

Geneviève DUPONT*, Benjamin WACQUIER

Unité de Chronobiologie Théorique,
Service de Chimie Physique et de Biologie Théorique,
Université Libre de Bruxelles (ULB), CP 231,
Boulevard du Triomphe, 1050 Bruxelles,

*Email : Genevieve.Dupont@ulb.ac.be

Signalisation calcique et invasion bactérienne

Résumé

Dans la plupart des cellules vivantes, l'ion Ca^{2+} est utilisé comme un signal : en réponse à une stimulation externe, sa concentration augmente, ce qui induit une ou plusieurs réponses physiologiques. Loin d'être monotone dans le temps et dans l'espace, cette augmentation de Ca^{2+} se fait le plus souvent sous la forme d'oscillations répétées, chaque pic correspondant à la propagation d'une onde de Ca^{2+} dans la cellule. Observations expérimentales et modélisation ont permis de comprendre le mécanisme responsable de cette organisation. L'importance physiologique de ces oscillations et ondes est particulièrement frappante dans certains cas d'invasions bactériennes, où les bactéries modifient l'organisation spatio-temporelle de la dynamique calcique de la cellule hôte. Cette usurpation permet aux pathogènes d'utiliser le signal Ca^{2+} généré par la cellule envahie à leur propre profit, pour favoriser par exemple leur propre prolifération et dissémination.

Keywords

Calcium signalling, spatio-temporal organization in cell biology, *Shigella*

Abstract

In most living cells, Ca^{2+} ion is used as a signal : in response to an external stimulation, its concentration increases, which induces one or several physiological responses. This Ca^{2+} increase is not monotonous in time and space,

but rather occurs in the form of repetitive oscillations, each peak corresponding to the propagation of a Ca^{2+} wave within the cell. Experimental observations and modelling allowed the understanding of the mechanism responsible for this organisation. The physiological importance of these oscillations and waves is striking in some cases of bacterial invasion, when bacteria modify the spatio-temporal organisation of Ca^{2+} dynamics in host cells. This usurpation allows pathogens to use Ca^{2+} signals generated by the invaded cells to their own profit, to promote their proliferation and dissemination.

1. Introduction

Le corps humain contient environ 1300 g de calcium, dont ~99% sont stockés dans les os, ~0.1% se trouvent dans le fluide extracellulaire et ~1% à l'intérieur des cellules. Ces 13 g de Ca^{2+} intracellulaire jouent un rôle vital, car cet ion est l'un des messagers intracellulaires les plus importants. Il contrôle en effet une multitude de fonctions physiologiques. Par exemple, il est indispensable au processus d'excitation-contraction dans les cellules musculaires, et d'excitation-sécrétion dans les synapses des neurones. Il contrôle l'exocytose et le transport de fluides dans les cellules exocrines, la reprise du cycle cellulaire à la fécondation dans les ovocytes, ainsi que la régulation génétique, la différenciation ou le mouvement dans tous les types

cellulaires. Certains pathogènes usurpent même la signalisation calcique des cellules-hôtes à leur propre profit, par exemple pour favoriser leur propre prolifération et dissémination.

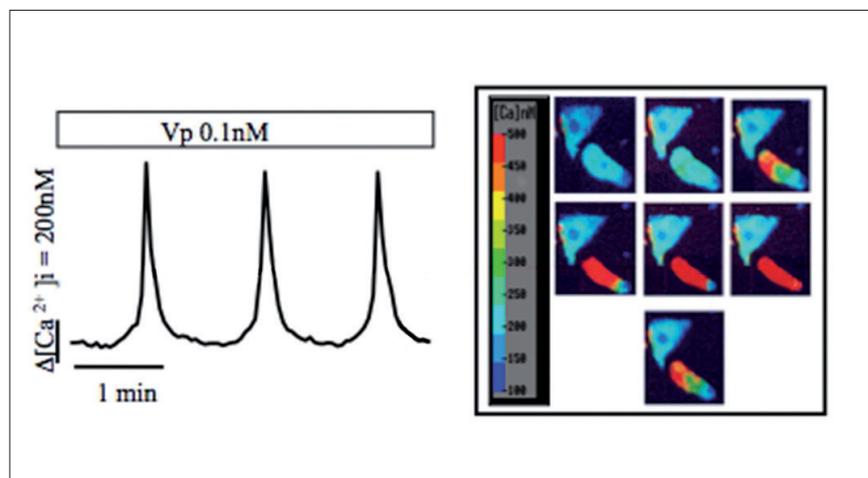
Afin d'utiliser le Ca^{2+} comme signal, les cellules maintiennent un gradient de concentration important entre le milieu extracellulaire ($\sim 1\text{mM}$) et le milieu intracellulaire ($\sim 0.1\mu\text{M}$). De même, des organites intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique et les lysosomes ont une concentration élevée en Ca^{2+} . Dès lors, n'importe quelle ouverture d'un canal Ca^{2+} , qu'il soit localisé dans la membrane plasmique ou dans la membrane d'un organite, provoque une augmentation rapide de la concentration en Ca^{2+} dans le cytoplasme de la cellule ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). Grâce à l'intensité élevée de ce gradient, l'ouverture ou la fermeture de quelques canaux calciques modifie considérablement et rapidement la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Mais cette flexibilité a un prix : le maintien de ce gradient nécessite une dépense constante d'énergie biochimique, sous la forme de l'hydrolyse d'ATP nécessaire à éliminer le Ca^{2+} du cytosol.

Le maintien d'une faible concentration en Ca^{2+} cytosolique est toutefois indispensable à la survie de la cellule. En effet, une concentration élevée et soutenue mènerait à la précipitation des phosphates, phénomène toxique pour la cellule. De plus, alors que des élévations temporaires de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ sont indispensables à la signalisation cellulaire, des concentrations élevées et prolongées participent à l'induction et l'exécution de l'apoptose, processus de mort programmée par lequel les cellules se détruisent elles-mêmes. A ce titre, le Ca^{2+} est souvent considéré comme un signal de « vie et mort » [1].

Dans la grande majorité des types cellulaires, la stimulation de la cellule par une hormone ou un neurotransmetteur induit donc des augmentations répétées et transitoires de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, dont un exemple dans des cellules de foie est donné dans la Fig. 1 [2]. Ces *oscillations de calcium* activent une réponse physiologique dont l'intensité est généralement proportionnelle à leur fréquence. De plus, chaque pic est organisé dans l'espace, puisqu'il correspond à la propagation d'une *onde de calcium*, se propageant dans la cellule à une vitesse de l'ordre de quelques dizaines de microns par seconde (Fig. 1). Cette organisation spatio-temporelle correspond à une structure dissipative pouvant se produire dans un système ouvert, loin de l'équilibre thermodynamique et soumis à des lois d'évolution suffisamment non-linéaires telles que celles qui décrivent les processus biochimiques et de transport à l'intérieur d'une cellule [3,4].

Avant de s'intéresser plus longuement aux mécanismes moléculaires permettant cette signalisation calcique finement régulée, on peut se demander pourquoi l'évolution a sélectionné précisément l'ion Ca^{2+} pour remplir ce rôle. Bien qu'il n'y ait évidemment pas de réponse défini-

Figure 1 : Oscillations et ondes de Ca^{2+} cytosolique dans des hépatocytes stimulées par de la vasopressine (Vp). Le panneau de gauche montre l'évolution temporelle de la concentration en Ca^{2+} cytosolique moyennée sur l'ensemble de la cellule. Le panneau de droite permet de voir la propagation spatiale d'un pic. A cette concentration de Vp, le Ca^{2+} augmente uniquement dans la cellule du bas. L'intervalle de temps entre deux images successives est de 0.8s, sauf pour la dernière image qui correspond à la situation 20s après l'avant-dernière image. On voit que le phénomène de propagation d'onde est périodique et que le site d'initiation reste le même. Données de L. Combettes [12]



tive à cette question, on peut émettre quelques hypothèses [5]. Les cations les plus abondants dans les organismes vivants sont ceux présents dans l'eau de mer, à savoir le Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} . Les cations monovalents sont moins bien adaptés comme signaux, car ils forment généralement des liaisons relativement peu stables avec les protéines. Dans cette optique, on comprend que le Na^+ et le K^+ soient utilisés par les neurones pour contrôler le potentiel membranaire, mais pas comme signaux chimiques en tant que tels. Reste donc la question des « avantages » du Ca^{2+} par rapport au Mg^{2+} . Une différence essentielle entre ces deux ions est leur rayon, plus important pour le Ca^{2+} . La structure électronique de ce dernier permet un nombre de coordination variable, ce qui n'est pas le cas pour le Mg^{2+} . Ces deux différences permettent au Ca^{2+} de fixer un plus grand nombre de substrats, et ce, de manière thermodynamiquement et cinétiquement plus favorable. Enfin, il est intéressant de mentionner que le Ca^{2+} a une forte affinité pour les groupements carboxylates, alors que le

Mg^{2+} a tendance à préférer les ligands azotés. Vu l'abondance de groupements carboxylates dans les cellules, cette différence pourrait également expliquer pourquoi l'évolution aurait favorisé l'utilisation du Ca^{2+} plutôt que du Mg^{2+} comme messenger biochimique [5].

2. Mécanisme responsable des oscillations et des ondes de Ca^{2+}

Dans les cellules électriquement non excitables, les oscillations de Ca^{2+} sont dues à un échange périodique de Ca^{2+} entre le cytosol et le réticulum endoplasmique (RE). Lorsque l'hormone stimulante se fixe sur son récepteur extracellulaire, elle active indirectement la synthèse d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3), une molécule soluble qui va à son tour se fixer sur un autre récepteur localisé dans la membrane du RE. Ce récepteur est en même temps un canal calcique, qui s'ouvre suite à la liaison d' IP_3 (Fig. 2). Puisque la concentration en Ca^{2+}

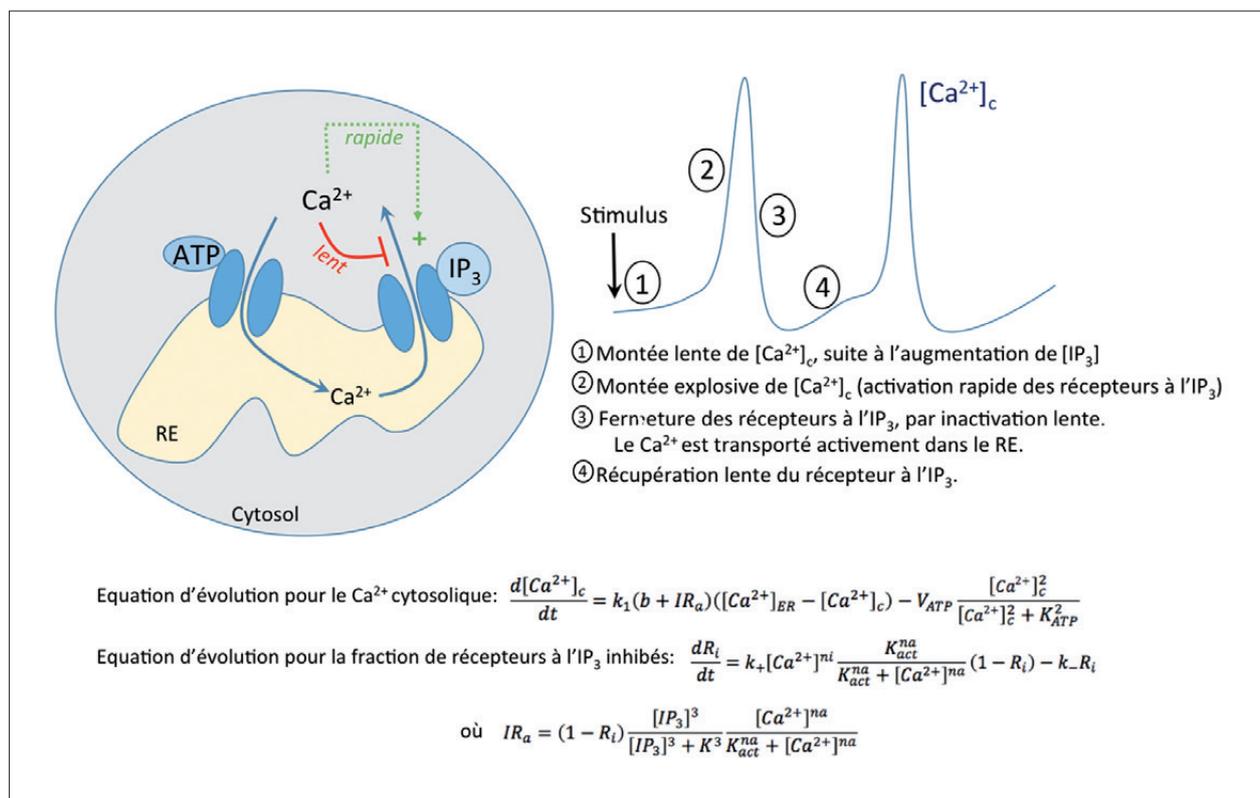


Figure 2 : Mécanisme moléculaire responsable des oscillations de Ca^{2+} . La rangée supérieure montre les phénomènes de transports et de régulations qui sont à la base des oscillations, ainsi que la séquence temporelle des différents processus. Le phénomène peut être décrit par des équations différentielles pour la concentration en Ca^{2+} cytosolique et la fraction de récepteurs à l' IP_3 /canaux calciques inhibés. L'intégration numérique de ces équations reproduit des oscillations telles que celles observées, pour des valeurs appropriées des paramètres cinétiques [6].

est bien plus élevée à l'intérieur de cet organe que dans le cytosol, la liaison d' IP_3 sur son récepteur induit une augmentation massive de Ca^{2+} dans le cytosol. De plus, l'activité de ce récepteur-canal est sensible à la concentration en Ca^{2+} dans le cytosol. De faibles concentrations l'activent, ce qui correspond à un processus autocatalytique permettant l'augmentation fulgurante de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ qui correspond à la phase ascendante du pic. Des concentrations élevées de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, de l'ordre de $1 \mu\text{M}$, ont cependant un effet inhibiteur sur ce récepteur-canal, qui se referme relativement lentement. L'activité des pompes de Ca^{2+} consommant de l'ATP permet alors le retour vers l'état basal de $[\text{Ca}^{2+}]_c$. A ce stade, le récepteur à l' IP_3 n'est plus inhibé, il peut se rouvrir et le cycle recommence. Des oscillations sont donc maintenues tant que le niveau d' IP_3 dans la cellule est suffisant. Ce mécanisme simple est très largement répandu, même si des régulations supplémentaires modulent spécifiquement ces oscillations dans les différents types cellulaires.

Ces processus de transports de Ca^{2+} et leurs régulations peuvent être décrits par deux équations différentielles décrivant les évolutions de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ et de la fraction de récepteurs à l' IP_3 inactifs (R_i), c'est-à-dire qui ont été inhibés par des concentrations élevées en Ca^{2+} . Les différents termes qui apparaissent dans ces équations prennent en compte les caractéristiques cinétiques et les décrivent selon les lois classiques de la cinétique enzymatique. Dans la description mathématique, on tient également compte des différentes échelles de temps caractérisant le phénomène. Au niveau de la dynamique de régulation du récepteur à l' IP_3 par exemple, les activations par l' IP_3 et le Ca^{2+} sont beaucoup plus rapides que l'inhibition par le Ca^{2+} . Dès lors, on peut considérer que les processus d'activation se mettent « instantanément » à l'équilibre, et décrire uniquement l'évolution de l'inhibition. Cette hypothèse très répandue – hypothèse de quasi-stationnarité – permet de remplacer les équations différentielles pour les variables les plus rapides par des équations algébriques, ce qui réduit le nombre d'équations différentielles et simpli-

fie donc considérablement l'étude du système. Les solutions des deux équations différentielles de la Fig. 2 reproduisent non seulement les oscillations de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ telles qu'elles sont observées, mais également leurs principales caractéristiques. Par exemple, la fréquence des oscillations simulées augmente bien avec la concentration en IP_3 , comme on l'observe expérimentalement [6].

Cette description du phénomène n'inclut pas les aspects spatiaux et ne permet donc pas d'appréhender les ondes de calcium. Toutefois, sans rentrer dans les détails, on peut comprendre celles-ci sur base des mêmes régulations que celles qui donnent naissance aux oscillations. L'augmentation de la concentration en IP_3 se produit souvent localement dans la cellule, là où se trouvent la majorité des récepteurs extracellulaires à l'hormone. De plus, la distribution des récepteurs à l' IP_3 est également polarisée. A cause de ces deux facteurs, le Ca^{2+} augmente souvent en priorité en un point particulier de la cellule. Le Ca^{2+} libéré localement du RE va ensuite diffuser vers des régions voisines, et, en synergie avec l' IP_3 , induire la libération de Ca^{2+} depuis le RE localisé dans des régions voisines. Ainsi, de proche en proche, le Ca^{2+} va être libéré dans toute la cellule, par un mécanisme de propagation active (Dupont et al., 2016). Ce mécanisme est nécessaire. En effet, comme le Ca^{2+} se lie avec une forte affinité à de très nombreuses molécules présentes dans la cellule, son coefficient de diffusion dans le cytosol est petit (environ 20 fois plus petit que dans l'eau). Cette diffusivité réduite exclut un mécanisme de propagation passive. Du point de vue de la modélisation, pour tenir compte des aspects spatiaux, il faut remplacer les équations différentielles ordinaires par des équations différentielles partielles, puisque les concentrations varient avec le temps et l'espace. La diffusion peut, en première approximation, être décrite par un terme de Fick. La valeur du coefficient de diffusion du Ca^{2+} dans le cytoplasme est de l'ordre de quelques dizaines de microns² par seconde [7].

3. Signalisation calcique et infection par la bactérie *Shigella*

Shigella est une bactérie qui envahit les cellules intestinales et induit une réponse inflammatoire importante, responsable de la destruction massive de l'épithélium intestinal. La shigellose est la maladie diarrhéique la plus répandue et la plus mortelle. En manipulant les composants du cytosquelette, les effecteurs bactériens de *Shigella* activent la polymérisation de l'actine et induisent une ondulation membranaire, initiant une séquence de processus aboutissant à la dissémination bactérienne. Il apparaît de plus en plus clairement que la signalisation calcique joue également un rôle clef dans cette pathogénèse, en affectant non seulement la réorganisation du cytosquelette, mais aussi l'expression enzymatique et l'apoptose. D'autres bactéries sont également connues pour provoquer une augmentation spécifique de la $[Ca^{2+}]_c$ dans les cellules qu'elles envahissent. C'est le cas par exemple de *Listeria monocytogenes*, d'*Helicobacter pylori* ou de *Campylobacter jejuni* [8].

Dans tous les cas mentionnés, les augmentations de Ca^{2+} induites par la bactérie reposent sur le même mécanisme que celui décrit plus haut, impliquant la libération de Ca^{2+} depuis le RE. Dans le cas de *Shigella*, il est bien établi que la synthèse d' IP_3 est induite par l'injection de l'effecteur bactérien de type III [9]. Les augmentations de Ca^{2+} peuvent être observées dès les premières minutes qui suivent l'injection des effecteurs bactériens dans la cellule-cible. En collaboration avec Guy Tran Van Nhieu (Collège de France, Paris) et Laurent Combettes (Université de Paris-Sud, Orsay), nous étudions les différents types de réponses calciques induites par la bactérie [10,11]. En particulier, nous essayons de comprendre par quel mécanisme les augmentations calciques restent le plus souvent localisées au site d'invasion bactérienne, alors qu'aucune barrière « physique » n'empêche la diffusion du Ca^{2+} dans le reste du cytoplasme de la cellule envahie. Un ensemble de résultats expérimentaux indiquent que trois facteurs participent à cette localisation de la réponse calcique au site d'invasion: une synthèse accrue d' IP_3 , un changement des proprié-

tés de diffusion, dû à la réorganisation du cytosquelette et une accumulation des récepteurs à l' IP_3 . Toutefois, les importances respectives de ces trois facteurs sont difficiles, sinon impossibles, à évaluer expérimentalement. La modélisation permet de répondre à cette question en faisant varier ces trois facteurs un à un. En effet, chacun correspond à un paramètre du modèle, pour lequel une valeur différente peut être assignée dans le cytosol et au site d'invasion. Le taux de synthèse d' IP_3 correspond à la vitesse maximale de la phospholipase C, enzyme responsable de l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol-4,5 diphosphate en IP_3 et diacyl-glycérol. L'estimation des coefficients de diffusion en cellules intactes est techniquement assez difficile. Celui de l' IP_3 a été évalué à environ $230 \mu m^2/s$ [7]. En utilisant la technique de FRAP, nos collaborateurs ont pu estimer que l'ATP diffuse ~ 1.6 fois moins vite au sein du site d'invasion que dans le reste du cytosol. Etant donné que l'ATP et l' IP_3 ont des poids moléculaires similaires, on peut estimer que les diminutions de diffusion d'ATP et d' IP_3 entre les deux régions de la cellule sont à peu près les mêmes. Il va de soi que la diffusion du calcium est également affectée, mais étant donné la faible diffusivité de cet ion dans la cellule, sa modification a peu d'impact. Enfin, la densité des récepteurs à l' IP_3 est directement incluse dans un paramètre du modèle représentant le flux maximal de Ca^{2+} à travers les récepteurs à l' IP_3 . Ce paramètre a été multiplié par trois au site d'invasion, en accord avec les observations. Comme illustré à la Fig. 3, la prise en compte de ces trois facteurs permet de reproduire le confinement (relatif) des réponses au site d'invasion. Les simulations indiquent également que la diffusion restreinte de l' IP_3 joue un rôle prépondérant dans la localisation des réponses calciques.

Une fois le modèle théorique établi, l'étude de son comportement permet à la fois de vérifier son accord avec des expériences effectuées dans différentes conditions et de faire des prédictions. Par exemple, le modèle a été validé par sa capacité à reproduire des observations faites sur des cellules infectées par une souche mutante de la bactérie. Chez ce mutant, l'appareil d'injec-

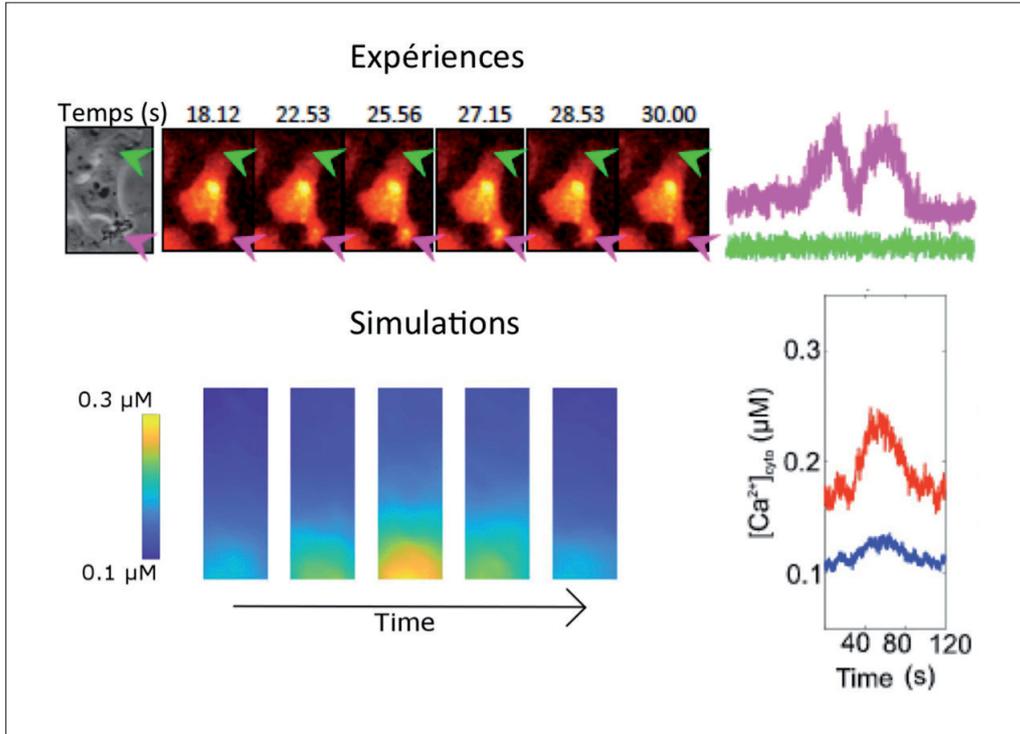


Figure 3 : Augmentations de Ca^{2+} localisées au site d'invasion lorsque *Shigella* envahit une cellule épithéliale. En haut, la concentration en Ca^{2+} augmente au site d'invasion (flèche rose) mais pas à l'autre extrémité de la cellule (flèche verte). En bas, simulations de la réponse calcique en tenant compte des spécificités observées du site d'invasion par rapport au reste de la cellule. Les panneaux de droite montrent l'évolution temporelle de la concentration en Ca^{2+} au site d'invasion (courbes rose et rouge) et à l'autre extrémité de la cellule (courbes verte et bleue), dans les expériences (haut) et dans les simulations (bas). Données expérimentales de G. Tran Van Nhieu et L. Combettes [10,11].

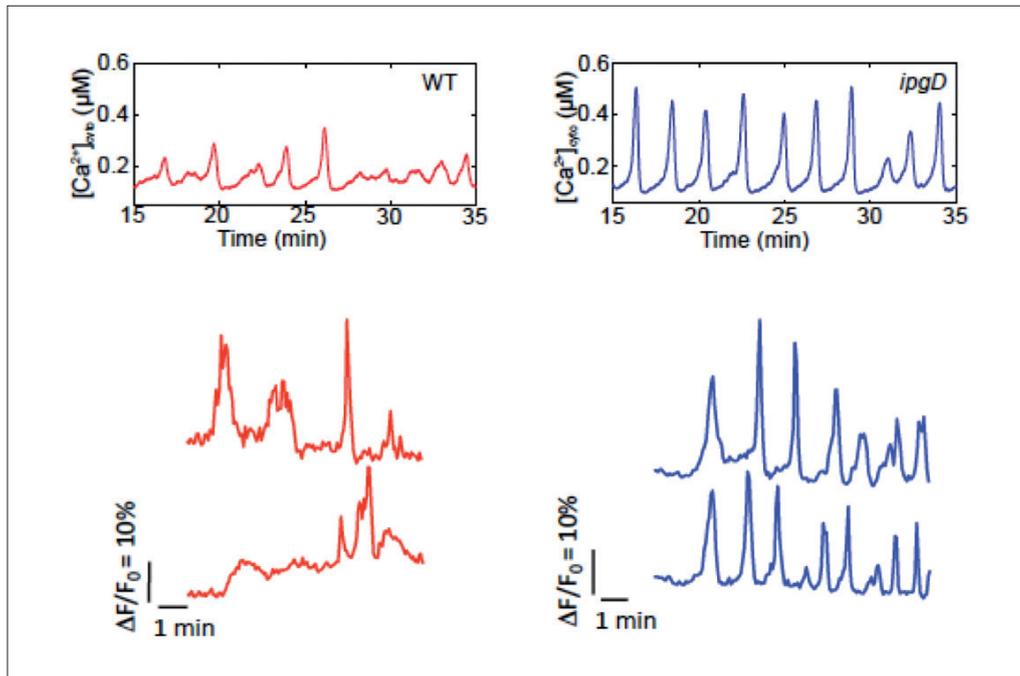


Figure 4 : Prédictions théoriques du caractère plus régulier de la dynamique calcique aux temps longs (15 min après l'invasion) lors de l'invasion d'une cellule par une bactérie mutante ($\text{IpgD}^{-/-}$) par rapport à une invasion par la bactérie de type sauvage. Les courbes rouges correspondent au type sauvage et les courbes bleues, au mutant. La rangée supérieure montre des résultats de simulations numériques et la rangée du bas des observations expérimentales. Pour ces dernières, on montre l'augmentation de fluorescence de l'indicateur calcique [11].

tion ne contient pas la phosphatase IpgD. Pour des raisons non encore totalement élucidées, ces bactéries induisent une réorganisation moindre du réseau d'actine (d'où une moins grande modification des propriétés de diffusion au site d'invasion), une synthèse accrue d'IP₃ et une plus grande accumulation de récepteurs à l'IP₃ au site d'invasion que le type sauvage. En tenant compte de ces différences entre les deux types de bactéries, le modèle reproduit l'observation que la souche mutante induit moins de réponses localisées que le type sauvage. Une proportion plus importante des réponses calciques induites par la bactérie se propage dans l'ensemble de la cellule infectée. De manière intéressante, le modèle suggère que lorsqu'on s'intéresse à l'évolution de la [Ca²⁺]_c à des temps ultérieurs (15 min après l'injection des effecteurs, au lieu des quelques premières minutes considérées précédemment) l'allure des oscillations de Ca²⁺ diffère drastiquement selon que ces dernières ont été induites par le type sauvage ou par la souche mutante. Comme montré dans le haut de la Fig. 4, le modèle prédit l'existence d'oscillations nettement plus prononcées dans le cas du mutant (courbe bleue) que pour le type sauvage (courbe rouge). Cette prédiction théorique a ensuite été validée expérimentalement (panneaux du bas de la Fig. 4), en mesurant les concentrations en Ca²⁺ induite par les deux types de bactéries dans une lignée de cellules épithéliales, à partir de 15 min après l'ajout des bactéries dans le milieu.

4. Conclusion

Grâce à un petit nombre de canaux calciques dont l'activité est très régulée, les cellules utilisent la concentration intracellulaire en Ca²⁺ comme un signal qui contrôle une pléthore de phénomènes physiologiques vitaux. Les variations de [Ca²⁺]_c prennent l'allure d'oscillations, dont le mécanisme repose sur un processus d'activation-inhibition d'un canal calcique par le Ca²⁺ lui-même. Vu le caractère hautement dynamique et non-linéaire de ce processus, la modélisation est un complément précieux aux approches expérimentales. En particulier,

elle permet de clarifier la manière par laquelle la bactérie *Shigella* favorise son processus d'invasion en manipulant la dynamique calcique des cellules épithéliales qu'elle envahit. A long terme, on peut espérer que l'utilisation de drogues agissant au niveau des flux calciques pourrait permettre d'interférer avec cette manipulation et réduire la dissémination bactérienne.

Références

- [1] M. Berridge, M. Bootman, P. Lipp, *Nature* 1998, 395, 645.
- [2] L. Combettes, D. Tran, T. Tordjmann, M. Laurent, B. Berthon, M. Claret, *Biochem. J.* 1994, 304, 585.
- [3] A. Goldbeter, 'Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms', Cambridge University Press, 1996.
- [4] G. Nicolis, I. Prigogine, 'Self-Organization in Nonequilibrium Systems', John Wiley & Sons, New York, 1977.
- [5] A. Ochiai, *J. Chem. Educat.* 1991, 68, 10.
- [6] G. Dupont, M. Falcke, V. Kirk, J. Sneyd, 'Models of Calcium Signalling', Springer, 2016.
- [7] N. Allbritton, T. Meyer, L. Stryer, *Science* 1992, 258, 1812.
- [8] G. Tran Van Nhieu, C. Clair, G. Gianfranco, P. Sansonetti, *Biology of the Cell* 2004, 96, 93.
- [9] G. Tran Van Nhieu, C. Clair, R. Bruzzone, M. Mesnil, P. Sansonetti, L. Combettes, *Nat. Cell Biol.* 2003, 5, 720.
- [10] G. Tran Van Nhieu, B. Kai Liu, J. Zhang, F. Pierre, S. Prigent, P. Sansonetti, C. Erneux, J. Kuk Kim, P. Suh, G. Dupont, L. Combettes, *Nat. Comm.* 2013, 4, 1567.
- [11] C. Sun, B. Wacquier, D. Aguilar, N. Carayol, K. Denis, S. Boucherie, C. Valencia-Gallardo, C. Simsek, C. Erneux, A. Lehman, J. Enninga, L. Arbibe, P. Sansonetti, G. Dupont, L. Combettes, G. Tran Van Nhieu, *EMBO J.* 2017 (in press)
- [12] Dupont G., Swillens S., Clair C., Tordjmann T., Combettes L. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1498, 134.