs à IP<sub>3</sub>) (Chameau et al., 2001). Mes résultats montrent également que les réserves calciques mobilisées par le NAADP sont, tout comme celles mobilisées par l'IP<sub>3</sub> et le cADPR, sensibles à la thapsigargine. Le NAADP a été décrit comme un agent plutôt capable de mobiliser le calcium des réserves acides insensibles à la thapsigargine et sensible à la concanamycine A (Brailoiu et al., 2005; Churchill et al., 2002; Genazzani et Galione, 1997; Menteyne et al., 2006; Patel et al., 2001). Cependant dans notre préparation, la réponse au NAADP n'est pas sensible à la concanamycine A. Ceci suggère que les réserves calciques de l'enveloppe ne sont pas compartimentalisées et que le même pool de calcium serait mobilisable par les trois messagers. Le NAADP fonctionne donc ici selon le modèle « one pool ». Nos résultats montrent donc que l'enveloppe nucléaire du neurone constitue une nouvelle réserve calcique mobilisable par le NAADP, le cADPR et l'IP<sub>3</sub> qui pourraient ainsi jouer un rôle dans le contrôle de l'activité nucléaire tel que, le contrôle du transport nucléaire ou de la transcription génique dépendante du Ca<sup>2+</sup>.

#### Le récepteur au NAADP et son rôle dans la coopération des récepteurs

Les données pharmacologiques montrent que dans certains systèmes comme les microsomes ou dans des compartiments très spécifiques de la cellule comme la synapse, le récepteur au NAADP n'est pas sensible aux antagonistes des RyRs et des IP<sub>3</sub>Rs. Cependant, certaines données sur les cellules intactes ou les noyaux isolés de pancréas suggèrent que le NAADP active le RyR (Dammermann et Guse, 2005; Gerasimenko et al., 2003; Hohenegger et al., 2002). Nos travaux sur les noyaux isolés de neurones montrent clairement que le NAADP active un récepteur différent des RyRs ou des IP<sub>3</sub>Rs, qui semble sensible spécifiquement à certains agents pharmacologiques tels que le SKF. De plus, la réponse au cADPR a toujours lieu en présence de concentrations désensibilisantes de NAADP, excluant l'activation du RyR. Cependant, la pharmacologie obtenue montre qu'au sein du compartiment nucléaire, les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> et à la ryanodine et au NAADP semblent comme dans de nombreux systèmes tels que le pancréas ou les lymphocytes, interagir et coopérer afin de générer des

signaux calciques. Les antagonistes des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> et à la ryanodine ont chacun une action drastique sur la réponse au NAADP. Ces expériences montrent à quel point dans notre modèle, la réponse au NAADP dépend de la fonctionnalité des récepteurs voisins. Ceci indique que la réponse au NAADP passe par un recrutement (certainement par CICR) des RyRs et des IP<sub>3</sub>Rs qui constituent des amplificateurs du signal. Contrairement ce qui peut être observé au niveau de la synapse chez l'Aplysie, la densité des récepteurs aux NAADP au sein du noyau ne semble donc pas être assez forte pour que celui-ci génère par sa seule activation un signal massif et détectable. Le NAADP agirait donc plutôt comme un déclencheur en stimulant une libération de calcium par son propre récepteur, tel que cela a pu être suggéré dans la cellule acineuse pancréatique (Cancela et al., 1999). Finalement, une étude récente montre que l'action du NAADP pourrait dépendre de l'activation du TRP mucolipine-1, même si aucune preuve de la modulation directe de ce canal par le NAADP n'a encore pu être apportée (Zhang et Li, 2007). Ce canal est ubiquitaire et est fortement exprimé au niveau des lysosomes (principale réserve mobilisable par le NAADP). Il est important de savoir que la mucolipine-1 possède une séquence consensus connue pour être un signal de localisation nucléaire (Bach, 2001), ce qui renforce, à la vue de nos données, sa position de candidat pour le rôle du récepteur au NAADP.

#### *La production par les messagers de signaux calciques nucléaires aux profils originaux et spécifiques*

Les processus nucléaires tels que l'activation des effecteurs qui contrôlent l'expression génique semblent dépendre de plusieurs paramètres dont la fréquence des oscillations calciques et la localisation du signal calcique. L'importance de l'élévation du Ca<sup>2+</sup> nucléaire et son implication dans ces processus n'est plus à démontrer. Celle-ci a d'ailleurs été soulignée pour l'activation spécifique du facteur de transcription CREB alors que l'élévation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique est nécessaire uniquement pour l'activation du facteur de transcription SRF (Dolmetsch et al., 1998; Hardingham et al., 1997; Li et al., 1998). Mes expériences nous ont permis une observation inattendue. Nous avons pu montrer pour la première fois que des noyaux isolés sont capables de façon autonome, en réponse aux 3 messagers, de produire des réponses calciques nucléoplasmiques sous forme d'oscillations. Ces oscillations n'ont encore été rapportées dans aucune étude effectuée sur des noyaux isolés. Dans les rares cas où l'action du cADPR et de l'IP<sub>3</sub> a été étudiée sur des noyaux d'hépatocytes ou de pancréas, les réponses sont très différentes des nôtres (Adebanjo et al., 1999; Gerasimenko et al., 2003; Gerasimenko et al., 1995; Khoo et al., 2000). Ceci pourrait être due au type cellulaire utilisé

dans notre étude ou aux conditions expérimentales. En effet, les expériences que nous avons réalisées avec le fluo-4 dextran l'ont été sur des durées beaucoup plus longues que les autres groupes. Leurs expériences effectuées sur des durées de quelques dizaines de secondes étaient bien trop courtes dans nos conditions pour voir apparaître des oscillations. De plus, nous avons choisi d'utiliser un type cellulaire bien particulier, à savoir la cellule neuronale où la régulation du signal calcique peut s'avérer bien différente de celle d'une cellule non excitable. Ainsi, nous observons que pour chacun des trois messagers, même si la quantité de calcium libérée ne semble pas varier considérablement, les profils de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  n'apparaissent pas tout à fait identiques. La libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le nucléoplasme par l' $\text{IP}_3$ , le NAADP et le cADPR se présente sous forme d'une augmentation soutenue de calcium sur laquelle viennent se greffer des bouffées d'oscillations de cinétiques différentes. A notre connaissance, une différence de signature calcique entre les messagers n'a été observée que dans le compartiment nucléaire d'ovocytes intacts d'étoile de mer (Santella et Kyojuka, 1997). Dans cette étude, les auteurs avaient utilisé des composés ( $\text{IP}_3$  et cADPR) cagés pour montrer que le cADPR induisait des oscillations calciques alors que l' $\text{IP}_3$  n'évoquait qu'une réponse transitoire.

Dans les neurones, le contrôle de l'augmentation du calcium nucléoplasmique est un élément capital pour l'activation directe de certains facteurs de transcription tels que DREAM. Il en est de même pour l'activation d'effecteurs nucléaires comme la calmoduline, les CaMkinases II et IV et les phosphatases qui sont susceptibles de réguler finement, en réponse à l'augmentation du calcium nucléoplasmique l'activation de facteurs de transcription tels que CREB.

Ce phénomène de régulation du signal transcriptionnel par le  $\text{Ca}^{2+}$  apparaît donc très complexe. L'expression de gènes pourrait dépendre de l'amplitude et de la fréquence du signal calcique au sein de la cellule, comme cela a été observé pour NFAT et NF $\kappa$ B dans les lymphocytes (Dolmetsch et al., 1997). Nos résultats montrent que les messagers intracellulaires sont capables de générer des oscillations, en bouffées de fréquences différentes. La fréquence des oscillations calciques est de première importance dans la physiologie des neurones. C'est elle qui va orienter et déterminer le sens de la plasticité synaptique (LTD ou LTP) (Mayford et al., 1995). La fréquence des oscillations calcique spontanées va aussi orienter le phénotype d'expression des neurotransmetteurs des neurones spinaux embryonnaires. La population de neurones glutamatergiques diminue d'un facteur 2 lorsque la fréquence des oscillations passe de 1 à 3 oscillations/heure (Borodinsky et al., 2004). Ces données montrent à quel point un facteur de 2 ou 3 pour la fréquence des

oscillations calcique peut avoir des conséquences importantes sur l'expression génique. Les oscillations calciques générées par les noyaux isolés que nous avons observées sont pour le NAADP de 0,7 oscillation/min (période : 1,4 min), pour l'IP<sub>3</sub> de 1,1 oscillation/min (période : 0,9 min) et pour le cADPR de 0,9 oscillation/min (période : 1,1 min). Certains travaux ont montré que pour activer l'expression dépendante de facteurs comme NF-AT ou NF-κB les oscillations sont plus efficaces que des augmentations soutenues de calcium (Dolmetsch et al., 1998; Li et al., 1998). D'autre part, toutes les fréquences ne sont pas équivalentes et il semble que les oscillations induisant le meilleur taux d'expression régulée par NF-AT soit de l'ordre d'une par minute (Li et al., 1998). NF-AT se comporterait comme un décodeur traduisant la fréquence des oscillations calciques en quantités de facteur parvenant au noyau (Tomida et al., 2003). Les profils oscillatoires que nous avons obtenus sont comparables à ceux observés dans le cas de ce facteur de transcription pour lequel l'activation maximale a lieu dans une fenêtre de fréquence calcique entre 0,66 oscillation/min (période : 1,5 min) et 2 oscillation/min (période : 0,5 min) (Tomida et al., 2003). Finalement, la fréquence des oscillations pourrait être un facteur discriminant pour l'activation sélective de certains facteurs de transcription comme NFAT et NF-κB. Leur activation est équivalente pour des oscillations ayant une période de 400 secondes (6,6 pics/min) ou moins. Mais pour des fréquences d'oscillations calciques plus basses, seul NF-κB est activé (Dolmetsch et al., 1998). Cette différence d'activation des facteurs de transcription peut être en partie expliquée par leurs temps de retour au cytoplasme qui est d'une minute pour NFAT contre 16 minutes pour NF-κB (Dolmetsch et al., 1997; Li et al., 1998). Pour d'autres voies de transduction du signal calcique, la sensibilité des intermédiaires aux oscillations calciques pourrait constituer un élément déterminant pour l'activation de facteurs de transcription se trouvant en aval. La CaMkinase II possède un rôle central dans les voies de régulation de l'expression génique calcium dépendante. Elle est présente dans le noyau où elle peut phosphoryler directement certains facteurs de transcription (Brocke et al., 1995; Srinivasan et al., 1994). Son mode d'activation complexe lui confère la propriété d'être sensible aux oscillations calciques qui lui permettent d'atteindre son état autonome. Elle constitue un décodeur de fréquence capable de traduire les fréquences d'oscillation en des degrés d'activité différents (De Koninck et Schulman, 1998). La CaMkinase II est capable d'intégrer à ce décodage la durée des pics calciques ainsi que les activités préalables dont dépend son état de base au moment où surviennent les oscillations. De plus, les variants d'épissage de cette enzyme exprimés dans les différentes cellules montrent des sensibilités différentes aux fréquences des oscillations (Bayer et al., 2002). Ainsi, la diversité des messagers, la localisation nucléaire des signaux

calciques et l'originalité de leur profil pourrait constituer la base d'un codage régulant de nombreux processus nucléaires.

#### *Translocation nucléaire de l'Aplysia cyclase*

J'ai montré que les messagers ADP ribose cyclique et NAADP étaient capables de mobiliser le calcium de l'enveloppe nucléaire vers le nucléoplasme. Ces deux messagers sont synthétisés par une même enzyme : l'Aplysia cyclase. Les ARN messagers codant pour cette enzyme ont été détectés dans les neurones (Mothet et al., 1998) et son rôle pour la synthèse de cADPribose est bien établi. Dans un premier temps, j'ai montré que cette enzyme était fonctionnelle dans les neurones concernant la synthèse du NAADP. Ensuite, je me suis intéressée à la distribution de l'Aplysia cyclase dans les neurones. Celle-ci se localise au niveau sous membranaire et sa distribution est restreinte au niveau cytoplasmique. Cependant, j'ai pu observer une différence dans la distribution de cette cyclase dans la cellule au repos et dans la cellule dépolarisée au KCl, qui suggère que sa localisation subcellulaire est un phénomène régulé. Dans les neurones, l'activité électrique n'est pas isolée des processus biochimiques intracellulaires. Une question importante à laquelle les neurobiologistes tentent d'ailleurs de répondre est de savoir de quelle façon l'activité neuronale est couplée aux cascades biochimiques intracellulaires et comment elle contribue à la régulation de la physiologie cellulaire. Selon nos expériences, il semble que la migration au noyau de la cyclase soit dépendante du calcium et particulièrement de l'entrée de calcium par les canaux de type L. Des expériences menées sur des souris KO pour CD38, la principale ADP ribosyl cyclase connue chez les mammifères, montrent que l'augmentation du calcium dans les terminaisons des neurones hypothalamiques suite à la dépolarisation par du KCl est moins importante chez les KO. Cela suggère que, lors de la dépolarisation, l'augmentation de calcium intracellulaire résulterait du couplage de l'entrée de calcium par les canaux voltage dépendants aux réserves calciques intracellulaires. Ce couplage passerait par l'intermédiaire de la production de messagers par l'ADP ribosyl cyclase (Jin et al., 2007). Dans notre modèle neuronal, le marquage des organites intracellulaires tels que les mitochondries montre que ces dernières constituent une barrière qui entoure le noyau. Dans d'autres types cellulaires, cette barrière mitochondriale peut d'ailleurs isoler le noyau des évènements calciques cytoplasmiques (Park et al., 2001; Tinel et al., 1999). De plus, il est peu probable que les produits de l'Aplysia cyclase puissent diffuser en quantité suffisante jusqu'au noyau sans être dégradés, avant d'activer spécifiquement des récepteurs de la membrane nucléaire interne. Ainsi, une synthèse locale, à proximité des récepteurs nucléaires des messagers pourrait être

le moyen le plus approprié pour le couplage d'évènements calciques membranaires et nucléaires. Le poids moléculaire de l'Aplysia ADP ribosyl cyclase est de 29kDa. Il est donc possible que cette protéine puisse transiter librement au travers des pores nucléaires des noyaux de neurones d'Aplysie qui laissent passer le dextran jusqu'à 70kDa. Les canaux de type L sont couplés physiquement à des effecteurs tels que la calmoduline qui leur permettent de communiquer avec des zones plus éloignées telles que le noyau pour y réguler la transcription (Dolmetsch et al., 2001). Dans certains types cellulaires, celle-ci a est capable de migrer vers le noyau en réponse à la stimulation hormonale (Craske et al., 1999). De plus, la translocation de protéines de signalisation calcique au noyau suite à la stimulation cellulaire a été observée de nombreuses fois dans les neurones. La CaMKI peut être relocalisée au noyau après une dépolarisation par le KCl (Sakagami et al., 2005). C'est aussi le cas de la CaMKIV alors que le mécanisme responsable de cette localisation est encore inconnu (Lemrow et al., 2004).

Cependant, nous ne connaissons pas les mécanismes dont résultent au repos la présence de l'Aplysia ADP ribosyl cyclase au niveau cytosolique. En dehors de toute stimulation, l'enzyme paraît sous forme d'agrégats localisés au niveau sous membranaire. On peut dès lors se demander si comme cela a pu être observé dans de nombreux cas, la protéine ne pourrait pas être séquestrée au niveau cytoplasmique par des protéines d'ancrage membranaire ou de rétention cytosolique. Certains effecteurs de la signalisation calcique (kinases et phosphatases sont liés directement ou indirectement par des protéines d'ancrage ; les AKAPs (A-kinase anchor proteins) sur les canaux de type L, les récepteurs au glutamate et d'autres récepteurs membranaires (Hall et al., 2007; Smith et al., 2006; Tao et al., 2006). L'hypothèse d'une séquestration à la membrane de l'Aplysia cyclase par ce type de protéines d'« échafaudage » devient alors envisageable. Suite à l'entrée de calcium, des évènements de phosphorylation ou déphosphorylation dépendants du calcium pourraient être à l'origine de la libération de l'enzyme et de sa re-localisation au niveau du noyau. D'autres expériences avec des inhibiteurs de kinases ou de phosphatases calcium dépendantes pourraient être menées afin d'éclaircir ce mécanisme de localisation nucléaire calcium dépendante.

La comparaison de la séquence protéique de l'Aplysia cyclase avec les bases de données disponibles montre que celle-ci contient une séquence d'acides aminés consensus pour un site de N-myristoylation. La myristoylation est une modification post transcriptionnelle permettant aux protéines de s'accrocher aux membranes lipidiques intracellulaires et se trouve impliquée dans les phénomènes de ciblage intracellulaire de protéines de signalisation (O'Callaghan et al., 2005; O'Callaghan et al., 2002).

On peut donc se demander si ce site de myristoylation ne pourrait pas constituer un ancrage de l'Aplysia cyclase à la membrane plasmique. Cet ancrage pourrait être régulé des effecteurs calcium dépendant. La cyclase ne serait alors plus séquestrée au niveau membranaire et pourrait diffuser librement vers le noyau. Depuis peu, la myristoylation est connue, comme un moyen pour les cellules en réponse à une stimulation provoquant une augmentation du calcium intracellulaire, de cibler des protéines de façon réversible vers des organites particuliers. Par exemple, les NCS (Neuronal Calcium Sensor) sont pour la plupart des protéines myristoylées capables de lier directement le calcium par des motifs « EF hands ». Lorsque la concentration calcique neuronale augmente, la fixation du calcium par les NCSs provoque un changement conformationnel, exposant le site de myristoylation et permettant à la protéine jusqu'alors cytosolique d'être adressée vers le compartiment approprié par ancrage dans la membrane. Ce mécanisme est connu sous le nom de « Calcium/Myristoyl switch » et cet ancrage est réversible lorsque la protéine retrouve sa conformation d'origine (O'Callaghan et Burgoyne, 2003 ; O'Callaghan et al., 2005; O'Callaghan et al., 2002; Spilker et al., 2002). L'Aplysia cyclase ne possède pas de motif EF hands lui permettant de lier le calcium directement, cependant l'analyse de sa séquence montre la présence de plusieurs sites consensus de phosphorylation par la protéine kinase C qui peut être activée par le calcium. On peut alors émettre l'hypothèse que, lors de l'entrée de calcium par la dépolarisation membranaire, un changement conformationnel exposant le site de myristoylation et dépendant d'évènements de phosphorylation régulés par le calcium exposerait le site d'ancrage membranaire, provoquant l'adressage au noyau. Ainsi, même si l'analyse de la séquence de l'Aplysia cyclase apporte certaines hypothèses s'avérant intéressantes pour l'étude de son ciblage au noyau, celle ne montre pas la présence de signal de localisation nucléaire. Ainsi, son transport résulterait d'un mécanisme alternatif qui reste à déterminer.

Finalement, l'Aplysia cyclase possède un motif consensus de phosphorylation par la caséine kinase II. Cette kinase est présente aussi bien au niveau cytoplasmique que nucléaire. Elle a été impliquée entre autre dans la phosphorylation de NF-AT suite à sa translocation au noyau. Cette phosphorylation régule son export du noyau lorsque l'activité cellulaire cesse (Shen et al., 2007). Cette kinase pourrait ainsi avoir un rôle dans la régulation de la durée de vie de l'Aplysia cyclase au noyau.

## CONCLUSION

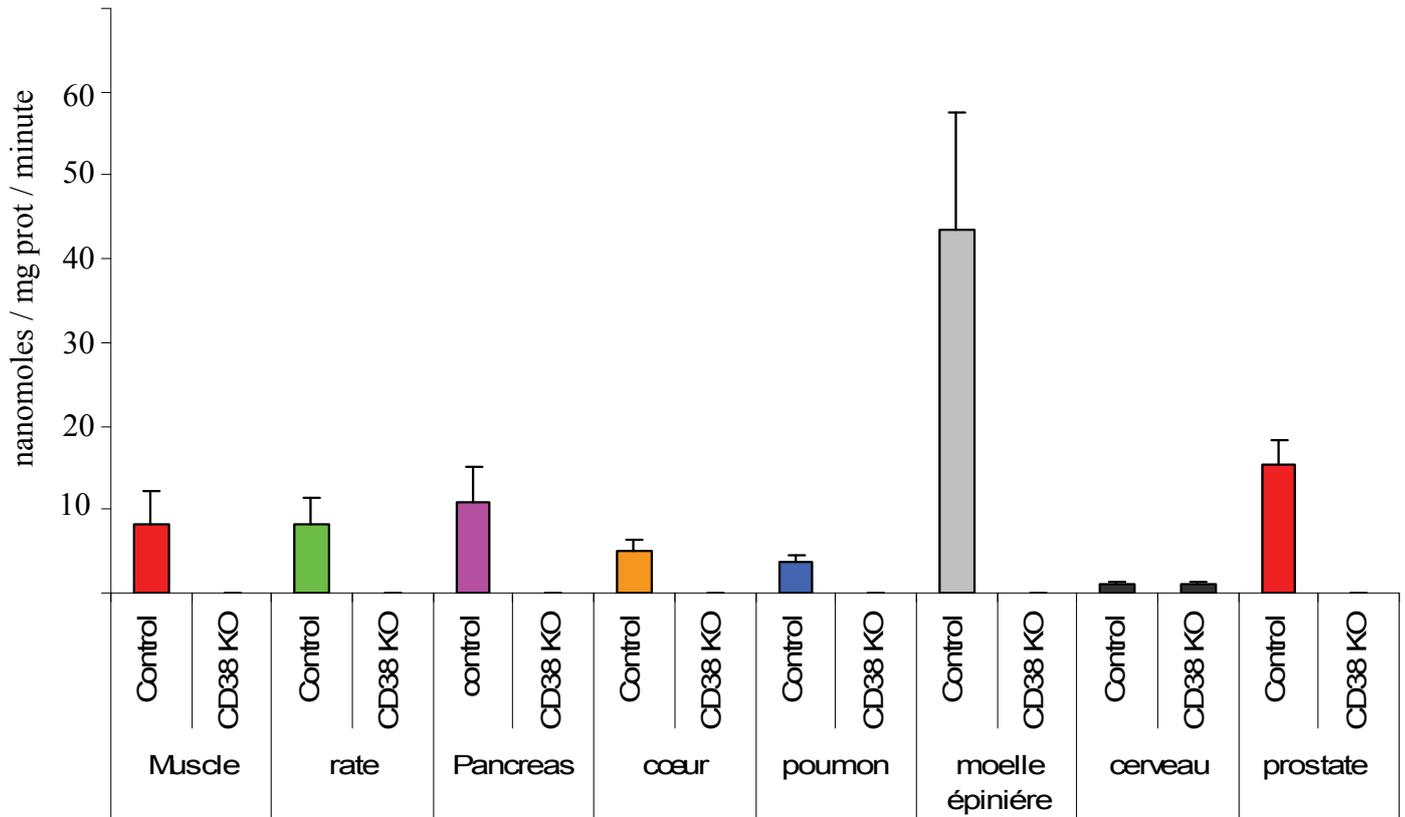
L'ensemble de nos résultats apporte la première évidence que les réserves calciques de l'enveloppe nucléaire de neurones de ganglions d'aplysie peuvent être mobilisées par l' $IP_3$ , le cADPR et le NAADP. De manière surprenante, ces messagers semblent évoquer des signaux calciques sous forme d'oscillations dont la fréquence peut varier d'un facteur deux entre le NAADP et l' $IP_3$ . L'aptitude des effecteurs nucléaires à décoder les fréquences des signaux calciques pourrait avoir des conséquences non négligeables sur la régulation de l'expression génique. De plus nous avons observé la localisation nucléaire de l'enzyme de synthèse du cADPR et du NAADP suite à la dépolarisation des neurones et l'augmentation du calcium intracellulaire. Ceci constitue un pas supplémentaire pour la compréhension du couplage de l'activité électrique membranaire aux événements biochimiques profonds de la cellule. Cependant les mécanismes conduisant au ciblage de la cyclase vers le noyau restent, avec les hypothèses dont nous disposons, à explorer.

# **PERSPECTIVES**

## **PERSPECTIVES**

Au cours de ma thèse, j'ai pu montrer que le NAADP est un acteur important pour la régulation de l'homéostasie calcique nucléaire, ce qui suggère un rôle dans la régulation de certains processus nucléaires tels que l'expression génique. Cependant, ce second messenger pourrait être impliqué dans la physiologie neuronale en agissant sur des fonctions dans d'autres compartiments cellulaires. Afin d'étudier cette question, j'ai en parallèle de mes premiers travaux sur l'Aplysie, développé un second modèle. Il s'agit d'une culture primaire de neurones spinaux embryonnaires de souris. Les travaux menés par notre équipe sur la synthèse de NAADP par CD38 montrent que la moelle épinière chez la souris est l'un des organes au sein duquel l'activité de synthèse de NAADP est de loin la plus importante (Fig. 1). De plus, cette activité semble exclusivement dépendante de l'enzyme CD38. Ce modèle, plus appropriée que ne l'est l'Aplysie aux techniques de biologie moléculaire, devrait nous permettre de déterminer le ou les rôles du NAADP dans l'établissement et le développement du réseau neuronal qui sont des phénomènes dépendants du calcium. D'une part, les agonistes liés à la stimulation de la synthèse du NAADP dans les neurones et les conséquences physiologiques liées à la synthèse et l'action de ce messenger restent à déterminer. De plus, nous avons à notre disposition une lignée de souris KO, CD38<sup>-/-</sup>, il deviendrait donc possible avec ce nouveau modèle d'étudier les conséquences fonctionnelles de l'absence de CD38 dans les neurones. Finalement, nous pourrions étudier le rôle de la Muco1ipine 1, un récepteur canal putatif du NAADP, dans la signalisation liée à ce messenger.

## Rôle de CD38 dans l'activité de synthèse de NAADP



**Figure 1. Importance de CD38 dans l'activité de synthèse du NAADP** Comparaison de l'activité de l'ADPribosyl Cyclase des souris contrôles C57 et CD38<sup>-/-</sup> mesurée dans différents tissus incubés 30 minutes en présence des substrats à 37°C. Les valeurs sont exprimées en nanomoles de NAADP formées par milligramme de protéines par minute,  $\pm$  écart type (n=3).

## **Résultats préliminaires**

### *1) Caractéristiques du modèle.*

Les enregistrements électrophysiologiques sur des préparations de moelle épinière de souris montre qu'il existe déjà un réseau générant une activité électrique rythmique spontanée (Hanson et Landmesser, 2003). Ce type d'activité spontanée a été observée dans d'autres régions du système nerveux central et apparaît caractéristique des réseaux neuronaux en développement (Ben-Ari, 2001; O'Donovan, 1999). Dans la moelle épinière d'embryon de souris, elle se présente sous forme de trains d'activité épisodiques qui semblent synchronisés le long de l'axe rostrocaudal. Un schéma du circuit à la base de cette activité spontanée chez la souris a d'ailleurs été proposé (Fig. 2). La propagation de cette activité repose sur l'activation de synapses chimiques et électriques. Une caractéristique de ce réseau est que la génération de l'activité spontanée ne met pas en jeu de neurones glutamatergiques (Hanson et Landmesser, 2003). Elle repose sur l'activation d'interneurones GABAergiques et glycinergiques par les collatérales axonales émises par les motoneurones cholinergiques. Pour les stades précoces de développement, il a été montré dans plusieurs régions du système nerveux que le GABA et la glycine pouvaient être excitateurs (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 2004; Hanson et Landmesser, 2003). Ceci résulte de l'absence de gradient de chlore qui est en concentration symétrique entre le milieu intra et extracellulaire. Ainsi, dans la moelle épinière d'embryons de souris de 12 jours le GABA et la glycine contribuent à l'excitation du circuit neuronal et pas le glutamate. Vers le 18ème jour d'embryogenèse, le profil d'activité spontanée change, ce qui correspond à la maturation des neurones dans lesquels un gradient de chlore entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule est établi. Les synapses glycinergiques et GABAergiques deviennent alors inhibitrices (Branchereau et al., 2002).

### *2) Caractéristiques du modèle.*

Les neurones mis en culture sont prélevés dans la partie ventrale de la moelle épinière d'embryons de 12,5 jours. A ce stade, l'innervation des muscles n'est pas encore établie et les motoneurones sont encore en poussée pour atteindre leurs cibles. Lors de l'étape de mise en culture, la moelle épinière est extraite de l'animal et les neurones dissociés. Les cellules sont ensuite réparties dans des plaques 12 puits au nombre de  $10^5$  cellules par puits, densité en dessous de laquelle, les cellules ne survivent pas. Les neurones 24 heures après leur mise en culture ont déjà ré-émis des prolongements et établi des contacts. La population de cellules

comporte quelques motoneurones, qui ne présentent pas de phénotype particulier permettant de les distinguer à priori des autres cellules. On trouve donc en grande majorité des interneurones (Fig 2).

J'ai d'abord pu observer en utilisant une sonde calcique fluorescente fluo4-AM qu'à ce stade, les cellules semblent très actives. Elles génèrent des oscillations calciques spontanées illustrées en figure 3. Cependant, l'enregistrement des courants membranaires en voltage clamp ne laisse pas apparaître de courants synaptiques dans les premiers jours de culture, même si les neurones sont connectés. L'apparition plus fréquente de courants synaptiques s'observe au alentour de 6 à 7 jours de culture (Fig. 4). A ce stade, nous avons visualisé deux types de courants qui possèdent des cinétiques différentes et qui ont été caractérisés sur ce modèle (Carrasco et al., 2007) :

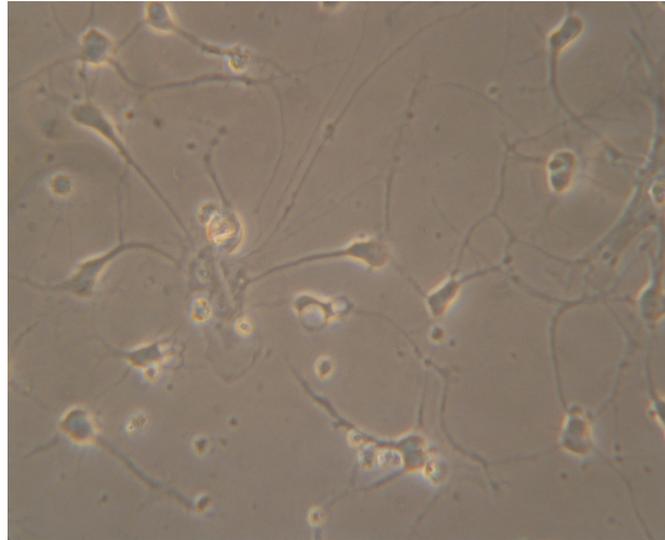
- d'une part des courant GABAergiques caractérisables par une cinétique lente.
- d'autre part des courants glycinergiques caractérisables par une cinétique plus rapide.

Ces données coïncident avec celles récemment publiées sur le même modèle, puisque jusqu'à 4 jours in vitro aucune des cellules patchées ne montrent des courants alors qu'à 7 jours, leur proportion passe à 50% (Carrasco et al., 2007). J'ai vérifié immédiatement après l'obtention de la configuration « cellule entière » et avant la dialyse du cytosol par le milieu intrapipette, que les courants synaptiques s'inversaient à 0mV. Cela confirme l'absence de gradient chimique pour le chlore et le caractère excitateur des activités synaptiques GABAergiques et glycinergiques (Fig 4). Ces courants excitateurs permettent d'atteindre le seuil d'excitabilité des neurones et de générer des potentiels d'action que nous avons visualisé en current clamp (Fig 4). Ainsi, cette activité donnant lieu à des potentiels d'actions peut être observée en imagerie calcique puisque ces derniers activent les canaux voltage dépendants de type L (Carrasco et al., 2007; Tapia et al., 2001).

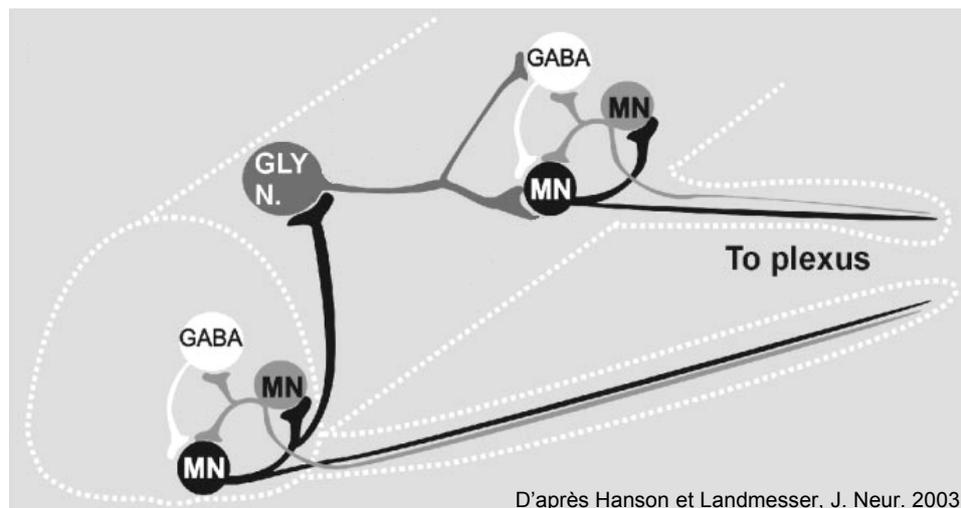
### 3) Expression de CD38.

J'ai voulu vérifier que les neurones spinaux en culture exprimaient bien l'antigène de surface CD38 et je me suis intéressée à la distribution de cette protéine dans ce nouveau système cellulaire. La RT-PCR confirme bien que les ARN messagers de l'enzyme sont présents dans les cellules (Fig. 5a). Il ressort des immuno-marquages anti-CD38 que cette protéine est largement exprimée par tous les types de neurones de la culture (Fig. 5b). De plus, son expression ne semble pas restreinte à un domaine subcellulaire en particulier puisque celle-ci apparaît aussi bien au niveau soma que dans les prolongements. Les marquages qui ont été

**a**



**b**

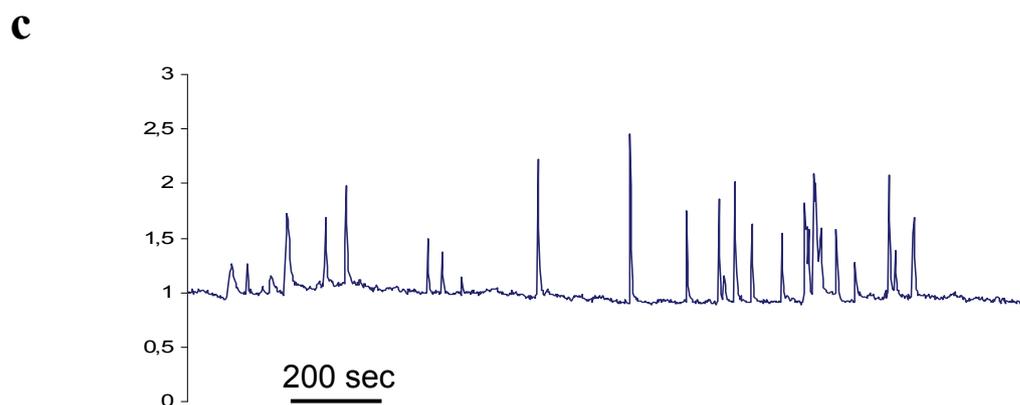
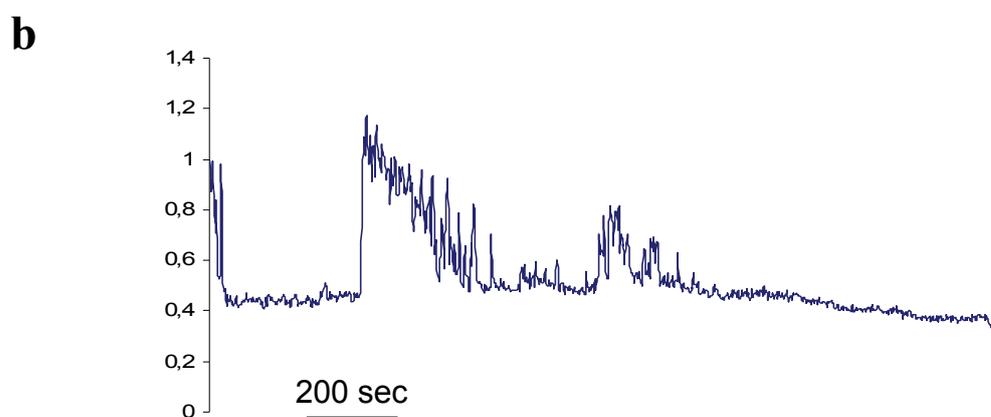
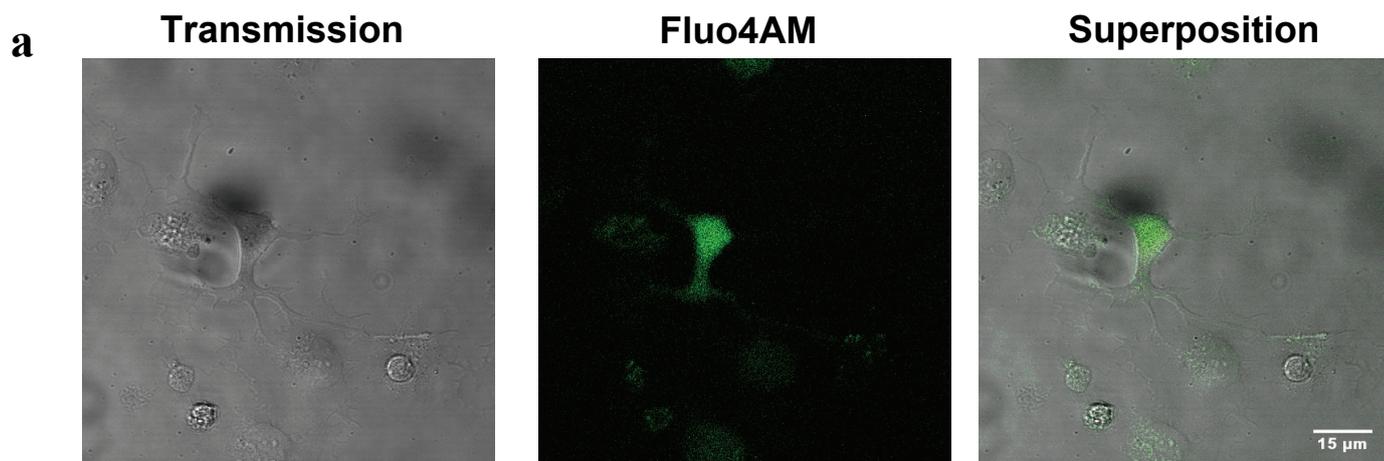


**GABA= interneurone GABAergique**

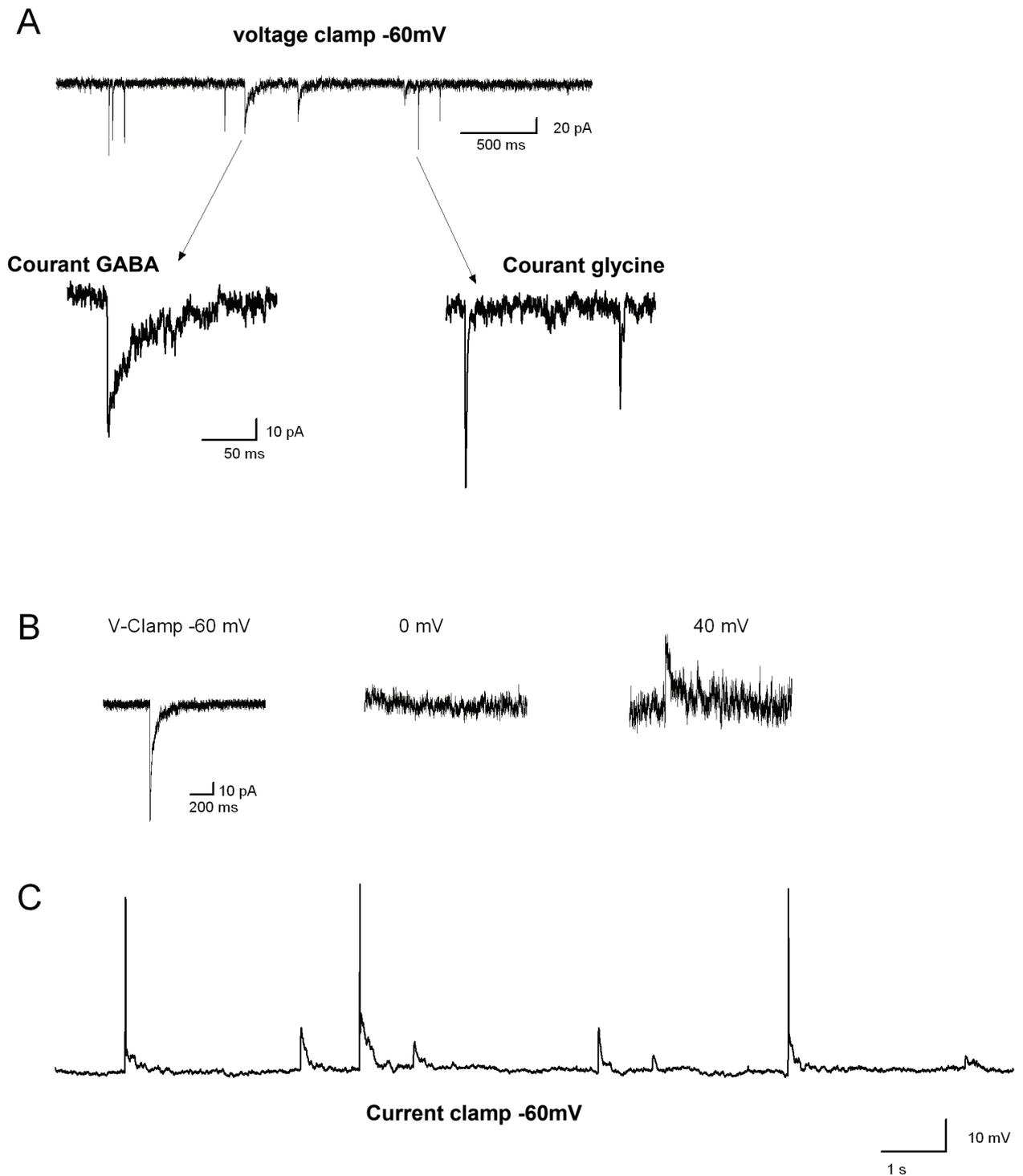
**Gly N.= interneurone glycinergique**

**MN= motoneurone**

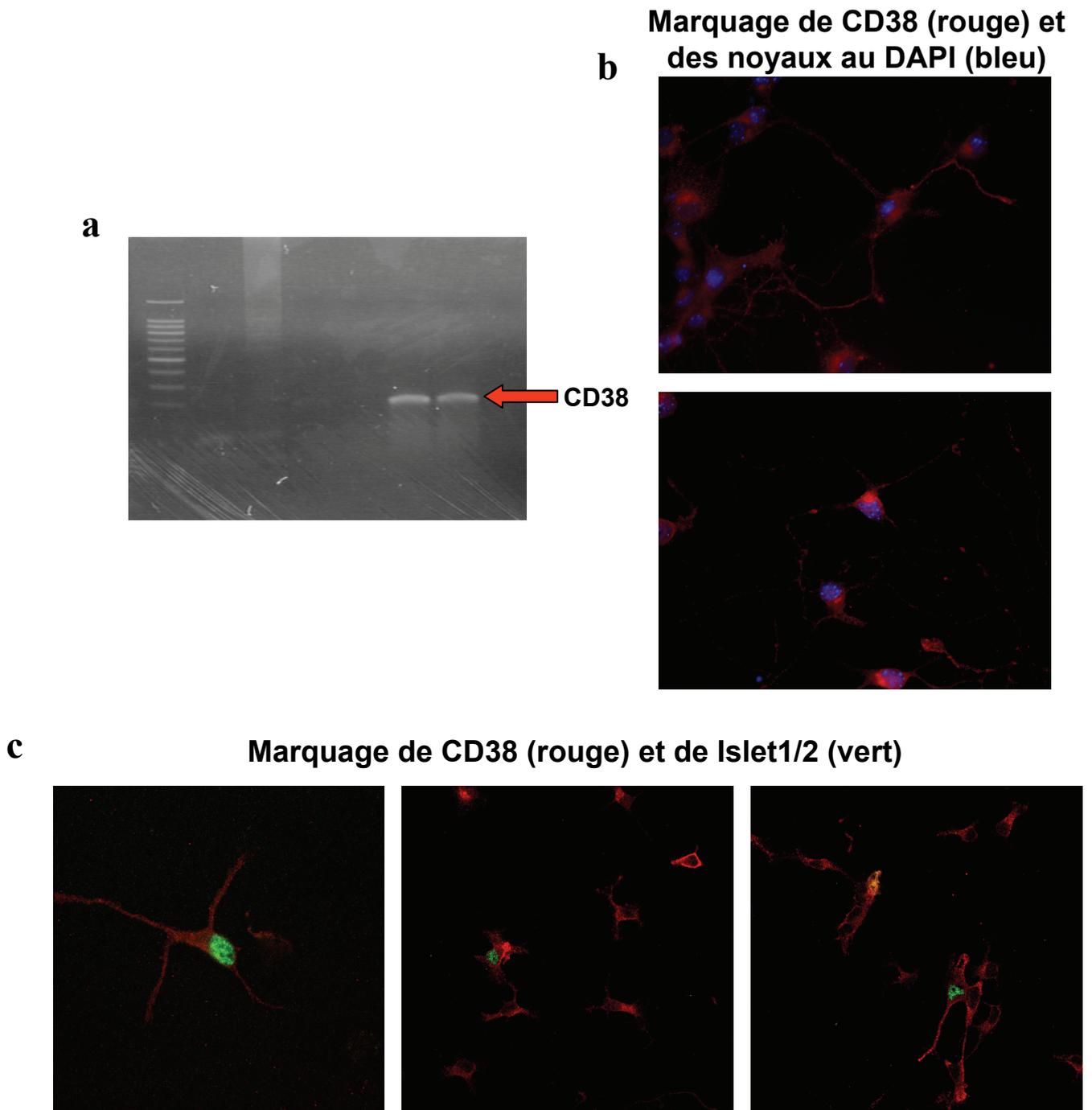
**Figure 2. Les neurones spinaux embryonnaires de souris.** (a) Photographie du réseau formé par les neurones spinaux 48 heures après leur mise en culture (J2). (b) Schématisation du réseau formé par les neurones spinaux embryonnaires dans la moelle épinière d'embryons de 12 jours (E12).



**Figure 3. Activités calciques spontanées des neurones spinaux embryonnaires de souris à jour 1 de culture.** Les neurones chargés par la sonde calcique fluo4 AM (a) présentent une activité calcique spontanée intense pendant les premiers jours de culture (b et c). Les deux traces montrent des exemples d'activités spontanées enregistrées sur deux cellules différentes.



**Figure 4. Caractérisation de l'activité synaptique observée sur les neurones spinaux embryonnaires de souris.** L'enregistrement en voltage clamp au potentiel de maintien de -60mV montre l'existence de deux types de courant synaptiques de cinétiques différentes: des courants GABAergiques lents et des courants glycinergiques plus rapides(a). Il s'agit de courants chlore excitateurs dont le potentiel d'inversion se situe à 0mV (b). Ces courants permettent d'atteindre le seuil d'excitabilité des cellules et de déclencher de potentiels d'action visibles en current clamp (c).



**Figure 5. Expression de CD38 dans les neurones embryonnaires de la moelle ventrale de souris.** (a) RT-PCR sur des ARN provenant des neurones lors de leur mise en culture (J0). (b) Marquage des neurones avec un anticorps anti-CD38 (en rouge). Les noyaux sont aussi marqués par le DAPI (en bleu).(c) Double marquage avec un anti-CD38 et un anti-Islet1/2, marqueur spécifique des motoneurones.

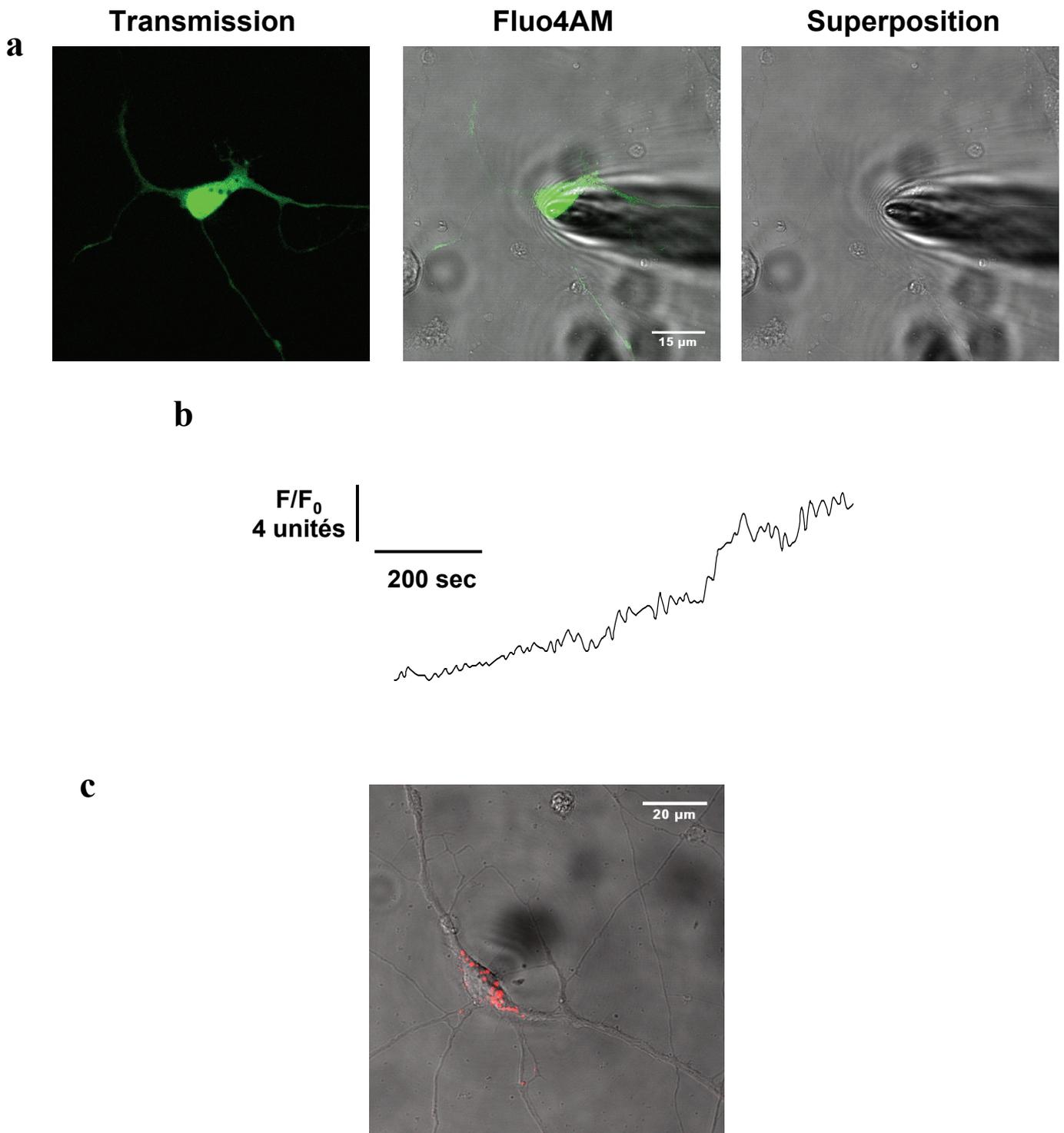
effectués à différents stades de culture ont toujours révélé la présence de CD 38, mais il serait tout de même intéressant de voir si dans notre système, son expression varie au cours du temps. D'autre part, CD38 étant capable de synthétiser le NAADP, nous nous sommes posés la question de savoir si le NAADP libérait du calcium dans notre modèle neuronal.

#### 4) L'effet du NAADP sur la concentration calcique intracellulaire des neurones spinaux embryonnaires de souris

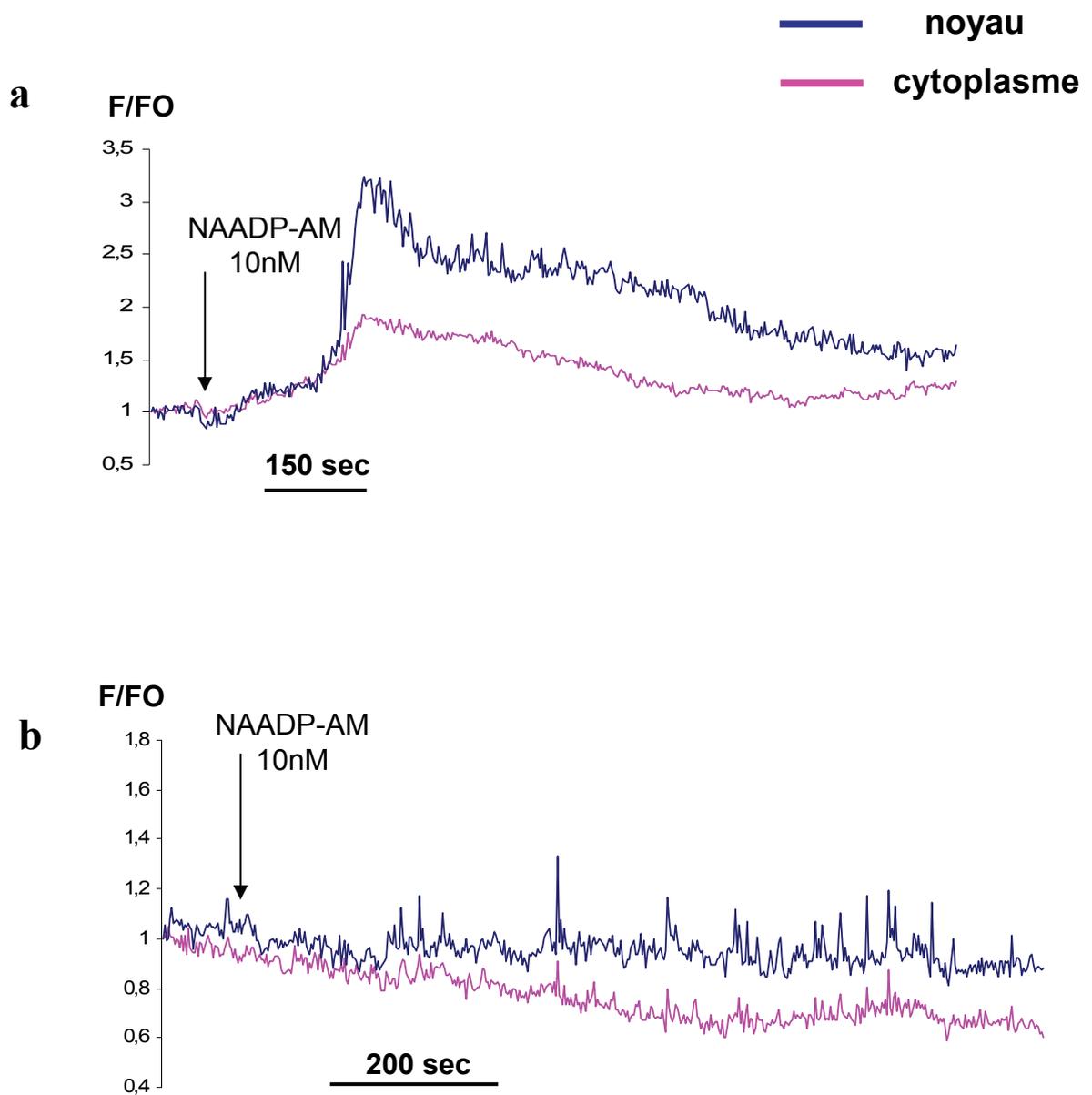
Le NAADP a été montré capable de libérer du calcium dans plusieurs types cellulaires, mais dans les neurones, les études se rapportant à ce messager sont rares. Le NAADP n'étant pas un composé capable de franchir les membranes, j'ai d'abord utilisé le patch clamp pour introduire ce messager, couplé à la sonde calcique Fluo-4 dans les neurones. A la concentration intrapipette de 500nM, le NAADP provoque une augmentation du calcium intracellulaire (n=5) (Fig 6 a et b). Par la suite, j'ai pu disposer d'une forme perméante du messager : le NAADP-AM. Le groupement AM lié de manière covalente au NAADP lui permet de passer la membrane cellulaire et une fois dans l'espace cytosolique se trouve clivé par les estérases. Le NAADP s'accumule donc dans la cellule au cours du temps. Le NAADP-AM à la concentration de 10nM dans le milieu a produit deux types de réponses (n=4) (Fig. 7). J'ai pu observer en imagerie, soit, une augmentation massive de calcium au sein du corps cellulaire (Fig. 7a), soit l'apparition d'oscillations calciques (Fig. 7b). Dans les deux cas, la cinétique du signal calcique entre le compartiment nucléaire et le compartiment cytoplasmique est différente. Lors de l'augmentation massive du calcium, le signal nucléaire précède le signal cytosolique et son amplitude est beaucoup plus importante. Dans l'autre cas, l'amplitude des oscillations nucléaires est plus importante que dans le reste du soma. De plus, certaines oscillations calciques nucléaires ne semblent pas être transmises au compartiment cytosolique. Suite à ces expériences, j'ai effectué sur les neurones spinaux un marquage au lysotracker red, un composé fluorescent s'accumulant spécifiquement dans les lysosomes connus une des réserves sensibles au NAADP. Il est intéressant de voir que les lysosomes se répartissent presque exclusivement dans le corps cellulaire, en périphérie du noyau (Fig 6c).

#### 5) Sensibilité des neurones spinaux embryonnaires de souris aux neurotrophines.

Dans les réseaux neuronaux en développement, les neurotrophines telles que le BDNF (Brain Derived Neurotrophique Factor) ou la NT3 (Neurotrophine 3) ont une importance primordiale pour la maturation. Elles ont été impliquées dans la survie, la poussée neuritique, la différenciation, l'établissement des connections synaptiques. On peut séparer les réponses aux



**Figure 6. Réponse des neurones spinaux embryonnaires de souris au NAADP.** Le NAADP (500 nM intrapipette) couplé à la sonde calcique fluo4 est introduit dans les neurones (jour 4 de culture) grâce à la pipette de patch clamp (a). Une augmentation de calcium intracellulaire est observée suite à l'introduction de NAADP dans la cellule (b). Visualisation des lysosomes, réserve sensible au NAADP avec le marqueur fluorescente vital : lysotracker red (c).

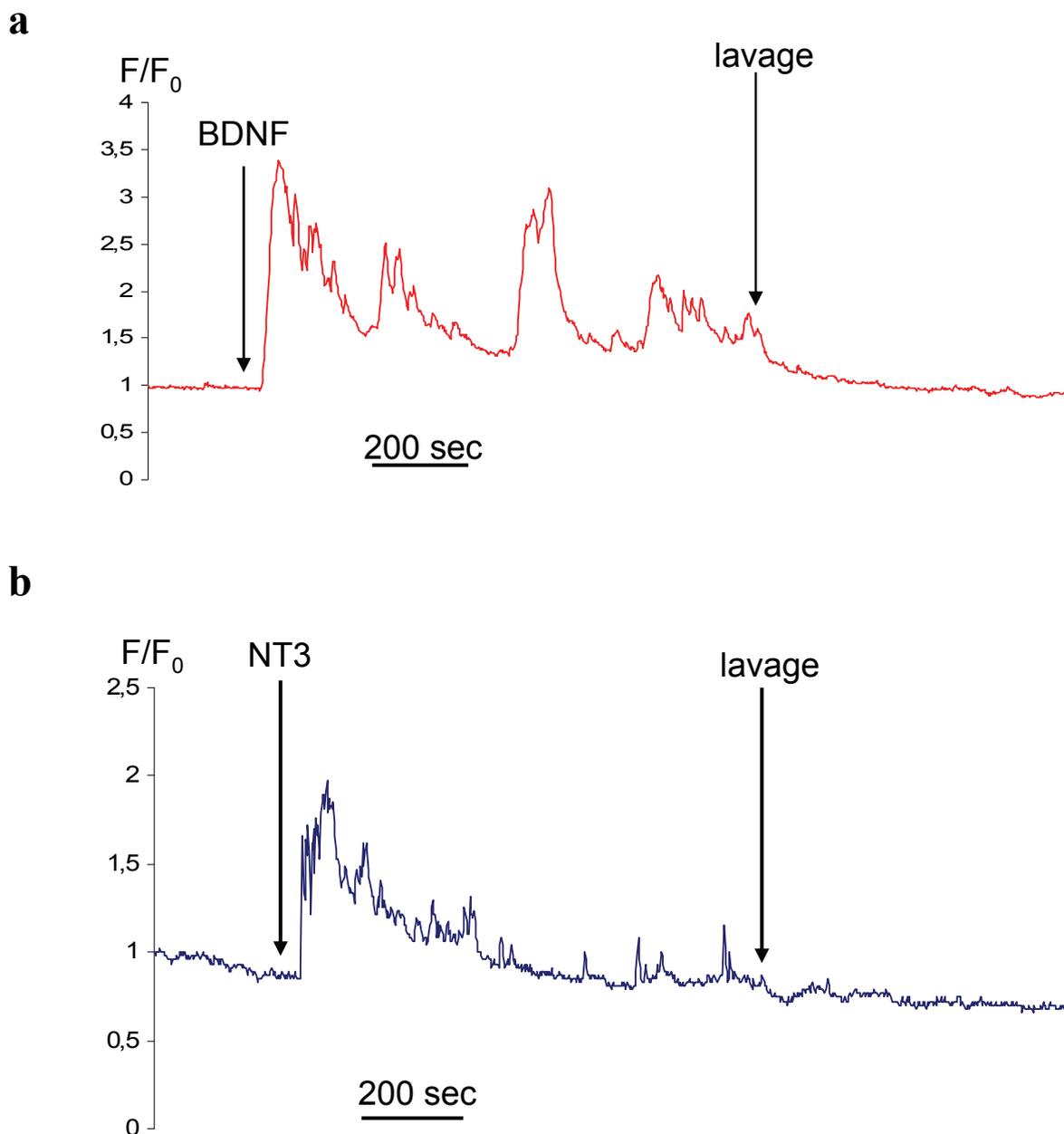


**Figure 7. Réponse des neurones spinaux embryonnaires de souris au NAADP-AM.** Les neurones chargés par la sonde calcique fluo4 AM ont été mis en présence de NAADP-AM (jour 4 de culture) perméant à la concentration de 10nM (a et b). Une augmentation du calcium cytoplasmique (en rose) et nucléoplasmique (en bleu) ont été observées.

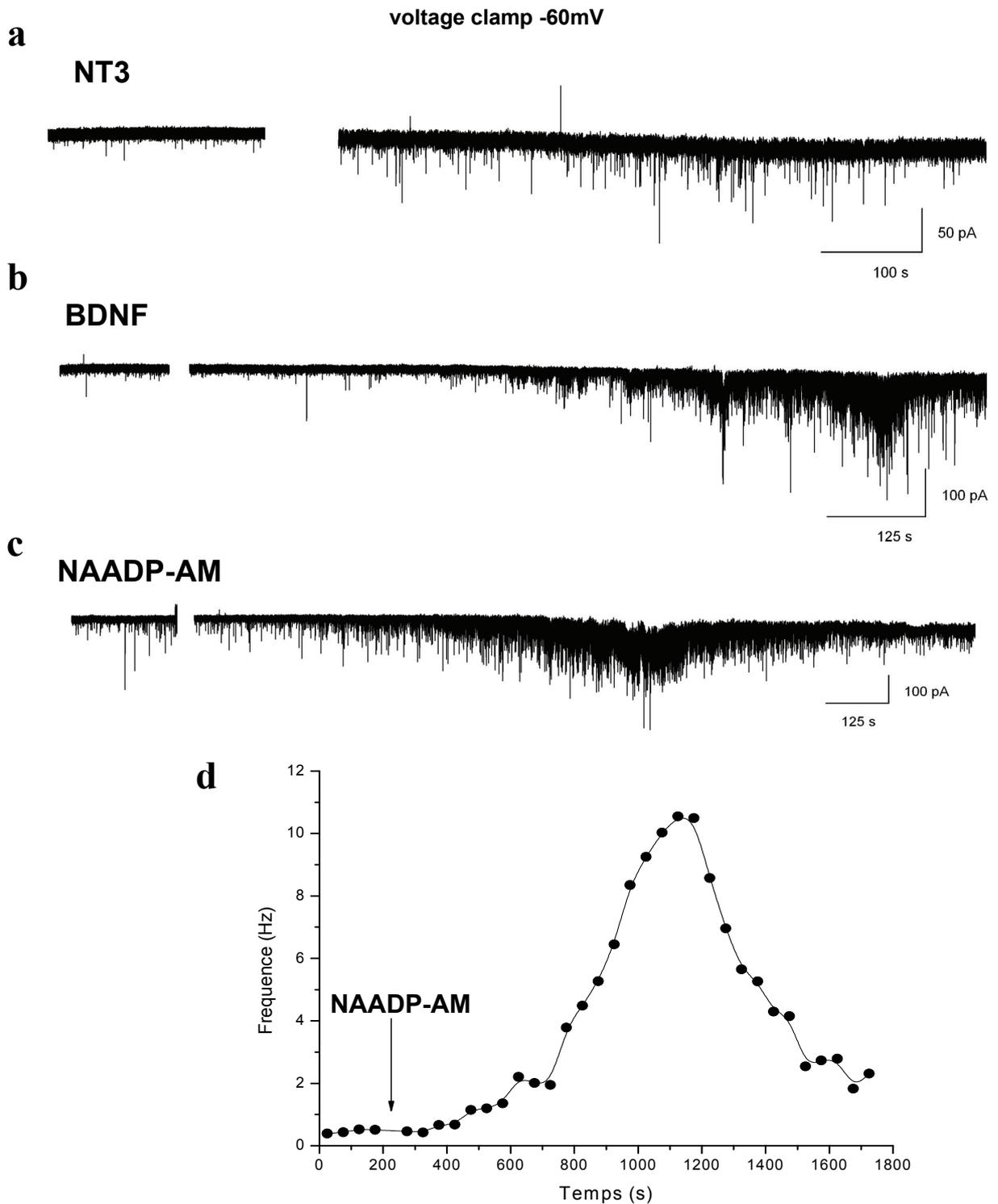
neurotrophines en deux catégories. Celles qui produisent des effets à court terme et à long terme. Certains des effets à long terme des neurotrophines passent par la régulation de l'expression génique calcium dépendante et mènent à la LTP (Korte et al., 2000; Minichiello et al., 2002). En imagerie, nous avons observé que le BDNF et la NT3 sont capables de provoquer des augmentations de la concentration calcique intracellulaire dans les neurones spinaux. (Fig 8). Il est possible que ces augmentations du calcium puissent être à l'origine de changements pré et post synaptiques tels que ceux qui ont été décrits, à la fois en régulant par exemple la qualité des récepteurs exprimés par les cellules mais aussi en agissant sur la quantité de neuromédiateur sécrétée. Les récepteurs aux neurotrophines TrkB (pour le BDNF) et TrkC (pour la NT3) ont été montré couplés à la PLC- $\gamma$ , et donc à la synthèse d'IP<sub>3</sub>, ce qui leur permet de mobiliser le calcium à partir des réserves intracellulaires. On peut dès lors se demander si ces récepteurs ne pourraient pas être couplés à d'autres enzymes capables de synthétiser d'autres seconds messagers et si le NAADP ne pourrait pas faire partie de la voie de signalisation liée aux neurotrophines.

#### 6) Effet des neurotrophines sur les courants synaptiques

Le BDNF a aussi été caractérisé comme un régulateur de la transmission synaptique capable de moduler positivement la transmission synaptique. Nos données montrent que l'application aiguë sur notre préparation de BDNF ou de NT3 à 100ng/ml provoque en quelques minutes une augmentation importante de la fréquence des courants synaptiques (n=4) (Fig 9). Ces observations sont à rapprocher des données récemment publiées montrant que l'application chronique de BDNF pendant la culture provoque une augmentation du pourcentage de cellules qui présentent des courants. De plus, la fréquence des courants ainsi que leur amplitude est augmentée (Carrasco et al., 2007). Les auteurs montrent aussi que les effets du BDNF sur la maturation des synapses résultent d'évènement post-synaptiques tels que le changement de la composition des récepteurs glycinergiques, mais aussi d'évènement pré-synaptiques tels qu'une augmentation de la probabilité de sécrétion des neurotransmetteurs. Selon la littérature, les neurotrophines peuvent être à l'origine d'effets rapides suite à l'augmentation du calcium intracellulaire. Un de ces effets est l'augmentation de la transmission synaptique via l'augmentation de la quantité de neurotransmetteur libérée par l'élément présynaptique (Blum et Konnerth, 2005; Paredes et al., 2007). La sécrétion de neurotransmetteurs est un phénomène connu pour être régulé par le calcium (Rusakov, 2006). Puisque le NAADP est capable de libérer du calcium dans les neurones spinaux



**Figure 8. Effet des neurotrophines sur la concentration calcique intracellulaire des neurones spinaux embryonnaires de souris.** Les neurones ont été chargés par la sonde calcique fluo4 AM. Le BDNF (a) et la neurotrophine 3 (NT3) (b) appliqués localement avec une pipette (1 $\mu$ g/ml dans la pipette) provoquent des augmentations de la concentration calcique intracellulaire .



**Figure 9. Effet des neurotrophines sur les courants synaptiques générés par les neurones spinaux embryonnaires de souris.** Les courants ont été enregistrés en voltage clamp au potentiel de maintien de -60mV. Les applications sur les neurones de NT3 (a) et de (b) BDNF (100ng/ml) provoquent des augmentations de la fréquence des courants synaptique. L'ajout de NAADP-AM (10nM) a pour conséquence une augmentation de la fréquence des courants suivie d'un retour à l'activité synaptique de base (c). Analyse de l'évolution de la fréquence des courants synaptiques suite à l'ajout de NAADP-AM (d).

embryonnaires, nous avons voulu tester l'effet de cet agent sur les courants synaptiques de notre réseau.

### 7) Effets du NAADP sur les courants synaptiques

Lorsque le NAADP-AM est ajouté à 10nM sur une préparation de neurones de 6 à 8 jours où les synapses sont matures, il se produit une très forte augmentation de la fréquence des courants synaptiques proche de celle obtenue suite à l'application des neurotrophines (n=4) (Fig 9). Après plusieurs minutes d'activité intense, on observe un retour à l'activité de base. Du calcium libéré par le NAADP au niveau des terminaisons présynaptiques pourrait provoquer une augmentation de l'exocytose à l'origine d'une libération massive de neurotransmetteurs. Ces résultats rejoignent d'ailleurs ceux obtenus au laboratoire suite aux travaux sur les neurones d'Aplysie dans lesquels l'injection de NAADP augmente le nombre de quanta d'acétylcholine libérés par un potentiel d'action au niveau présynaptique (Chameau et al., 2001).Après plusieurs minutes, les courants synaptiques disparaissent ce qui suggère que, soit le stock de vésicules de neuromédiateurs s'épuise, soit le NAADP qui continue de s'accumuler dans les cellules atteint une concentration de plusieurs micromolaires, qui provoque une désensibilisation de son récepteur. Ces hypothèses restent encore à tester.

## **Conclusion**

Nos expériences montrent que le NAADP est capable de libérer du calcium au sein des neurones spinaux embryonnaires de souris et l'enzyme à l'origine de sa synthèse est largement présente à tous les niveaux de la cellule. Le NAADP est capable de libérer du calcium dans le corps cellulaire et particulièrement dans le compartiment nucléaire. De plus, il semble qu'il le soit aussi au niveau des terminaisons synaptiques et que cette libération puisse être à l'origine d'une augmentation de l'activité de la synapse. Le NAADP pourrait donc être impliqué dans différents processus ayant lieu à différents niveaux de la cellule. Dans les neurones, les agonistes qui déclenchent la synthèse du NAADP sont encore inconnus et nos résultats préliminaires nous amènent à poser l'hypothèse selon laquelle le NAADP pourrait être impliqué dans la voie de signalisation des neurotrophines. Une prochaine étape serait de vérifier si le fait de bloquer le récepteur au NAADP a une incidence sur la réponse aux neurotrophines. Il sera aussi intéressant de savoir si la stimulation par le BDNF provoque sa synthèse en mesurant les variations du taux endogène de NAADP. Si tel est le cas, le NAADP pourrait donc constituer un second messager d'une grande importance pour le développement et la maturation du réseau neuronal.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

- Aarhus, R., R.M. Graeff, D.M. Dickey, T.F. Walseth, et H.C. Lee. 1995. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem.* 270:30327-33.
- Adebanjo, O.A., H.K. Anandatheerthavarada, A.P. Koval, B.S. Moonga, G. Biswas, L. Sun, B.R. Sodam, P.J. Bevis, C.L. Huang, S. Epstein, F.A. Lai, N.G. Avadhani, et M. Zaidi. 1999. A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Nat Cell Biol.* 1:409-14.
- Aizawa, H., S.C. Hu, K. Bobb, K. Balakrishnan, G. Ince, I. Gurevich, M. Cowan, et A. Ghosh. 2004. Dendrite development regulated by CREST, a calcium-regulated transcriptional activator. *Science.* 303:197-202.
- Alberti, S., S.M. Krause, O. Kretz, U. Philippar, T. Lemberger, E. Casanova, F.F. Wiebel, H. Schwarz, M. Frotscher, G. Schutz, et A. Nordheim. 2005. Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:6148-53.
- Allen, T.D., J.M. Cronshaw, S. Bagley, E. Kiseleva, et M.W. Goldberg. 2000. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 10):1651-9.
- Alonso, M.T., C. Villalobos, P. Chamero, J. Alvarez, et J. Garcia-Sancho. 2006. Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium.* 40:513-25.
- Ambudkar, I.S., B.C. Bandyopadhyay, X. Liu, T.P. Lockwich, B. Paria, et H.L. Ong. 2006. Functional organization of TRPC-Ca<sup>2+</sup> channels and regulation of calcium microdomains. *Cell Calcium.* 40:495-504.
- Antonelli, A., et E. Ferrannini. 2004. CD38 autoimmunity: recent advances and relevance to human diabetes. *J Endocrinol Invest.* 27:695-707.
- Arnaudeau, S., W.L. Kelley, J.V. Walsh, Jr., et N. Demaurex. 2001. Mitochondria recycle Ca(2+) to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem.* 276:29430-9.
- Baba, Y., K. Hayashi, Y. Fujii, A. Mizushima, H. Watarai, M. Wakamori, T. Numaga, Y. Mori, M. Iino, M. Hikida, et T. Kurosaki. 2006. Coupling of STIM1 to store-operated Ca<sup>2+</sup> entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:16704-9.
- Bach, G. 2001. Mucopolidosis type IV. *Mol Genet Metab.* 73:197-203.
- Bading, H., D.D. Ginty, et M.E. Greenberg. 1993. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science.* 260:181-6.
- Bading, H., M.M. Segal, N.J. Sucher, H. Dudek, S.A. Lipton, et M.E. Greenberg. 1995. N-methyl-D-aspartate receptors are critical for mediating the effects of glutamate on intracellular calcium concentration and immediate early gene expression in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience.* 64:653-64.
- Badminton, M.N., A.K. Campbell, et C.M. Rembold. 1996. Differential regulation of nuclear and cytosolic Ca<sup>2+</sup> in HeLa cells. *J Biol Chem.* 271:31210-4.
- Badminton, M.N., J.M. Kendall, C.M. Rembold, et A.K. Campbell. 1998. Current evidence suggests independent regulation of nuclear calcium. *Cell Calcium.* 23:79-86.
- Badminton, M.N., J.M. Kendall, G. Sala-Newby, et A.K. Campbell. 1995. Nucleoplasm-targeted aequorin provides evidence for a nuclear calcium barrier. *Exp Cell Res.* 216:236-43.
- Bak, J., R.A. Billington, G. Timar, A.C. Dutton, et A.A. Genazzani. 2001. NAADP receptors are present and functional in the heart. *Curr Biol.* 11:987-90.

- Bak, J., P. White, G. Timar, L. Missiaen, A.A. Genazzani, et A. Galione. 1999. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate triggers Ca<sup>2+</sup> release from brain microsomes. *Curr Biol.* 9:751-4.
- Bao, J.X., E.R. Kandel, et R.D. Hawkins. 1997. Involvement of pre- and postsynaptic mechanisms in posttetanic potentiation at Aplysia synapses. *Science.* 275:969-73.
- Bao, J.X., E.R. Kandel, et R.D. Hawkins. 1998. Involvement of presynaptic and postsynaptic mechanisms in a cellular analog of classical conditioning at Aplysia sensory-motor neuron synapses in isolated cell culture. *J Neurosci.* 18:458-66.
- Barger, S.W., D. Horster, K. Furukawa, Y. Goodman, J. Krieglstein, et M.P. Mattson. 1995. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca<sup>2+</sup> accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9328-32.
- Bartsch, D., A. Casadio, K.A. Karl, P. Serodio, et E.R. Kandel. 1998. CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell.* 95:211-23.
- Bartsch, D., M. Ghirardi, P.A. Skehel, K.A. Karl, S.P. Herder, M. Chen, C.H. Bailey, et E.R. Kandel. 1995. Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell.* 83:979-92.
- Bayer, K.U., P. De Koninck, et H. Schulman. 2002. Alternative splicing modulates the frequency-dependent response of CaMKII to Ca(2+) oscillations. *Embo J.* 21:3590-7.
- Beard, N.A., M.M. Sakowska, A.F. Dulhunty, et D.R. Laver. 2002. Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. *Biophys J.* 82:310-20.
- Beck, A., M. Kolisek, L.A. Bagley, A. Fleig, et R. Penner. 2006. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose regulate TRPM2 channels in T lymphocytes. *Faseb J.* 20:962-4.
- Ben-Ari, Y. 2001. Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* 24:353-60.
- Ben-Ari, Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 3:728-39.
- Ben-Ari, Y., I. Khalilov, A. Represa, et H. Gozlan. 2004. Interneurons set the tune of developing networks. *Trends Neurosci.* 27:422-7.
- Benedito, A.B., M. Lehtinen, R. Massol, U.G. Lopes, T. Kirchhausen, A. Rao, et A. Bonni. 2005. The transcription factor NFAT3 mediates neuronal survival. *J Biol Chem.* 280:2818-25.
- Bennett, M.K., et M.B. Kennedy. 1987. Deduced primary structure of the beta subunit of brain type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase determined by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:1794-8.
- Berg, I., B.V. Potter, G.W. Mayr, et A.H. Guse. 2000. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP(+)) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca(2+)-signaling. *J Cell Biol.* 150:581-8.
- Bernardi, P. 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* 79:1127-55.
- Berridge, G., G. Dickinson, J. Parrington, A. Galione, et S. Patel. 2002. Solubilization of receptors for the novel Ca<sup>2+</sup>-mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem.* 277:43717-23.
- Berridge, M.J. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 32:235-49.
- Berridge, M.J. 2006. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium.* 40:405-12.

- Berridge, M.J., M.D. Bootman, et P. Lipp. 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature*. 395:645-8.
- Bezin, S., G. Charpentier, P. Fossier, et J.M. Cancela. 2006. The Ca(2+)-releasing messenger NAADP, a new player in the nervous system. *J Physiol Paris*.
- Bezprozvanny, I., et B.E. Ehrlich. 1994. Inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP3)-gated Ca channels from cerebellum: conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *J Gen Physiol*. 104:821-56.
- Bito, H., K. Deisseroth, et R.W. Tsien. 1996. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*. 87:1203-14.
- Bito, H., K. Deisseroth, et R.W. Tsien. 1997. Ca2+-dependent regulation in neuronal gene expression. *Curr Opin Neurobiol*. 7:419-29.
- Blum, R., et A. Konnerth. 2005. Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)*. 20:70-8.
- Boitier, E., R. Rea, et M.R. Duchen. 1999. Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca2+ waves in rat cortical astrocytes. *J Cell Biol*. 145:795-808.
- Boittin, F.X., F. Coussin, N. Macrez, C. Mironneau, et J. Mironneau. 1998. Inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca2+ release channel-dependent Ca2+ signalling in rat portal vein myocytes. *Cell Calcium*. 23:303-11.
- Bolotina, V.M., et P. Csutora. 2005. CIF and other mysteries of the store-operated Ca2+-entry pathway. *Trends Biochem Sci*. 30:378-87.
- Bonni, A., D.D. Ginty, H. Dudek, et M.E. Greenberg. 1995. Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Mol Cell Neurosci*. 6:168-83.
- Bootman, M.D., P. Lipp, et M.J. Berridge. 2001. The organisation and functions of local Ca(2+) signals. *J Cell Sci*. 114:2213-22.
- Borodinsky, L.N., C.M. Root, J.A. Cronin, S.B. Sann, X. Gu, et N.C. Spitzer. 2004. Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature*. 429:523-30.
- Bourtchuladze, R., B. Frenguelli, J. Blendy, D. Cioffi, G. Schutz, et A.J. Silva. 1994. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*. 79:59-68.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.
- Brailoiu, E., D. Churamani, V. Pandey, G.C. Brailoiu, F. Tuluc, S. Patel, et N.J. Dun. 2006. Messenger-specific role for nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate in neuronal differentiation. *J Biol Chem*. 281:15923-8.
- Brailoiu, E., J.L. Hoard, C.M. Filipeanu, G.C. Brailoiu, S.L. Dun, S. Patel, et N.J. Dun. 2005. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate potentiates neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 280:5646-50.
- Branchereau, P., J. Chapron, et P. Meyrand. 2002. Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord. *J Neurosci*. 22:2598-606.
- Brini, M., M. Murgia, L. Pasti, D. Picard, T. Pozzan, et R. Rizzuto. 1993. Nuclear Ca2+ concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *Embo J*. 12:4813-9.

- Brocke, L., M. Srinivasan, et H. Schulman. 1995. Developmental and regional expression of multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms in rat brain. *J Neurosci.* 15:6797-808.
- Brosenitsch, T.A., et D.M. Katz. 2001. Physiological patterns of electrical stimulation can induce neuronal gene expression by activating N-type calcium channels. *J Neurosci.* 21:2571-9.
- Bruzzone, S., L. Guida, E. Zocchi, L. Franco, et A. De Flora. 2001. Connexin 43 hemichannels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells. *Faseb J.* 15:10-12.
- Bruzzone, S., C. Verderio, U. Schenk, E. Fedele, E. Zocchi, M. Matteoli, et A. De Flora. 2004. Glutamate-mediated overexpression of CD38 in astrocytes cultured with neurones. *J Neurochem.* 89:264-72.
- Buck, E., I. Zimanyi, J.J. Abramson, et I.N. Pessah. 1992. Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem.* 267:23560-7.
- Bunney, T.D., P.J. Shaw, P.A. Watkins, J.P. Taylor, A.F. Beven, B. Wells, G.M. Calder, et B.K. Drobak. 2000. ATP-dependent regulation of nuclear Ca(2+) levels in plant cells. *FEBS Lett.* 476:145-9.
- Bustamante, J.O., E.R. Michelette, J.P. Geibel, D.A. Dean, J.A. Hanover, et T.J. McDonnell. 2000. Calcium, ATP and nuclear pore channel gating. *Pflugers Arch.* 439:433-44.
- Byrne, J.H., et E.R. Kandel. 1996. Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci.* 16:425-35.
- Cancela, J.M. 2001. Specific Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP3. *Annu Rev Physiol.* 63:99-117.
- Cancela, J.M., G. Charpentier, et O.H. Petersen. 2003. Co-ordination of Ca(2+) signalling in mammalian cells by the new Ca(2+)-releasing messenger NAADP. *Pflugers Arch.* 446:322-7.
- Cancela, J.M., G.C. Churchill, et A. Galione. 1999. Coordination of agonist-induced Ca<sup>2+</sup>-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature.* 398:74-6.
- Cancela, J.M., O.V. Gerasimenko, J.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, et O.H. Petersen. 2000. Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca(2+) release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *Embo J.* 19:2549-57.
- Cancela, J.M., H. Mogami, A.V. Tepikin, et O.H. Petersen. 1998. Intracellular glucose switches between cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate triggering of cytosolic Ca<sup>2+</sup> spiking. *Curr Biol.* 8:865-8.
- Cancela, J.M., et O.H. Petersen. 1998. The cyclic ADP ribose antagonist 8-NH<sub>2</sub>-cADP-ribose blocks cholecystokinin-evoked cytosolic Ca<sup>2+</sup> spiking in pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* 435:746-8.
- Cancela, J.M., F. Van Coppenolle, A. Galione, A.V. Tepikin, et O.H. Petersen. 2002. Transformation of local Ca<sup>2+</sup> spikes to global Ca<sup>2+</sup> transients: the combinatorial roles of multiple Ca<sup>2+</sup> releasing messengers. *Embo J.* 21:909-19.
- Canellada, A., E. Cano, L. Sanchez-Ruiloba, F. Zafra, et J.M. Redondo. 2006. Calcium-dependent expression of TNF-alpha in neural cells is mediated by the calcineurin/NFAT pathway. *Mol Cell Neurosci.* 31:692-701.
- Cannell, M.B., et C. Soeller. 1999. Mechanisms underlying calcium sparks in cardiac muscle. *J Gen Physiol.* 113:373-6.
- Carafoli, E. 2002. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:1115-22.

- Cardenas, C., J.L. Liberona, J. Molgo, C. Colasante, G.A. Mignery, et E. Jaimovich. 2005. Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptors regulate local Ca<sup>2+</sup> transients and modulate cAMP response element binding protein phosphorylation. *J Cell Sci.* 118:3131-40.
- Carrasco, M.A., P. Castro, F.J. Sepulveda, J.C. Tapia, K. Gatica, M.I. Davis, et L.G. Aguayo. 2007. Regulation of glycinergic and GABAergic synaptogenesis by brain-derived neurotrophic factor in developing spinal neurons. *Neuroscience.* 145:484-94.
- Carrasco, M.A., et C. Hidalgo. 2006. Calcium microdomains and gene expression in neurons and skeletal muscle cells. *Cell Calcium.* 40:575-83.
- Carrion, A.M., W.A. Link, F. Ledo, B. Mellstrom, et J.R. Naranjo. 1999. DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. *Nature.* 398:80-4.
- Carroll, J., K. Swann, D. Whittingham, et M. Whitaker. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development.* 120:3507-17.
- Carter, B.D., C. Kaltschmidt, B. Kaltschmidt, N. Offenhauser, R. Bohm-Matthaei, P.A. Baeuerle, et Y.A. Barde. 1996. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science.* 272:542-5.
- Castellucci, V.F., W.N. Frost, P. Goelet, P.G. Montarolo, S. Schacher, J.A. Morgan, H. Blumenfeld, et E.R. Kandel. 1986. Cell and molecular analysis of long-term sensitization in Aplysia. *J Physiol (Paris).* 81:349-57.
- Castellucci, V.F., et E.R. Kandel. 1974. A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in Aplysia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:5004-8.
- Ceni, C., H. Muller-Steffner, F. Lund, N. Pochon, A. Schweitzer, M. De Waard, F. Schuber, M. Villaz, et M.J. Moutin. 2003. Evidence for an intracellular ADP-ribosyl cyclase/NAD<sup>+</sup>-glycohydrolase in brain from CD38-deficient mice. *J Biol Chem.* 278:40670-8.
- Ceni, C., N. Pochon, M. Villaz, H. Muller-Steffner, F. Schuber, J. Baratier, M. De Waard, M. Ronjat, et M.J. Moutin. 2006. The CD38-independent ADP-ribosyl cyclase from mouse brain synaptosomes: a comparative study of neonate and adult brain. *Biochem J.* 395:417-26.
- Chad, J.E., et R. Eckert. 1984. Calcium domains associated with individual channels can account for anomalous voltage relations of CA-dependent responses. *Biophys J.* 45:993-9.
- Chameau, P., Y. Van de Vrede, P. Fossier, et G. Baux. 2001. Ryanodine-, IP<sub>3</sub>- and NAADP-dependent calcium stores control acetylcholine release. *Pflugers Arch.* 443:289-96.
- Chamero, P., C. Villalobos, M.T. Alonso, et J. Garcia-Sancho. 2002. Dampening of cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations on propagation to nucleus. *J Biol Chem.* 277:50226-9.
- Chatila, T., K.A. Anderson, N. Ho, et A.R. Means. 1996. A unique phosphorylation-dependent mechanism for the activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase type IV/GR. *J Biol Chem.* 271:21542-8.
- Chawla, S., G.E. Hardingham, D.R. Quinn, et H. Bading. 1998. CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science.* 281:1505-9.
- Chen, H.J., M. Rojas-Soto, A. Oguni, et M.B. Kennedy. 1998. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron.* 20:895-904.
- Cheng, H., W.J. Lederer, et M.B. Cannell. 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* 262:740-4.

- Ching, L.L., A.J. Williams, et R. Sitsapesan. 2000. Evidence for Ca(2+) activation and inactivation sites on the luminal side of the cardiac ryanodine receptor complex. *Circ Res.* 87:201-6.
- Chini, E.N., K.W. Beers, et T.P. Dousa. 1995. Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *J Biol Chem.* 270:3216-23.
- Chini, E.N., et T.P. Dousa. 1996. Nicotinate-adenine dinucleotide phosphate-induced Ca(2+)-release does not behave as a Ca(2+)-induced Ca(2+)-release system. *Biochem J.* 316 ( Pt 3):709-11.
- Christensen, K.A., J.T. Myers, et J.A. Swanson. 2002. pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J Cell Sci.* 115:599-607.
- Chrivia, J.C., R.P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M.R. Montminy, et R.H. Goodman. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature.* 365:855-9.
- Churchill, G.C., et A. Galione. 2001a. NAADP induces Ca<sup>2+</sup> oscillations via a two-pool mechanism by priming IP<sub>3</sub>- and cADPR-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores. *Embo J.* 20:2666-71.
- Churchill, G.C., et A. Galione. 2001b. Prolonged inactivation of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release mediates a spatiotemporal Ca<sup>2+</sup> memory. *J Biol Chem.* 276:11223-5.
- Churchill, G.C., J.S. O'Neill, R. Masgrau, S. Patel, J.M. Thomas, A.A. Genazzani, et A. Galione. 2003. Sperm deliver a new second messenger: NAADP. *Curr Biol.* 13:125-8.
- Churchill, G.C., Y. Okada, J.M. Thomas, A.A. Genazzani, S. Patel, et A. Galione. 2002. NAADP mobilizes Ca(2+) from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell.* 111:703-8.
- Clapper, D.L., T.F. Walseth, P.J. Dargie, et H.C. Lee. 1987. Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem.* 262:9561-8.
- Clementi, E., M. Riccio, C. Sciorati, G. Nistico, et J. Meldolesi. 1996. The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. Role of the nitric oxide/cGMP pathway. *J Biol Chem.* 271:17739-45.
- Clubb, B.H., et M. Locke. 1998. 3T3 cells have nuclear invaginations containing F-actin. *Tissue Cell.* 30:684-91.
- Cockayne, D.A., T. Muchamuel, J.C. Grimaldi, H. Muller-Steffner, T.D. Randall, F.E. Lund, R. Murray, F. Schuber, et M.C. Howard. 1998. Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood.* 92:1324-33.
- Collins, T.J., M.J. Berridge, P. Lipp, et M.D. Bootman. 2002. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *Embo J.* 21:1616-27.
- Comb, M., N.C. Birnberg, A. Seasholtz, E. Herbert, et H.M. Goodman. 1986. A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature.* 323:353-6.
- Crabtree, G.R. 1999. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell.* 96:611-4.
- Craske, M., T. Takeo, O. Gerasimenko, C. Vaillant, K. Torok, O.H. Petersen, et A.V. Tepikin. 1999. Hormone-induced secretory and nuclear translocation of calmodulin: oscillations of calmodulin concentration with the nucleus as an integrator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4426-31.
- Cruzalegui, F.H., et A.R. Means. 1993. Biochemical characterization of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase type IV expressed in insect cells. *J Biol Chem.* 268:26171-8.

- Dale, N., et E.R. Kandel. 1993. L-glutamate may be the fast excitatory transmitter of Aplysia sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:7163-7.
- Dale, N., S. Schacher, et E.R. Kandel. 1988. Long-term facilitation in Aplysia involves increase in transmitter release. *Science.* 239:282-5.
- Dammermann, W., et A.H. Guse. 2005. Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local Ca<sup>2+</sup> signaling in T-lymphocytes. *J Biol Chem.* 280:21394-9.
- Dash, P.K., B. Hochner, et E.R. Kandel. 1990. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature.* 345:718-21.
- De Flora, A., L. Franco, L. Guida, S. Bruzzone, C. Usai, et E. Zocchi. 2000. Topology of CD38. *Chem Immunol.* 75:79-98.
- De Flora, A., L. Guida, L. Franco, et E. Zocchi. 1997. The CD38/cyclic ADP-ribose system: a topological paradox. *Int J Biochem Cell Biol.* 29:1149-66.
- De Flora, A., E. Zocchi, L. Guida, L. Franco, et S. Bruzzone. 2004. Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD<sup>+</sup>/cyclic ADP-ribose system. *Ann N Y Acad Sci.* 1028:176-91.
- De Koninck, P., et H. Schulman. 1998. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science.* 279:227-30.
- Deisseroth, K., H. Bito, et R.W. Tsien. 1996. Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron.* 16:89-101.
- Deisseroth, K., E.K. Heist, et R.W. Tsien. 1998. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature.* 392:198-202.
- Deisseroth, K., P.G. Mermelstein, H. Xia, et R.W. Tsien. 2003. Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* 13:354-65.
- Desai, B.N., et D.E. Clapham. 2005. TRP channels and mice deficient in TRP channels. *Pflugers Arch.* 451:11-8.
- Deshpande, D.A., S. Dogan, T.F. Walseth, S.M. Miller, Y. Amrani, R.A. Panettieri, et M.S. Kannan. 2004. Modulation of calcium signaling by interleukin-13 in human airway smooth muscle: role of CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31:36-42.
- Deshpande, D.A., T.A. White, S. Dogan, T.F. Walseth, R.A. Panettieri, et M.S. Kannan. 2005. CD38/cyclic ADP-ribose signaling: role in the regulation of calcium homeostasis in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288:L773-88.
- Dikic, I., G. Tokiwa, S. Lev, S.A. Courtneidge, et J. Schlessinger. 1996. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature.* 383:547-50.
- Divecha, N., S.G. Rhee, A.J. Letcher, et R.F. Irvine. 1993. Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: phosphoinositidase C isoform beta 1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. *Biochem J.* 289 ( Pt 3):617-20.
- Dogan, S., D.A. Deshpande, M.S. Kannan, et T.F. Walseth. 2004. Changes in CD38 expression and ADP-ribosyl cyclase activity in rat myometrium during pregnancy: influence of sex steroid hormones. *Biol Reprod.* 71:97-103.
- Dolmetsch, R.E., R.S. Lewis, C.C. Goodnow, et J.I. Healy. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature.* 386:855-8.

- Dolmetsch, R.E., U. Pajvani, K. Fife, J.M. Spotts, et M.E. Greenberg. 2001. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*. 294:333-9.
- Dolmetsch, R.E., K. Xu, et R.S. Lewis. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*. 392:933-6.
- Ebinu, J.O., D.A. Bottorff, E.Y. Chan, S.L. Stang, R.J. Dunn, et J.C. Stone. 1998. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science*. 280:1082-6.
- Echevarria, W., M.F. Leite, M.T. Guerra, W.R. Zipfel, et M.H. Nathanson. 2003. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol*. 5:440-6.
- Edelman, A.M., K.I. Mitchelhill, M.A. Selbert, K.A. Anderson, S.S. Hook, D. Stapleton, E.G. Goldstein, A.R. Means, et B.E. Kemp. 1996. Multiple Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase kinases from rat brain. Purification, regulation by Ca(2+)-calmodulin, and partial amino acid sequence. *J Biol Chem*. 271:10806-10.
- Erickson, E.S., O.L. Mooren, D. Moore-Nichols, et R.C. Dunn. 2004. Activation of ryanodine receptors in the nuclear envelope alters the conformation of the nuclear pore complex. *Biophys Chem*. 112:1-7.
- Etkin, A., J.M. Alarcon, S.P. Weisberg, K. Touzani, Y.Y. Huang, A. Nordheim, et E.R. Kandel. 2006. A role in learning for SRF: deletion in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. *Neuron*. 50:127-43.
- Farnsworth, C.L., N.W. Freshney, L.B. Rosen, A. Ghosh, M.E. Greenberg, et L.A. Feig. 1995. Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature*. 376:524-7.
- Fill, M., et J.A. Copello. 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev*. 82:893-922.
- Fill, M., A. Zahradnikova, C.A. Villalba-Galea, I. Zahradnik, A.L. Escobar, et S. Gyorke. 2000. Ryanodine receptor adaptation. *J Gen Physiol*. 116:873-82.
- Flanagan, W.M., B. Corthesy, R.J. Bram, et G.R. Crabtree. 1991. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature*. 352:803-7.
- Foskett, J.K., C. White, K.H. Cheung, et D.O. Mak. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Physiol Rev*. 87:593-658.
- Fossier, P., L. Tauc, et G. Baux. 1999. Calcium transients and neurotransmitter release at an identified synapse. *Trends Neurosci*. 22:161-6.
- Frangakis, M.V., T. Chatila, E.R. Wood, et N. Sahyoun. 1991. Expression of a neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, CaM kinase-Gr, in rat thymus. *J Biol Chem*. 266:17592-6.
- Galione, A., et G.C. Churchill. 2002. Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium*. 32:343-54.
- Galione, A., H.C. Lee, et W.B. Busa. 1991. Ca(2+)-induced Ca<sup>2+</sup> release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*. 253:1143-6.
- Galione, A., et O.H. Petersen. 2005. The NAADP Receptor: New Receptors or New Regulation? *Mol Interv*. 5:73-9.
- Galione, A., A. White, N. Willmott, M. Turner, B.V. Potter, et S.P. Watson. 1993. cGMP mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> in sea urchin eggs by stimulating cyclic ADP-ribose synthesis. *Nature*. 365:456-9.
- Gasser, A., S. Bruhn, et A.H. Guse. 2006. Second messenger function of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate revealed by an improved enzymatic cycling assay. *J Biol Chem*. 281:16906-13.
- Genazzani, A.A., et A. Galione. 1997. A Ca<sup>2+</sup> release mechanism gated by the novel pyridine nucleotide, NAADP. *Trends Pharmacol Sci*. 18:108-10.

- Genazzani, A.A., M. Mezna, D.M. Dickey, F. Michelangeli, T.F. Walseth, et A. Galione. 1997. Pharmacological properties of the Ca<sup>2+</sup>-release mechanism sensitive to NAADP in the sea urchin egg. *Br J Pharmacol.* 121:1489-95.
- Genoux, D., U. Haditsch, M. Knobloch, A. Michalon, D. Storm, et I.M. Mansuy. 2002. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature.* 418:970-5.
- Gerasimenko, J.V., Y. Maruyama, K. Yano, N.J. Dolman, A.V. Tepikin, O.H. Petersen, et O.V. Gerasimenko. 2003. NAADP mobilizes Ca<sup>2+</sup> from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol.* 163:271-82.
- Gerasimenko, J.V., M. Sherwood, A.V. Tepikin, O.H. Petersen, et O.V. Gerasimenko. 2006. NAADP, cADPR and IP<sub>3</sub> all release Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci.* 119:226-38.
- Gerasimenko, O.V., J.V. Gerasimenko, P.V. Belan, et O.H. Petersen. 1996. Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell.* 84:473-80.
- Gerasimenko, O.V., J.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, et O.H. Petersen. 1995. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from the nuclear envelope. *Cell.* 80:439-44.
- Ghirardi, M., P.G. Montarolo, et E.R. Kandel. 1995. A novel intermediate stage in the transition between short- and long-term facilitation in the sensory to motor neuron synapse of aplysia. *Neuron.* 14:413-20.
- Gilabert, J.A., D. Bakowski, et A.B. Parekh. 2001. Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx. *Embo J.* 20:2672-9.
- Gilabert, J.A., et A.B. Parekh. 2000. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC). *Embo J.* 19:6401-7.
- Gobeil, F., Jr., T. Zhu, S. Brault, A. Geha, A. Vazquez-Tello, A. Fortier, D. Barbaz, D. Checchin, X. Hou, M. Nader, G. Bkaily, J.P. Gratton, N. Heveker, A. Ribeiro-da-Silva, K. Peri, H. Bard, A. Chorvatova, P. D'Orleans-Juste, E.J. Goetzl, et S. Chemtob. 2006. Nitric oxide signaling via nuclearized endothelial nitric-oxide synthase modulates expression of the immediate early genes iNOS and mPGES-1. *J Biol Chem.* 281:16058-67.
- Goldberg, J., A.C. Nairn, et J. Kuriyan. 1996. Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Cell.* 84:875-87.
- Gomez-Villafuertes, R., B. Torres, J. Barrio, M. Savignac, N. Gabellini, F. Rizzato, B. Pintado, A. Gutierrez-Adan, B. Mellstrom, E. Carafoli, et J.R. Naranjo. 2005. Downstream regulatory element antagonist modulator regulates Ca<sup>2+</sup> homeostasis and viability in cerebellar neurons. *J Neurosci.* 25:10822-30.
- Goodrich, S.P., H. Muller-Steffner, A. Osman, M.J. Moutin, K. Kusser, A. Roberts, D.L. Woodland, T.D. Randall, E. Kellenberger, P.T. LoVerde, F. Schuber, et F.E. Lund. 2005. Production of calcium-mobilizing metabolites by a novel member of the ADP-ribosyl cyclase family expressed in *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry.* 44:11082-97.
- Graef, I.A., F. Wang, F. Charron, L. Chen, J. Neilson, M. Tessier-Lavigne, et G.R. Crabtree. 2003. Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell.* 113:657-70.
- Graeff, R., Q. Liu, I.A. Kriksunov, Q. Hao, et H.C. Lee. 2006. Acidic residues at the active sites of CD38 and ADP-ribosyl cyclase determine nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthesis and hydrolysis activities. *J Biol Chem.* 281:28951-7.

- Graeff, R.M., L. Franco, A. De Flora, et H.C. Lee. 1998. Cyclic GMP-dependent and -independent effects on the synthesis of the calcium messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem.* 273:118-25.
- Greber, U.F., et L. Gerace. 1992. Nuclear protein import is inhibited by an antibody to a luminal epitope of a nuclear pore complex glycoprotein. *J Cell Biol.* 116:15-30.
- Greber, U.F., et L. Gerace. 1995. Depletion of calcium from the lumen of endoplasmic reticulum reversibly inhibits passive diffusion and signal-mediated transport into the nucleus. *J Cell Biol.* 128:5-14.
- Grimm, C., R. Kraft, S. Sauerbruch, G. Schultz, et C. Harteneck. 2003. Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem.* 278:21493-501.
- Groth, R.D., et P.G. Mermelstein. 2003. Brain-derived neurotrophic factor activation of NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-dependent transcription: a role for the transcription factor NFATc4 in neurotrophin-mediated gene expression. *J Neurosci.* 23:8125-34.
- Guerrini, L., F. Blasi, et S. Denis-Donini. 1995. Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9077-81.
- Gyorke, S., et M. Fill. 1993. Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca(2+)-induced Ca2+ release in heart. *Science.* 260:807-9.
- Hajnoczky, G., R. Hager, et A.P. Thomas. 1999. Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca2+. *J Biol Chem.* 274:14157-62.
- Hall, D.D., M.A. Davare, M. Shi, M.L. Allen, M. Weisenhaus, G.S. McKnight, et J.W. Hell. 2007. Critical role of cAMP-dependent protein kinase anchoring to the L-type calcium channel Cav1.2 via A-kinase anchor protein 150 in neurons. *Biochemistry.* 46:1635-46.
- Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, et F.J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.
- Hammond, P.I., T.A. Craig, R. Kumar, et S. Brimijoin. 2003. Regional and cellular distribution of DREAM in adult rat brain consistent with multiple sensory processing roles. *Brain Res Mol Brain Res.* 111:104-10.
- Han, B., et C.D. Logsdon. 2000. CCK stimulates mob-1 expression and NF-kappaB activation via protein kinase C and intracellular Ca(2+). *Am J Physiol Cell Physiol.* 278:C344-51.
- Hanson, M.G., et L.T. Landmesser. 2003. Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci.* 23:587-600.
- Hanson, P.I., T. Meyer, L. Stryer, et H. Schulman. 1994. Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron.* 12:943-56.
- Hara, Y., M. Wakamori, M. Ishii, E. Maeno, M. Nishida, T. Yoshida, H. Yamada, S. Shimizu, E. Mori, J. Kudoh, N. Shimizu, H. Kurose, Y. Okada, K. Imoto, et Y. Mori. 2002. LTRPC2 Ca2+-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell.* 9:163-73.
- Hardie, R.C. 2004. Regulation of Drosophila TRP channels by lipid messengers. *Novartis Found Symp.* 258:160-7; discussion 167-71, 263-6.

- Hardingham, G.E., F.J. Arnold, et H. Bading. 2001a. A calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication. *Nat Neurosci.* 4:565-6.
- Hardingham, G.E., F.J. Arnold, et H. Bading. 2001b. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci.* 4:261-7.
- Hardingham, G.E., S. Chawla, F.H. Cruzalegui, et H. Bading. 1999. Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels. *Neuron.* 22:789-98.
- Hardingham, G.E., S. Chawla, C.M. Johnson, et H. Bading. 1997. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature.* 385:260-5.
- Hardingham, G.E., Y. Fukunaga, et H. Bading. 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci.* 5:405-14.
- Heidemann, A.C., C.G. Schipke, et H. Kettenmann. 2005. Extracellular application of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate induces Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes in situ. *J Biol Chem.* 280:35630-40.
- Heist, E.K., M. Srinivasan, et H. Schulman. 1998. Phosphorylation at the nuclear localization signal of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II blocks its nuclear targeting. *J Biol Chem.* 273:19763-71.
- Hennager, D.J., M.J. Welsh, et S. DeLisle. 1995. Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1,4,5- trisphosphate levels can control nuclear Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem.* 270:4959-62.
- Herlitze, S., M. Xie, J. Han, A. Hummer, K.V. Melnik-Martinez, R.L. Moreno, et M.D. Mark. 2003. Targeting mechanisms of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Bioenerg Biomembr.* 35:621-37.
- Hernandez-Guijo, J.M., V.E. Maneu-Flores, A. Ruiz-Nuno, M. Villarroya, A.G. Garcia, et L. Gandia. 2001. Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca<sup>2+</sup> channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J Neurosci.* 21:2553-60.
- Hirata, Y., N. Kimura, K. Sato, Y. Ohsugi, S. Takasawa, H. Okamoto, J. Ishikawa, T. Kaisho, K. Ishihara, et T. Hirano. 1994. ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1. *FEBS Lett.* 356:244-8.
- Hohenegger, M., J. Suko, R. Gscheidlinger, H. Drobny, et A. Zidar. 2002. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem J.* 367:423-31.
- Hoth, M., D.C. Button, et R.S. Lewis. 2000. Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10607-12.
- Hu, S.C., J. Chrivia, et A. Ghosh. 1999. Regulation of CBP-mediated transcription by neuronal calcium signaling. *Neuron.* 22:799-808.
- Hudmon, A., et H. Schulman. 2002. Neuronal CA<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem.* 71:473-510.
- Humbert, J.P., N. Matter, J.C. Artault, P. Koppler, et A.N. Malviya. 1996. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J Biol Chem.* 271:478-85.
- Hussain, A.M., H.C. Lee, et C.F. Chang. 1998. Functional expression of secreted mouse BST-1 in yeast. *Protein Expr Purif.* 12:133-7.

- Ichikawa, T., S. Sekihara, S. Ohsako, Y. Hirata, et T. Yamauchi. 1992. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in the rat cerebellum: an immunohistochemical study with monoclonal antibodies specific to either alpha or beta subunit. *J Chem Neuroanat.* 5:383-90.
- Ishii, K., K. Hirose, et M. Iino. 2006. Ca<sup>2+</sup> shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca<sup>2+</sup> oscillations. *EMBO Rep.* 7:390-6.
- Ivanov, A., C. Pellegrino, S. Rama, I. Dumalska, Y. Salyha, Y. Ben-Ari, et I. Medina. 2006. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol.* 572:789-98.
- Jang, M.K., Y.H. Goo, Y.C. Sohn, Y.S. Kim, S.K. Lee, H. Kang, J. Cheong, et J.W. Lee. 2001. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV stimulates nuclear factor-kappa B transactivation via phosphorylation of the p65 subunit. *J Biol Chem.* 276:20005-10.
- Jefferson, K.K., M.F. Smith, Jr., et D.A. Bobak. 1999. Roles of intracellular calcium and NF-kappa B in the Clostridium difficile toxin A-induced up-regulation and secretion of IL-8 from human monocytes. *J Immunol.* 163:5183-91.
- Jensen, K.F., C.A. Ohmstede, R.S. Fisher, et N. Sahyoun. 1991. Nuclear and axonal localization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase type Gr in rat cerebellar cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:2850-3.
- Jin, D., H.X. Liu, H. Hirai, T. Torashima, T. Nagai, O. Lopatina, N.A. Shnayder, K. Yamada, M. Noda, T. Seike, K. Fujita, S. Takasawa, S. Yokoyama, K. Koizumi, Y. Shiraishi, S. Tanaka, M. Hashii, T. Yoshihara, K. Higashida, M.S. Islam, N. Yamada, K. Hayashi, N. Noguchi, I. Kato, H. Okamoto, A. Matsushima, A. Salmina, T. Munesue, N. Shimizu, S. Mochida, M. Asano, et H. Higashida. 2007. CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. *Nature.* 446:41-5.
- Jin, I., et R.D. Hawkins. 2003. Presynaptic and postsynaptic mechanisms of a novel form of homosynaptic potentiation at aplysia sensory-motor neuron synapses. *J Neurosci.* 23:7288-97.
- Johnson, C.M., C.S. Hill, S. Chawla, R. Treisman, et H. Bading. 1997. Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *J Neurosci.* 17:6189-202.
- Johnson, J.D., et S. Mislser. 2002. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate-sensitive calcium stores initiate insulin signaling in human beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14566-71.
- Jouaville, L.S., F. Ichas, E.L. Holmuhamedov, P. Camacho, et J.D. Lechleiter. 1995. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature.* 377:438-41.
- Kaltschmidt, B., D. Ndiaye, M. Korte, S. Pothion, L. Arbibe, M. Prullage, J. Pfeiffer, A. Lindecke, V. Staiger, A. Israel, C. Kaltschmidt, et S. Memet. 2006. NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol.* 26:2936-46.
- Kaltschmidt, C., B. Kaltschmidt, H. Neumann, H. Wekerle, et P.A. Baeuerle. 1994. Constitutive NF-kappa B activity in neurons. *Mol Cell Biol.* 14:3981-92.
- Kanaseki, T., Y. Ikeuchi, H. Sugiura, et T. Yamauchi. 1991. Structural features of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II revealed by electron microscopy. *J Cell Biol.* 115:1049-60.
- Kang, B.N., K.G. Tirumurugan, D.A. Deshpande, Y. Amrani, R.A. Panettieri, T.F. Walseth, et M.S. Kannan. 2006. Transcriptional regulation of CD38 expression by tumor

- necrosis factor-alpha in human airway smooth muscle cells: role of NF-kappaB and sensitivity to glucocorticoids. *Faseb J.* 20:1000-2.
- Kasri, N.N., A.M. Holmes, G. Bultynck, J.B. Parys, M.D. Bootman, K. Rietdorf, L. Missiaen, F. McDonald, H. De Smedt, S.J. Conway, A.B. Holmes, M.J. Berridge, et H.L. Roderick. 2004. Regulation of InsP3 receptor activity by neuronal Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Embo J.* 23:312-21.
- Kato, I., Y. Yamamoto, M. Fujimura, N. Noguchi, S. Takasawa, et H. Okamoto. 1999. CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, and insulin secretion. *J Biol Chem.* 274:1869-72.
- Khoo, K.M., M.K. Han, J.B. Park, S.W. Chae, U.H. Kim, H.C. Lee, B.H. Bay, et C.F. Chang. 2000. Localization of the cyclic ADP-ribose-dependent calcium signaling pathway in hepatocyte nucleus. *J Biol Chem.* 275:24807-17.
- King, M.M., C.Y. Huang, P.B. Chock, A.C. Nairn, H.C. Hemmings, Jr., K.F. Chan, et P. Greengard. 1984. Mammalian brain phosphoproteins as substrates for calcineurin. *J Biol Chem.* 259:8080-3.
- Kinney, N.P., F.X. Boittin, J.M. Thomas, A. Galione, et A.M. Evans. 2004. Lysosome-sarcoplasmic reticulum junctions. A trigger zone for calcium signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and endothelin-1. *J Biol Chem.* 279:54319-26.
- Klee, C.B., H. Ren, et X. Wang. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* 273:13367-70.
- Klein, M., J. Camardo, et E.R. Kandel. 1982. Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:5713-7.
- Knoll, B., O. Kretz, C. Fiedler, S. Alberti, G. Schutz, M. Frotscher, et A. Nordheim. 2006. Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nat Neurosci.* 9:195-204.
- Kolodziej, S.J., A. Hudmon, M.N. Waxham, et J.K. Stoops. 2000. Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase IIalpha and truncated CaM kinase IIalpha reveal a unique organization for its structural core and functional domains. *J Biol Chem.* 275:14354-9.
- Komeili, A., et E.K. O'Shea. 2001. New perspectives on nuclear transport. *Annu Rev Genet.* 35:341-64.
- Kornhauser, J.M., C.W. Cowan, A.J. Shaywitz, R.E. Dolmetsch, E.C. Griffith, L.S. Hu, C. Haddad, Z. Xia, et M.E. Greenberg. 2002. CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron.* 34:221-33.
- Korte, M., L. Minichiello, R. Klein, et T. Bonhoeffer. 2000. Shc-binding site in the TrkB receptor is not required for hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology.* 39:717-24.
- Kraft, R., et C. Harteneck. 2005. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch.* 451:204-11.
- Kramer, D., L. Fresu, D.S. Ashby, T.C. Freeman, et A.A. Genazzani. 2003. Calcineurin controls the expression of numerous genes in cerebellar granule cells. *Mol Cell Neurosci.* 23:325-30.
- Krushel, L.A., B.A. Cunningham, G.M. Edelman, et K.L. Crossin. 1999. NF-kappaB activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes. *J Biol Chem.* 274:2432-9.
- Kukimoto, I., S. Hoshino, K. Kontani, K. Inageda, H. Nishina, K. Takahashi, et T. Katada. 1996. Stimulation of ADP-ribosyl cyclase activity of the cell surface antigen CD38 by zinc ions resulting from inhibition of its NAD<sup>+</sup> glycohydrolase activity. *Eur J Biochem.* 239:177-82.

- Kuno, T., H. Mukai, A. Ito, C.D. Chang, K. Kishima, N. Saito, et C. Tanaka. 1992. Distinct cellular expression of calcineurin A alpha and A beta in rat brain. *J Neurochem.* 58:1643-51.
- Kwok, R.P., J.R. Lundblad, J.C. Chrivia, J.P. Richards, H.P. Bachinger, R.G. Brennan, S.G. Roberts, M.R. Green, et R.H. Goodman. 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature.* 370:223-6.
- Langhorst, M.F., N. Schwarzmann, et A.H. Guse. 2004. Ca<sup>2+</sup> release via ryanodine receptors and Ca<sup>2+</sup> entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in T-lymphocytes. *Cell Signal.* 16:1283-9.
- Lanini, L., O. Bachs, et E. Carafoli. 1992. The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 267:11548-52.
- LaPlante, J.M., J. Falardeau, M. Sun, M. Kanazirska, E.M. Brown, S.A. Slaugenhaupt, et P.M. Vassilev. 2002. Identification and characterization of the single channel function of human mucolipin-1 implicated in mucopolipidosis type IV, a disorder affecting the lysosomal pathway. *FEBS Lett.* 532:183-7.
- LaPlante, J.M., C.P. Ye, S.J. Quinn, E. Goldin, E.M. Brown, S.A. Slaugenhaupt, et P.M. Vassilev. 2004. Functional links between mucolipin-1 and Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane trafficking in mucopolipidosis IV. *Biochem Biophys Res Commun.* 322:1384-91.
- Ledo, F., A.M. Carrion, W.A. Link, B. Mellstrom, et J.R. Naranjo. 2000. DREAM-alphaCREM interaction via leucine-charged domains derepresses downstream regulatory element-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 20:9120-6.
- Ledo, F., L. Kremer, B. Mellstrom, et J.R. Naranjo. 2002. Ca<sup>2+</sup>-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM. *Embo J.* 21:4583-92.
- Lee, H.C. 2000. NAADP: An emerging calcium signaling molecule. *J Membr Biol.* 173:1-8.
- Lee, H.C. 2001. Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:317-45.
- Lee, H.C. 2005. NAADP-mediated calcium signaling. *J Biol Chem.*
- Lee, H.C., et R. Aarhus. 1995. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem.* 270:2152-7.
- Lee, H.C., R. Aarhus, et D. Levitt. 1994. The crystal structure of cyclic ADP-ribose. *Nat Struct Biol.* 1:143-4.
- Lee, H.C., T.F. Walseth, G.T. Bratt, R.N. Hayes, et D.L. Clapper. 1989. Structural determination of a cyclic metabolite of NAD<sup>+</sup> with intracellular Ca<sup>2+</sup>-mobilizing activity. *J Biol Chem.* 264:1608-15.
- Lee, M., et J. Park. 2006. Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression. *Mol Cells.* 22:1-7.
- Lee, M.A., R.C. Dunn, D.E. Clapham, et L. Stehno-Bittel. 1998. Calcium regulation of nuclear pore permeability. *Cell Calcium.* 23:91-101.
- Lee, M.G., X. Xu, W. Zeng, J. Diaz, R.J. Wojcikiewicz, T.H. Kuo, F. Wuytack, L. Racymaekers, et S. Muallem. 1997. Polarized expression of Ca<sup>2+</sup> channels in pancreatic and salivary gland cells. Correlation with initiation and propagation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> waves. *J Biol Chem.* 272:15765-70.
- Leite, M.F., J.A. Dranoff, L. Gao, et M.H. Nathanson. 1999. Expression and subcellular localization of the ryanodine receptor in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J.* 337 ( Pt 2):305-9.
- Leite, M.F., E.C. Thrower, W. Echevarria, P. Koulen, K. Hirata, A.M. Bennett, B.E. Ehrlich, et M.H. Nathanson. 2003. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2975-80.

- Lemrow, S.M., K.A. Anderson, J.D. Joseph, T.J. Ribar, P.K. Noeldner, et A.R. Means. 2004. Catalytic activity is required for calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV to enter the nucleus. *J Biol Chem.* 279:11664-71.
- Lev, S., H. Moreno, R. Martinez, P. Canoll, E. Peles, J.M. Musacchio, G.D. Plowman, B. Rudy, et J. Schlessinger. 1995. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature.* 376:737-45.
- Li, Q., A.C. Roberts, et D.L. Glanzman. 2005. Synaptic facilitation and behavioral dishabituation in *Aplysia*: dependence on release of Ca<sup>2+</sup> from postsynaptic intracellular stores, postsynaptic exocytosis, and modulation of postsynaptic AMPA receptor efficacy. *J Neurosci.* 25:5623-37.
- Li, W., J. Llopis, M. Whitney, G. Zlokarnik, et R.Y. Tsien. 1998. Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca<sup>2+</sup> spike frequency can optimize gene expression. *Nature.* 392:936-41.
- Lilienbaum, A., et A. Israel. 2003. From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. *Mol Cell Biol.* 23:2680-98.
- Lilliehook, C., S. Chan, E.K. Choi, N.F. Zaidi, W. Wasco, M.P. Mattson, et J.D. Buxbaum. 2002. Calsenilin enhances apoptosis by altering endoplasmic reticulum calcium signaling. *Mol Cell Neurosci.* 19:552-9.
- Lim, D., K. Kyojuka, G. Gragnaniello, E. Carafoli, et L. Santella. 2001. NAADP<sup>+</sup> initiates the Ca<sup>2+</sup> response during fertilization of starfish oocytes. *Faseb J.* 15:2257-67.
- Lin, C.R., M.S. Kapiloff, S. Durgerian, K. Tatemoto, A.F. Russo, P. Hanson, H. Schulman, et M.G. Rosenfeld. 1987. Molecular cloning of a brain-specific calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:5962-6.
- Liou, J., M.L. Kim, W.D. Heo, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E. Ferrell, Jr., et T. Meyer. 2005. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol.* 15:1235-41.
- Lobaton, C.D., L. Vay, E. Hernandez-Sanmiguel, J. Santodomingo, A. Moreno, M. Montero, et J. Alvarez. 2005. Modulation of mitochondrial Ca(2+) uptake by estrogen receptor agonists and antagonists. *Br J Pharmacol.* 145:862-71.
- Lui, P.P., F.L. Chan, Y.K. Suen, T.T. Kwok, et S.K. Kong. 2003. The nucleus of HeLa cells contains tubular structures for Ca<sup>2+</sup> signaling with the involvement of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 308:826-33.
- Lui, P.P., S.K. Kong, K.P. Fung, et C.Y. Lee. 1998a. The rise of nuclear and cytosolic Ca<sup>2+</sup> can be uncoupled in HeLa cells. *Pflugers Arch.* 436:371-6.
- Lui, P.P., S.K. Kong, T.T. Kwok, et C.Y. Lee. 1998b. The nucleus of HeLa cell contains tubular structures for Ca<sup>2+</sup> signalling. *Biochem Biophys Res Commun.* 247:88-93.
- Lukyanenko, V., et S. Gyorke. 1999. Ca<sup>2+</sup> sparks and Ca<sup>2+</sup> waves in saponin-permeabilized rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 521 Pt 3:575-85.
- Ma, J., et Z. Pan. 2003. Junctional membrane structure and store operated calcium entry in muscle cells. *Front Biosci.* 8:d242-55.
- Macian, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 5:472-84.
- Malli, R., M. Frieden, K. Osibow, et W.F. Graier. 2003a. Mitochondria efficiently buffer subplasmalemmal Ca<sup>2+</sup> elevation during agonist stimulation. *J Biol Chem.* 278:10807-15.
- Malli, R., M. Frieden, K. Osibow, C. Zoratti, M. Mayer, N. Demaurex, et W.F. Graier. 2003b. Sustained Ca<sup>2+</sup> transfer across mitochondria is Essential for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> buffering, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and Ca<sup>2+</sup> store refilling. *J Biol Chem.* 278:44769-79.

- Malli, R., M. Frieden, M. Trenker, et W.F. Graier. 2005. The role of mitochondria for Ca<sup>2+</sup> refilling of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 280:12114-22.
- Mallone, R., E. Ortolan, S. Pinach, M. Volante, M.M. Zanone, G. Bruno, G. Baj, T. Lohmann, P. Cavallo-Perin, et F. Malavasi. 2002. Anti-CD38 autoantibodies: characterisation in new-onset type I diabetes and latent autoimmune diabetes of the adult (LADA) and comparison with other islet autoantibodies. *Diabetologia.* 45:1667-77.
- Malviya, A.N., et C. Klein. 2006. Mechanism regulating nuclear calcium signaling. *Can J Physiol Pharmacol.* 84:403-22.
- Malviya, A.N., P. Rogue, et G. Vincendon. 1990. Stereospecific inositol 1,4,5-[<sup>32</sup>P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:9270-4.
- Malviya, A.N., et P.J. Rogue. 1998. "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell.* 92:17-23.
- Mandi, M., B. Toth, G. Timar, et J. Bak. 2006. Ca<sup>2+</sup> release triggered by NAADP in hepatocyte microsomes. *Biochem J.* 395:233-8.
- Mao, L., Q. Tang, S. Samdani, Z. Liu, et J.Q. Wang. 2004. Regulation of MAPK/ERK phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons. *Eur J Neurosci.* 19:1207-16.
- Marchenko, S.M., V.V. Yarotsky, T.N. Kovalenko, P.G. Kostyuk, et R.C. Thomas. 2005. Spontaneously active and InsP<sub>3</sub>-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *J Physiol.* 565:897-910.
- Marius, P., M.T. Guerra, M.H. Nathanson, B.E. Ehrlich, et M.F. Leite. 2006. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 39:65-73.
- Masgrau, R., G.C. Churchill, A.J. Morgan, S.J. Ashcroft, et A. Galione. 2003. NAADP: a new second messenger for glucose-induced Ca<sup>2+</sup> responses in clonal pancreatic beta cells. *Curr Biol.* 13:247-51.
- Mattson, M.P., C. Culmsee, Z. Yu, et S. Camandola. 2000. Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem.* 74:443-56.
- May, M.J., et S. Ghosh. 1999. I kappa B kinases: kinsmen with different crafts. *Science.* 284:271-3.
- Mayford, M., J. Wang, E.R. Kandel, et T.J. O'Dell. 1995. CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell.* 81:891-904.
- McGuinness, T.L., Y. Lai, et P. Greengard. 1985. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. Isozymic forms from rat forebrain and cerebellum. *J Biol Chem.* 260:1696-704.
- McKemy, D.D., W.M. Neuhauser, et D. Julius. 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature.* 416:52-8.
- Meffert, M.K., et D. Baltimore. 2005. Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci.* 28:37-43.
- Meffert, M.K., J.M. Chang, B.J. Wiltgen, M.S. Fanselow, et D. Baltimore. 2003. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci.* 6:1072-8.
- Meissner, G. 1994. Ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol.* 56:485-508.
- Mellstrom, B., et J.R. Naranjo. 2001. Ca<sup>2+</sup>-dependent transcriptional repression and derepression: DREAM, a direct effector. *Semin Cell Dev Biol.* 12:59-63.
- Memet, S. 2006. NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol.* 72:1180-95.

- Menteyne, A., A. Burdakov, G. Charpentier, O.H. Petersen, et J.M. Cancela. 2006. Generation of specific Ca<sup>2+</sup> signals from Ca<sup>2+</sup> stores and endocytosis by differential coupling to messengers. *Curr Biol*. 16:1931-7.
- Meyer, T., P.I. Hanson, L. Stryer, et H. Schulman. 1992. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science*. 256:1199-202.
- Mignen, O., J.L. Thompson, D.I. Yule, et T.J. Shuttleworth. 2005. Agonist activation of arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup>-selective (ARC) channels in murine parotid and pancreatic acinar cells. *J Physiol*. 564:791-801.
- Miller, S.G., et M.B. Kennedy. 1985. Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. *J Biol Chem*. 260:9039-46.
- Minichiello, L., A.M. Calella, D.L. Medina, T. Bonhoeffer, R. Klein, et M. Korte. 2002. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*. 36:121-37.
- Miranti, C.K., D.D. Ginty, G. Huang, T. Chatila, et M.E. Greenberg. 1995. Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase. *Mol Cell Biol*. 15:3672-84.
- Misra, R.P., A. Bonni, C.K. Miranti, V.M. Rivera, M. Sheng, et M.E. Greenberg. 1994. L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *J Biol Chem*. 269:25483-93.
- Missiaen, L., K. Van Acker, K. Van Baelen, L. Raeymaekers, F. Wuytack, J.B. Parys, H. De Smedt, J. Vanoevelen, L. Dode, R. Rizzuto, et G. Callewaert. 2004. Calcium release from the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments. *Cell Calcium*. 36:479-87.
- Mitchell, K.J., F.A. Lai, et G.A. Rutter. 2003. Ryanodine receptor type I and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate receptors mediate Ca<sup>2+</sup> release from insulin-containing vesicles in living pancreatic beta-cells (MIN6). *J Biol Chem*. 278:11057-64.
- Mitchell, K.J., P. Pinton, A. Varadi, C. Tacchetti, E.K. Ainscow, T. Pozzan, R. Rizzuto, et G.A. Rutter. 2001. Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic Ca<sup>2+</sup> store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimera. *J Cell Biol*. 155:41-51.
- Miyamoto, E. 2006. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci*. 100:433-42.
- Miyano, O., I. Kameshita, et H. Fujisawa. 1992. Purification and characterization of a brain-specific multifunctional calmodulin-dependent protein kinase from rat cerebellum. *J Biol Chem*. 267:1198-203.
- Mizuguchi, M., N. Otsuka, M. Sato, Y. Ishii, S. Kon, M. Yamada, H. Nishina, T. Katada, et K. Ikeda. 1995. Neuronal localization of CD38 antigen in the human brain. *Brain Res*. 697:235-40.
- Moccia, F., R.A. Billington, et L. Santella. 2006. Pharmacological characterization of NAADP-induced Ca<sup>2+</sup> signals in starfish oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 348:329-36.
- Moccia, F., D. Lim, G.A. Nusco, E. Ercolano, et L. Santella. 2003. NAADP activates a Ca<sup>2+</sup> current that is dependent on F-actin cytoskeleton. *Faseb J*. 17:1907-9.
- Mojzisova, A., O. Krizanova, L. Zacikova, V. Kominkova, et K. Ondrias. 2001. Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart. *Pflugers Arch*. 441:674-7.

- Montarolo, P.G., P. Goelet, V.F. Castellucci, J. Morgan, E.R. Kandel, et S. Schacher. 1986. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science*. 234:1249-54.
- Montell, C. 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*. 2005:re3.
- Montero, M., C.D. Lobaton, E. Hernandez-Sanmiguel, J. Santodomingo, L. Vay, A. Moreno, et J. Alvarez. 2004. Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids. *Biochem J*. 384:19-24.
- Montero, M., C.D. Lobaton, A. Moreno, et J. Alvarez. 2002. A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190. *Faseb J*. 16:1955-7.
- Montminy, M.R., et L.M. Bilezikjian. 1987. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*. 328:175-8.
- Montminy, M.R., K.A. Sevarino, J.A. Wagner, G. Mandel, et R.H. Goodman. 1986. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:6682-6.
- Morita, K., S. Kitayama, et T. Dohi. 1997. Stimulation of cyclic ADP-ribose synthesis by acetylcholine and its role in catecholamine release in bovine adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*. 272:21002-9.
- Mothet, J.P., P. Fossier, F.M. Meunier, J. Stinnakre, L. Tauc, et G. Baux. 1998. Cyclic ADP-ribose and calcium-induced calcium release regulate neurotransmitter release at a cholinergic synapse of *Aplysia*. *J Physiol*. 507 ( Pt 2):405-14.
- Mukherji, S., et T.R. Soderling. 1994. Regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by inter- and intrasubunit-catalyzed autophosphorylations. *J Biol Chem*. 269:13744-7.
- Munshi, C.B., R. Graeff, et H.C. Lee. 2002. Evidence for a causal role of CD38 expression in granulocytic differentiation of human HL-60 cells. *J Biol Chem*. 277:49453-8.
- Munton, R.P., S. Vizi, et I.M. Mansuy. 2004. The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett*. 567:121-8.
- Nairn, A.C., et P. Greengard. 1987. Purification and characterization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I from bovine brain. *J Biol Chem*. 262:7273-81.
- Nakamura, Y., S. Okuno, F. Sato, et H. Fujisawa. 1995. An immunohistochemical study of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV in the rat central nervous system: light and electron microscopic observations. *Neuroscience*. 68:181-94.
- Nakazawa, H., et T.H. Murphy. 1999. Activation of nuclear calcium dynamics by synaptic stimulation in cultured cortical neurons. *J Neurochem*. 73:1075-83.
- Nathanson, M.H., M.B. Fallon, P.J. Padfield, et A.R. Maranto. 1994. Localization of the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the Ca<sup>2+</sup> wave trigger zone of pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*. 269:4693-6.
- Nicotera, P., D.J. McConkey, D.P. Jones, et S. Orrenius. 1989. ATP stimulates Ca<sup>2+</sup> uptake and increases the free Ca<sup>2+</sup> concentration in isolated rat liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:453-7.
- Nicotera, P., S. Orrenius, T. Nilsson, et P.O. Berggren. 1990. An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool in liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:6858-62.
- Nilius, B., J. Prenen, G. Droogmans, T. Voets, R. Vennekens, M. Freichel, U. Wissenbach, et V. Flockerzi. 2003. Voltage dependence of the Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem*. 278:30813-20.
- Nishimura, H., H. Sakagami, A. Uezu, K. Fukunaga, M. Watanabe, et H. Kondo. 2003. Cloning, characterization and expression of two alternatively splicing isoforms of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I gamma in the rat brain. *J Neurochem*. 85:1216-27.

- Noguchi, N., S. Takasawa, K. Nata, A. Tohgo, I. Kato, F. Ikehata, H. Yonekura, et H. Okamoto. 1997. Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release Ca<sup>2+</sup> from islet microsomes. *J Biol Chem.* 272:3133-6.
- Norman, C., M. Runswick, R. Pollock, et R. Treisman. 1988. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell.* 55:989-1003.
- O'Callaghan, D.W., et R.D. Burgoyne. 2003. Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins. *Biochem Soc Trans.* 31:963-5.
- O'Callaghan, D.W., L.P. Haynes, et R.D. Burgoyne. 2005. High-affinity interaction of the N-terminal myristoylation motif of the neuronal calcium sensor protein hippocalcin with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochem J.* 391:231-8.
- O'Callaghan, D.W., L. Ivings, J.L. Weiss, M.C. Ashby, A.V. Tepikin, et R.D. Burgoyne. 2002. Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a determinant of spatio-temporal aspects of Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *J Biol Chem.* 277:14227-37.
- O'Donovan, M.J. 1999. The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 9:94-104.
- O'Neill, L.A., et C. Kaltschmidt. 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 20:252-8.
- Okamoto, H., S. Takasawa, A. Tohgo, K. Nata, I. Kato, et N. Noguchi. 1997. Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38: inhibition of hydrolysis by ATP and physiological significance. *Methods Enzymol.* 280:306-18.
- Orlova, E.V., Serysheva, II, M. van Heel, S.L. Hamilton, et W. Chiu. 1996. Two structural configurations of the skeletal muscle calcium release channel. *Nat Struct Biol.* 3:547-52.
- Pahl, H.L., et P.A. Baeuerle. 1996. Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett.* 392:129-36.
- Pante, N., et U. Aebi. 1996. Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 31:153-99.
- Paredes, D., A.C. Granholm, et P.C. Bickford. 2007. Effects of NGF and BDNF on baseline glutamate and dopamine release in the hippocampal formation of the adult rat. *Brain Res.* 1141:56-64.
- Parekh, A.B., et J.W. Putney, Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 85:757-810.
- Park, M.K., M.C. Ashby, G. Erdemli, O.H. Petersen, et A.V. Tepikin. 2001. Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *Embo J.* 20:1863-74.
- Parker, D., U.S. Jhala, I. Radhakrishnan, M.B. Yaffe, C. Reyes, A.I. Shulman, L.C. Cantley, P.E. Wright, et M. Montminy. 1998. Analysis of an activator:coactivator complex reveals an essential role for secondary structure in transcriptional activation. *Mol Cell.* 2:353-9.
- Parker, I., J. Choi, et Y. Yao. 1996. Elementary events of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> liberation in *Xenopus* oocytes: hot spots, puffs and blips. *Cell Calcium.* 20:105-21.
- Partida-Sanchez, S., D.A. Cockayne, S. Monard, E.L. Jacobson, N. Oppenheimer, B. Garvy, K. Kusser, S. Goodrich, M. Howard, A. Harmsen, T.D. Randall, et F.E. Lund. 2001. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med.* 7:1209-16.

- Partida-Sanchez, S., S. Goodrich, K. Kusser, N. Oppenheimer, T.D. Randall, et F.E. Lund. 2004. Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity*. 20:279-91.
- Patel, S., G.C. Churchill, et A. Galione. 2000a. Unique kinetics of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) binding enhance the sensitivity of NAADP receptors for their ligand. *Biochem J*. 352 Pt 3:725-9.
- Patel, S., G.C. Churchill, et A. Galione. 2001. Coordination of Ca<sup>2+</sup> signalling by NAADP. *Trends Biochem Sci*. 26:482-9.
- Patel, S., G.C. Churchill, T. Sharp, et A. Galione. 2000b. Widespread distribution of binding sites for the novel Ca<sup>2+</sup>-mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, in the brain. *J Biol Chem*. 275:36495-7.
- Pauly, N., M.R. Knight, P. Thuleau, A. Graziana, S. Muto, R. Ranjeva, et C. Mazars. 2001. The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium*. 30:413-21.
- Pauly, N., M.R. Knight, P. Thuleau, A.H. van der Luit, M. Moreau, A.J. Trewavas, R. Ranjeva, et C. Mazars. 2000. Control of free calcium in plant cell nuclei. *Nature*. 405:754-5.
- Peier, A.M., A. Moqrich, A.C. Hergarden, A.J. Reeve, D.A. Andersson, G.M. Story, T.J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan, et A. Patapoutian. 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. 108:705-15.
- Perez-Terzic, C., A.M. Gacy, R. Bortolon, P.P. Dzeja, M. Puceat, M. Jaconi, F.G. Prendergast, et A. Terzic. 1999. Structural plasticity of the cardiac nuclear pore complex in response to regulators of nuclear import. *Circ Res*. 84:1292-301.
- Perez-Terzic, C., J. Pyle, M. Jaconi, L. Stehno-Bittel, et D.E. Clapham. 1996. Conformational states of the nuclear pore complex induced by depletion of nuclear Ca<sup>2+</sup> stores. *Science*. 273:1875-7.
- Perez-Terzic, C.M., E.N. Chini, S.S. Shen, T.P. Dousa, et D.E. Clapham. 1995. Ca<sup>2+</sup> release triggered by nicotinate adenine dinucleotide phosphate in intact sea urchin eggs. *Biochem J*. 312 ( Pt 3):955-9.
- Perraud, A.L., A. Fleig, C.A. Dunn, L.A. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A.J. Stokes, Q. Zhu, M.J. Bessman, R. Penner, J.P. Kinet, et A.M. Scharenberg. 2001. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*. 411:595-9.
- Perraud, A.L., B. Shen, C.A. Dunn, K. Rippe, M.K. Smith, M.J. Bessman, B.L. Stoddard, et A.M. Scharenberg. 2003. NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem*. 278:1794-801.
- Pessah, I.N., et I. Zimanyi. 1991. Characterization of multiple [<sup>3</sup>H]ryanodine binding sites on the Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal and cardiac muscle: evidence for a sequential mechanism in ryanodine action. *Mol Pharmacol*. 39:679-89.
- Petersen, O.H., O.V. Gerasimenko, J.V. Gerasimenko, H. Mogami, et A.V. Tepikin. 1998. The calcium store in the nuclear envelope. *Cell Calcium*. 23:87-90.
- Picciotto, M.R., M. Zoli, G. Bertuzzi, et A.C. Nairn. 1995. Immunochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Synapse*. 20:75-84.
- Pinton, P., T. Pozzan, et R. Rizzuto. 1998. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *Embo J*. 17:5298-308.
- Pizarro, G., N. Shirokova, A. Tsugorka, et E. Rios. 1997. 'Quantal' calcium release operated by membrane voltage in frog skeletal muscle. *J Physiol*. 501 ( Pt 2):289-303.

- Podesta, M., F. Benvenuto, A. Pitto, O. Figari, A. Bacigalupo, S. Bruzzone, L. Guida, L. Franco, L. Paleari, N. Bodrato, C. Usai, A. De Flora, et E. Zocchi. 2005. Concentrative uptake of cyclic ADP-ribose generated by BST-1+ stroma stimulates proliferation of human hematopoietic progenitors. *J Biol Chem.* 280:5343-9.
- Quintana, A.R., D. Wang, J.E. Forbes, et M.N. Waxham. 2005. Kinetics of calmodulin binding to calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun.* 334:674-80.
- Reber, B.F., et B. Schindelholz. 1996. Detection of a trigger zone of bradykinin-induced fast calcium waves in PC12 neurites. *Pflugers Arch.* 432:893-903.
- Reyes-Harde, M., R. Empson, B.V. Potter, A. Galione, et P.K. Stanton. 1999a. Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in long-term synaptic depression in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4061-6.
- Reyes-Harde, M., B.V. Potter, A. Galione, et P.K. Stanton. 1999b. Induction of hippocampal LTD requires nitric-oxide-stimulated PKG activity and Ca<sup>2+</sup> release from cyclic ADP-ribose-sensitive stores. *J Neurophysiol.* 82:1569-76.
- Rhodes, K.J., K.I. Carroll, M.A. Sung, L.C. Doliveira, M.M. Monaghan, S.L. Burke, B.W. Strassle, L. Buchwalder, M. Menegola, J. Cao, W.F. An, et J.S. Trimmer. 2004. KChIPs and Kv4 alpha subunits as integral components of A-type potassium channels in mammalian brain. *J Neurosci.* 24:7903-15.
- Rios, E., et G. Pizarro. 1991. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol Rev.* 71:849-908.
- Rivera, V.M., C.K. Miranti, R.P. Misra, D.D. Ginty, R.H. Chen, J. Blenis, et M.E. Greenberg. 1993. A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol.* 13:6260-73.
- Rizzuto, R., M.R. Duchen, et T. Pozzan. 2004. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca<sup>2+</sup> liaison. *Sci STKE.* 2004:re1.
- Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F.S. Fay, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft, et T. Pozzan. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science.* 280:1763-6.
- Rizzuto, R., et T. Pozzan. 2006. Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* 86:369-408.
- Roberts, A.C., et D.L. Glanzman. 2003. Learning in Aplysia: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends Neurosci.* 26:662-70.
- Roos, J., P.J. DiGregorio, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J.A. Kozak, S.L. Wagner, M.D. Cahalan, G. Velicelebi, et K.A. Stauderman. 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol.* 169:435-45.
- Rosen, L.B., D.D. Ginty, M.J. Weber, et M.E. Greenberg. 1994. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron.* 12:1207-21.
- Rossi, D., et V. Sorrentino. 2002. Molecular genetics of ryanodine receptors Ca<sup>2+</sup>-release channels. *Cell Calcium.* 32:307-19.
- Rusakov, D.A. 2006. Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms of presynaptic control at central synapses. *Neuroscientist.* 12:317-26.
- Sakagami, H., A. Kamata, H. Nishimura, J. Kasahara, Y. Owada, Y. Takeuchi, M. Watanabe, K. Fukunaga, et H. Kondo. 2005. Prominent expression and activity-dependent nuclear translocation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase Idelta in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 22:2697-707.
- Sakurai, H., H. Chiba, H. Miyoshi, T. Sugita, et W. Toriumi. 1999. IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem.* 274:30353-6.

- Salanova, M., G. Priori, V. Barone, E. Intravaia, B. Flucher, F. Ciruela, R.A. McIlhinney, J.B. Parys, K. Mikoshiba, et V. Sorrentino. 2002. Homer proteins and InsP(3) receptors co-localise in the longitudinal sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibres. *Cell Calcium*. 32:193-200.
- Sanchez, J.A., M.C. Garcia, V.K. Sharma, K.C. Young, M.A. Matlib, et S.S. Sheu. 2001. Mitochondria regulate inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat heart. *J Physiol*. 536:387-96.
- Sano, Y., K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, H. Yokoi, H. Matsushime, et K. Furuichi. 2001. Immunocyte Ca<sup>2+</sup> influx system mediated by LTRPC2. *Science*. 293:1327-30.
- Santella, L., et E. Carafoli. 1997. Calcium signaling in the cell nucleus. *Faseb J*. 11:1091-109.
- Santella, L., et K. Kyojuka. 1997. Effects of 1-methyladenine on nuclear Ca<sup>2+</sup> transients and meiosis resumption in starfish oocytes are mimicked by the nuclear injection of inositol 1,4,5-trisphosphate and cADP-ribose. *Cell Calcium*. 22:11-20.
- Santella, L., K. Kyojuka, A.A. Genazzani, L. De Riso, et E. Carafoli. 2000. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-induced Ca(2+) release. Interactions among distinct Ca(2+) mobilizing mechanisms in starfish oocytes. *J Biol Chem*. 275:8301-6.
- Savignac, M., B. Mellstrom, et J.R. Naranjo. 2007. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch*. 454:523-33.
- Schuber, F., et F.E. Lund. 2004. Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med*. 4:249-61.
- Selbert, M.A., K.A. Anderson, Q.H. Huang, E.G. Goldstein, A.R. Means, et A.M. Edelman. 1995. Phosphorylation and activation of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase IV by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase Ia kinase. Phosphorylation of threonine 196 is essential for activation. *J Biol Chem*. 270:17616-21.
- Shen, T., Z. Cseresnyes, Y. Liu, W.R. Randall, et M.F. Schneider. 2007. Regulation of the nuclear export of the transcription factor NFATc1 by protein kinases after slow fibre type electrical stimulation of adult mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol*. 579:535-51.
- Sheng, M., M.A. Thompson, et M.E. Greenberg. 1991. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*. 252:1427-30.
- Shirakawa, H., et S. Miyazaki. 1996. Spatiotemporal analysis of calcium dynamics in the nucleus of hamster oocytes. *J Physiol*. 494 ( Pt 1):29-40.
- Shubinsky, G., et M. Schlesinger. 1997. The CD38 lymphocyte differentiation marker: new insight into its ectoenzymatic activity and its role as a signal transducer. *Immunity*. 7:315-24.
- Shuttleworth, T.J., J.L. Thompson, et O. Mignen. 2004. ARC channels: a novel pathway for receptor-activated calcium entry. *Physiology (Bethesda)*. 19:355-61.
- Simpson, C.S., et B.J. Morris. 1999. Activation of nuclear factor kappaB by nitric oxide in rat striatal neurones: differential inhibition of the p50 and p65 subunits by dexamethasone. *J Neurochem*. 73:353-61.
- Singaravelu, K., et J.W. Deitmer. 2006. Calcium mobilization by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) in rat astrocytes. *Cell Calcium*. 39:143-53.
- Sitsapasan, R., et A.J. Williams. 1997. Regulation of current flow through ryanodine receptors by luminal Ca<sup>2+</sup>. *J Membr Biol*. 159:179-85.
- Smith, K.E., E.S. Gibson, et M.L. Dell'Acqua. 2006. cAMP-dependent protein kinase postsynaptic localization regulated by NMDA receptor activation through translocation of an A-kinase anchoring protein scaffold protein. *J Neurosci*. 26:2391-402.

- Soares, S., M. Thompson, T. White, A. Isbell, M. Yamasaki, Y. Prakash, F.E. Lund, A. Galione, et E.N. Chini. 2007. NAADP as a second messenger: neither CD38 nor base-exchange reaction are necessary for in vivo generation of NAADP in myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292:C227-39.
- Spilker, C., T. Dresbach, et K.H. Braunewell. 2002. Reversible translocation and activity-dependent localization of the calcium-myristoyl switch protein VILIP-1 to different membrane compartments in living hippocampal neurons. *J Neurosci*. 22:7331-9.
- Srinivasan, M., C.F. Edman, et H. Schulman. 1994. Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol*. 126:839-52.
- Stedman, D.R., N.V. Uboha, T.T. Stedman, A.C. Nairn, et M.R. Picciotto. 2004. Cytoplasmic localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I-alpha depends on a nuclear export signal in its regulatory domain. *FEBS Lett*. 566:275-80.
- Stehno-Bittel, L., A. Luckhoff, et D.E. Clapham. 1995a. Calcium release from the nucleus by InsP3 receptor channels. *Neuron*. 14:163-7.
- Stehno-Bittel, L., C. Perez-Terzic, et D.E. Clapham. 1995b. Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear Ca<sup>2+</sup> store. *Science*. 270:1835-8.
- Stemmer, P.M., et C.B. Klee. 1994. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry*. 33:6859-66.
- Sternfeld, L., E. Krause, A.H. Guse, et I. Schulz. 2003. Hormonal control of ADP-ribosyl cyclase activity in pancreatic acinar cells from rats. *J Biol Chem*. 278:33629-36.
- Stewart, A.A., T.S. Ingebritsen, A. Manalan, C.B. Klee, et P. Cohen. 1982. Discovery of a Ca<sup>2+</sup>- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80). *FEBS Lett*. 137:80-4.
- Sun, P., H. Enslin, P.S. Myung, et R.A. Maurer. 1994. Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev*. 8:2527-39.
- Sutton, K.G., J.E. McRory, H. Guthrie, T.H. Murphy, et T.P. Snutch. 1999. P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature*. 401:800-4.
- Sutton, M.A., et T.J. Carew. 2000. Parallel molecular pathways mediate expression of distinct forms of intermediate-term facilitation at tail sensory-motor synapses in *Aplysia*. *Neuron*. 26:219-31.
- Szegedi, C., S. Sarkozi, A. Herzog, I. Jona, et M. Varsanyi. 1999. Calsequestrin: more than 'only' a luminal Ca<sup>2+</sup> buffer inside the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J*. 337 ( Pt 1):19-22.
- Takahashi, J., Y. Kagaya, I. Kato, J. Ohta, S. Isoyama, M. Miura, Y. Sugai, M. Hirose, Y. Wakayama, M. Ninomiya, J. Watanabe, S. Takasawa, H. Okamoto, et K. Shirato. 2003. Deficit of CD38/cyclic ADP-ribose is differentially compensated in hearts by gender. *Biochem Biophys Res Commun*. 312:434-40.
- Tang, J., Y. Lin, Z. Zhang, S. Tikunova, L. Birnbaumer, et M.X. Zhu. 2001. Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem*. 276:21303-10.
- Tao, J., E. Shumay, S. McLaughlin, H.Y. Wang, et C.C. Malbon. 2006. Regulation of AKAP-membrane interactions by calcium. *J Biol Chem*. 281:23932-44.
- Tao, X., S. Finkbeiner, D.B. Arnold, A.J. Shaywitz, et M.E. Greenberg. 1998. Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*. 20:709-26.
- Tapia, J.C., G.Z. Mentis, R. Navarrete, F. Nualart, E. Figueroa, A. Sanchez, et L.G. Aguayo. 2001. Early expression of glycine and GABA(A) receptors in developing spinal cord neurons. Effects on neurite outgrowth. *Neuroscience*. 108:493-506.

- Thrower, E.C., H. Mobasher, S. Dargan, P. Marius, E.J. Lea, et A.P. Dawson. 2000. Interaction of luminal calcium and cytosolic ATP in the control of type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor channels. *J Biol Chem.* 275:36049-55.
- Tinel, H., J.M. Cancela, H. Mogami, J.V. Gerasimenko, O.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, et O.H. Petersen. 1999. Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals. *Embo J.* 18:4999-5008.
- Tobimatsu, T., et H. Fujisawa. 1989. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem.* 264:17907-12.
- Tohgo, A., H. Munakata, S. Takasawa, K. Nata, T. Akiyama, N. Hayashi, et H. Okamoto. 1997. Lysine 129 of CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) participates in the binding of ATP to inhibit the cyclic ADP-ribose hydrolase. *J Biol Chem.* 272:3879-82.
- Tokumitsu, H., D.A. Brickey, J. Glod, H. Hidaka, J. Sikela, et T.R. Soderling. 1994. Activation mechanisms for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV. Identification of a brain CaM-kinase IV kinase. *J Biol Chem.* 269:28640-7.
- Tokumitsu, H., et T.R. Soderling. 1996. Requirements for calcium and calmodulin in the calmodulin kinase activation cascade. *J Biol Chem.* 271:5617-22.
- Tomida, T., K. Hirose, A. Takizawa, F. Shibasaki, et M. Iino. 2003. NFAT functions as a working memory of Ca<sup>2+</sup> signals in decoding Ca<sup>2+</sup> oscillation. *Embo J.* 22:3825-32.
- Vanden Abeele, F., L. Lemonnier, S. Thebault, G. Lepage, J.B. Parys, Y. Shuba, R. Skryma, et N. Prevarskaya. 2004. Two types of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem.* 279:30326-37.
- Villalobos, C., L. Nunez, M. Montero, A.G. Garcia, M.T. Alonso, P. Chamero, J. Alvarez, et J. Garcia-Sancho. 2002. Redistribution of Ca<sup>2+</sup> among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *Faseb J.* 16:343-53.
- Walseth, T.F., R. Aarhus, J.A. Kerr, et H.C. Lee. 1993. Identification of cyclic ADP-ribose-binding proteins by photoaffinity labeling. *J Biol Chem.* 268:26686-91.
- Wang, D., et A.S. Baldwin, Jr. 1998. Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem.* 273:29411-6.
- Wang, J.Q., E.E. Fibuch, et L. Mao. 2007. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem.* 100:1-11.
- Ward, C.W., W. Feng, J. Tu, I.N. Pessah, P.K. Worley, et M.F. Schneider. 2004. Homer protein increases activation of Ca<sup>2+</sup> sparks in permeabilized skeletal muscle. *J Biol Chem.* 279:5781-7.
- Wes, P.D., J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten, et C. Montell. 1995. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9652-6.
- West, A.E., W.G. Chen, M.B. Dalva, R.E. Dolmetsch, J.M. Kornhauser, A.J. Shaywitz, M.A. Takasu, X. Tao, et M.E. Greenberg. 2001. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11024-31.
- White, T.A., T.F. Walseth, et M.S. Kannan. 2002. Nitric oxide inhibits ADP-ribosyl cyclase through a cGMP-independent pathway in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283:L1065-71.
- Willmott, N., J.K. Sethi, T.F. Walseth, H.C. Lee, A.M. White, et A. Galione. 1996. Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J Biol Chem.* 271:3699-705.

- Wilson, H.L., et A. Galione. 1998. Differential regulation of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate and cADP-ribose production by cAMP and cGMP. *Biochem J.* 331 ( Pt 3):837-43.
- Wolfe, S.A., P. Zhou, V. Dotsch, L. Chen, A. You, S.N. Ho, G.R. Crabtree, G. Wagner, et G.L. Verdine. 1997. Unusual Rel-like architecture in the DNA-binding domain of the transcription factor NFATc. *Nature.* 385:172-6.
- Wooten, M.W. 1999. Function for NF- $\kappa$ B in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C. *J Neurosci Res.* 58:607-11.
- Wu, G.Y., K. Deisseroth, et R.W. Tsien. 2001. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:2808-13.
- Wu, H., A. Peisley, I.A. Graef, et G.R. Crabtree. 2007. NFAT signaling and the invention of vertebrates. *Trends Cell Biol.* 17:251-60.
- Wu, X., et C.T. McMurray. 2001. Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein. *J Biol Chem.* 276:1735-41.
- Xia, Z., et D.R. Storm. 2005. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 6:267-76.
- Xie, G.H., S.Y. Rah, S.J. Kim, T.S. Nam, K.C. Ha, S.W. Chae, M.J. Im, et U.H. Kim. 2005. ADP-ribosyl cyclase couples to cyclic AMP signaling in the cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 330:1290-8.
- Xiong, T.C., A. Jauneau, R. Ranjeva, et C. Mazars. 2004. Isolated plant nuclei as mechanical and thermal sensors involved in calcium signalling. *Plant J.* 40:12-21.
- Yamada, M., M. Mizuguchi, N. Otsuka, K. Ikeda, et H. Takahashi. 1997. Ultrastructural localization of CD38 immunoreactivity in rat brain. *Brain Res.* 756:52-60.
- Yamasaki, M., R. Masgrau, A.J. Morgan, G.C. Churchill, S. Patel, S.J. Ashcroft, et A. Galione. 2004. Organelle selection determines agonist-specific Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic acinar and beta cells. *J Biol Chem.* 279:7234-40.
- Yamasaki, M., J.M. Thomas, G.C. Churchill, C. Garnham, A.M. Lewis, J.M. Cancela, S. Patel, et A. Galione. 2005. Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca<sup>2+</sup> spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr Biol.* 15:874-8.
- Yamauchi, T. 2005. Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bull.* 28:1342-54.
- Yang, J., S. McBride, D.O. Mak, N. Vardi, K. Palczewski, F. Haeseleer, et J.K. Foskett. 2002. Identification of a family of calcium sensors as protein ligands of inositol trisphosphate receptor Ca(2+) release channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7711-6.
- Yao, Y., J. Choi, et I. Parker. 1995. Quantal puffs of intracellular Ca<sup>2+</sup> evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 482 ( Pt 3):533-53.
- Yi, J.H., S.W. Park, R. Kapadia, et R. Vemuganti. 2007. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochem Int.* 50:1014-27.
- Young, G.S., E. Choleris, F.E. Lund, et J.B. Kirkland. 2006. Decreased cADPR and increased NAD<sup>+</sup> in the Cd38<sup>-/-</sup> mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 346:188-92.
- Yu, J.Z., D.X. Zhang, A.P. Zou, W.B. Campbell, et P.L. Li. 2000. Nitric oxide inhibits Ca(2+) mobilization through cADP-ribose signaling in coronary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279:H873-81.

- Yu, Z., D. Zhou, A.J. Bruce-Keller, M.S. Kindy, et M.P. Mattson. 1999. Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. *J Neurosci.* 19:8856-65.
- Zhang, F., et P.L. Li. 2007. Reconstitution and characterization of an NAADP-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channel from liver lysosomes of rats. *J Biol Chem.*
- Zhang, L., C. Franzini-Armstrong, V. Ramesh, et L.R. Jones. 2001. Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J Mol Cell Cardiol.* 33:233-47.
- Zhang, S.L., Y. Yu, J. Roos, J.A. Kozak, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, K.A. Stauderman, et M.D. Cahalan. 2005. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature.* 437:902-5.
- Zocchi, E., C. Usai, L. Guida, L. Franco, S. Bruzzone, M. Passalacqua, et A. De Flora. 1999. Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization: role of NAD<sup>+</sup> transport across cell membranes. *Faseb J.* 13:273-83.

## **ROLE DU NAADP ET DE SON ENZYME DE SYNTHÈSE, L'ADP RIBOSYL CYCLASE, DANS LES NEURONES : LA REGULATION DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE NUCLEAIRE.**

Le calcium est un second messenger impliqué dans la plupart des fonctions neuronales et possède un rôle particulièrement important dans la régulation de l'expression génique. Pour activer l'expression de certains gènes, une augmentation de la concentration calcique au sein du noyau est essentielle. L'augmentation du calcium intracellulaire dépend entre autre, de la mobilisation du calcium contenu dans les stocks intracellulaires par des seconds messagers comme l'IP<sub>3</sub>, le cADPR et le NAADP, plus récemment découvert. Au cours de ma thèse, j'ai montré que dans les neurones d'aplysies, l'Aplysia ADP ribosyl cyclase, l'enzyme de synthèse du cADPR et du NAADP migrait dans le noyau suite à la dépolarisation et à l'entrée de calcium par les canaux voltage dépendants de type L. De plus, grâce à la microscopie confocale et l'utilisation de sondes calciques fluorescentes, nous avons observé sur des noyaux de neurones isolés, que les seconds messagers étaient capables de mobiliser le calcium contenu dans l'enveloppe nucléaire pour générer des oscillations calciques nucléoplasmiques. Nos données pharmacologiques montrent que le NAADP active un récepteur qui lui est propre et que ce dernier coopère avec les RyRs et IP<sub>3</sub>R pour générer ces signaux. Finalement, afin d'explorer les rôles du NAADP dans la physiologie du neurone entier, j'ai mis au point un modèle de neurones spinaux embryonnaire de souris. Les résultats préliminaires nous permettent de poser de nouvelles hypothèses concernant l'implication du NAADP dans certaines grandes fonctions neuronales régulées par les neurotrophines.

**Mots clés:** calcium, neurones, noyau, oscillations, NAADP, IP<sub>3</sub>, cADPR, ADP ribosyl cyclase.

## **ROLE OF NAADP AND ITS SYNTHESIZING ENZYME, ADP RIBOSYL CYCLASE, IN NEURONS: REGULATION OF NUCLEAR CALCIUM HOMEOSTASIS.**

Calcium is a second messenger, implicated in the regulation of many neuronal functions and has a particularly important role in regulating gene expression. In some cases, gene activation requires nucleoplasmic calcium elevation. In cells, calcium rise can results of calcium mobilization from intracellular stores by second messengers like IP<sub>3</sub>, cADPR or NAADP, which has been more recently discovered. During my PhD, I show that in neurons, Aplysia ADP ribosyl cyclase, the enzyme synthesizing cADPR and NAADP, can translocate to the nucleus following depolarization and calcium entry through L type calcium channels. Moreover, by using confocal microscopy and calcium fluorescent dyes, we observed in isolated neuronal nuclei that second messengers were able to mobilize calcium from the nuclear envelope in order to generate nucleoplasmic calcium oscillations. Our pharmacological data prove that NAADP activates its own receptor which cooperates with RyRs and IP<sub>3</sub>Rs to elicit these calcium signals. Finally, to explore the role of NAADP in the general neuronal physiology, I developed a new model of mouse embryonic spinal neurons. Our preliminary data enable us to put an assumption on the implication of NAADP in some important neuronal functions regulated by neurotrophins.

**Key words:** calcium, neurons, nucleus, oscillations, NAADP, IP<sub>3</sub>, cADPR, ADP ribosyl cyclase.