



pour obtenir le titre de

Thèse présentée

Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg 1

Discipline : Sciences du Vivant

par

Rania DAGHER

Recherche de petites molécules bioactives
sur la Calmoduline :

Outils de recherche pour analyser son rôle dans le signal calcique

Soutenue publiquement le 12 Décembre 2008 devant le Jury :

Directeur de thèse :	M. Jacques HAIECH
Directeur de thèse :	M ^{me} Claire PIGAULT
Rapporteur externe :	M. Marc MOREAU
Rapporteur externe :	M. Roland POCHET
Rapporteur interne :	M. Jean-Luc GALZI
Examineur :	M. Hervé CHNEIWEISS

À mes parents

QUE SOIENT REMERCIÉS,

Monsieur **Marcel HIBERT**, Directeur du département de Pharmacochimie de la Communication Cellulaire, pour m'avoir accueillie en thèse dans son département et pour sa gentillesse.

Monsieur **Jacques HAIECH**, Professeur à l'Université Louis Pasteur pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour la confiance qu'il m'a accordée en dirigeant cette thèse. Ses conseils et ses critiques avisés m'ont guidé tout au long de ce travail. Que ce travail soit le témoignage de mon profond respect.

Madame **Claire PIGAULT**, Maître de Conférences à l'Université Louis Pasteur, pour tout le temps qu'elle a passé à m'encadrer pendant cette thèse.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance aux membres du Jury, M. **Jean-Luc GALZI**, Directeur de Recherche au CNRS, M. **Marc MOREAU**, Directeur de Recherche au CNRS, M. **Roland POCHE**T, Professeur à l'Université Libre de Bruxelles et M. **Hervé CHNEIWEISS**, Directeur de Recherche à l'INSERM, pour l'honneur qu'ils me font de juger cette thèse.

Je remercie également Mme **Marie-Claude KILHOFFER** pour ses conseils judicieux qu'elle m'a prodigués et qui a su trouver les mots justes pour me rassurer dans mes « quelques » moments de doute en cette fin de thèse.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres du département de Pharmacochimie de la Communication Cellulaire. Je tiens également à remercier les collègues du laboratoire de Chimie Biologie Intégrative particulièrement **Dominique BONNET** pour ses conseils en chimie, **Stéphanie LOISON** pour sa gentillesse et **Romain HANY** pour son aide et sa sympathie.

J'exprime ma gratitude à Monsieur **Pascal VILLA**, Responsable de la Plateforme de criblage et je remercie tous les membres de la Plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg (PCBIS) dirigée par M. Jacques HAIECH. Un grand merci à **Adeline** pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide. Mille mercis à **Bruno DIDIER**, pour ses différents services au niveau de la chimiothèque, son humour et sa sympathie.

Un énorme MERCI de tout mon cœur à mes parents qui ont permis que tout cela se réalise. Merci **mama Hanane** pour ton accompagnement quotidien par la pensée, avec beaucoup d'amour et avec sagesse malgré les distances. Merci **baba Elie**, pour ton amour, ton humour et ta confiance en moi. Je suis fière de vous et de la famille sur laquelle vous veillez.

Je ne peux que souhaiter à ma sœur **Zeina** ce qu'elle désire profondément, qui m'a toujours soutenue. Zeina, je te suis éternellement reconnaissante et suis fière de toi. « **Zayoun ra7 min dall nbawtiss sawa !!!** »

Eliane, Alain et Christian pour leurs encouragements que nous avons échangés via le Messenger et les emails.

Je suis reconnaissante envers mes amis **Carole** et **Jean** pour leur soutien constant et pour l'atmosphère chaleureuse et rassurante qu'ils ont su créer autour de moi. Merci pour votre fidélité, votre amitié et votre accueil. Merci pour ces petites complicités, ces attentions discrètes et ces centaines de sourires qui ont façonné ma vie quotidienne durant les années de ma thèse. Carole et Jean, je vous souhaite tout deux beaucoup de bons moments de bonheur avec le « **petit PELUSO** » qui arrive; je sais que vous ferez d'excellents parents, courage !!!

Un merci spécial à mon amoureux, **Laurent**, qui m'a aidée à conclure cette aventure professionnelle et humaine que j'avais commencé toute seule, afin de pouvoir en entamer une autre à deux...

Sommaire

LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	12
ABRÉVIATIONS	14
AVANT PROPOS	18
INTRODUCTION	22
I. Signalisation calcique	23
A. Introduction	23
B. Boîte à outils du signal calcium	24
C. Mécanisme « ON »	25
D. Mécanisme « OFF »	27
E. Protéines de liaison du calcium : CaBPs	28
F. Organisation spatio-temporelle et spécificité du signal calcique.....	30
G. Principales fonctions du signal calcique	32
II. Famille des protéines à motif EF-hand	34
A. Introduction	34
B. Motif EF-hand : unité structurale de base du site de liaison du calcium	35
C. Dimérisation du motif EF-hand	44
D. Organisation en domaines EF-hand pour une meilleure flexibilité moléculaire.....	45
E. Conséquences de la liaison du calcium sur la conformation des protéines de liaison du calcium	47
F. Déterminants de l'affinité du motif EF-hand pour le calcium	53
III. La calmoduline, une calciprotéine multifonctionnelle	64
A. Introduction	64
B. Localisation, mobilité et translocation cellulaire.....	67
C. Sites de liaison du calcium.....	68
D. Changements conformationnels induits par la liaison du calcium.....	71
E. Interaction de la calmoduline et ses cibles en présence de calcium.....	72
F. Mode de liaison canonique d'enroulement	76
G. Plasticité conformationnelle de la calmoduline	80
IV. Antagonistes connus de la calmoduline	82
V. Article : les protéines de liaison du calcium peuvent-elles être des cibles de nouveaux médicaments ?	98
À LA RECHERCHE DE NOUVEAUX INTERACTEURS DE LA CALMODULINE	104
I. Validation de l'essai de criblage et du concept « signature calcique »	106

A.	Introduction.....	106
B.	Stratégie et Résultats : validation de l'essai de criblage	109
C.	Article: Use of a fluorescent polarization based high throughput assay to identify new Calmodulin ligands.....	116
D.	Sélection et caractérisation de « touches » de la calmoduline	124
II.	Stratégie et Résultats : validation du concept « Calmodulin Antagonist Induced Calcium Signature»	126
A.	Introduction.....	126
B.	Article: Calcium fingerprints induced by Calmodulin interactors in eukaryotic cells.....	128
C.	Conclusion	152
	EXPLORATION DES DIFFERENTES RÉGIONS DE LA CALMODULINE	156
I.	Caractérisation de l'interaction des sondes fluorescentes	158
II.	Nouveaux interacteurs de la calmoduline obtenus par criblage de la chimiothèque patrimoine....	168
III.	Conditions expérimentales	171
A.	Mesures spectroscopiques.....	172
B.	Titration par polarisation de fluorescence (FP).....	172
C.	Détermination du taux de polarisation	172
D.	Titration par microcalorimétrie isotherme	173
E.	Détermination des constantes macroscopiques de liaison du calcium sur la SynCaM en présence des sondes fluorescentes (G_1 , G_2 , G_3 and G_4).....	174
	CONCLUSION GÉNÉRALE	176
	ANNEXE – Tableau des antagonistes connus de la Calmoduline.....	184
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	205
	AUTRES PUBLICATIONS	226
I.	Small Neutralizing Molecules to Inhibit Actions of the Chemokine CXCL12.....	228
II.	Solid-Phase Organic Tagging Resins for Labeling Biomolecules by 1,3- Dipolar Cycloaddition: Application to the Synthesis of a Fluorescent Non- Peptidic Vasopressin Receptor Ligand.....	245

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanisme « ON/OFF ».....	24
Figure 2 : Éléments de la boîte à outils du signal calcique.	29
Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation spatiale de la libération du calcium à partir des stocks internes.....	32
Figure 4: Les trois catégories de fonctions cellulaires déclenchées par trois différents signaux calciques.	33
Figure 5: Structure du motif EF-hand.	36
Figure 6: Coordination de l'ion Ca^{2+} dans une boucle canonique.	37
Figure 7: Représentation en logo des motifs EF-hand.	39
Figure 8: Présentation des différents types de boucle canonique et non canonique.	43
Figure 9: Paire de motifs EF-hand du domaine N-terminal de la Calmoduline.	44
Figure 10: Représentation schématique des modifications subies par le motif EF-hand au cours de l'évolution.	47
Figure 11: Représentation en rubans des structures des formes apo et holo du domaine N-terminal de la troponine squelettique C.....	48
Figure 12: Représentations schématisées de l'arrangement de deux domaines EF-hand.	49
Figure 13: Représentation en rubans de la structure apo d'un domaine EF-hand.	50
Figure 14: Changements structuraux de la boucle de coordination du calcium suite à la fixation du calcium.	51
Figure 15: Modèle EFBS: EF-hand β -scaffold.....	52
Figure 16: Schéma représentatif des déterminants majeurs de l'affinité du calcium observée (ΔG_{obs}).....	54
Figure 17: Propriétés intrinsèques des motifs EF-hand pour la liaison du calcium.	57
Figure 18: Différentes voies réactionnelles de la liaison du calcium sur une paire de motif EF-hand.....	60
Figure 19: Modèle de liaison du calcium avec une coopérativité positive entre deux motifs EF-hand.....	63
Figure 20: Structure hiérarchique des motifs EF-hand dans le prototype calmoduline.	68
Figure 21 : Séquence de la calmoduline humaine.....	68
Figure 22: Représentation en rubans de la Calmoduline.	72
Figure 23 : 20 structures de la calmoduline liée à différentes cibles.	74

Figure 24: Structures des différents modes de liaison des complexes calmoduline-cibles.	78
Figure 25: Structures tridimensionnelles du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-TFP}$	83
Figure 26: Structure tridimensionnelle du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-W7}$	86
Figure 27: Structure tridimensionnelle du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-KAR-2}$	92
Figure 28: Différents modes de liaison du KAR-2 ou de la TFP sur la calmoduline.	92
Figure 30: Modèle de docking de HBC en complexe superposé sur la structure RMN du W7.	94
Figure 31: Complexe CaM-dérivé arylamide 1.	96
Figure 32: Stratégie mise en place dans ce travail de thèse.	108
Figure 33: Principe de l'anisotropie (r) ou de la polarisation de fluorescence (p)	112
Figure 34 : Principes de la méthode de polarisation/anisotropie de Fluorescence.	113
Figure 35: Expériences de déplacement de la sonde fluorescente par les nouvelles molécules.	125
Figure 36: Structure de la sonde TNS.	158
Figure 37: Structure de la sonde ANS.	158
Figure 38: Structures des sondes fluorescentes sélectionnées par criblage de la chimiothèque fluorescente.	159
Figure 39 : Modèle séquentiel de liaison des sondes fluorescentes à la calmoduline.	160
Figure 40: Courbes de titration isothermique de la SynCaM et de ses mutants électrostatiques par le calcium.	161
Figure 41: Différentes titrations par SynCaM des quatre sondes fluorescentes à différentes concentrations de calcium libre.	163
Figure 42 : Titrations par polarisation de fluorescence de la calmoduline avec la sonde S1 en présence de calcium 1 mM.	165
Figure 43: Criblage de la chimiothèque patrimoine de Strasbourg avec l'essai utilisant la sonde S1.	168

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Séquences en acides aminés des motifs EF-hand.....	37
Tableau 2: La calmoduline et ses cibles fonctionnelles.....	66
Tableau 3: Certaines fonctions cellulaires et enzymes dépendant de la calmoduline.	67
Tableau 4 : Classification des motifs de reconnaissance moléculaire pour la calmoduline et ses cibles.	76
Tableau 5 : Cibles Ca ²⁺ dépendantes ou indépendantes mais CaM-dépendantes présentant des motifs IQ....	79
Tableau 6: Effet du Calmidazolium et du composé 48/80 sur l'activité enzymatique de certaines pompes ATPasiques.....	87
Tableau 7: Résultats de l'essai de polarisation de fluorescence.	96
Tableau 8: Touches de la calmoduline issues du criblage de la chimiothèque Prestwick.	125
Tableau 9: Constantes d'association des 4 sites de liaison du calcium pour la calmoduline et les 3 mutants électrostatiques.....	162
Tableau 10: Caractéristiques thermodynamiques des 4 sites de liaison de la calmoduline et des mutants électrostatiques.....	162
Tableau 11: Constantes d'association des sondes S1, S2, S3 et S4 pour les différents complexes calciques de la calmoduline (SynCaM/VU1).	163
Tableau 12: Constantes d'association des sondes S1, S2, S3 et S4 pour les différents complexes calciques de la calmoduline VU24.	164
Tableau 13: Constantes d'association des sondes S1, S2, S3 et S4 pour les différents complexes calciques de la calmoduline VU8.	164
Tableau 14: Constantes d'association des sondes S1, S2, S3 et S4 pour les différents complexes calciques de la calmoduline VU12.	164
Tableau 15: Composés présentant des valeurs de K _i identiques.	169
Tableau 16: Composés présentant un K _i différent avec la sonde S1 ou la sonde S3.....	170

ABRÉVIATIONS

9AC:	9-Anthroylcholine
AC:	Adenylate Cyclase
ACTH:	Adreno CorticoTropic Hormone
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADPRc :	ADP ribosyle cyclase
ALG-2	Apoptosis-Linked Gene-2
ANS:	8-anilino-1-naphthalensulfonanic acid)
Apo :	Forme ellipsoïde de la calmoduline
AtCBL2:	Aradidopsis thaliana Calcineurin B-like Protein
ATP :	Adénosine TriPhosphate
ATPase:	ATP hydrolase
BAPTA:	Acide 1, 2 - bis (o-aminophénoxy) éthane - N,N,N',N' tétraacétique
BY-2:	Cellule de tabac
Ca²⁺ :	Calcium
Ca²⁺-buffer:	Tampon calcique
Ca²⁺-gated	Canal potassium calcium dépendent
K⁺-channel :	
Ca²⁺-sensor :	Senseur calcique
CaBP :	Protéine de liaison du calcium
cADPR :	AdénosineDiPhosphate Ribose cyclique
CAICS:	Calmodulin Antagonist Induced Calcium Signature
CaM :	Calmoduline
CaMBD:	Calmodulin Binding Domain
CaMKI:	Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase I
CaMKII:	Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II
CaMKK:	Calmodulin-dependent protein Kinase Kinase
CHPO et GP :	Chimiothèque fluorescente fractions "Christel Pourbaix" et "Fabrice Gillet"
CIB:	Calcium and Integrin- Binding Protein
CICR:	Calcium-Induced Calcium-Released
Cn :	Calcineurine
cNOS:	constitutive Nitric Oxide Synthase
CRS:	CaM Recruitment Signaling
CST:	Calcium-Signalling Toolkit
EDTA:	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EF (Anthrax):	oEdema Factor from Bacillus anthracis
EF:	motif EF-hand
EFBS :	EF-hand β -Scaffold ou modèle
EGTA:	Acide éthylène glycol tétraacétique
FP:	Polarization de Fluorescence
GAD:	Glutamate Decarboxylase
GFP:	Green Fluorescent Protein
GIP:	Gastric Inhibitory Peptide
HMJ model :	Modèle de "Herzberg-Moult-James" expliquant les changements conformationnels induits par la fixation du calcium

Holo :	Forme étendue de la calmoduline saturée en calcium
IP3 ou	Inositol(1.4.5)triPhosphate
Ins(1.4.5)P3:	
IQ motif:	IQxxxRGxxxR
MARKS:	Myristoylated Alanine-Rich protein Kinase C substrate
Mg²⁺:	Magnésium
MLCK :	kinase de la chaîne légère la myosine
Myosine ELC:	Myosine Essential Light Chain
NAADP :	Acide Nicotinique Adénine Dinucléotide Phosphate
NAADPR:	Acide Nicotinique Adénine Dinucléotide Phosphate Receptor
NAD :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NCS :	Neuronal Ca ²⁺ -Sensor
NCX :	Échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
NSCP	Nereis diversicolor Sarcoplasmic Calcium-binding Protein
PCBIS:	Plate-forme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg
PDE:	PhosphoDiEstérase
PLC:	PhospholipaseC
PMCA :	Pompe Calciques de la Membrane Plasmique
PtdIns(4,5) P2:	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PTP :	Pore Transition Permeability
R24 571:	Calmidazolium
RCPG :	Récepteur Couplés aux Protéines G
RDC:	Couplages Dipolaires Résiduels
RE :	Réticulum Endoplasmique
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
ROC:	Receptor Operated Calcium Channel
RS :	Réticulum Sarcoplasmique
RTK :	Récepteur des Tyrosine Kinases
RYR:	Ryanodine receptor
S1P:	Sphingosine 1-Phosphate
SAXS:	Small Angle X-ray Scattering
SCaMPER:	Sphingolipid Ca ²⁺ release-Mediating Protein of ER
SK Channel:	Small conductance calcium-activated potassium Channel
smMLCK:	mooth muscle Myosin Light Chain Kinase
SMOC:	Second Messenger Operated Calcium Channel
SOC:	Store-Operated Calcium Channel
SPARC:	Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein
SynCaM	Calmoduline Synthétique
TFP:	Trifluopérazine
TGNM01:	Cellules initiatrices de tumeur isolées de glioblastoma humaine
TN-I:	Troponine I
TNS:	2-p-Toluidinyl-Naphtalène-6-Sulfonate
TRP:	Transient Receptor Potential
VOC:	Voltage Operated Calcium Channel
Ψ-hand :	pseudo-EF-hand

AVANT PROPOS

Le calcium est un élément fondamental de notre organisme et est essentiel à la vie d'une cellule. Au niveau intracellulaire, il interagit avec des protéines de liaison du calcium (CaBPs) qui majoritairement appartiennent à la superfamille des calcioprotéines caractérisées par le motif EF-hand.

Ces protéines remplissent des fonctions cellulaires très variées, allant du tampon calcique, au transport, en passant par l'activation d'enzymes ainsi que la régulation de la contraction musculaire, la sécrétion et la prolifération cellulaire. Au cours de la réponse cellulaire, les senseurs calciques (protéines transductrices du signal calcique) sont notamment capables de déchiffrer l'information codée par le signal calcique et d'induire des fonctions biologiques via l'activation de protéines cibles cellulaires. Un certain nombre de maladies dont la cardiomyopathie, les processus inflammatoires, les désordres cérébraux, le cancer, le diabète et les dysfonctionnements cardiaques, sont associées à la dérégulation des calcioprotéines impliquées dans la signalisation calcique. De ce fait, certaines de ces calcioprotéines ont été sélectionnées et utilisées comme marqueurs prédictifs dans le diagnostic de maladies. C'est notamment le cas des protéines S100 qui sont des marqueurs de la tumorigénisation des cellules ou de l'inflammation (Heizmann 2005).

La calmoduline (CaM) est une calcioprotéine de la famille des protéines à motif EF-hand qui est impliquée dans la régulation de l'homéostasie tout en ayant un rôle actif en tant que médiateur calcique. Douée d'une plasticité conformationnelle remarquable et ayant plus d'une centaine de cibles intracellulaires, elle est par excellence la protéine « hub » modulée par le signal calcique. Récemment, il s'est avéré que la calmoduline est une cible thérapeutique potentielle associée à certains types de cancer et aux maladies inflammatoires.

Notre objectif dans ce travail de thèse a été de trouver de petites molécules qui interagissent avec la calmoduline non pas comme futurs candidats médicaments mais

comme outils de recherche permettant de perturber cette protéine et d'en comprendre mieux son rôle fondamental.

Au cours de cette étude, nous avons validé une stratégie permettant de mettre en place un essai de criblage quand on dispose d'une protéine purifiée même si l'on ne connaît ni son ligand et ni la fonction de cette protéine.

Dans le **premier chapitre** de ce mémoire nous présenterons « le **cycle du calcium** » dans la cellule et la gestion du signal calcique par les calcioprotéines cellulaires caractéristiques du motif EF-hand et nous étudierons les caractéristiques générales de cette famille.

Afin de déchiffrer le rôle cellulaire de la **calmoduline** modulé par le calcium, nous exposerons par la suite un aperçu sur ses propriétés structurales et conformationnelles liées à sa capacité de lier le calcium selon un modèle séquentiel, ainsi que sa plasticité conformationnelle impliquée dans les mécanismes moléculaires de reconnaissance de ses cibles. Les différentes cibles, fonctions et antagonistes connus de la calmoduline seront alors détaillés.

Nous ferons l'inventaire des molécules qui se lient à la calmoduline et nous essayerons d'en donner les caractéristiques principales.

Nous décrivons la **stratégie** que nous avons mise en place pour le développement d'essais de criblage par anisotropie de fluorescence pour la recherche de petites molécules interagissant spécifiquement avec la calmoduline et perturbant ses fonctions au niveau moléculaire et cellulaire dans la signalisation calcique. Cette stratégie est générale et peut être utilisée pour toute protéine soluble purifiée.

Nous présenterons dans le **chapitre deux**, le développement de nos essais de criblage par anisotropie/polarisation de fluorescence sur la calmoduline. Dans un premier temps, nous rechercherons des sondes marquées à la lissamine à partir du criblage de la chimiothèque fluorescente (CHPO et GP). Dans un deuxième temps, nous rechercherons des petites molécules suite au criblage de la chimiothèque « Prestwick » par déplacement de la sonde fluorescente précédemment trouvée sur la calmoduline.

Ensuite, nous étudierons dans des cellules eucaryotes la capacité des antagonistes connus de la calmoduline à perturber l'homéostasie calcique.

Nous caractériserons dans le **chapitre trois**, la fixation des sondes fluorescentes sur la calmoduline et ses mutants électrostatiques en fonction du calcium ainsi que les différents modes de liaison de certains antagonistes connus de la calmoduline. Cette étude nous permettra de déchiffrer les modes d'interaction et d'activation d'une protéine cible de la calmoduline par la calmoduline.

Nous présenterons deux nouvelles classes de petites molécules interagissant avec la calmoduline obtenues par criblage de la chimiothèque patrimoine de Strasbourg.

Ces molécules capables d'interagir avec différentes conformations de la calmoduline, et ainsi de perturber de manière différentielle les diverses fonctions de cette protéine, sont des outils utiles pour disséquer les mécanismes moléculaires et le rôle de la calmoduline dans une cellule eucaryote dans un état physiologique défini.

Chapitre I

INTRODUCTION

I. Signalisation calcique

*“In the furnaces of the stars the elements evolved from hydrogen.
When oxygen and neon captured successive α particles,
the element calcium was born.
Roughly 10 billion years later, cell membranes began to parse the world by charge,
temporarily and locally defying relentless entropy.
To adapt to changing environments, cells must signal,
and signaling requires messengers whose concentration varies with time.
Filling this role, calcium ions (Ca^{2+}) and phosphate ions have come to rule cell signaling.”*

David E. Clapham

A. Introduction

L'universalité du calcium en tant que second messenger intracellulaire dépend de sa versatilité cellulaire en termes de vitesse, amplitude et organisation spatio-temporelle. Cette versatilité émerge du fait que les cellules possèdent un répertoire varié de composants moléculaires appelés « **boîte à outils du signal calcium** » qui peuvent être mélangés et assortis afin de créer différents systèmes de signalisation spatiaux et temporels réglant des processus cellulaires aussi variés que la fécondation, la prolifération, le développement, l'apprentissage et la mémoire, la contraction musculaire et la sécrétion. (Berridge et al. 2003; Berridge et al. 2000).

Le calcium contrôle aussi l'expression de ses systèmes de signalisation qui se remodelent constamment dans une cellule normale et dont la dérégulation spatio-temporelle peut induire la mort cellulaire par nécrose et/ou apoptose (Carafoli et al. 1999; Carafoli et al. 2001), (Mellstrom and Naranjo 2001) et (West et al. 2001).

Suite à une stimulation cellulaire, la concentration en calcium cytosolique varie dans un rapport de 10-100 par comparaison avec l'état de repos des cellules où la concentration en calcium intracellulaire est de l'ordre de 100 nM (Berridge et al. 2000). Une augmentation

de la concentration en calcium intracellulaire $[Ca^{2+}] \geq 1 \mu M$ gènera différentes réponses dont certaines seront dues à la combinaison de voies de signalisation cellulaire variées (Figure 1).

B. Boîte à outils du signal calcium

Chaque type cellulaire exprime son propre répertoire moléculaire permettant ainsi d'élaborer des systèmes de signalisation spécifiques caractérisés par un large éventail de propriétés spatio-temporelles. Suite à une stimulation, ces systèmes responsables de l'activation et de la désactivation du signal calcique sont divisés en deux groupes en fonction de l'induction d'une augmentation ou d'une diminution de la concentration calcique cytosolique, c'est ce que l'on appelle le **mécanisme « ON/OFF »**. Le **mécanisme « OFF »** est composé d'un ensemble de pompes et d'échangeurs calciques permettant le retour à l'état de repos en évacuant le calcium vers le milieu extracellulaire et les stocks internes (Figure 1).

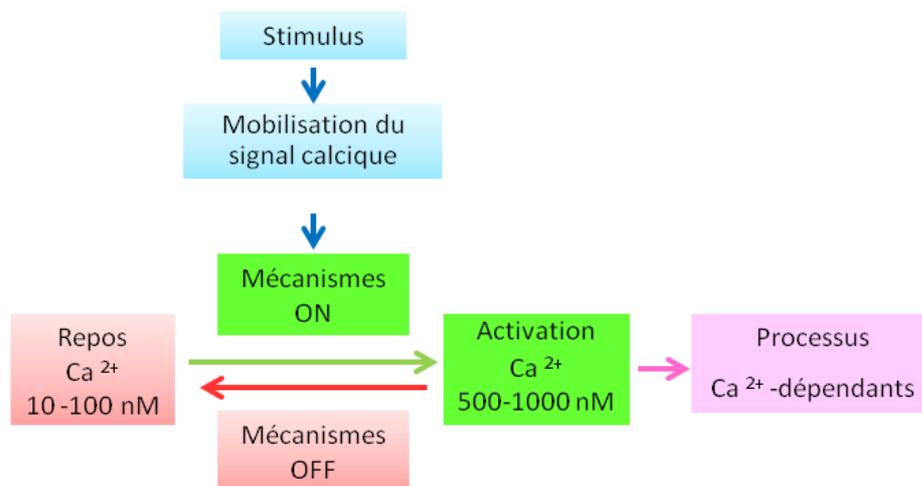


Figure 1 : Mécanisme « ON/OFF ».

Une stimulation cellulaire gènera une mobilisation calcique via les différents mécanismes « ON » qui contribuent à une augmentation du calcium cytosolique pour l'activation des différents processus cellulaires Ca^{2+} -dépendants induisant ainsi une réponse cellulaire qui s'achèvera via le mécanisme « OFF » par la restauration de la concentration calcique basale ($\sim 100nM$) (Berridge et al. 2000).

C. Mécanisme « ON »

Dans une cellule au repos, la concentration en calcium libre est de l'ordre de 100 nM. Il existe donc un gradient de concentration entre le cytosol d'une part et le milieu extracellulaire ($[Ca^{2+}] = 1 \text{ mM}$) d'autre part, ainsi qu'entre le cytosol et des réservoirs intracellulaires tel que le Réticulum Endo (Sarco) plasmique (jusqu'à 10 mM). Ces gradients sont maintenus à l'état de repos grâce à l'imperméabilité des membranes au calcium et à l'existence de systèmes d'expulsion du calcium.

Une stimulation cellulaire telle que la dépolarisation membranaire, les stimuli nocifs, les agonistes extracellulaires, les messagers intracellulaires et la déplétion calcique des stocks internes, induit l'importation de calcium dans le cytosol à partir du milieu extracellulaire (1 mM) et des stocks internes (10 mM) via le **mécanisme « ON »**.

1. Importation de calcium depuis le milieu extracellulaire

A la surface cellulaire, les stimuli sont principalement perçus par des Récepteurs des Tyrosine Kinases (**RTKs**) ou des Récepteurs Couplés aux Protéines G (**RCPGs**) capables de générer des signaux intracellulaires et d'induire directement ou indirectement l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium. Cette augmentation est transitoire et déclenche une cascade de processus qui permet d'amplifier le signal dans la cellule (**Figure 2**). Outre le calcium comme second messenger, la cellule utilise aussi (Clapham 1995):

- L'inositol (1.4.5) triPhosphate $Ins(1.4.5)P_3$ (**IP3**) obtenu suite à l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (**PtdIns(4,5)P₂**) par la phospholipaseC ($PLC\beta$, $PLC\gamma$), (Berridge 1993).
- L'AdénosineDiPhosphate Ribose cyclique (**cADPR**) (Clapper et al. 1987) et l'Acide Nicotinique Adénine Dinucléotide Phosphate (**NAADP**) (Genazzani and Galione 1997) qui sont générés à partir de Nicotinamide Adénine Dinucléotide (**NAD**) et de son dérivé phosphorylé NADP par l'activité de l'ADP ribosyle cyclase.
- La sphingosine 1-phosphate (**S1P**) est générée à partir de la sphingosine par l'activité de la sphingosine kinase (Young et al. 1999).

Le flux de calcium depuis le milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire est la principale source de calcium pour la cellule. Ce flux est contrôlé par des canaux membranaires tels que VOCs (Hashii et al. 2000), ROCs (Kawabata et al. 1996), SMOCs (Mignen and Shuttleworth 2000), SOCs (Trepakova et al. 2000) et TRPs qui sont des canaux peu spécifiques modulés par des changements transitoires de potentiel membranaire (Clapham et al. 2001).

2. Entrée du calcium depuis les stocks internes

La libération du calcium à partir des stocks internes, généralement le Réticulum Endoplasmique (RE) ou son équivalent musculaire le Réticulum Sarcoplasmique (RS), est gérée par le calcium et des seconds messagers intracellulaires décrits dans le paragraphe précédent (l'IP₃, le cADPR, le NAADP et la S1P) (Cancela et al. 2002). Il existe dans la cellule un mécanisme autocatalytique permettant au calcium cytosolique d'induire la libération du calcium à partir des stocks internes en activant les canaux IP₃R et RYR (Cancela et al. 2002). Ce mécanisme est nommé « Calcium-Induced Calcium-Released » (**CICR**), (**Figure 2**).

3. Détection d'une modification de la concentration intracellulaire de calcium

Des études sur le génome humain dénombrent près de 200 protéines de liaison du calcium (**CaBPs**) qui interagissent avec le calcium dans le cytosol. Certaines de ces CaBPs fonctionnent soit comme des senseurs calciques « **Ca²⁺-sensors** » et sont impliqués dans le **mécanisme « ON »** (Carafoli 2002) soit comme des tampons calciques « **Ca²⁺-buffers** » (Fierro and Llano 1996) (**Figure 2**). La fin du signal calcique est marquée par le retour pour la cellule à un état de repos caractérisé notamment par une concentration cytosolique de calcium de l'ordre de 100 nM, c'est le mécanisme « OFF ».

La relation fonctionnelle entre les deux mécanismes ON et OFF ainsi que les différentes composantes du signal calcique sont illustrées et résumées dans la **Figure 2**.

D. Mécanisme « OFF »

L'exclusion du calcium cytosolique se fait en utilisant l'énergie chimique stockée dans l'ATP (pompes calciques) et/ou l'énergie électrochimique du gradient sodium externe. Les pompes calciques membranaires sont localisées dans le plasmalemma (**PMCA**) (Caride et al. 2001) et le réticulum sarcoplasmique (**SERCA**) (Wuytack et al. 2002). Elles transfèrent un ion Ca^{2+} du milieu cytosolique vers le milieu extracellulaire ou deux ions Ca^{2+} du milieu cytosolique vers le milieu intra-réticulaire par molécule d'ATP hydrolysée. En ce qui concerne l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (**NCX**), trois ions sodium traversent la membrane plasmique le long du gradient de concentration, pendant qu'un ion calcium est transporté en sens inverse. Cet échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est couplé indirectement à une ATPase Na^+/K^+ dépendante (Blaustein and Lederer 1999).

A la fin de la stimulation, ces diverses pompes et échangeurs calciques assurent le mécanisme « OFF » en repompant le calcium cytosolique vers les stocks internes ou vers le milieu extracellulaire, rétablissant ainsi le niveau calcique de repos approximativement à 100 nM et maintenant les stocks internes chargés en calcium (10 mM).

La mitochondrie, un autre composant du « mécanisme OFF » (Bernardi 1999), est douée d'une capacité élevée pour l'accumulation du calcium dans sa matrice mitochondriale riche en protéines **tampons calciques**. L'uniprotéine mitochondriale est caractérisé par une faible sensibilité pour le calcium : il atteint 50% de son activité pour une concentration en calcium cytosolique d'environ 15 μM . Par conséquent, l'activité de l'uniprotéine mitochondriale (importation de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale) n'est importante que lorsque les mitochondries sont à proximité des canaux calciques tels que l'IP3R et RYRs. Cet échange de calcium par la mitochondrie est suffisamment élevé pour affecter l'amplitude et les caractéristiques spatio-temporelles du signal calcique (Csordas et al. 1999).

Après séquestration du calcium dans sa matrice, la mitochondrie le libère lentement dans le cytosol au cours du « mécanisme OFF », par l'échangeur NCX ou grâce à la perméabilité d'un pore membranaire appelé « Pore Transition Permeability » (**PTP**). Ce dernier fonctionne selon le mécanisme CICR et est caractérisé par deux états fonctionnels: (1) un état réversible de faible conductance qui permet à la mitochondrie d'être facilement excitable et de générer des signaux calciques et (2) un état irréversible de haute conductance qui induit un écroulement du potentiel transmembranaire suivi par l'expulsion

du cytochrome c (protéine soluble essentielle à la chaîne respiratoire) et l'initiation de l'apoptose (Ichas and Mazat 1998).

E. Protéines de liaison du calcium : CaBPs

Les protéines **tampons calciques**, par exemple la caldindin-D_{9K} et la calretinin ont un rôle de stockage du calcium : elles fixent le calcium durant le mécanisme « ON » lorsque la concentration en calcium intracellulaire est élevée et le relarguent par la suite au cours du mécanisme « OFF », modulant ainsi les propriétés spatio-temporelles du signal calcique (Skelton et al. 1994).

Les senseurs calciques tels que la troponine C, la synaptotagmine, les protéines S100, les annexines et la **calmoduline**, ont quant à eux, un rôle d'effecteur : ils vont activer différents processus cellulaires dépendant du type et du contexte cellulaires, (**Figure 2**), (Nelson and Chazin 1998a).

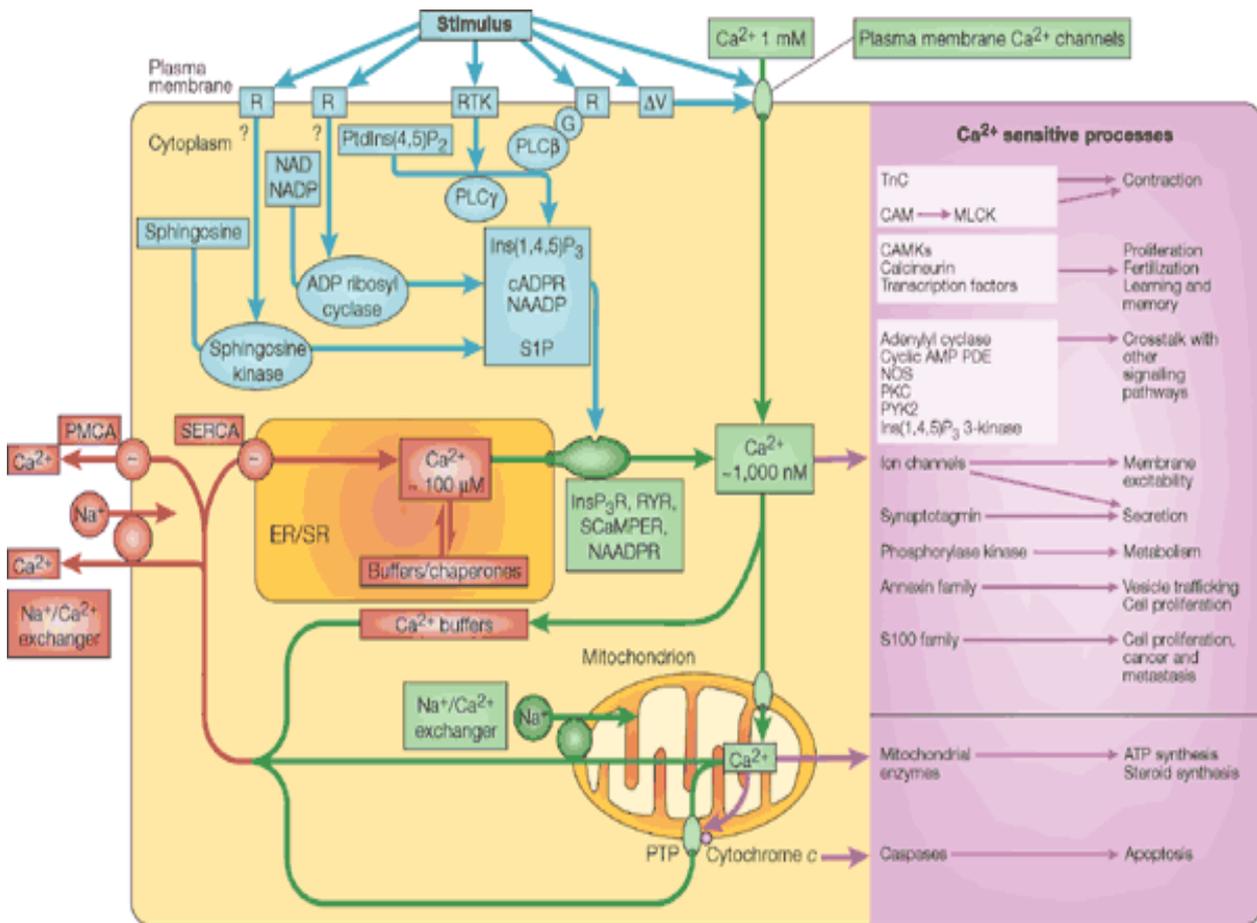


Figure 2 : Éléments de la boîte à outils du signal calcique.

En bleu, les composants cellulaires mobilisés suite à des stimuli qui agissent à la surface cellulaire. En vert, le mécanisme ON composé des canaux calciques membranaires ainsi que des canaux calciques intracellulaires IP₃R, RYR, NAADPR et SCaMPEP. Le calcium libéré dans le cytosol active des senseurs calciques (en rose) qui vont déclencher différents processus cellulaires (rose) dépendant du type et du contexte cellulaires. En rouge, le mécanisme OFF qui consiste à pomper le calcium vers l'extérieur de la cellule via l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ et la pompe Ca²⁺-ATPase de la membrane plasmique (PMCA), ou vers le RE/RS via la pompe Ca²⁺-ATPase (SERCA) (Berridge et al. 2000).

F. Organisation spatio-temporelle et spécificité du signal calcique

Du fait de l'existence d'un gradient de concentration, l'augmentation du calcium cytosolique de $[Ca^{2+}] = 10^{-8}$ M à $[Ca^{2+}] = 10^{-5}$ M survient rapidement après une stimulation nerveuse ou hormonale. Lorsque la stimulation cesse, les ions calcium sont pompés vers des compartiments extracytosoliques.

Les mouvements de calcium à travers les membranes génèrent au niveau du cytosol, une **vague calcique** transitoire, qui code l'information capable de modifier une ou plusieurs voies métaboliques de la cellule (Berridge et al. 1998). Cette vague calcique est caractérisée par plusieurs paramètres qui préservent l'information codée par le premier messenger et par conséquent, préservent la spécificité de la réponse cellulaire. Ces paramètres sont les suivants :

- La **localisation** de la vague calcique.
- L'**amplitude** de la variation de la concentration calcique.
- Les caractéristiques **cinétiques** de la vague calcique (vitesse de montée et de diminution de la concentration intracellulaire de calcium) et durée de la vague.

La libération du calcium à partir des stocks internes présente plusieurs aspects cellulaires décrits par Berridge et al. (Berridge et al. 1998), à savoir : les **quarks/blips** (impulsions simples), les **puffs/sparks** (impulsions complexes) (Cheng et al. 1993) et les **vagues calciques** (Scharenberg and Kinet 1998).

Les **quarks** et **blips** sont des évènements calciques intracellulaires élémentaires qui se produisent suite à une faible stimulation respectivement des récepteurs à la ryanodine et des récepteurs à l'IP3. La réponse calcique enregistrée est considérée comme la réponse d'un seul canal et est désignée par « quarks » quand il s'agit d'un canal RYR et « blips » pour un canal IP3R (Bootman et al. 1997; Lipp and Niggli 1998).

Les **puffs** ou **sparks** sont des événements plus complexes que les précédents, qui résultent respectivement de la sommation de quarks ou de blips (Cheng et al. 1993). De ce fait, ils constituent un signal calcique intracellulaire qui est la résultante de la combinaison d'un ou plusieurs groupes de canaux IP3R et RYR (Lipp and Niggli 1998). Ces signaux élémentaires **puffs/sparks** produisent une augmentation de la concentration cytosolique en calcium de l'ordre de 50 à 600 nM, avec une diffusion spatiale limitée (2-6 μm).

Les **vagues calciques** sont des mouvements calciques intracellulaires qui se produisent suite à l'ouverture des canaux calcium-dépendants IP3R et RYR par amplification de type « Calcium Induced Calcium Released ». Ce mouvement est initié par un groupe de canaux qui libèrent le calcium dans le cytosol à partir des stocks internes et qui transmettent l'information aux récepteurs voisins grâce à un mécanisme de "**propagation saltatoire**". Par conséquent, les récepteurs voisins seront stimulés et libèreront davantage d'ions Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique/réticulum sarcoplasmique (RE/RS) afin d'établir un processus **générateur** de cette vague calcique intracellulaire. Ces vagues peuvent s'étendre aux cellules voisines quand elles sont reliées par des « jonctions gap » afin de créer des **réponses calciques globales** intercellulaires capables de **coordonner l'activité** de plusieurs cellules. Les vagues calciques intercellulaires sont connues pour stimuler par exemple la fréquence de battement des cils dans les voies aériennes (Lansley and Sanderson 1999), et elles ont été enregistrées dans le foie (Robb-Gaspers and Thomas 1995). Dans ces deux exemples, le calcium se propagerait via les jonctions gap (**Figure 3**).

Compte tenu des caractéristiques de la vague calcique, la gestion du signal calcique par les calciprotéines dépend de (Berridge et al. 1998) :

- La régulation topologique qui correspond à la **colocalisation** du signal calcique et d'une ou de plusieurs calciprotéines.
- La **régulation cinétique** présentée par le mécanisme cinétique de la liaison du calcium.
- La **régulation génétique** qui contrôle la concentration en calciprotéines présentes en un endroit de la cellule et à un moment donné.

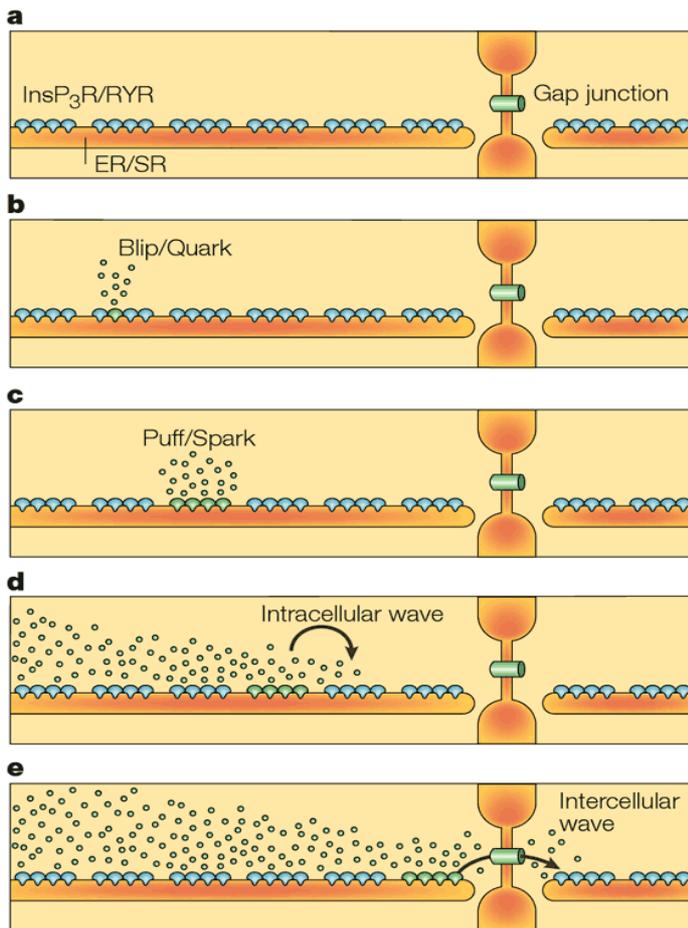


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation spatiale de la libération du calcium à partir des stocks internes.

a) les récepteurs IP3R et RYRs sont distribués à la surface du RE/RS. b) en réponse à une faible stimulation les canaux individuels des canaux IP3R et RYRs s'ouvrent pour générer des « blips » ou des « quarks » c) suite à une forte stimulation les clusters de canaux IP3R et RYRs s'ouvrent ensemble pour produire des « puffs » ou des « sparks ». d) lorsque les cellules sont complètement excitées, les éléments mentionnés dans (c) peuvent stimuler des récepteurs voisins par CICR créant ainsi une vague calcique intracellulaire. e) les vagues calciques peuvent se propager à travers les cellules via les jonctions gap générant ainsi une vague intercellulaire. (Berridge et al. 2000).

G. Principales fonctions du signal calcique

Il existe trois grandes catégories de fonctions cellulaires régulées par le signal calcique. Ces catégories sont établies en fonction du signal qui les a engendrées (Berridge et al. 1998) :

- Les fonctions cellulaires déclenchées par les signaux calciques élémentaires (Figure 4a):
 - La migration cellulaire, l'excitabilité membranaire, le métabolisme mitochondrial, la sécrétion vésiculaire, la relaxation des muscles lisses et la plasticité synaptique.

- Les fonctions cellulaires déclenchées par les vagues calciques intracellulaires (Figure 4b):
 - La fécondation, les contractions des muscles lisses, squelettiques et cardiaques, le métabolisme du foie, la transcription génique et la prolifération cellulaire.
- Les fonctions cellulaires déclenchées par les vagues calciques extracellulaires, (Figure 4c):
 - La cicatrisation des blessures, le battement ciliaire, le fonctionnement des cellules gliales, la sécrétion biliaire, la synthèse de l'oxyde nitrique au niveau de l'endothélium du muscle lisse.

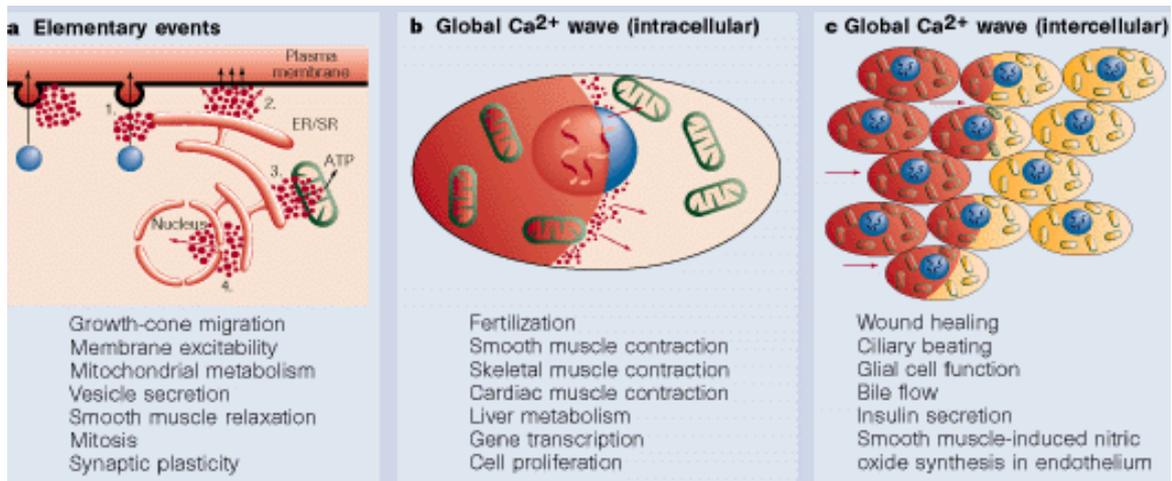


Figure 4: Les trois catégories de fonctions cellulaires déclenchées par trois différents signaux calciques. (Berridge et al. 1998).

II. Famille des protéines à motif EF-hand

A. Introduction

Les protéines de liaison du calcium (CaBPs) forment une famille de protéines homologues qui dérivent vraisemblablement d'un même ancêtre commun (Kawasaki et al. 1998). Leur unité structurale, évolutive et fonctionnelle est le motif **EF-hand** qui est composé de 36 résidus. Au cours de l'évolution, ce domaine aurait subi deux duplications successives pour donner une protéine à quatre domaines qui serait l'ancêtre de cette famille (Kawasaki et al. 1998). Cet ancêtre aurait alors évolué pour générer les protéines membres de la famille des protéines à motif EF-hand, (Gifford et al. 2007).

Fonctionnellement les protéines appartenant à la famille des protéines à motif EF-hand se regroupent, en général, en deux classes, les **senseurs calciques** et les **tampons calciques** (Gifford et al. 2007).

Les **senseurs calciques** convertissent les signaux calciques en des événements biochimiques accomplis (Bhattacharya et al. 2004; Grabarek 2006), principalement par le biais de **changements conformationnels** induits par la fixation de calcium à la protéine (Capozzi et al. 2006). Ce phénomène a été illustré grâce à des exemples structuraux de protéines telles que la troponine C (protéine impliquée dans la régulation de la contraction du muscle strié) (Spyracopoulos et al. 2001) ou les protéines de la famille de la protéine S100 (Marenholz et al. 2004) et la calmoduline (Evenas et al. 2001; Evenas et al. 1998). La calmoduline qui est un médiateur important du signal calcique, a été amplement étudiée afin de caractériser les changements conformationnels entre les formes **apo** et **holo**. La calmoduline constitue le prototype le plus étudié de la famille des protéines à motif EF-hand (Hoeflich and Ikura 2002).

Les **tampons calciques** forment un sous-ensemble de calcioprotéines mobiles dont l'un des exemples les plus caractéristiques est la calbindin D_{9K} (Szebenyi and Moffat 1986; Szebenyi et al. 1981). Falk et al. (Falke et al. 1994) ainsi que Linse et Forsen (Linse and Forsen 1995; Linse et al. 1991) ont remarqué que des modifications mineures au niveau de

la séquence d'acides aminés permettent à un motif EF-hand d'exhiber une large gamme d'affinité pour le calcium (Gifford et al. 2007). Ces variations d'affinité se retrouvent à l'intérieur même des protéines de la famille des protéines à motif EF-hand et semblent intrinsèquement liées à la spécificité de leur fonction (Haiech and Kilhoffer 2002). Certains de ces motifs EF-hand sont de plus caractérisés par une importante sélectivité pour les ions Ca^{2+} par rapport aux ions Mg^{2+} , ions chimiquement semblables aux ions Ca^{2+} qui, dans une cellule au repos, peuvent se trouver à une concentration intracellulaire quatre fois plus élevée que celle des ions Ca^{2+} (0.5 – 2 mM).

B. Motif EF-hand : unité structurale de base du site de liaison du calcium

Le terme « **EF-hand** » a été inventé par R.H. Kretsinger, il y a plus de 30 ans et fut attribué au variant du motif **hélice-boucle-hélice** des protéines de liaison du calcium. Ce motif fut découvert pour la première fois dans la structure cristalline de la Parvalbumine, petite calciprotéine isolée à partir du muscle de carpe (Kretsinger and Nockolds 1973). Par la suite le motif EF-hand a été identifié dans la séquence d'acides aminés de la Troponine C (Collins 1974), des chaînes légères de la myosine (Collins 1974), de la calmoduline ubiquitaire (Stevens 1983; Van Eldik and Watterson 1979) et d'autres protéines (Kawasaki and Kretsinger 1995).

Le motif EF-hand se compose de deux hélices α respectivement E et F, séparées par une boucle centrale liant un ion Ca^{2+} . L'arrangement tridimensionnel de ces hélices peut être représenté par les doigts d'une main où le pouce et l'index représentent les hélices alpha (**Figure 5a**), ce qui a donné lieu à son appellation EF-hand.

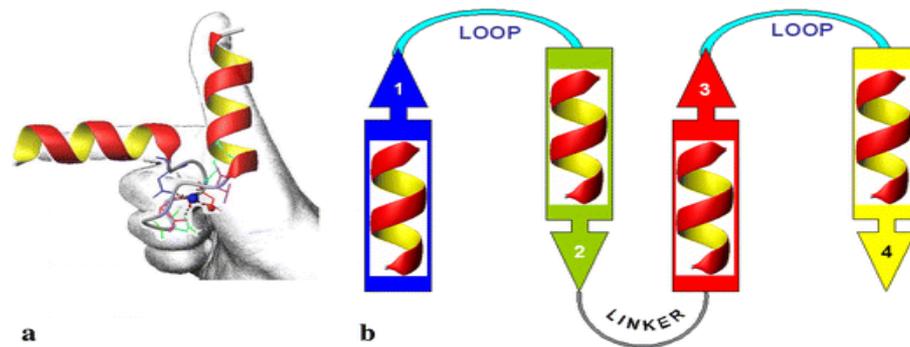


Figure 5: Structure du motif EF-hand.

a) motif EF-hand caractérisé par la structure hélice-boucle-hélice qui ressemble au pouce et à l'index d'une main. b) structure d'un domaine EF-hand constitué d'une paire d'hélice-boucle-hélice liée par un espaceur. Les hélices sont représentées de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. En bleu et rouge les hélices entrantes et en vert et jaune celles sortantes, (Capozzi et al. 2006).

La sous-famille la plus représentative de la superfamille des protéines à motif EF-hand est celle des **CaM-like protéines** dotées de deux domaines constitués chacun d'une paire de motif EF-hand en tandem (**Figure 5b**), permettant ainsi au total, la liaison de quatre ions Ca^{2+} . Il semble que ces protéines résultent de deux cycles de duplications successives de gènes et de fusion d'un motif simple, qui se seraient produits très tôt au cours de l'évolution (Nelson and Chazin 1998b).

La liaison des ions Ca^{2+} au sein du motif EF-hand est dominée par des **interactions ioniques** de faible énergie, ce qui explique la sur-représentation d'acides aminés anioniques tels que l'acide glutamique et l'acide aspartique dans le site de liaison de l'ion calcium (McPhalen et al. 1991). La géométrie préférée pour la coordination de l'ion Ca^{2+} suit un mode bipyramidal pentagonal, qui correspond à la géométrie de l'ion Ca^{2+} dans l'eau.

1. Boucle canonique du motif EF-hand

Le domaine ancestral à partir duquel ont évolué les protéines de liaison du calcium, était constitués de 36 aminoacides (Kawasaki et al. 1998).

Position de la boucle EF	1	2	4	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ligand de coordination	X sc		Y sc		Z sc		-Y bb		-X sc*			-Z sc2
Résidu le plus courant	Asp 100%	Lys 29%	Asp 76%	Gly 56%	Asp 52%	Gly 96%	Thr 23%	Ile 68%	Asp 32%	Phe 23%	Glu 29%	Glu 92%
Résidu également souvent observé		Ala Gln Thr Val Ile Ser Glu Arg	Asn	Lys Arg Asn	Ser Asn		Phe Lys Gln Tyr Glu Arg	Val Leu	Ser Thr Glu Asn Gly Gln	Tyr Ala Thr Leu Glu Lys	Asp Lys Ala Pro Asn	Asp

Tableau 1 : Séquences en acides aminés des motifs EF-hand.

Les résidus chélatant l'ion Ca^{2+} sont indiqués selon leur position dans la boucle de coordination du Ca^{2+} ou d'après leur position dans la séquence. Les résidus qui participent par leur chaîne latérale sont indiqués par la notation sc (side-chain), tandis que ceux qui participent par leur chaîne principale sont marqués par bb (backbone). L'astérisque indique les ligands qui par leurs chaînes latérales peuvent établir des liaisons hydrogène avec une molécule d'eau pour chélater les ions Ca^{2+} . Sur cette figure les résidus les plus communs sont mentionnés en chaque position ainsi que le pourcentage de leur occurrence. Seuls les résidus les plus fréquents sont présentés dans ce tableau, (Gifford et al. 2007).

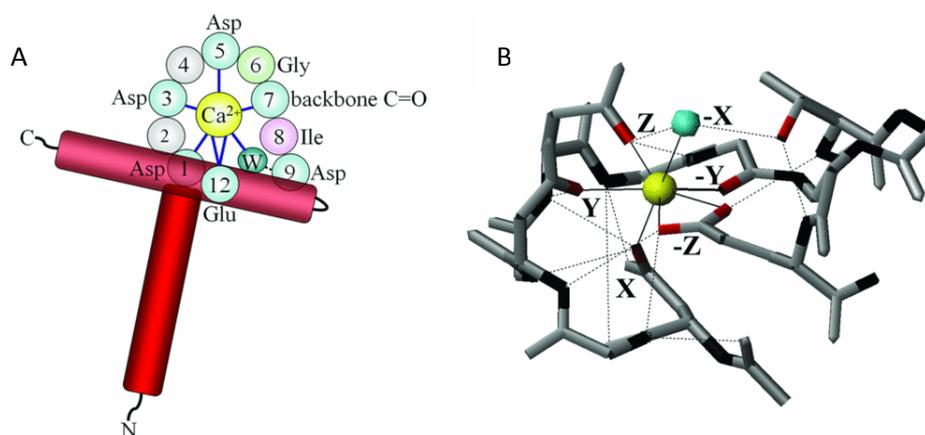


Figure 6: Coordination de l'ion Ca^{2+} dans une boucle canonique.

(PDB : 1EXR). A) Diagramme schématisé de la sphère de coordination de l'ion Ca^{2+} de la boucle canonique. Les deux hélices α sont représentées en rouge. Les ligands coordonnant l'ion Ca^{2+} dans la boucle sont présentés dans l'ordre de la séquence. (W) indique la présence d'une molécule d'eau. B) Coordination de l'ion Ca^{2+} par la boucle canonique au niveau du motif EF1 de la calmoduline illustrant la géométrie pentagonale bipyramidale (en lignes continues) et l'importance du réseau de liaisons hydrogène. Les liaisons NH sont représentées en noir, les atomes d'oxygène des chaînes latérales des résidus de la boucle en rouge. La sphère jaune représente l'ion Ca^{2+} , la sphère bleue représente une molécule coordonnant l'ion Ca^{2+} (Gifford et al. 2007).

Le motif EF-hand est composé de deux hélices α reliées par une boucle de 12 résidus capables de lier l'ion Ca^{2+} et par six ligands oxygénés (X, Y, Z, -Y, -X, -Z).

Les résidus de la boucle chélatant le calcium sont annotés de deux manières. La première est basée sur la séquence linéaire des acides aminés constituant la boucle et la seconde repose sur la géométrie tertiaire imposée par l'alignement de ces résidus par rapport aux axes de la bipyramide pentagonale, c'est à dire par rapport à un système orthogonal centré sur l'ion Ca^{2+} dont les axes X, Y et Z sont définis par les trois premiers ligands qui chélatent l'ion Ca^{2+} dans la boucle : 1 (+X), 3 (+Y), 5 (+Z), 7 (- Y), 9 (- X), 12 (- Z) (**Tableau 1, Figures 6 A et B**). Les paires d'axes Y et Z s'alignent le long des sommets du pentagone approximativement planaire, tandis que l'axe des X prend une position axiale perpendiculaire au plan formé par les deux axes Y et Z (Strynadka and James 1989).

Trois à quatre ligands parmi les cinq de la boucle sont formés par des résidus anioniques dont les chaînes latérales présentent des groupements carboxyles ; s'ajoute à ces ligands un groupement carbonyle fourni par le squelette peptidique. La sphère de coordination de l'ion Ca^{2+} est fréquemment complétée par une molécule d'eau formant des liaisons hydrogène entre la chaîne latérale d'un résidu distant et l'ion Ca^{2+} (**Figure 6A**).

Par ces liaisons hydrogène intra-boucles, le premier résidu 1 (+X) définit l'arrangement stéréochimique de la boucle (**Tableau1, Figure 6B**).

Le huitième résidu de la boucle est généralement un résidu hydrophobe (Ile, Val et Leu) (Godzik and Sander 1989) dont les groupements NH et CO de la chaîne principale établissent deux liaisons hydrogène avec leurs équivalents en position 8 de la paire de motifs EF-hand. Les deux résidus hydrophobes font partie des deux courts feuillets- β antiparallèles reliant les deux boucles des deux motifs EF-hand entre eux.

La chaîne latérale du résidu en position 9 chélate l'ion Ca^{2+} directement ou par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Le résidu en position 12, hautement conservé (Glu), contribue à la stabilité de la conformation par les liaisons hydrogène supplémentaires entre le carboxylate de sa chaîne latérale et d'autres groupements.

La boucle canonique des motifs EF-hand est caractérisée par la conservation des résidus aspartate en position 1 (X), 3 (Y) et 5 (Z) en plus de la glycine en position 6, formant ainsi un motif DxDxDG (Pfam : PF00036), (**Figure 7**).

D'autres résidus ont été observés en position 3 et 5 dans le profil de conservation de PROSITE (PS00018) : D-x-[DNS]- {ILV-FYW} - [DENSTG]-[DNQGHRK] – {GP} – [LIVMC] – [DENQSTAGC] - x(2) - [DE] - [LIVMFYW]. Cette différence de conservation pourrait avoir un rôle quant à l'affinité pour le calcium et la sélectivité pour le magnésium (Morgan et al. 2006; Rigden and Galperin 2004).

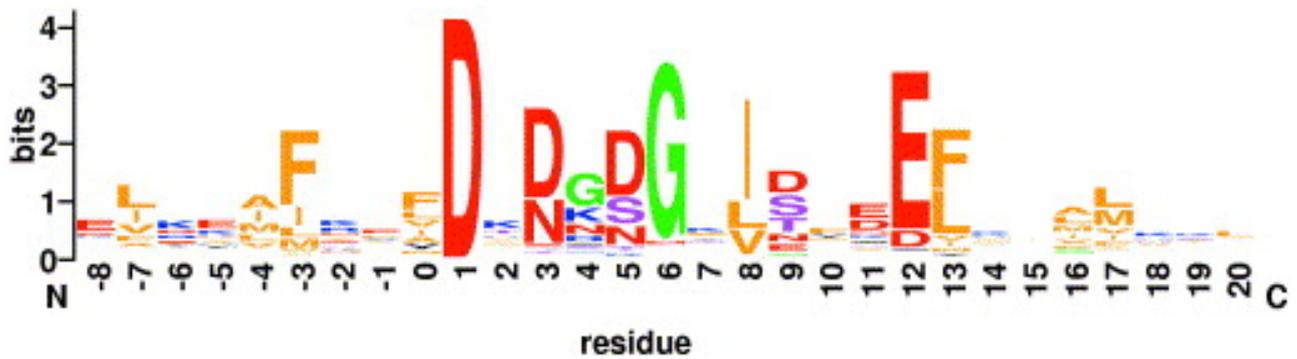


Figure 7: Représentation en logo des motifs EF-hand.

Ce motif se trouve dans la base de données Pfam (Pfam : PF00036). Les résidus D, E, N sont présentés en rouge; les résidus K et R en bleu; les résidus S et T en mauve, le résidu G en vert et les résidus hydrophobes en jaune (Rigden and Galperin 2004). La Pfam database est une base de données de familles protéiques générée à partir de l'analyse d'alignements multiples de séquences, avec des modèles de Markov cachés (HMMs). Dans cette base de données, chaque protéine est identifiée comme l'assemblage de plusieurs domaines.

2. Boucle non-canonique du motif EF-hand

Bien que le modèle de chélation de l'ion Ca^{2+} décrit ci-dessus soit employé pour la majorité des protéines à motif EF-hand, la composition et la longueur de ces boucles peut varier de façon significative au sein du « EF-handome » (terme inventé par Haiech et collaborateurs pour désigner l'ensemble des motifs EF-hand (Haiech et al. 2004). Les différentes boucles non-canoniques peuvent être classées en quatre groupes dont trois sont caractérisés par différentes stratégies pour compléter la sphère de coordination de l'ion Ca^{2+} selon la géométrie bipyramidale pentagonale.

a) Premier groupe de boucles non-canoniques dans les domaines EF-hand

Le premier groupe contient des motifs EF-hand ayant la même longueur de séquence dans la boucle (12 résidus) que les motifs canoniques, mais les ligands de l'ion Ca^{2+} différent (**Figure 8A**). Ce groupe englobe deux types de divergence :

- Approximativement 10% des motifs EF-hand connus possèdent un résidu acide aspartique (Asp) au lieu d'un résidu acide glutamique (Glu) en position 12 de la boucle. Ces boucles ayant un Asp en position 12 tendent à être plus petites et plus compactes que la boucle canonique, caractéristique qui a des effets sur la coordination de l'ion Ca^{2+} et la sélectivité de l'ion Mg^{2+} . Dans la structure cristalline du troisième motif EF-hand de CIB (Calcium et Integrin-Binding Protein), la chaîne latérale de l'Asp12 est trop courte pour que les deux atomes d'oxygène coordonnent l'ion Ca^{2+} , et bien que la coordination de l'ion Ca^{2+} se fasse par un des deux atomes d'oxygène, une coordination complète ne pourra être atteinte que par l'intermédiaire de liaisons hydrogène avec des molécules d'eau (Gentry et al. 2005).
- Un ensemble de boucles du motif EF-hand telles que EF4 d'AtCBL2 [Arabidopsis thaliana (arabette de thalium ou arabette des dames) calcineurine β -like protéine], lient l'ion Ca^{2+} par un nombre plus élevé de groupements carbonyle (de la chaîne principale) (Nagae et al. 2003). Cette différence est une réponse substitutive à la réduction de la séquence de résidus formant la boucle du motif EF-hand.

b) Second groupe de boucles non-canoniques dans les motifs EF-hand

Le deuxième groupe de boucles non-canoniques comporte ceux qui ont des insertions d'acides aminés au niveau de la boucle (**Figure 8B**). La famille des protéines S100s et ses protéines liées incluant la calbindin $\text{D}_{9\text{K}}$, contient une boucle non-canonique au niveau du motif EF1 nommé la « pseudo-EF-boucle » formant ainsi une variante du motif EF-hand connue sous le nom de Ψ -hand (pseudo-EF-hand). Pour adapter deux résidus d'insertion dans la première partie de la boucle, ce segment est tourné de l'intérieur vers l'extérieur "inside-out" positionnant les groupements carbonyles de la chaîne principale au

niveau de la sphère de coordination de l'ion Ca^{2+} , remplaçant ainsi les résidus en position +X, +Y et +Z. La présence de ces groupes comme ligands inhabituels n'empêche pas la formation de plusieurs liaisons hydrogène favorables ; c'est le cas notamment pour la calbindin $\text{D}_{9\text{K}}$.

Dans le cas de l'AtCBL2 (Nagae et al. 2003), des groupements de la chaîne principale sont également utilisés comme ligands coordonnant l'ion Ca^{2+} pour surmonter une insertion de trois résidus entre les positions +X et +Y, permettant ainsi l'établissement de la géométrie bipyramidale pentagonale autour de l'ion Ca^{2+} au niveau du motif EF-hand. De même, une insertion d'un résidu entre ces mêmes positions au niveau du motif EF-hand 1 a été observée dans la glycoprotéine extracellulaire BM40 également connue sous le nom de SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) et ostéonectine (Hohenester et al. 1996). Les boucles des motifs EF1 non-canonique et le motif EF2 canonique de la protéine BM40 peuvent être superposés avec un RMSD (Racine Carrée de la Moyenne de Déviation) de 0.25 Å, démontrant que l'insertion d'un résidu au niveau du motif EF1 a pour conséquence un effet très localisé.

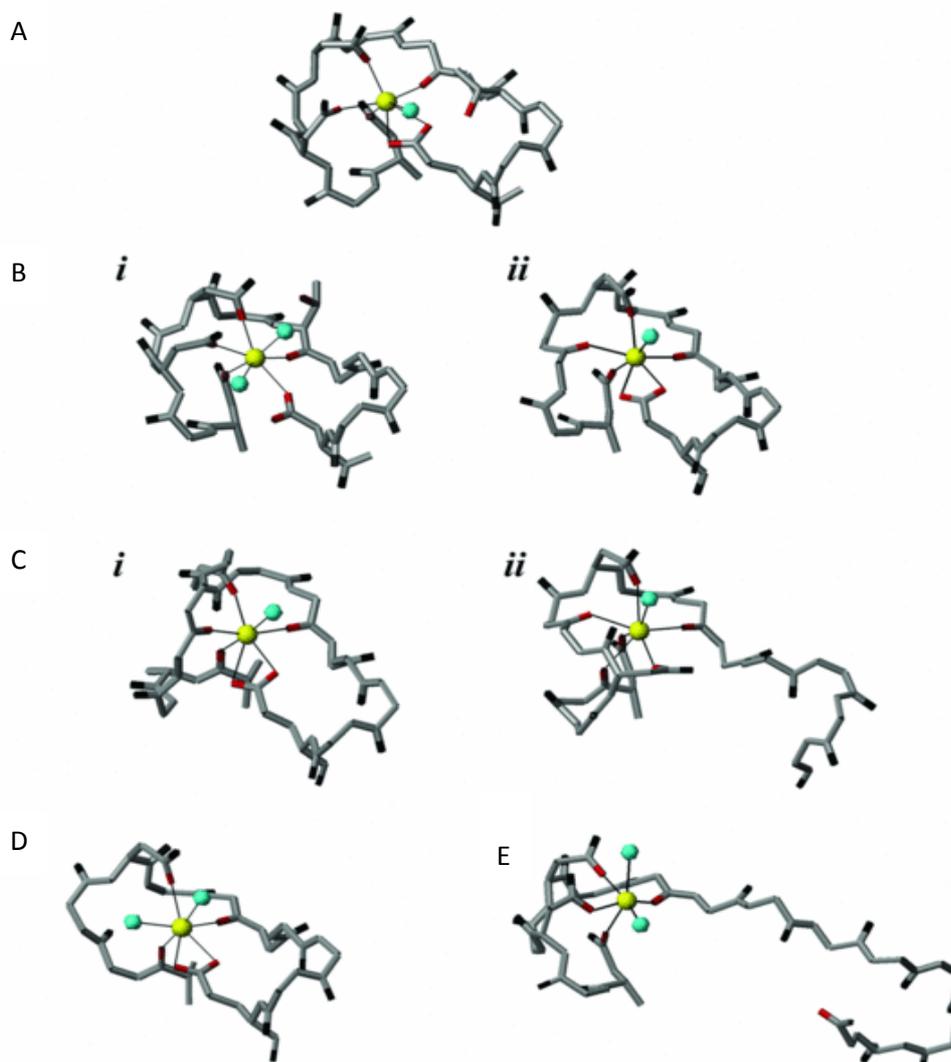
Le motif EF-hand non-canonique qui fait partie de ce sous-groupe est le simple motif EF-hand fonctionnel trouvé dans l'ELC (Chaîne Légère Essentielle) de myosine de coquille sont de certains mollusques de la famille des pectinidés (*Argopecten irradians*) qui comporte aussi les coquilles Saint-Jacques (Houdusse and Cohen 1996). La boucle du motif EF-hand 1 est peu commune pour les raisons suivantes :

- Bien que le nombre d'acides aspartiques dans la boucle soit significatif, ce sont majoritairement les groupements carbonyles de la chaîne principale qui fournissent des ligands coordonnant l'ion Ca^{2+} ; ceci est dû à leur séparation dans l'espace, peu commune.
- La substitution de la lysine de l'extrémité C-terminale par un acide glutamique est compensée par une insertion de deux résidus après le premier ligand, permettant la coordination de l'ion Ca^{2+} entièrement par l'extrémité N-terminale de la boucle.
- Les deux ligands finaux sont procurés par les deux chaînes latérales de l'hélice entrante au lieu d'être fournis par le carboxyle de l'acide glutamique de l'hélice spirale sortante.

c) Troisième groupe de boucles non-canoniques dans les motifs EF-hand

Les membres du troisième groupe de boucles non-canoniques forment des motifs rares. Actuellement il n'y a qu'un seul exemple d'une boucle de chélation de l'ion Ca^{2+} plus courte que celle du motif EF-hand canonique. La boucle des onze résidus du motif EF-hand1 pour la plupart des membres de la sous-famille de protéines est un domaine penta-EF-hand (**Figure 8C**). Dans ces boucles, comme pour les autres boucles mentionnées ci-dessus, le manque de chaînes latérales prototypiques en positions X et Y est compensé par une conformation alternative de la boucle permettant à l'atome d'oxygène d'un groupement carbonyle de la chaîne principale d'agir en tant que ligand de coordination de l'ion Ca^{2+} par l'intermédiaire de liaisons hydrogène impliquant une molécule d'eau (Blanchard et al. 1997).

La boucle d'un motif EF-hand non-canonique peut abandonner la coordination bipyramidale pentagonale en coordonnant l'ion Ca^{2+} selon une géométrie octaédrique. Cet arrangement a été observé dans le motif EF-hand 5 de la protéine ALG-2 (apoptosis-linked gene-2) (**Figure 8D**). La boucle de ce motif EF-hand comme pour tous les membres connus de la sous-famille de protéines à domaine penta-EF-hand contient une insertion de deux résidus au niveau de l'extrémité C-terminale qui inactive le site, à l'exception de la protéine ALG-2 (Tarabykina et al. 2000). Dans l'exemple de la protéine ALG-2, comme le ligand potentiel coordonnant l'ion Ca^{2+} est la glutamine qui est un résidu trop éloigné, il sera remplacé par une molécule d'eau ce qui implique une coordination de l'ion Ca^{2+} seulement par l'extrémité N-terminale selon une géométrie octaédrique (Jia et al. 2001). La conformation de cette boucle EF-hand empêche les ligands de l'extrémité C-terminale de participer au modèle de coordination.



CIB	: Calcium and Integrin Binding Protein
AtCLB2	: <i>Arabidopsis thaliana</i> Calcineurin B-like Protein
Myosine ELC	: Myosin Essential Light Chain
ALG-2	: Apoptosis-Linked Gene-2

Figure 8: Présentation des différents types de boucle canonique et non canonique.

A) Boucle canonique du motif EF1 de la CaM (PDB : 1EXR). B) Boucles non canoniques représentant le premier groupe. *i*, le motif EF3 de la CIB (PDB : 1XO5) ; *ii*, le motif EF4 de l'AtCBL2 ayant une lysine en position +Y (PDB : 1UHN). C) Boucles non canoniques ayant des insertions. *i*, le motif EF-hand de la calbindin D_{9k} (PDB : 3ICB) ; *ii*, le motif EF-hand de la myosine ELC (PDB : 1WDC). D) Boucle non canonique du domaine VI de la calpaine (PDB : 1DVI). E) Boucle non canonique du motif EF5 de l'ALG-2 ayant une géométrie octaédrique (PDB : 1HQV). En A-E) l'ion Ca²⁺ est représenté par une sphère jaune, les molécules d'eau par des sphères bleues. Les ligands chélatant l'ion Ca²⁺ sont en rouge. Les chaînes latérales des acides aminés sont en noir. Pour plus de clarté le résidu en position 9 qui chélate l'ion Ca²⁺ par l'intermédiaire d'une molécule d'eau n'est pas représenté dans les boucles de ces structures (Gifford et al. 2007).

C. Dimérisation du motif EF-hand

Dans les protéines de liaison du calcium, le domaine EF-hand se trouve généralement en paire préservant une distance de 11 Å entre les deux ions Ca^{2+} liés (Biekofsky and Feeney 1998) (**Figure 9**). Cette paire forme un ensemble de quatre hélices où les acides aminés amphipathiques se regroupent afin de former un noyau hydrophobe. L'intégrité structurale de la paire de motifs EF-hand est stabilisée par un court feuillet- β antiparallèle localisé entre les boucles des motifs EF-hands (Grabarek 2006). Quoique les deux motifs EF-hand d'un même domaine soient reliés par 2 axes de symétrie passant par le résidu en huitième position de la boucle (Strynadka and James 1989), ils ne sont pas identiques. La position d'un motif EF-hand dans une paire EF-hand est désignée en tant que « paire » ou « impaire ». Cette asymétrie se traduit par des différences d'affinité au niveau des sites de liaison du calcium, phénomène bien documenté pour la calmoduline (Evenas et al. 1998; Malmendal et al. 1999b) et la calbindin $\text{D}_{9\text{K}}$ (Akke et al. 1993; Maler et al. 2000).

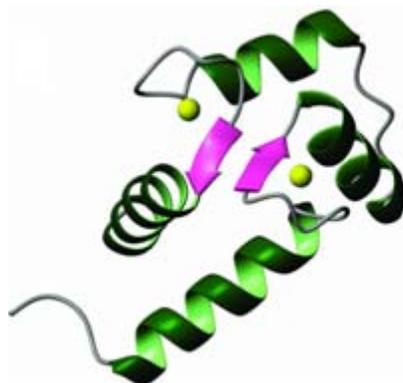


Figure 9: Paire de motifs EF-hand du domaine N-terminal de la Calmoduline.

Les feuillets- β reliant les résidus appartenant aux deux motifs EF-hand sont indiqués en rose (PDB : 1EXR) (Gifford et al. 2007).

L'appariement des motifs EF-hand est un phénomène dominant au sein de la superfamille de protéines à motifs EF-hand pour deux raisons :

- Il favorise la structuration des motifs EF-hand et donc augmente leur affinité (Grabarek 2006).

- Les deux motifs EF-hand au sein d'une paire sont asymétriques. Cette asymétrie est traduite par une coopérativité entre les deux motifs, par conséquent, elle influence les propriétés de liaison du calcium (Maler et al. 2000).

D. Organisation en domaines EF-hand pour une meilleure flexibilité moléculaire

Au cours de l'évolution des protéines de la super-famille des protéines à domaine EF-hand, la diversité en termes de séquence et de structure des motifs EF-hand a contribué à la diversification fonctionnelle que l'on observe aujourd'hui pour cette super-famille (Bhattacharya et al. 2004). Ces modifications subies au cours du temps résultent à la fois de **mutations ponctuelles non catastrophiques** (Figure 10: axe des abscisses) mais aussi d'**événements catastrophiques** (Figure 10: axe des ordonnées) tels que des duplications ou cross-overs inégaux qui ont changé l'organisation des inter-domaines (Nelson and Chazin 1998b).

L'organisation des inter-domaines dérive de deux étapes différentes constitutives de **l'évolution structurale** des protéines à domaine EF-hand (Kawasaki et al. 1998) :

- La **duplication du motif**, où les deux motifs EF-hand sont liés par un espaceur fonctionnel.
- L'**homodimérisation / hétérodimérisation** (Linse et al. 1993).

Le plus petit membre de la famille de protéines à motif EF-hand est la calbindin D_{9K}, une protéine de 9 kDa qui ne contient qu'une **unique paire de motifs** EF-hand.

Cependant, la plupart des protéines de la famille des protéines à motif EF-hand possèdent **deux paires de motifs**, chacune semblable à la paire de la calbindin D_{9K}. Trois arrangements différents des deux domaines ont été observés et dépendent de la conformation et de la longueur de l'espaceur liant les motifs EF-hand appariés :

- Les deux domaines globulaires indépendants se connectent par un **espaceur flexible**. Comme pour la calmoduline (Babu et al. 1985), la flexibilité de l'espaceur dans cet arrangement permet aux deux domaines EF-hand de s'orienter de

différentes façons permettant ainsi à la protéine de posséder plusieurs arrangements conformationnels pour interagir avec ses cibles.

- Dans la structure de la recoverine et d'autres membres de la sous-famille de NCS (Neuronal Ca^{2+} -Sensor), l'espaceur prend une **forme en « U »** positionnant les motifs EF-hand en tandem sur **une seule face** de la protéine avec les quatre motifs EF-hand formant une **structure compacte** (Ames et al. 1999). Ici, la disposition relative des domaines est définie par des contacts intra- et inter-domaines.
- Dans l'arrangement **globulaire compact** observé dans la structure de la NSCPs (Nereis diversicolor Sarcoplasmic Calcium-binding Protein) chez les invertébrés (Rabah et al. 2005) les deux paires de motifs EF-hand sont localisés sur des faces opposées de la molécule compacte.

Bien que la configuration la plus courante pour cette superfamille soit de deux paires de motifs EF-hand, il est également possible d'observer des organisations à base de trois paires de motifs. C'est le cas par exemple des membres de la superfamille des protéines à six motifs EF-hand, avec en particulier la protéine neuroprotective calbindin $\text{D}_{28\text{K}}$ et son homologue calretinin, ainsi que la sous-famille des protéines régulatrices du RE y compris le reticulocalbindin. Pour la calbindin $\text{D}_{28\text{K}}$ les trois paires de motifs EF-hand adoptent une conformation ellipsoïdale compacte (Kojetin et al. 2006).

Puisque les motifs EF-hand tendent à s'apparier, les exemples de protéines qui contiennent un nombre impair de domaine EF-hand sont rares. Cependant, une protéine ne disposant que d'**un seul motif EF-hand fonctionnel** a été trouvée au niveau de l'extrémité C-terminale de la sous-unité CaV1.2 du canal calcique voltage-dépendant. En dépit de la séquence non-canonique trouvée dans sa boucle EF-hand, ce motif est censé lier des cations bivalents (Brunet et al. 2005). Les parvalbumines, une sous-famille de protéines à trois motifs EF-hand, dispose d'un motif EF1 qui est pourtant non apparié et qui fonctionnellement ne lie pas le calcium. Il semble cependant avoir un rôle dans la stabilisation des motifs EF-hand 2 et 3 (Babini et al. 2005).

Une sous-famille entière de cinq motifs EF-hand favorise son auto-dimérisation en une unité structurale de dix motifs EF-hand fonctionnelle (Jia et al. 2000), le motif penta-EF-hand représente la principale unité structurale et le motif de dimérisation (Gifford et al. 2007).

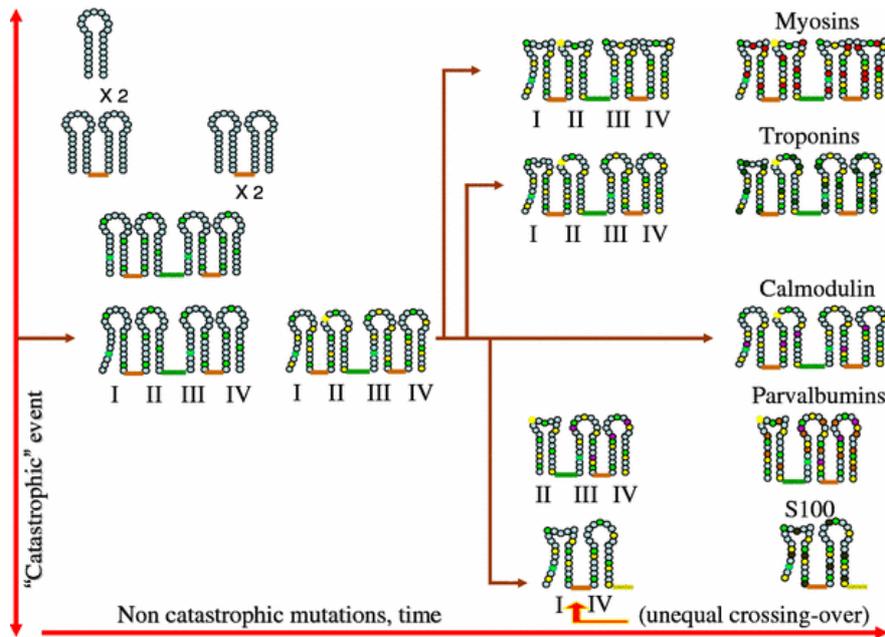


Figure 10: Représentation schématique des modifications subies par le motif EF-hand au cours de l'évolution.

La structure de ces protéines a évolué suite à des mutations non catastrophiques (représentées par un changement de couleur au niveau des résidus du motif) qui figurent le long de l'axe des abscisses ; et aussi par l'organisation des inter-domaines suite à des événements catastrophiques tels qu'une duplication ou un cross-over inégal (représentés le long de l'axe des ordonnées) pour la diversification des membres de la famille des protéines à motif EF-hand. (Capozzi et al. 2006).

E. Conséquences de la liaison du calcium sur la conformation des protéines de liaison du calcium

1. Changements conformationnels de motif EF-hand

Le paradigme de la régulation calcique par des **senseurs calciques** est décrit par la transition de la structure d'une protéine de la **forme « fermée »** vers la **forme « ouverte »** suite à la liaison du Ca^{2+} (**Figure 11**). De ce fait, il en résulte l'exposition d'une grande surface hydrophobe permettant à la protéine d'agir et de réguler la fonction de sa cible, tandis que la fixation d'ions Ca^{2+} par des protéines tampons calciques **«Ca⁺-buffer»** est accompagnée de changements conformationnels plus modestes (Akke and Chazin 2001).

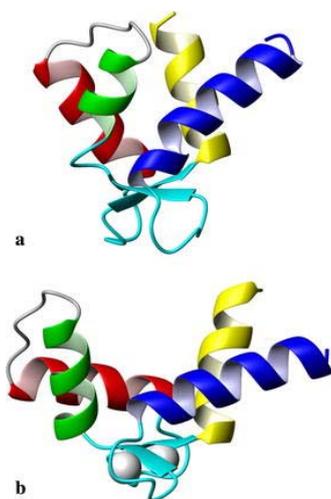


Figure 11: Représentation en rubans des structures des formes apo et holo du domaine N-terminal de la troponine squelettique C.

(a) la forme apo (PDB : 5TNC) et (b) forme holo (PDB : 1AVS). La plupart des protéines à domaine EF-hand subissent un réarrangement conformationnel en passant de forme apo à la forme holo, (Capozzi et al. 2006).

Les changements conformationnels induits par la fixation du calcium dans l'exemple de la calmoduline impliquent un réarrangement des hélices au sein de chaque domaine de la protéine, lui permettant ainsi de moduler ses propriétés structurales (Finn et al. 1995; Zhang et al. 1995). Selon le modèle « Herzberg-Moult-James » (HMJ) proposé par Herzberg et al. (Herzberg et al. 1986) qui est appliqué à la calmoduline, la forme apo est caractérisée par une disposition quasi antiparallèle (conformation fermée) des hélices de chaque domaine, tandis que la conformation ouverte (saturée en calcium) présente une disposition quasi orthogonale de ces hélices exposant vers la surface de la protéine les résidus méthionine (Houdusse et al. 1997; Kuboniwa et al. 1995), (**Figure 12**). Il a été conclu d'après les études structurales et biochimiques (Finn et al. 1993; Finn et al. 1995; Tan et al. 1996) du modèle HMJ, que les hélices des deux motifs EF-hand de chaque domaine doivent être douées d'une flexibilité inter-hélice significative.

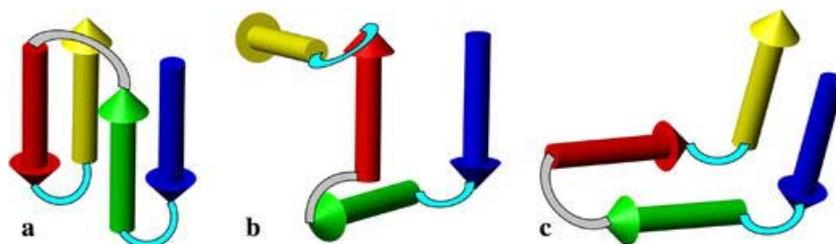


Figure 12: Représentations schématisées de l'arrangement de deux domaines EF-hand.

a) antiparallèle, b) orthogonal et c) chaise, correspondant respectivement aux conformations fermée, ouverte, et semi-ouverte, d'une même protéine. Les orientations réciproques des hélices (cylindres orientés) sont réalisées au moyen de mouvements des boucles (arcs en couleur cyan) et de l'espaceur (arcs gris), (Capozzi et al. 2006).

Certaines protéines à domaine EF-hand ne subissent cependant pas un changement conformationnel après fixation du calcium, ce qui semble exclure leur fonction régulatrice calcium-dépendante. Il a été proposé que de telles protéines dites les non-senseurs calciques « **non-sensor** », par exemple la calbindin D9k, fonctionnent comme des tampons calciques, contribuant à la **régulation du signal calcique** en modulant ses propriétés spatio-temporelles (Skelton et al. 1994).

(Nelson and Chazin 1998a) ont expliqué ces changements conformationnels des CaBPs par le biais d'un bilan énergétique en montrant que la fixation d'un ion Ca^{2+} dans une conformation fermée imposait des contraintes géométriques énergétiquement plus défavorables que les contraintes induites par l'exposition de chaînes latérales hydrophobes en conformation ouverte. Ces données expérimentales et théoriques semblent cohérentes avec les observations structurales des formes apo et holo de la calmoduline et d'autres senseurs calciques (Harris and Davidson 1994).

Ces mouvements structuraux sont décrits en terme de variations d'angles inter-hélices (Zhang et al. 1995) représentant les réarrangements complexes des interfaces formées par les quatre hélices d'un même domaine (**Figure 13**). La conformation d'un motif EF-hand est souvent caractérisée par ses angles inter-hélices, c'est à dire les angles formés entre les vecteurs définis par la moyenne des positions de 11 atomes appartenant au squelette protéique et qui sont localisés aux extrémités C et N terminales des hélices respectives.

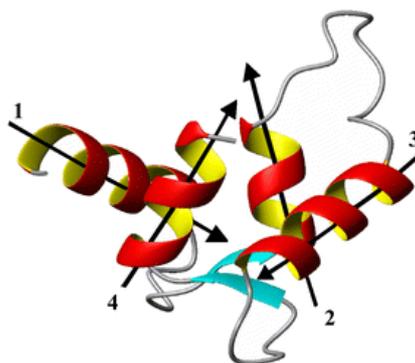


Figure 13: Représentation en rubans de la structure apo d'un domaine EF-hand.

Les réarrangements complexes au niveau des interfaces entre les quatre hélices (numérotées par ordre croissant de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale) sont décrits en terme de variations de six angles formés entre les quatre axes des hélices (indiqués par les flèches noires), (Capozzi et al. 2006).

En conséquence, les changements conformationnels induits par la fixation du calcium sur la calmoduline peuvent être décrits par une diminution de l'angle inter-hélice du motif EF-hand de 135° (quasi antiparallèle) jusqu'à 90° (quasi perpendiculaire) (Figure 13, axes (1, 2) et (3, 4)).

Une autre approche quantitative tridimensionnelle a été proposée par Yap et al. (Yap et al. 1999) pour analyser les structures cristallographiques par rayon X et RMN de 90 motifs EF-hand appartenant à 31 protéines à partir de l'orientation des hélices au sein du motif EF-hand. Les auteurs ont pu montrer d'après leur étude que les motifs EF-hand adoptent une multitude d'états conformationnels, constituant un « **continuum conformationnel** ». Une analyse plus récente d'une base de données contenant 307 domaines de paires de motifs EF-hand a montré une large distribution des angles inter-hélices (Babini et al. 2005) soulignant l'exceptionnelle **versatilité structurale** du motif EF-hand, apte à fonctionner dans des états conformationnels très différents.

2. Arrangement β du motif EF-hand : Interaction entre deux motifs EF hand par les feuilletts β

À un niveau moléculaire le changement conformationnel des protéines à motif EF-hand induit par l'ion Ca^{2+} semble être la conséquence de la chélation de cet ion par la boucle EF-hand. En fait, l'ion Ca^{2+} est coordonné à la boucle du motif EF-hand par des

ligands appartenant à l'extrémité N-terminale (1, 3, 5 et 7) (Kobayashi and Takada 2006), tandis que le résidu en position 12 est fourni par les ligands de l'extrémité C-terminale qui s'éloignent de centre de la sphère de coordination (**Figure 14**). Pour que la sphère de coordination de l'ion Ca^{2+} soit complète, l'hélice sortante doit se rapprocher de 2Å, un processus énergétiquement favorable qui engendre un changement conformationnel du motif EF-hand.

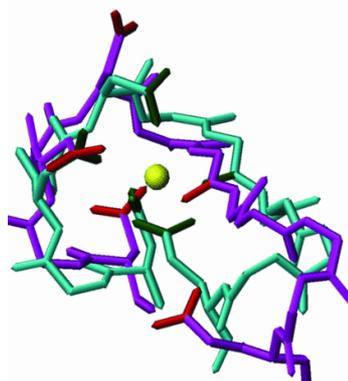


Figure 14: Changements structuraux de la boucle de coordination du calcium suite à la fixation du calcium.

La forme **apo** (mauve) de la boucle de coordination du motif EF-hand1 appartenant à la calmoduline avec les ligands calcium en rouge. La forme **holo** (turquoise) de la boucle de coordination du calcium avec les ligands calcium en vert. L'ion Ca^{2+} lié est représenté en jaune, et les molécules d'eau liant le calcium sont supprimées pour plus de clarté. Dans la structure apo, la majorité des ligands du bout N-terminal de la boucle sont en place pour lier le calcium. La différence majeure entre les deux structures est observée au niveau du résidu en position 12 la Glu, qui doit se déplacer de quelques angströms pour chélater le calcium (PDB: 1EXR), (Gifford et al. 2007).

Récemment, un intermédiaire conformationnel de la calmoduline correspondant au mutant (CaM41/75) ayant le domaine N-terminal bloqué dans une conformation *apo_like* par une liaison disulfure a été cristallisé en présence de calcium (Grabarek 2005). La structure cristalline montre que dans le domaine bloqué, le calcium interagit seulement avec l'extrémité N-terminale de la boucle de coordination de l'ion, alors que les ligands fournissant le Glu, en position 12, de l'extrémité C-terminale se trouvent éloignés de 2.0–3.6 Å, ne permettant pas une liaison entre oxygène et ion Ca^{2+} . D'après ces résultats, le changement conformationnel de la calmoduline lié au rapprochement du ligand Glu de l'ion Ca^{2+} a été mis en évidence. En dépit de la coordination « incomplète » de l'ion Ca^{2+} dans les deux boucles EF-hand selon une conformation fermée de la CaM41/75, les deux ions Ca^{2+} du domaine N-terminal bloqué se situaient à la même distance l'un de l'autre conformément à la structure native saturée en calcium de conformation ouverte (**Figure 15a**).

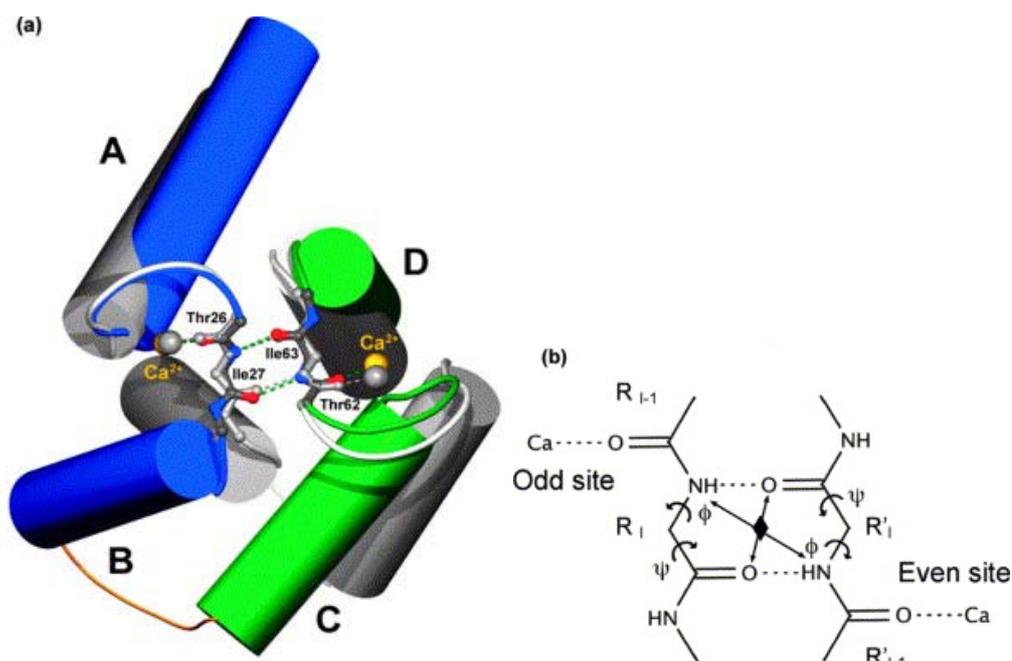


Figure 15: Modèle EFBS: EF-hand β -scaffold.

(a) Comparaison du domaine N-terminal de la calmoduline dans une conformation saturée en Ca^{2+} ouverte (PDB code 1CLL) avec la conformation intermédiaire fermée de CaM41/75 saturée en Ca^{2+} (PDB code 1Y6W). Le motif EF-hand 1 de la Calmoduline native est en bleu et l'EF-hand 2I est en vert. La structure de CaM41/75 est colorée en gris. Pour la superposition des deux structures les atomes du squelette peptidique de Thr26, d'Ile27, de Thr62 et d'Ile63 ont été utilisés (RMSD = 0.36 Å pour 16 atomes). Ces atomes forment la structure désignée sous le nom de l'arrangement EF-hand β -scaffold.

(b) Représentation schématique du motif EF-hand β -scaffold. Les boucles de liaison du calcium sont connectées par deux liaisons hydrogène entre les résidus hydrophobes localisés centralement R_i (Ile27 dans EF-hand 1 de la Calmoduline) et R'_i (Ile63 dans EF-hand 2 de la Calmoduline). Les atomes d'oxygène des groupements carbonyles des résidus R_{i-1} et R'_{i-1} sont les ligands invariables du Ca^{2+} . Les changements des angles de rotation du squelette peptidique dans les directions Φ , Ψ des résidus R_i et R'_i sont indiqués par les flèches. Le diamant noir indique le point d'intersection de deux axes de symétrie reliant les structures « impaire » et « paire » du domaine EF-hand. (Grabarek 2006).

Ces observations ont permis de conclure que la distance entre les deux ions Ca^{2+} liés au domaine EF-hand ne change pas pendant l'ouverture du domaine et que cette distance est déterminée principalement par le réseau de liaisons hydrogène assurant le positionnement du calcium et la stabilisation de la conformation.

Ce réseau de liaisons hydrogène au centre de la boucle de liaison du calcium implique l'atome d'oxygène du groupement carbonyle du squelette peptidique comme ligand invariable et les deux liaisons hydrogène du résidu adjacent faisant partie du court feuillet

β -antiparallèle, raison pour laquelle ce réseau de liaisons hydrogène est désigné sous le nom de **EF-hand β -scaffold** ou **modèle EFBS** (Figure 15b).

Ce modèle a été mis en évidence par des études de **RMN** et des calculs de **mécanique quantique** (Biekofsky et al. 1998; Biekofsky et al. 2004). Ces auteurs ont précisé que la charge positive de l'ion Ca^{2+} lié polarise le réseau de liaisons reliant les deux boucles et ils ont conclu que ce réseau polarisé favorise par la suite la formation d'une structure de résonance qui stabilise la forme saturée en calcium de la protéine et peut ainsi contribuer à la coopérativité des deux sites de liaisons du calcium.

En conclusion, le mécanisme de la liaison du calcium peut-être réalisé en deux étapes:

- la liaison du calcium sur l'extrémité N-terminale de la boucle génère tout d'abord un lien rigide entre l'hélice entrante et l'arrangement « EF-hand β -scaffold ».
- la flexibilité de torsion du squelette peptidique permet alors à l'hélice sortante de changer son orientation, ce qui permet notamment au ligand bidenté Glu de se déplacer de 2 Å pour compléter la sphère de coordination du calcium, tout ceci induisant ainsi les changements conformationnels décrits précédemment par (Grabarek 2005).

F. Déterminants de l'affinité du motif EF-hand pour le calcium

(Gifford et al. 2007) ont défini quatre facteurs déterminants pour la capacité des motifs EF-hand à lier le calcium (Figure 16).

Premier facteur (ΔG_{intr}): l'affinité intrinsèque pour le calcium de chaque motif EF-hand (ΔG_{intr}), qui reflète la contribution des ligands coordonnant l'ion Ca^{2+} et celle des interactions des autres résidus de la boucle.

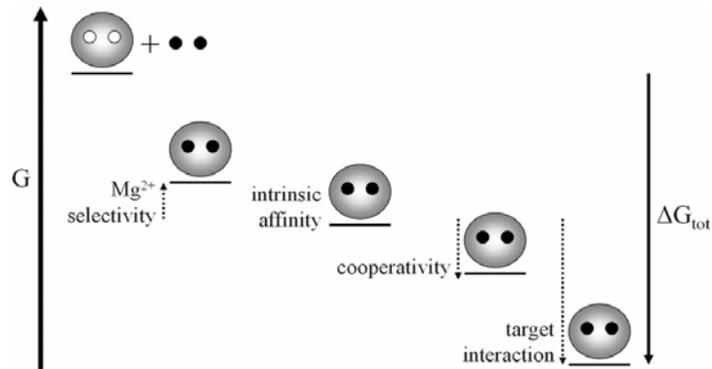


Figure 16: Schéma représentatif des déterminants majeurs de l'affinité du calcium observée (ΔG_{obs}). (Gifford et al. 2007).

Second facteur ($\Delta\Delta G_{\text{sel}}$): la **sélectivité** d'un motif EF-hand vis-à-vis des ions Mg^{2+} , cations chimiquement semblables aux ions Ca^{2+} et qui sont présents dans le cytosol en fortes concentrations.

Troisième facteur ($\Delta\Delta G_{\text{coop}}$): la **coopérativité**, un phénomène qui permet à une paire de motifs EF-hand de lier le calcium comme unité fonctionnelle, en dépit de toutes les différences d'affinité intrinsèque, créant ainsi une réponse rapide à une augmentation calcique.

Quatrième facteur ($\Delta\Delta G_{\text{interaction}}$) (ne concerne que les protéines à domaine EF-hand agissant en tant que senseurs calciques): il s'agit de l'interaction du senseur calcique avec sa cible. Il a été montré que la présence de la **cible peut moduler de manière significative l'affinité du motif EF-hand** pour le calcium (Haiech et al. 1981; Lukas et al. 1988).

Ces facteurs sont décrits comme des éléments énergétiques représentés par la variation de l'énergie totale de Gibbs (ΔG_{tot}) qui reflète la différence de l'affinité en présence et en absence de chaque élément désigné. En conséquence, le couplage énergétique de tous ces éléments reflète l'affinité observée (ΔG_{obs}) du motif EF-hand pour le calcium décrite comme suit :

$$\Delta G_{\text{obs}} = \Delta G_{\text{intr}} + \Delta\Delta G_{\text{sel}} + \Delta\Delta G_{\text{coop}} + \Delta\Delta G_{\text{interaction}} \quad (1)$$

Avec *obs*, *intr* et *sel* désignant respectivement *observée*, *interne* et *sélectivité*, *Coop* pour coopérativité des sites d'interaction et *Interaction* pour l'interaction avec une protéine cible, où

$$\Delta\Delta G_{\text{sel}} = \Delta G_{\text{tot, présence de Mg}} - \Delta G_{\text{tot, absence de Mg}}$$

1. Déterminants de l'affinité intrinsèque pour le calcium

Considérant la thermodynamique, l'affinité intrinsèque d'un motif EF-hand pour la liaison du calcium peut être déduite des équations suivantes:

$$\Delta G = - RT \ln K_a \quad (2)$$

Où R est la constante des gaz parfaits et T la température en degrés Kelvin

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (3)$$

Où ΔH et ΔS représentent respectivement les changements d'enthalpie et l'entropie du système. L'affinité intrinsèque du calcium est déterminée par la différence d'énergie libre de Gibbs (ΔG) entre les deux conformations apo et holo. Plus ΔG est grand et négatif, meilleure est l'affinité. En conséquence, à température constante, les phénomènes qui augmentent le ΔS ou diminuent ΔH entre les deux conformations devraient augmenter l'affinité (**Figure 17A**).

a) Contribution de l'entropie à l'affinité pour le calcium (ΔG_{intr})

Quand le calcium se lie à un motif EF-hand, une molécule d'eau "figée" dans sa sphère de coordination est libérée dans le solvant (Linse and Forsen 1995), phénomène entropiquement favorable. Cette variation d'entropie dépend du nombre de molécules d'eau échangées par les ligands de la protéine : plus le nombre de molécules d'eau "figée" est élevé, plus l'affinité est faible (**Figure 17A**).

L'entropie favorable dans l'équation (3) est contrebalancée par des facteurs défavorisant l'entropie de liaison du calcium aux domaines EF-hand comme la perte de l'entropie conformationnelle de la boucle et l'exposition des surfaces hydrophobes de la protéine.

Des données obtenues par RMN et cristallographie indiquent que la présence d'un triplet de glycine à l'extrémité N-terminale de la boucle du motif EF1 de la sTnC induit une structure flexible plus désordonnée, et par conséquent, une entropie libre conformationnelle plus stable que celle du motif EF2 (Li et al. 1995; Strynadka et al. 1997). Le fait de modifier la flexibilité de la boucle se traduit par une diminution de 10 fois de l'affinité par rapport à EF2 (Gagne et al. 1997) (**Figure 17B**).

b) Contribution de l'enthalpie à l'affinité pour les ions Ca^{2+}

L'enthalpie globale de liaison des cations bivalents peut être exothermique ($\Delta H < 0$) si elle est couplée à un processus enthalpiquement favorable tel que la formation de liaisons électrostatiques et des liaisons hydrogène au niveau de la boucle de coordination du calcium et la stabilisation des hélices (Gilli et al. 1998; Osawa et al. 2005; Yamniuk et al. 2004) qui s'établissent entre l'ion Ca^{2+} et les ligands de la boucle, particulièrement les ligands carboxylates.

Une hypothèse plus récente se rapportant à la nature des ligands de la boucle et de l'affinité de Ca^{2+} , selon un modèle désigné sous le nom de « **Charge-Ligand-Balanced Model** » (Ye et al. 2005) est basée sur des études réalisées sur des boucles EF-hand isolées de la calmoduline et qui sont greffées dans un cœur protéique. Ce modèle propose que les déterminants majeurs de l'affinité intrinsèque pour l'ion Ca^{2+} sont définis par les résidus ne coordonnant pas l'ion Ca^{2+} et par le nombre de groupes chargés négativement chélatant le calcium. Dans la boucle, les interactions qui contribuent favorablement au changement enthalpique de la liaison du calcium incluent les liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques. Cinétiquement, les charges de surface à proximité du site de liaison du calcium sont supposées influencer la vitesse de fixation du calcium, modulant elles aussi l'affinité du domaine EF-hand pour le calcium (Linse et al. 1988).

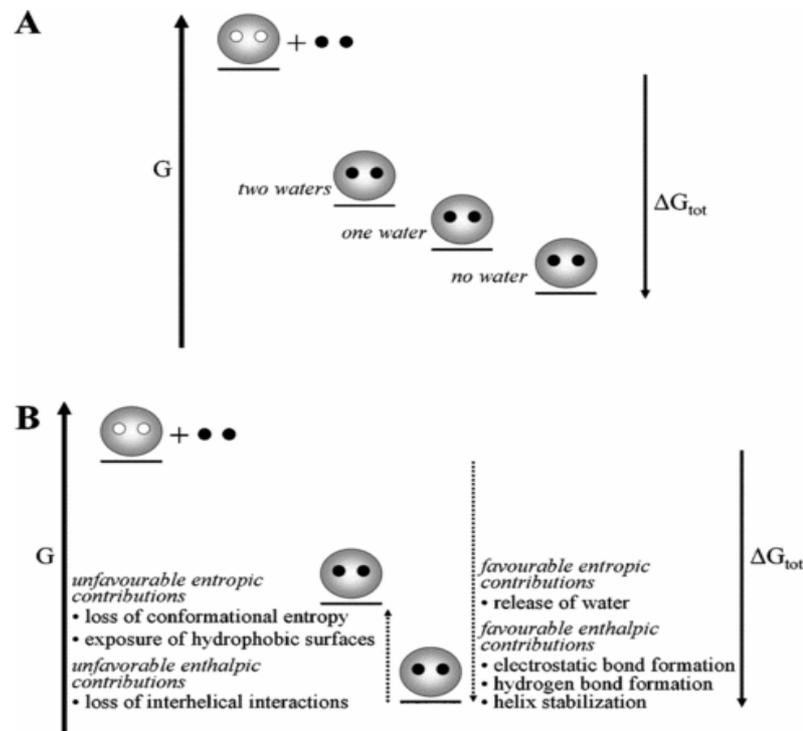


Figure 17: Propriétés intrinsèques des motifs EF-hand pour la liaison du calcium.

A) Effet des molécules d'eau dans la sphère de coordination sur l'affinité du calcium (ΔG_{obs}). B) Effets des facteurs entropiques et enthalpiques favorables ou non-favorables sur la liaison du calcium, (Gifford et al. 2007).

L'effet de l'hélicité des chaînes formant le motif EF-hand sur l'enthalpie de liaison du calcium a été mis en évidence par de nombreuses études, notamment, les études d'interaction des fragments peptidiques correspondant au CaMBD avec la calmoduline (Marsden et al. 1990; Reid et al. 1981). Dans ces études, il a été démontré que l'hélicité des chaînes d'acides aminés formant le motif EF-hand influence l'enthalpie de liaison de l'ion calcium. Comme la force électrostatique est inversement proportionnelle à la polarité du site de liaison de l'ion calcium, Sekharudu et Sundaralingam ont montré que l'hydrophobicité des hélices α et de la boucle formant le motif EF-hand, contribuent à l'environnement diélectrique du site d'interaction (Sekharudu and Sundaralingam 1988). Cette hydrophobicité élevée des hélices stabilise le coeur de la protéine favorisant l'enthalpie de liaison du Ca^{2+} et menant ainsi à une augmentation de l'affinité du site pour le calcium (Kragelund et al. 1998). D'après les travaux de (Nicholson et al. 1988), il a été démontré

que les interactions favorables entre les dipôles des hélices contribuent à une variation enthalpique négative.

Finalement, les interactions inter-hélices sont des déterminants énergétiquement non favorables sur l'enthalpie de liaison du calcium surtout pour les protéines qui subissent des changements conformationnels considérables suite à la fixation du calcium. Ces interactions sont favorables dans la forme apo des protéines à motif EF-hand puisque les hélices adjacentes se disposent selon une orientation antiparallèle dans laquelle les surfaces de contact sont plus importantes, ce qui favorise les interactions électrostatiques dues aux orientations des dipôles des hélices (Ababou and Desjarlais 2001; Gagne et al. 1997).

c) Sélectivité pour le magnésium ($\Delta\Delta G_{sel}$)

Dans la cellule, le motif EF-hand lie sélectivement l'ion Ca^{2+} en présence d'ions K^+ et Na^+ qui se trouvent pourtant dans des concentrations 10^3 à 10^5 fois plus élevées que celui-ci. Cette sélectivité a été expliquée par le modèle électrostatique de répulsion (Falke et al. 1991), qui suppose que la charge négative de la sphère de coordination de la boucle d'un motif EF-hand est adaptée pour les **cations bivalents**, ce qui n'est pas le cas pour les **cations univalents** auxquels il manque une charge positive pour stabiliser la répulsion entre les atomes d'oxygène chargés négativement (ligands du Ca^{2+}). En raison de leurs charges positives, l'ion Ca^{2+} et d'autres cations bivalents peuvent équilibrer cette répulsion O-O. Le magnésium, qui se trouve à une concentration libre élevée dans la cellule (0.5-2.0 mM), peut entrer en compétition avec le calcium, ce qui module l'affinité observée de certaines protéines à motif EF-hand (Ebel and Gunther 1980).

La **sélectivité** des sites spécifiques du calcium est fournie par deux propriétés distinctes (Martin et al. 1990) :

- le **rayon ionique** de l'ion Mg^{2+} (0.64 Å) plus petit celui de l'ion Ca^{2+} (0.97 Å), qui occupe un volume ionique inférieur de 47% comparé à celui de l'ion Ca^{2+} ce qui exige une énergie de déshydratation plus élevée.
- la liaison de l'ion Mg^{2+} au niveau de la boucle du motif EF-hand est coordonnée pour six ligands arrangés selon une **géométrie octaédrique**.

En contrôlant la flexibilité de ces ligands, les motifs EF-hand peuvent exclure l'ion Mg^{2+} en empêchant la **coordination sextuple requise** ou la formation préférée d'une petite sphère de coordination de l'ion Mg^{2+} .

En dépit de ces mécanismes de sélectivité, dans une cellule au repos lorsque la concentration en magnésium est élevée, les motifs EF-hands sont probablement occupés par l'ion Mg^{2+} . Les études de RMN indiquent que les domaines EF-hand de la calmoduline lient l'ion Mg^{2+} avec des constantes de dissociation de l'ordre du millimolaire (Ohki et al. 1997), ce qui implique que la protéine est saturée à 50% avec le magnésium lorsque la concentration du calcium cytosolique est de l'ordre du nanomolaire (Haiech et al. 1981; Malmendal et al. 1998). Bien que l'ion Mg^{2+} se lie aux sites spécifiques de l'ion Ca^{2+} , il est coordonné par les ligands de l'extrémité N-terminale de la boucle (1, 3, 5 et 7), sans engagement des résidus de l'extrémité C-terminale de la boucle, ni le douzième résidu critique. La liaison du magnésium n'affecte pas la conformation globale du motif EF-hand, et la structure du complexe Mg^{2+} -Calmoduline est quasi identique à celle de l'apo-calmoduline (Ohki et al. 1997), mais la conformation locale dans la boucle du motif EF-hand est rigidifiée et par conséquent ces sites d'interaction restent inactifs « OFF ».

d) Fonctions du magnésium

Il se lie aux sites de liaisons Ca^{2+}/Mg^{2+} , comme par exemple le domaine C-terminal de la Troponine (Zot and Potter, 1982). Étant un compétiteur potentiel des sites d'interaction du calcium, le magnésium, en se liant au motif EF-hand, peut moduler l'affinité des sites pour le calcium. Quoiqu'il ne soit pas coordonné par le résidu en position 12, l'ion Mg^{2+} peut réduire la vitesse d'association de l'ion Ca^{2+} au niveau de son site EF-hand d'interaction ce qui implique une réponse calcique retardée (Derancourt et al. 1978; Malmendal et al. 1999b).

Finalement l'ion Mg^{2+} peut se lier sur des sites de liaison remplissant des fonctions différentes de celles de l'ion Ca^{2+} . Il a été suggéré que le simple motif EF-hand appartenant au domaine cytoplasmique C-terminal du canal CaV 1.2 des cardiomyocytes, lie spécifiquement le magnésium, inhibant ainsi la conductance calcique et par conséquence régulant les fonctions contractiles du cœur induites par le stress (Brunet et al. 2005).

e) Coopérativité des motifs EF-hand ($\Delta\Delta G_{coop}$)

Beaucoup de protéines à motif EF-hand lient le calcium avec une coopérativité positive, c'est à dire que la liaison d'un ion Ca^{2+} sur le premier site augmente l'affinité pour le calcium du second site. Ce phénomène augmente la sensibilité des senseurs calciques d'un domaine pour détecter de faibles variations de la concentration en calcium et permet ainsi de mieux contrôler des réponses physiologiques.

La coopérativité positive est définie en termes d'énergie libre où $\Delta\Delta G_{coop}$ et reflète la différence d'affinité d'un site en présence et absence d'un ion Ca^{2+} dans le second site (Figure 18), (Linse et al. 1991).

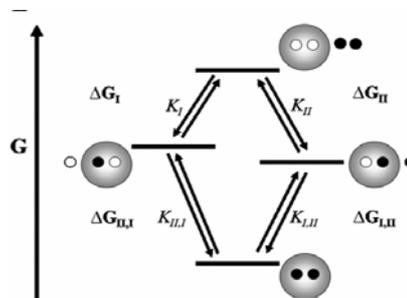


Figure 18: Différentes voies réactionnelles de la liaison du calcium sur une paire de motif EF-hand.

Les voies réactionnelles sont représentées avec les ΔG et constantes d'affinité correspondant, (Gifford et al. 2007).

$$\Delta\Delta G_{coop} = \Delta G_{(I, II)} - \Delta G_{(I)} = \Delta G_{(II, I)} - \Delta G_{(II)} \text{ (Akke et al. 1991)}$$

Comme la majorité des protéines sont asymétriques :

$$\Delta G_{(I, II)} \neq \Delta G_{(II, I)} \text{ et } \Delta G_{(I)} \neq \Delta G_{(II)} \text{ et } \Delta G_{(I, II)} - \Delta G_{(II)} \neq \Delta G_{(II, I)} - \Delta G_{(I)}$$

Le $\Delta\Delta G_{coop}$ représente l'affinité observée de l'ion via les constantes microscopiques de liaison dans l'équation suivante, où K_I et K_{II} sont les constantes intrinsèques d'affinité :

$$\Delta\Delta G_{coop} = -RT \ln (K_{II, I} / K_{II}) = -RT \ln (K_{I, II} / K_I)$$

$\Delta\Delta G_{coop}$ est l'énergie libre des interactions inter-site, appelés aussi couplages des sites.

Si le deuxième ion se fixe avec une affinité plus élevée que celle du premier site, $\Delta\Delta G_{coop}$ est négatif, indiquant une coopérativité positive (Linse and Forsen 1995).

2. Effets conformationnels : changements de structure et de dynamique

La coopérativité induit des effets conformationnels structuraux et dynamiques :

Les effets structuraux sont dominés par les facteurs enthalpiques. La liaison du premier ion Ca^{2+} implique la réorganisation structurale associée aux changements du cœur protéique ainsi que la préformation de la boucle partenaire (Akke et al. 1995; Malmendal et al. 1999a). Lors de la liaison du deuxième ion Ca^{2+} , les déplacements chimiques sont observés au niveau du squelette peptidique des résidus impliqués dans la coordination de l'ion Ca^{2+} (Evenas et al. 1998).

D'après des études de RMN, il a été conclu que les effets dynamiques de la coopérativité positive sont dominés par les facteurs entropiques (Forsen et al. 1991) tels que les changements de la flexibilité des boucles-EF et des mouvements internes des deux cœurs du domaine EF-hand (Akke et al. 1991; Tjandra et al. 1995). Dans l'état "apo", la structure du domaine est très dynamique ; cette flexibilité permet à la protéine d'adopter plusieurs conformations de faibles affinités pour le calcium. Lors de la fixation du premier ion Ca^{2+} , la dynamique du squelette peptidique diminue essentiellement pour atteindre un niveau similaire à celui du conformère saturé par les ions Ca^{2+} . Puisque la flexibilité des boucles et les fluctuations structurales internes diminuent, les deux motifs EF-hand se trouvent figés dans une conformation ouverte "holo" (Maler et al. 2000; Marchand and Roux 1998).

Cependant, les études de RMN réalisées par Akke et coll. (Akke et al. 1991; Akke et al. 1993; Skelton et al. 1992) ont montré que la fixation du premier ion Ca^{2+} par rapport à la liaison du deuxième ion Ca^{2+} implique des échanges énergétiques considérables :

- enthalpiques en raison de la réorganisation de la structure.
- entropiques dus à la perte de flexibilité (et donc de degrés de liberté).

3. Mécanisme moléculaire de la coopérativité positive

Le modèle de Biekofsky a été proposé pour l'étude du mécanisme moléculaire de la coopérativité positive. Il implique les résidus 7 et 8 du court feuillet- β antiparallèle formé entre les deux motifs EF-hand, ainsi que le Glu12 de chaque boucle de coordination du calcium (Biekofsky et al. 1998) (**Figure 19**). Il semble que les deux sites de liaison du calcium communiquent par l'intermédiaire des liaisons hydrogène qui contribuent à la formation même du feuillet- β (Marchand and Roux 1998). Dans la majorité des motifs EF-hand, les deux liaisons hydrogène formant ce feuillet- β ont été observées dans les deux formes apo et holo. Cependant, dans la forme apo, ces deux liaisons fluctuent de manière significative, contrairement à la forme holo où elles sont rigides. L'augmentation de stabilité est due à un champ électrique interne créé par un réseau cyclique de deux chaînes antiparallèles formées par les liaisons hydrogène du feuillet- β , les deux ions Ca^{2+} et les groupements carboxylates du résidu 12 appartenant aux deux sites de liaison (Biekofsky and Feeney 1998). Lors de la coordination de l'ion Ca^{2+} , la charge positive du cation favorise le dipôle induit au niveau des deux boucles, stabilisant ainsi les deux feuillets- β et augmentant la force du champ électrique interne de la boucle. En raison de sa nature antiparallèle, l'appariement de deux chaînes en feuillet- β est également stabilisé et permet à la chaîne latérale du Glu12 de se positionner dans le site de liaison afin de coordonner le deuxième ion Ca^{2+} . Ainsi la liaison d'un ion stabilise la conformation appropriée au moins de deux ligands de l'autre boucle-EF qui sont l'oxygène du groupement carbonyle du résidu en position 7 et un des deux atome d'oxygène du groupement carboxyle de Glu12.

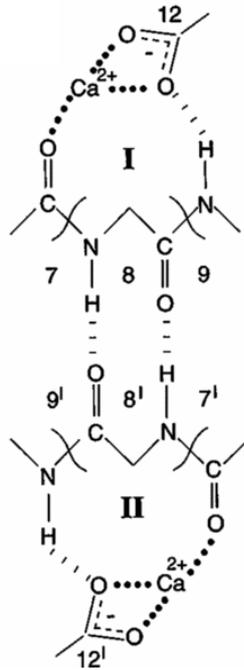


Figure 19: Modèle de liaison du calcium avec une coopérativité positive entre deux motifs EF-hand.

Ce modèle montre les deux feuillets β entre les résidus 7 et 8 des deux boucles. Les liaisons hydrogène et les deux dipôles d'interaction sont indiqués en pointillé sur la figure (Biekofsky and Feeney 1998).

III. La calmoduline, une calciprotéine multifonctionnelle

A. Introduction

La calmoduline (**CaM**) a été découverte par Cheung (Cheung 1970) et Kakiuchi (Kakiuchi and Yamazaki 1970) comme **activateur de la phosphodiesterase** cyclique du cerveau. La même année, Kakiuchi et Yamazaki révélèrent l'importance du calcium dans ce système. La première purification de cet activateur remonte à 1973 (Teo et al. 1973). Ils démontrèrent qu'il s'agissait d'une protéine capable de lier le calcium puis déterminèrent l'affinité de la calmoduline bovine du muscle cardiaque pour le calcium ($K_D \sim 1-10 \mu\text{M}$) (Teo and Wang 1973).

En 1975, Brostrom et coll. (Brostrom et al. 1975) montrèrent que cette protéine est un **activateur de l'adénylate cyclase cérébrale**. Les résultats obtenus dans les années 1975-79 montrent que la calmoduline opère un changement conformationnel très important après fixation de deux ions Ca^{2+} dans des conditions où l'on observe une apparente coopérativité positive entre les deux premiers sites occupés par le calcium. Par la suite d'autres cibles ont été identifiées telles que le transporteur Ca^{2+} -ATPase (Gopinath and Vincenzi 1977; Jarrett and Penniston 1977), la kinase de la chaîne légère la myosine (MLCK) (Yazawa and Yagi 1977) la phosphorylase kinase (Cohen et al. 1978) et la calcineurine (Klee and Haiech 1980). La calmoduline du cerveau de bœuf fut la première à être séquencée par Watterson et ses collaborateurs (Watterson et al. 1980). Enfin, en 1980, la calmoduline a été cristallisée pour la première fois (Cook et al. 1980; Kretsinger 1980).

Dans un souci d'intégrer les multiples régulations de la calmoduline, (Haiech et al. 1981) ont émis en 1980 le concept du **calcisome**, un complexe supramoléculaire réalisant une fonction cellulaire régulée par le calcium. L'ADN complémentaire de la calmoduline humaine a été isolé en 1984 (Wawrzynczak and Perham 1984).

En 1985 les gènes codant pour les calmodulines de poulet (Simmen et al. 1985) et de *Xenopus leavis* (Chien and Dawid 1984) ont été isolés. En 1986, la délétion du gène de la calmoduline de levure a été montrée létale par Davis et coll. (Davis et al. 1986), à cause

de son vaste réseau d'interaction et son implication dans des processus métaboliques différents.

La calmoduline est une des protéines les plus conservée avec 100 % d'identité de séquence chez les vertébrés (Friedberg and Rhoads 2001). C'est une protéine relativement petite de 148 résidus acides aminés (calmoduline des vertébrés), 16,7 kDa et son pI est de 4,6 (Yamniuk et al. 2004).

Il y a 500 millions d'années un gène ancestral commun a donné lieu à trois gènes pour l'ensemble des vertébrés. Les mammifères et les poissons sont séparés par 450 millions d'années et les oiseaux sont séparés des mammifères par 150 millions d'années. Les mammifères (y compris *Homo sapiens*) conservent les trois gènes qui codent pour la calmoduline avec 100% d'identité de séquence. Les grenouilles et les oiseaux ont quant à eux perdu deux gènes parmi les trois. D'autre part le génome du poisson zèbre (*Teleost zebrafish*) contient six gènes qui dérivent des trois précurseurs, et tous produisent eux-aussi une protéine identique à celle des vertébrés avec 100% d'identité de séquence (Friedberg and Taliaferro 2005). Quelques substitutions qui ont été conservées au cours de l'évolution se sont cependant produites chez les levures, les plantes et les invertébrés mais la séquence en acides aminés de *C. elegans* partage malgré tout 96% d'identité avec la forme des vertébrés. Quant à *Arabidopsis thaliana*, l'organisme ne contient pas moins de sept gènes codant pour quatre isoformes qui partagent 89% d'identité avec la séquence de la calmoduline des vertébrés (McCormack et al. 2005).

La calmoduline est le prototype le plus étudié de la famille des CaBPs à motif EF-hand (Yap et al. 1999). La liaison du calcium à cette protéine induit des états conformationnels (Evenas et al. 1998) variés qui rendent la protéine spécifiquement active pour chacune de ses cibles (Haiech et al. 1988; Ikura 1996).

La calmoduline est médiateur du signal calcique et régulateur de l'activité fonctionnelle et structurale de nombreuses cibles (**Tableau 2**) dont le nombre excède 100 (Yap et al. 2000) incluant des transporteurs ioniques tels que IP3R (Michikawa et al. 1999), RYR (Carafoli 2003; Tang et al. 2002), PMCA (Carafoli 2003), le canal calcique L-type

(Zuhlke et al. 1999) et certaines enzymes bactériennes infectieuses tels que l'adénylate cyclase de *Bacillus anthracis* et *Bordetella pertussis*, (Collier and Young 2003).

Calmoduline	Cibles fonctionnelles	Références	année
	Myosine de la chaîne légère	Yawaza et Yagi	1977
	Kinase Calmoduline- dépendante	Lukas	1999
	Phosphorylase Kinase	Cohen et al.	1978
	Substrat Myristoylé de la Protéine KinaseC	Matsubara et al.	2004
	Calcineurine	Klee et al	1978, 1998
	Adénylate cyclase	Drum et al.	2002
	Glutamate carboxylase	Yap et al.	2003
	Synthase de l'oxyde nitrique	Stuehr et al.	1991
	Phosphodiesterase	Cheung	1970
		Kakiuchi et Yamakazi	1970
	Ca ²⁺ -ATPase de la membrane plasmique	Crafoli	1997
	Canal SK	Schumacher et al.	2001
	Canal Ca ²⁺ voltage dépendent	Huhlke et al.	1999
	Ins(1.4 .5)P ₃ R	Michikawa et al.	1999
	RyR	Tang et al.	2002
	Récepteurs à l'œstrogène α et β	Li et Sacks	2007

Tableau 2: La calmoduline et ses cibles fonctionnelles.

(Ikura and Ames 2006).

La calmoduline est impliquée dans plusieurs processus cellulaires (**Tableau 3**) tels que le métabolisme du glycogène, la motilité cellulaire, le transport calcique, le métabolisme des nucléotides cycliques, la phosphorylation et la déphosphorylation des protéines, le cycle cellulaire, la régulation de l'expression de gène.

Mouvement cellulaire

Motilité cellulaire :

Contraction des muscles lisses et activité APTasique de l'actomyosine des cellules non musculaires : kinases des chaînes légères de la myosine.

Cytosquelette : polymérisation des microtubules - Caldesmon

Mitose

Mécanismes sécrétoires

Sécrétion ionique de l'intestin

Sécrétion des neurotransmetteurs

Sécrétion de l'insuline

Endocytose

Polymérisation de la clathrine

Production énergétique

Métabolisme du glycogène : phosphorylase b kinase et inhibiteur de la glycogène synthétase kinase

Modulation des messagers intracellulaires

Métabolisme des nucléotides cycliques

Synthèse : adénylate cyclase (cerveau, ilots pancréatiques de Langerhans)

Dégradation : phosphodiesterase

Flux calciques

Pompes calciques des membranes plasmiques :ATPase calcium-dépendante

Pompes calciques du réticulum sarcoplasmique cardiaque : kinase du phospholamban

Phosphorylation de protéines

Kinases calcium et Calmoduline dépendantes
 Métabolisme de la sérotonine et de la dopamine
 Régulation de nombre de récepteurs muscariniques
 Phosphatases
 Activation de la calcineurine

Tableau 3: Certaines fonctions cellulaires et enzymes dépendant de la calmoduline.

B. Localisation, mobilité et translocation cellulaire

La calmoduline représente au moins 0.1 % de la quantité totale de protéines cellulaires c'est-à-dire l'équivalent d'une concentration qui varie entre 1 μM et 10 μM . Elle est fortement exprimée pendant la division cellulaire et la différenciation. La localisation de la calmoduline a été explorée par Hahn (Hahn et al. 1992) et par Craske (Craske et al. 1999).

En 1999, des expériences réalisées sur des cellules Hela exprimant la calmoduline fusionnée à la GFP montre que la calmoduline est localisée dans le noyau et le cytosol et qu'elle se concentre autour de l'appareil mitotique pendant la mitose cellulaire particulièrement autour des centrioles et du fuseau cytoplasmique pendant le cytokinèse (Li et al. 1999). En 1998, Diesseroth (Diesseroth et al. 1998) a montré que la calmoduline transloque dans le noyau. En 1999 Liao (Liao et al. 1999) a décrit le mécanisme de translocation par diffusion passive de la calmoduline dans le noyau des cellules acinaires pancréatiques.

Des études réalisées en 1998 par Török (Torok et al. 1998) sur les œufs d'oursin en mitose, indiquent que la distribution spatiale du calcium est différente de celle du complexe Ca^{2+} -calmoduline. Par conséquent l'activation de la calmoduline par le calcium montre une distribution hétérogène dans la cellule. Ces études soulignent l'importance des rapports temporels et spatiaux entre les signaux du calcium et la fonction de la calmoduline.

Afin de déchiffrer le rôle cellulaire de la calmoduline modulé par le calcium, nous présentons dans ce chapitre un aperçu sur ses propriétés structurales et conformationnelles liées à sa capacité de fixer le calcium, nous présentons les principales cibles et antagonistes connus de la calmoduline ainsi que sa plasticité conformationnelle impliquée dans ses mécanismes moléculaires pour la reconnaissance de ces cibles.

C. Sites de liaison du calcium

La calmoduline est le prototype le plus étudié de la famille des protéines à motif EF-hand. Elle est composée de quatre motifs EF-hand canonique.

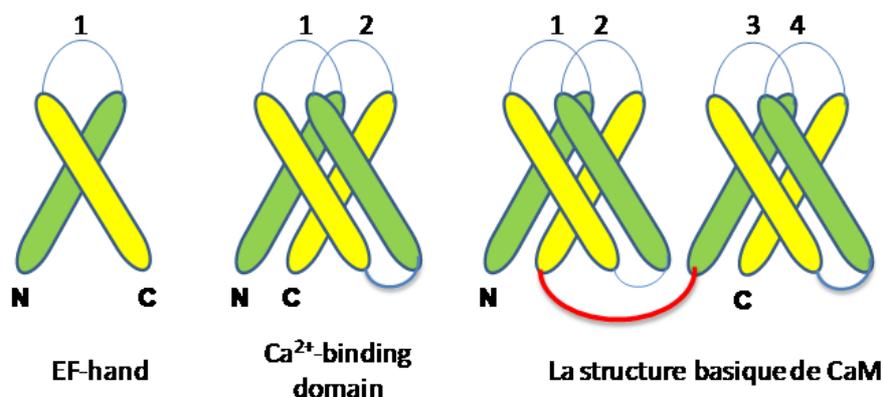


Figure 20: Structure hiérarchique des motifs EF-hand dans le prototype calmoduline.

Les motifs EF-hand s'organisent en deux paires dont une est désignée sous le nom domaine N-term et l'autre C-term. Un espaceur (en rouge) relie l'extrémité C-term du premier domaine (EF2) à l'extrémité N-term du second domaine (EF3). Les hélices sont représentées par des barres. Les motifs EF-hand sont numérotés et N et C indiquent les extrémités terminales (Schaub and Heizmann 2008).

En se basant sur l'alignement de séquences de nucléotides et d'acides aminés, il s'avère que la structure de calmoduline a été obtenue à la suite de deux duplications de gènes et leur fusion (**Figure 20**) et les motifs EF1, EF3 et EF2, EF4 ont une homologie de séquences élevée (Friedberg and Rhoads 2001).

```
MADQLTE
EQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQN PTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDT
DSEEEIREAFRVFDKDGNGYLSAAELRHVMTNLGKELTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK
```

X : motif EF-hand 1
X : motif EF-hand 2
X : motif EF-hand 3
X : motif EF-hand 4
X : liaison au calcium

Figure 21 : Séquence de la calmoduline humaine.

(Uniprot: **P62158**)

Chaque motif EF-hand est composé de 36 acides aminés. Les résidus 1-12 forment l'**hélice α entrante (E)**, les résidus 13-24 représentent la boucle canonique et les résidus 25-36 forment l'**hélice α sortante (F)**. La liaison du calcium s'effectue selon une géométrie pentagonale bipyramidale dans laquelle six ligands appartenant à la boucle canonique chélatent le calcium, le septième étant substitué par une molécule d'eau. La séquence consensus des 12 résidus des quatre sites EF-hand est représentée par le motif : DxDGDGTlxxxE (**Figure 21**). Les motifs EF-hand s'organisent en paire formant ainsi deux domaines N et C-term. Ces deux domaines sont respectivement constitués des motifs EF-hand I, II et III, IV et sont liés par un espaceur flexible. Cet appariement favorise la coopérativité positive de la liaison du calcium (Bhattacharya et al. 2004).

L'interaction entre la calmoduline et les ions Ca^{2+} a fait l'objet de nombreuses études:

Milos (Milos et al. 1986) considère que les sites sont indépendants et équivalents.

La liaison coopérative du calcium à la calmoduline a été proposée par (Crouch and Klee 1980) développée par Haiech (Haiech et al. 1981) et (Kilhoffer et al. 1988) et confirmée par Keller (Keller et al. 1982) et Linse (Linse et al. 1991). En 1992, l'ordre de remplissage des sites a été proposé par Kilhoffer (Kilhoffer et al. 1992). La liaison du calcium sur la calmoduline s'effectue d'une façon séquentielle où les ions Ca^{2+} occupent tout d'abord les sites III et IV du domaine C-terminal avec une coopérativité positive, et par la suite ils occupent les deux sites II et I du domaine N-terminal (Crouch and Klee 1980; Gilli et al. 1998; Linse et al. 1991).

Peersen (Peersen et al. 1997) a démontré que l'affinité de la calmoduline pour calcium peut augmenter d'un facteur 10 en présence d'une cible Ca^{2+} -calmoduline dépendante (Haiech et al. 1981; Lukas et al. 1988).

Afin de décrire le couplage entre la vague calcique et la stimulation des enzymes par la calmoduline, trois théories ont été élaborées :

La **première** est fondée sur les 2 concepts suivants :

- 1) La calmoduline présente quatre sites équivalents et indépendants
- 2) Les changements de conformation induits par le calcium sont liés au nombre de sites occupés sans considérer la nature de ces sites ; Autrement dit, la conformation de la calmoduline, après liaison de deux ions Ca^{2+} , est identique quelque soit le couple de sites occupés.

Dans la **seconde théorie**, émise à partir d'études par résonance magnétique nucléaire, la calmoduline présente deux types de sites pour le calcium : deux sites ayant une forte affinité (localisés dans les sites III et IV) et deux sites ayant une affinité plus faible (localisés dans les sites I et II). La liaison probablement coopérative du calcium aux deux sites de forte affinité induit un changement conformationnel majeur avec exposition de sites hydrophobes qui permettent l'interaction de la calmoduline avec les enzymes cibles. L'activation de ces dernières prend ensuite place lorsque le troisième puis le quatrième ion Ca^{2+} se fixent dans les sites de faible affinité. Ce modèle est fondé sur l'homologie entre la calmoduline et la troponine C.

La **troisième théorie** se propose d'expliquer comment la calmoduline peut transformer un signal quantitatif en réponse qualitative de la cellule. Dans ce modèle, la calmoduline lie le calcium de manière séquentielle et ordonnée. En d'autres termes, dans la cellule au repos, la calmoduline présente un site de liaison pour le calcium ; la liaison à ce site permet au second site de se former ou d'adopter une structure fonctionnelle et ainsi de suite. Ainsi, au cours de la vague calcique, plusieurs complexes Ca^{2+} -CaM, ayant vraisemblablement des conformations différentes peuvent apparaître et on admet que, dans une conformation donnée, la calmoduline interagit spécifiquement avec une enzyme ou un groupe d'enzymes donné. Ce complexe ternaire enzyme-CaM- Ca^{2+} lierait ensuite d'autres ions Ca^{2+} pour atteindre une activité maximale lorsque les quatre sites calcium de la calmoduline sont occupés, ce qui est favorable cinétiquement puisque l'interaction de la calmoduline avec ses cibles augmente son affinité pour le calcium.

Actuellement, il semble que la première et la deuxième théorie ont été abandonnées et que le modèle séquentiel de la liaison du calcium paraît le plus adapté pour l'interprétation des mécanismes d'action de la calmoduline avec ses cibles (Valeyev et al. 2008b).

D. Changements conformationnels induits par la liaison du calcium

Le calcium se lie de façon coopérative sur les domaines C-terminal puis N-terminal avec des constantes de dissociation respectives de l'ordre de 1 μM et 10 μM (Crouch and Klee 1980). En interagissant avec une cible les quatre sites deviennent complètement coopératifs (Haiech et al. 1981; Yazawa et al. 1987). La liaison du calcium à la calmoduline induit un changement de conformation qui est indispensable pour son interaction avec les protéines cibles et leur activation.

Les changements conformationnels affectent la conformation globale de la protéine qui passe de la forme **ellipsoïde (apo)** à la forme haltère ou **étendue (holo)**. La forme apo a été mise en évidence par des expériences en solution par RMN (Barbato et al. 1992; Tjandra et al. 1995) et la forme holo a été observée dans la structure cristalline de la calmoduline (Babu et al. 1985) et (Wilson and Brunger 2000) (**Figures 22A, B**).

En comparant la structure cristalline de la forme holo avec la forme apo, Chattopadhyaya et ses collaborateurs ont observé que l'hélice centrale est douée d'une flexibilité remarquable en solution (Chattopadhyaya et al. 1992), particulièrement entre les résidus 77-81, permettant aux deux domaines de la protéine de **s'orienter dynamiquement en solution** (Barbato et al. 1992). Cette comparaison a permis aussi de constater que les deux domaines tournent autour de l'hélice centrale, mouvement permettant d'augmenter la distance entre les deux domaines ce qui a été démontré aussi par la méthode SAXS (small angle X-ray scattering) (Barbato et al. 1992).

Le calcium se lie de manière séquentielle sur la calmoduline. La liaison de chaque ion Ca^{2+} stabilise localement la région partiellement non-structurée de la boucle et induit des changements des angles inter-hélices des hélices du même motif EF-hand, ce qui va induire une stabilisation globale de la mobilité interne de toutes les hélices de la protéine permettant ainsi à la protéine d'adopter une conformation plus ouverte (**Figures 22A, B**). Par conséquent, les hélices antiparallèles dans l'apo-calmoduline se disposent dans une orientation quasi perpendiculaire dans la holo-calmoduline. (Zhang et al. 1995). Il en résulte, dans chaque domaine, une ouverture des surfaces « patch » qui sont constituées par les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes enfermés à l'intérieur du domaine de la forme apo de la calmoduline. Ainsi chaque domaine se déplace d'une conformation « fermée » dans l'apo-calmoduline, vers la conformation « ouverte » suite à la fixation du

calcium. En absence de calcium, le domaine N-terminal de la molécule d'apo-calmoduline adopte une conformation « fermée », (Zhang et al. 1995).

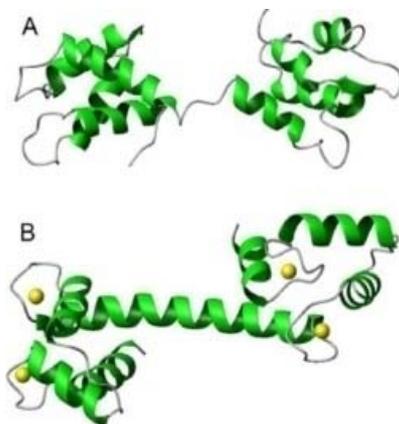


Figure 22: Représentation en rubans de la Calmoduline.

A) la forme apo (PDB: 1DMO).

B) la forme saturée en calcium holo (PDB: 1CLL).

Par conséquent, ces réarrangements structuraux de la calmoduline engendrent au niveau de chaque domaine une exposition concertée au solvant, des groupements hydrophobes riches en méthionine.

Cependant, suite à des études par spectroscopie RMN à travers les RDC (Couplages Dipolaires Résiduels), il s'est avéré que le domaine N-terminal de la holo-calmoduline en solution présente une conformation moins ouverte que le domaine C-terminal (Swindells and Ikura 1996). Ce qui suggère que le domaine C-terminal contribue en premier à l'initiation du mécanisme d'interaction moléculaire de la calmoduline et de sa cible.

La RDC est une méthode qui utilise la résonance magnétique nucléaire pour étudier la dynamique d'une molécule en solution. Elle fournit des informations très précises sur l'orientation des liaisons internucléaires au sein d'une molécule permettant ainsi de déterminer sa structure.

E. Interaction de la calmoduline et ses cibles en présence de calcium

La calmoduline peut interagir au niveau cellulaire avec au moins 100 cibles de séquences variables pour réguler leurs fonctions biologiques en réponse à une stimulation

calcique (Hoeflich and Ikura 2002). L'interaction entre la calmoduline et ses cibles peut se réaliser d'une façon Ca^{2+} dépendante ou indépendante.

Des travaux antérieurs (Chin and Means 2000; Crivici and Ikura 1995; Haiech et al. 1981) concernant le **mécanisme d'activation des enzymes** cibles, soulignent l'importance de l'intégrité de la structure de la calmoduline pour avoir une activation optimale. Cette observation peut être corrélée avec la remarquable conservation de la calmoduline au cours de l'évolution.

De nos jours, 20 structures de la calmoduline liée à différentes cibles ont été résolues, celles-ci incluent :

- deux structures pour la forme apo,
- deux autres pour la forme partiellement occupée par le calcium
- 16 structures pour la forme holo.

Ces structures permettent de comparer les différents modes de liaison affectant l'activation de la cible (**Figure 23**), (www.rcsb.org/pdb/).

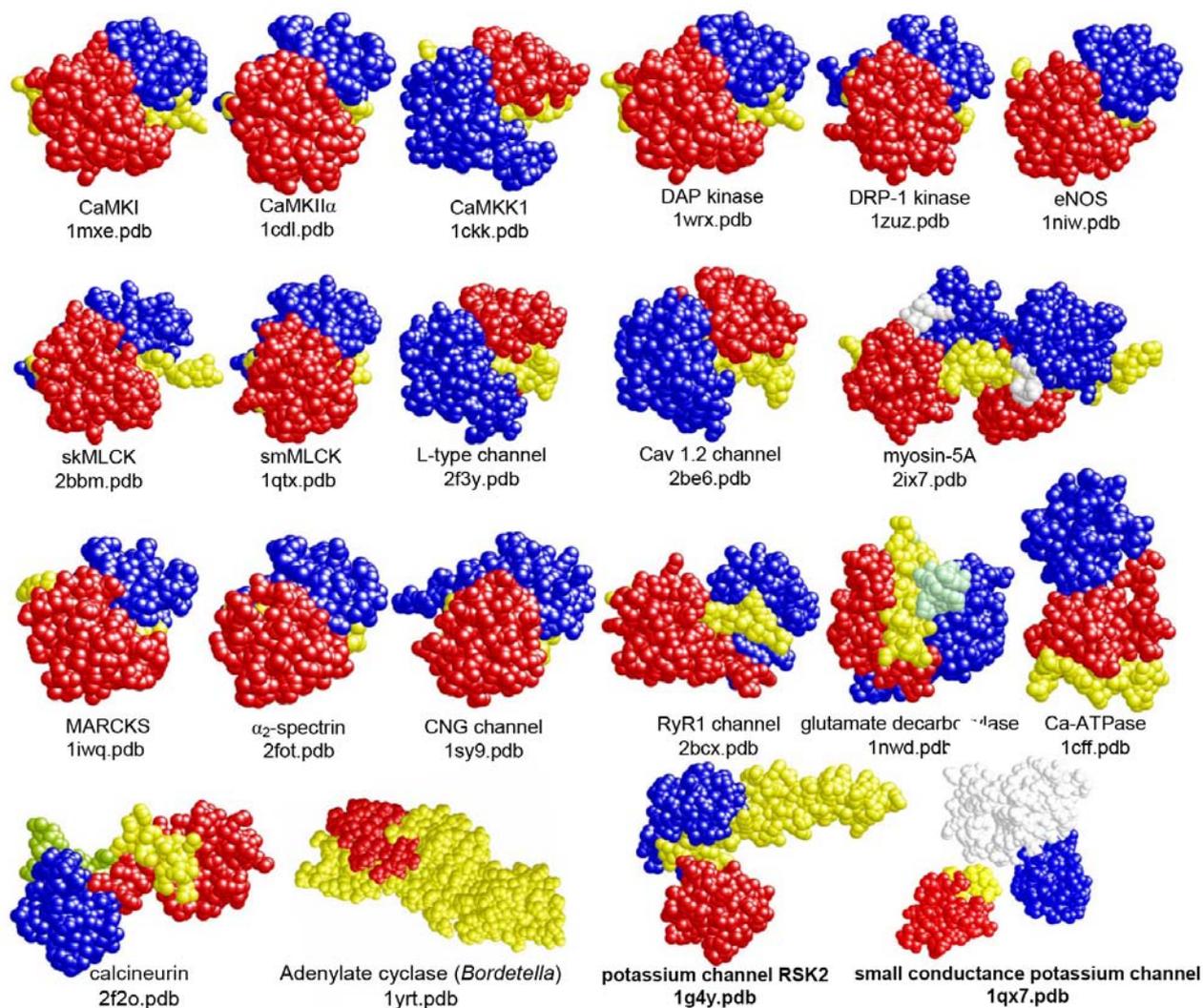


Figure 23 : 20 structures de la calmoduline liée à différentes cibles.

En bleu, le lobe N-terminal de la calmoduline, en rouge, le lobe C terminal et en jaune le domaine peptidique d'interaction de la protéine cible de la calmoduline.

(Boschek et al. 2008)

La diversité des structures cristallines des complexes formés par la calmoduline et ses partenaires permet d'observer des mécanismes d'interactions très diverses. Cela confirme que la calmoduline agit comme un transducteur entre la quantité du calcium libre présent dans le cytosol de la cellule et la réponse qualitative observée. Cela montre qu'en fonction du nombre et du type de sites calcium occupés, ajoutant à cela sa plasticité conformationnelle, la calmoduline adopterait différentes conformations (**Figure 23**), chaque conformation permettant ensuite soit d'autoriser une interaction et d'activer une cible précise, soit au contraire d'en bloquer, (Valeyev et al. 2008a).

Cette reconnaissance moléculaire présente différents mécanismes structuraux impliquant les domaines d'interaction (**CaMBD**), appelés aussi CaM Recruitment Signaling (**CRS**) qui peuvent être assimilés à des peptides. Ces sites de liaisons CRS, ont été trouvés par comparaison de séquences dans au moins 180 protéines étudiées. Les mécanismes d'interaction de la calmoduline avec ses cibles ont été étudiés grâce aux structures cristallines de la calmoduline et de ses peptides ou CRS (Hoeflich and Ikura 2002). Les CRS n'ont pas de séquences consensus, ils ont cependant une nature hydrophobe ou basique et ils sont constitués de 15 à 30 acides aminés.

Les CRS sont regroupés dans une base de données indiquée sur le site: (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb>).

A partir des informations structurales tridimensionnelles des complexes CaM-peptide, les CRS sont répartis généralement en deux classes (voir **Tableau 4**) :

- La classe de l'hélice α canonique où la calmoduline se lie à sa cible dans un rapport 1 : 1. Cette classe est divisée en quatre catégories : 1 – 10, 1 – 14, IQ motif et divers. La calmoduline se lie à ses peptides selon un mode canonique d'enroulement autour du motif peptidique. Chaque catégorie est caractérisée par un mode structural de reconnaissance moléculaire différent et présente différentes propriétés.
- S'ajoutent à la classe précédente trois autres nouveaux modes d'interaction observés avec la glutamate décarboxylase de Pétunia (Yuan and Vogel 1998), l'adénylate cyclase de l'anthrax Edema Factor (Drum et al. 2002) et la dimérisation de la calmoduline au niveau du canal potassique SK (Schumacher et al. 2001), (**Figures 24 B, C et D**)

Classe	Type	Cible	Fonction
Classe de l'hélice α canonique (1 : 1)			
	Classe 1 -10		
	1 – 10	CaMKII	levée du domaine d'auto-inhibition
	1 – 5 – 10		
	Basique 1 – 5 – 10		
	Hydrophilique 1 – 4 – 10		
	Classe 1 -14		
	1 – 14	CaMKI cNOS	levée du domaine d'auto-inhibition
	1 – 8 – 14		
	Basique 1 - 8 – 14	Calcineurine	
	1 – 5 – 8 – 14		
	Classe IQ = IQxxxRGxxxR		
	IQ		activation Ca^{2+} dépendante
	IQ-like		
	Autres		
	1 – 12	CaMKK	levée du domaine d'auto-inhibition
	1 – 16		
	Basique		
Nouveaux modes d'interaction			
	1 : 1	anthrax AC	remodelage du site de liaison
	1 : 2	GAD	dimérisation et activation
	2 : 2	channel K^+ Ca^{2+}-dépendant	dimérisation et activation

Tableau 4 : Classification des motifs de reconnaissance moléculaire pour la calmoduline et ses cibles. (Hoeflich and Ikura 2002; Yap et al. 2000).

F. Mode de liaison canonique d'enroulement

Ce mode de liaison est surtout observé dans les complexes de la calmoduline et de ses kinases cibles. La calmoduline active sa cible en se fixant sur le peptide représentant le domaine d'auto inhibition de la kinase, comme l'illustre l'exemple de la smMLCK (**Figure 24A**). Grâce à la flexibilité de l'hélice centrale, ce peptide est enveloppé par les deux extrémités de la calmoduline et adopte une conformation en hélice α . Le complexe calmoduline-cible est ancré par des résidus hydrophobes et stabilisé par les résidus basiques du peptide qui interagissent avec les résidus acides du site de liaison de la calmoduline. En se basant sur l'espacement entre les résidus hydrophobes qui servent de

point d'ancrage pour le peptide, les CaMBD se classent en quatre catégories : motifs 1 – 10, 1 – 14, 1 – 16 et IQ

Les numéros indiquent la position d'un résidu hydrophobe dans le motif CRS. La face hydrophobe des motifs CRS interagit avec la poche hydrophobe de la calmoduline et les résidus basiques chargés positivement ($\geq + 4$) de ces motifs peuvent établir des interactions électrostatiques avec les résidus acides de la calmoduline.

Les motifs typiques de CRS sont peu structurés en absence de calmoduline et ils forment une hélice α après sa fixation, à l'exception de certaines protéines comme MARKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate) et la phosphorylase kinase dont le CRS est supposé avoir une conformation non-hélicoïdale.

D'après Bahler (Bahler and Rhoads 2002) et Putkey (Putkey et al. 2003) le **motif IQ** est caractérisé par :

- Une séquence de 20-25 acides aminés ne contenant pas des résidus proline et formant une hélice α .
- Cette séquence peut être partiellement ou non amphipathique avec une charge nette totale variant entre 2+ et 5+.
- Un résidu hydrophobe occupe la position 1 de la séquence.
- L'extrémité N-terminale de la protéine interagit avec l'extrémité C-terminale de la cible.
- Le résidu en position 14 est caractérisé souvent par plusieurs répétitions en tandem séparées par 9 à 16 résidus.
- Le motif IQ représente parfois un site de phosphorylation pour la phosphorylase C et K notamment pour la neuromoduline et la neurogranine.
- Pour certaines cibles Ca^{2+} -dépendantes de la calmoduline, le motif IQ sert à lier la calmoduline lorsque la concentration du calcium cytosolique est faible, (**Tableau 5**).

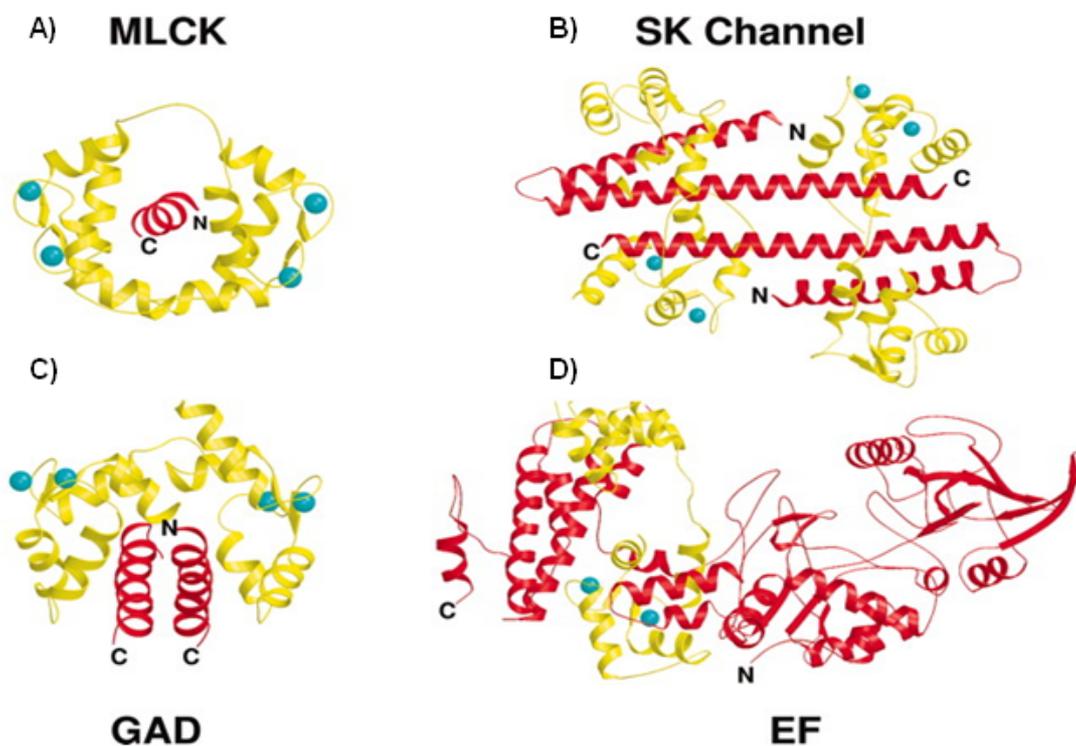


Figure 24: Structures des différents modes de liaison des complexes calmoduline-cibles.

A) Complexe de la CaM et du peptide dérivé de la smMLCK (PDB : 1CDL). B) Liaison de la calmoduline au canal potassique SK (PDB : 1G4Y). C) Complexe CaM-pompe Ca^{2+} (PDB : 1CFF). C) Dimérisation de l'extrémité N-terminale de la glutamate décarboxylase de Pétunia (GAD) (PDB 1NWD) induite par la calmoduline. D) Complexe CaM-oEdema factor (PDB : 1K93). La calmoduline est représentée en jaune et les peptides en rouge. L'ion Ca^{2+} est représenté par une sphère bleue (Ikura and Ames 2006).

	+ Calcium	- Calcium
Croissance	Ras GRF1/2 (CDC25) ^a	Neuromodulin IGLOO-L Neurogranine IQ GAP Yesast IRAs (?) PEP-19
Apoptose	DAP kinase Plant ethylene up-regulated	
Canaux	Canaux-voltage Ca ²⁺ dépendants ^d Canaux K ⁺ activés par le Ca ²⁺	Canaux sodium (?)
Régulation du calcium	Pompes Ca ²⁺ de la membrane plasmique	Canaux capacitifs (Trp4)
Contraction, motilité	MLCK Troponine I (TNC) ^b NO synthase Protéine de type kinésine (plante) Caldesmon	Conventional myosin (ELC/RLC) ^b Non-conventional myosins Dynein
Nucléotide cyclique	Adenyl cyclases Nucléotide cyclique PDE Canaux olfactifs régulés par les cNMP Canaux ^a de plantes régulés par les cNMP	
Cytosquelette / structure	Utrophine alpha-Fodrine Caldesmon MARCKS Nina C ^a	Brush border myosin Beta spectrin
Mitose	NUF1/SP110p/kendrine ^d Protéine de type kinésine (plante)	ASP (Drosophila) SHA1 CaM-binding protein
(Dé) Phosphorylation	Kinases Calmodulines dépendantes (I, II, IV) Calcineurine Protéines kinases Ca ²⁺ dépendantes (CDPK, protéine EF-hand)	Protein phosphatases (EF-hand containing)
Développement		Sperm surface protein Inversin (?)
Divers	Calspermin p68, RNA helicase	

? la modulation par calmoduline ou tout autre domaine EF-hand n'a été démontrée.

^a le motif IQ appartient à des domaines de liaison de la CaM Ca²⁺-dépendants.

^b la cible peut être modulée par une autre protéine à motif EF-hand que la calmoduline.

^c la cible présente un motif IQ unique.

^d la liaison de la calmoduline peut être Ca²⁺-dépendante ou indépendante.

Tableau 5 : Cibles Ca²⁺ dépendantes ou indépendantes mais CaM-dépendantes présentant des motifs IQ. Dans ce tableau sont présentées aussi leurs fonctions cellulaires associées à ces cibles. (Bahler and Rhoads 2002).

G. Plasticité conformationnelle de la calmoduline

Les nombreuses investigations portant sur les mécanismes appropriés par la calmoduline pour l'identification et l'activation de ses cibles (Drum et al. 2002; Elshorst et al. 1999; Grabarek 2005; Guo et al. 2005; Haiech et al. 1981; Hoeflich and Ikura 2002; Ikura 1996; Maune et al. 1992; Minowa and Yagi 1984; Mirzoeva et al. 1999; Ogawa and Tanokura 1984) ont permis de déduire que sa spécificité et sa sélectivité pour ces cibles résident dans sa plasticité conformationnelle et ses interfaces d'interaction avec ses cibles (Andre et al. 2004; Andre et al. 2006).

Les études par RMN et par cristallographie ont été réalisées sur un bon nombre de complexes CaM-cibles focalisant l'attention sur sa plasticité conformationnelle. Ces études ont permis de conclure que la calmoduline adopte des conformations variées dépendantes de l'entité structurale sur laquelle elle se fixe et que cette plasticité conformationnelle résulte des propriétés suivantes :

- La flexibilité de son espaceur central qui permet aux deux domaines de s'orienter différemment afin d'accommoder la structure de la calmoduline par rapport à celle de sa cible (Ikura et al. 1992; Meador et al. 1992).

- Les surfaces « patch » hautement hydrophobes dans les deux domaines de la calmoduline qui sont particulièrement riches en résidus Met. Ces résidus Met représentent 6% de la séquence protéique sachant que la moyenne du protéome connu est de 1%. Chaque domaine contient quatre résidus Met qui occupent la moitié de la surface patch. Les résidus Met permettent à la calmoduline d'interagir par des liaisons de Van Der Waals avec les résidus hydrophobes de sa protéine cible (Gellman 1991). Les chaînes latérales des résidus Met sont remarquablement flexibles et contribuent à l'adaptabilité conformationnelle des surfaces patch par rapport à la cible (Zhang and Vogel 1994). Les études par RMN confirment que l'exposition de ces résidus au solvant dans la forme Ca-CaM (Siivari et al. 1995) contribue à la promiscuité de la protéine.

- La flexibilité des chaînes latérales aliphatiques des autres résidus appartenant à la poche hydrophobe, tels que Trp, Phe, Ile, Leu, Val et Lys, qui rendent les surfaces « patch » hautement dynamique en solution.

Ces propriétés regroupées, confèrent à la calmoduline une multifonctionnalité remarquable lui permettant d'interagir et de réguler plusieurs cibles, (Ikura and Ames 2006).

IV. Antagonistes connus de la calmoduline

La calmoduline est impliquée dans plusieurs processus cellulaires notamment la phosphorylation et la déphosphorylation des protéines. Un certain nombre de maladies dont les maladies inflammatoires, le cancer et les dysfonctionnements cardiaques, sont associées à la dérégulation de la calmoduline (Khaksari et al. 2007; Schaub and Heizmann 2008; Shim et al. 2004). Pour analyser son rôle au niveau cellulaire, plusieurs inhibiteurs ont été utilisés dans différents laboratoires depuis les années 1980.

Dans cette partie, nous présentons une description d'un certain nombre d'inhibiteurs de la calmoduline. Cette présentation illustre la multiplicité de modes de liaison des complexes calmoduline-inhibiteur ainsi que la diversité structurale de ces composés.

Nous structurerons la présentation autour de quatre groupes de molécules (voir [annexe-Tableau des antagonistes connus de la calmoduline](#)):

- Les familles de molécules ayant un noyau tricyclique telles que les phénothiazines, l'anthraline, le zaldaride, l'eudistomidin-A, les acridones et les phénoxazines. Le composé type de cette famille est le Trifluoperazine (TFP)
- Les familles ayant un noyau naphthalène telles que les naphthalènesulfonamides, le Ro 22-4839 et les dérivés kobusins avec comme composé type, le W7.
- Un certain nombre de molécules ayant un ou plusieurs groupements phényl(s) tels que les antifongiques azolés, le CV-159, le CD-349, l'AR-2, le HMN-709, le composé 48/80, le DY-9760, l'AAA, le HBC, le HF-2035, le 10506-2A et les dérivés arylamides. Nous regarderons plus particulièrement le calmidazolium et le composé 48/80.
- D'autres composés tels que les dihydropyridines, le KS-504a, le KAR-2, le malbranchéamide et l'amantadine.

Les drogues antagonistes de la calmoduline sont des molécules qui interagissent avec la protéine et qui inhibent l'activation de ses enzymes-cibles. En 1976, Levin et Weiss furent les premiers à montrer que l'activation de la phosphodiesterase des nucléotides cycliques par la calmoduline pouvait être inhibée par la **trifluopérazine (TFP)** (Levin and

Weiss 1977). La TFP est une drogue antipsychotique de la famille des phénothiazines. Elle a été co-cristallisée avec la calmoduline dans différentes conditions expérimentales (**Figure 25**) et l'analyse quantitative des résultats obtenus par cristallographie montre une stœchiométrie respectivement de 1:1, 1:2 (Cook et al. 1994; Vertessy et al. 1997) et 1:4 (Vandonselaar et al. 1994).

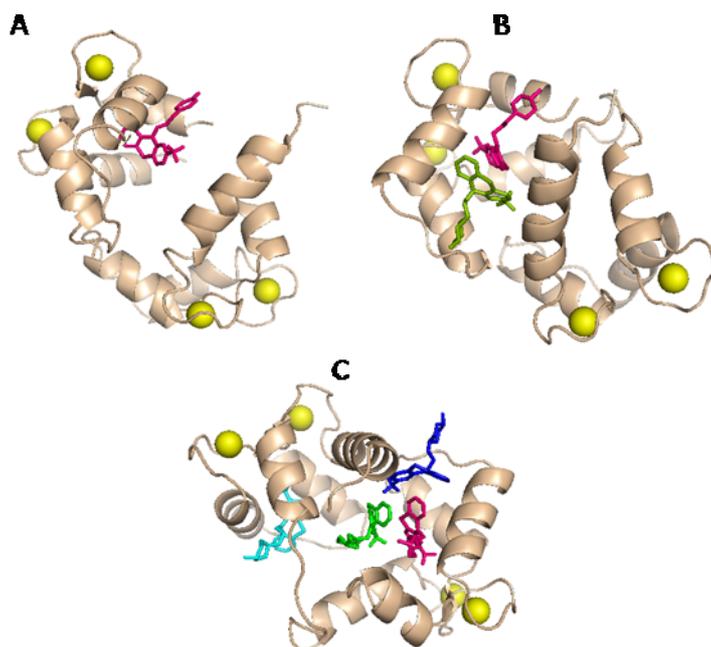


Figure 25: Structures tridimensionnelles du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-TFP}$.

Structures tridimensionnelles du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-TFP}$, avec une stœchiométrie de : (A) 1:1 (PDB : 1ctr), (B) 1:2 (PDB : 1a29) et (C) 1:4 (PDB : 1lin).

Les molécules de la **famille des phénothiazines** telles que la **chlorpromazine**, la **norchlorpromazine**, la **trifluopérazine** et la **fluophénazine** sont peu spécifiques de la calmoduline et se lient aux protéines S100, à la protéine kinase C, et à la troponine C (Marshak et al. 1981). Elles ont été utilisées comme sonde pour indiquer la présence des sites hydrophobes sur la calmoduline. De même, (Levin and Weiss 1979) ont montré que d'autres antipsychotiques tels que la **thioridazine**, le **benperidol**, la **pimozide** et le **chlorprothixène**, ainsi que les antidépresseurs l'**amitriptyline** et la **desimipramine** sont aussi des inhibiteurs de la phosphodiesterase du cerveau. En 1982, des études de Relation Structure-Activité (RSA) ont été réalisées entre des dérivés de la phénothiazine et l'activité

anti-calmoduline (Prozialeck and Weiss 1982). L'activité anti-calmoduline a été évaluée par inhibition de la phosphodiesterase en absence et en présence de la calmoduline (Walter and Schultz 1981).

Le **Fluphenazine-Mustard** est un dérivé phénothiazine dont la structure présente une chaîne chlorethylamine lui permettant de se fixer de manière irréversible sur la calmoduline (Hait et al. 1987) et d'inactiver certaines de ses enzymes cibles en particulier la phosphodiesterase calmoduline-dépendante avec une valeur d'IC₅₀ de 4 µM. Ce composé présente une activité anti-proliférative et cytotoxique sur des lignées cellulaires malignes : L1210 (modèle de leucémie murine), HL60 (modèle de leucémie humaine), C₆ (modèle d'astrocytome chez le rat) et 9L (modèle de gliome chez le rat) ; avec des valeurs respectives d'IC₅₀ de 20 µM, 20 µM, 21 µM, 19 µM.

En 1978, Hidaka et al., ont décrit le premier dérivé naphthalènesulfonamide, le **N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalènesulfonamide (W7)** en tant qu'inhibiteur de la calmoduline (Hidaka et al. 1978). W7 a été étudié pour son rôle vaso-relaxant sur des muscles lisses vasculaires isolés du lapin ; il s'est avéré qu'à des concentrations variant de 1 à 300 µM, W7 induisait la relaxation de ces muscles en inhibant la phosphorylation de la MLC par la MLCK calmoduline-dépendante empêchant ainsi l'interaction entre la myosine et l'actine. Par la suite, en 1981, Hidaka et ses collaborateurs ont étudié l'implication de la calmoduline dans la réponse vasculaire en utilisant d'autres dérivés naphthalènesulfonamides (Hidaka et al. 1981a). Ces dérivés naphthalènesulfonamides sont caractérisés structuralement par un motif aromatique (le naphthalène) qui peut être chloré ou pas en position 5, ainsi que par une chaîne alkyle aliphatique de longueur variable (C₂-C₁₀) en position **1 ou 2 sur le naphthalène**.

Les études de caractérisation de ces dérivés naphthalènesulfonamides ont montré que:

- en suivant la radioactivité du W7 tritié, les dérivés naphthalènesulfonamides chlorés en position 5 sont des antagonistes de la calmoduline par comparaison avec les dérivés non-chlorés.
- les dérivés chlorés induisent l'activation de la PDE calmoduline-dépendante et la relaxation vasculaire des coupes de l'aorte thoracique du lapin.
- les dérivés chlorés ou non chlorés induisent une contraction vasculaire des coupes de l'aorte thoracique du lapin associée à l'élévation de l'efflux de norépinephrine, un agent sympathomimétique. Ces données suggèrent la présence d'un autre processus calmoduline-indépendant gérant la contraction des muscles lisses.
- une corrélation entre l'antagonisme de ces dérivés pour la calmoduline et la relaxation musculaire indiquant un mécanisme de relaxation vasculaire calmoduline-dépendante.

Hidaka et ses collaborateurs ont montré également que W7 inhibe l'activité de la pompe Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase des érythrocytes humains ainsi que la MLCK Calcium-dépendante du gésier de poulet et de l'aorte bovin (Hidaka et al. 1980).

Nishikawa et Hidaka ont suggéré l'implication de la calmoduline dans le processus d'**agrégation plaquettaire** (Hidaka and Nishikawa 1980). Grâce à l'utilisation de W7 et de ses analogues structuraux en tant qu'antagonistes de la calmoduline, une corrélation a pu être établie entre l'affinité de ces composés et l'agrégation plaquettaire, ce qui a permis de suggérer que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par des antagonistes de la calmoduline empêche la phosphorylation calcium-dépendante de la MLC, protéine de 20 kDa, par la MLCK calmoduline-dépendante (Nishikawa and Hidaka 1982).

La sonde fluorescente **2-p-toluidinylnaphthalène-6-sulfonate (TNS)**, utilisée généralement pour caractériser les zones hydrophobes d'une protéine donnée, interagit avec la calmoduline en présence de calcium (LaPorte et al. 1980). Il a été montré que la fluorescence de cette sonde TNS a été supprimée suite à la fixation du W7 sur la protéine (Tanaka et al. 1982a).

Les expériences de Hidaka et collaborateurs sur des cellules CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary K1), en utilisant le W7 tritié, suggèrent que le W7 inhibe la phase G₁/S et montre une implication de la CaM dans la **prolifération cellulaire** (Hidaka et al. 1981b).

Dès années 1980 jusqu'au nos jours, les dérivés naphthalènesulfonamides, particulièrement les paires W5/W7 et W12/W13, ont été utilisés dans de nombreuses études pour analyser le rôle de la calmoduline notamment au niveau cellulaire :

- la sécrétion de l'insuline (Yaney and Sharp 1990),
- la libération de la rénine au niveau des reins (Matsumura et al. 1984),
- la phagocytose via le système complément (Ito 1986; Ito and Hidaka 1983b; Ito et al. 1991),
- la mobilisation du calcium cytosolique dans des cellules ostéosarcome humaines (Jan et al. 2000a) et des carcinomes transitoires de la vessie (Jan et al. 2000b),
- la modulation de certains types de cancer :
 - La sarcome-180, tumeur solide chez la souris (Ito and Hidaka 1983a),
 - L'hépatome MH-134, carcinome et mélanocarcinome chez la souris (Ito and Hidaka 1983b),
 - Le cancer de sein chez l'homme (Strobl and Peterson 1992 ; Wei et al. 1983),
 - La tumeur de la peau (Nakadate et al. 1986; Nishino et al. 1984)
 - L'inhibition de la métastase de carcinomes de poumons implantés chez la souris (Ito et al. 1991).

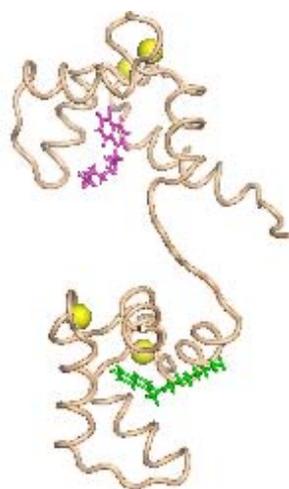


Figure 26: Structure tridimensionnelle du complexe Ca²⁺/CaM-W7.
(Stœchiométrie 1:2 (PBD : 1mux)).

La structure du complexe Ca²⁺-calmoduline-W7 a été déterminée par RMN en solution et montre la liaison d'une molécule W7 sur chacun des deux domaines de la calmoduline (**Figure 26**). Dans chaque domaine, le noyau naphthalène de la molécule interagit avec les résidus méthionine ainsi que d'autres groupements aromatiques formant

la poche hydrophobe impliquée dans l'activation des enzymes calmoduline-dépendantes telles que la MLCK et la CaMKII (Osawa et al. 1998).

En 1981, le **Calmidazolium**, appelé aussi **R 24571**, s'est révélé être un puissant inhibiteur de la pompe Ca^{2+} -ATPase des globules rouges et du transport de Ca^{2+} « inside-out » des vésicules des globules rouges avec des valeurs d'IC₅₀ respectives de 0,5 et 2 mM (Gietzen et al. 1981). L'action de R 24571 est relativement spécifique pour la Ca^{2+} -ATPase des globules rouges par rapport à celle de la Mg^{2+} -ATPase (IC₅₀ = 20 μM), alors que le transport (Na^+/K^+) via la pompe Na^+/K^+ -ATPase n'est que légèrement affecté ($\leq 20 \mu\text{M}$).

Le **Composé 48/80** a été décrit en 1983 par Gietzen comme nouvel antagoniste de la calmoduline (Gietzen et al. 1983) et inhibiteur de l'activation de la PDE calmoduline-dépendante du cerveau et de la pompe Ca^{2+} -ATPase des vésicules de globules rouges avec des valeurs d'IC₅₀ respectivement de 0.3 et 0.85 $\mu\text{g/ml}$. La même année, Gietzen a comparé l'effet de ce composé à celui du calmidazolium en étudiant le transport des cations mono et bivalents via les pompes ATPasiques calmoduline-dépendantes telles que la calcium-ATPase du muscle cardiaque du chien, du muscle squelettique, de l'érythrocyte, ainsi que celles qui sont calmoduline-indépendantes telles que la pompe de la Mg^{2+} -ATPase du muscle squelettique et de l'érythrocyte et la Na^+/K^+ -ATPase du sarcolemme du muscle cardiaque, voir **Tableau 6**.

Enzyme	IC ₅₀ values	
	Calmidazolium (μM)	Compound 48/80 ($\mu\text{g/ml}$)
Cardiac SR Ca^{2+} -transporting ATPase	2,1	16
Skeletal-muscle SR Ca^{2+} -transporting ATPase	2,9	80
Cardiac SL Na^+/K^+ -transporting ATPase	15	> 300
Skeletal-muscle SR Mg^{2+} -dependent ATPase	3,3	≥ 300
Erythrocyte Mg^{2+} -dependent ATPase	20	≥ 300
Erythrocyte Ca^{2+} -transporting ATPase Basal	9	≥ 300

Tableau 6: Effet du Calmidazolium et du composé 48/80 sur l'activité enzymatique de certaines pompes ATPasiques.
(Gietzen et al. 1983).

De cette étude comparative, il a été conclu que le calmidazolium connu comme antagoniste de la calmoduline, peut également inhiber d'autres cibles calmoduline-dépendantes et qu'il était possible dans cette famille de développer des molécules plus spécifiques pour inhiber les enzymes calmoduline-dépendants.

Les antifongiques dérivés azolés tels que le **Bifonazole** et le **Kétonazole**, ont été décrits comme des agents thérapeutiques potentiels pour certaines maladies inflammatoires cutanées telle que la dermatite séborrhéique. De nombreuses études ont montré l'association de la calmoduline à certaines maladies dermatologiques caractérisées par une inflammation cutanée telle que le psoriasis. En 1993, les investigations de Hagemann sur l'effet des antifongiques azolés sur l'activité de la phosphodiesterase calmoduline-dépendante comme indicateur de l'activité de la calmoduline, ont pu révéler une inhibition de l'activité de cette enzyme (Hagemann et al. 1993).

En 1987, Zimmer et Hofmann ont étudié l'interaction de 36 composés hydrophobes avec la calmoduline en déterminant les valeurs K_i de la phosphodiesterase calmoduline-dépendante et de la kinase de la chaîne légère de la myosine purifiées du muscle cardiaque bovin et en mesurant les valeurs de K_d de ces mêmes composés par déplacement du bépridil tritié (Zimmer and Hofmann 1987). Le bépridil tritié présente un site de forte affinité pour la calmoduline avec un K_d apparent de 0.4 μM et quatre sites de faible affinité avec un K_d apparent de 44 μM . Les données obtenues avaient permis de différencier au moins trois groupes distincts de molécules :

- Les groupes I et II inhibent de manière compétitive l'activation de la phosphodiesterase et de la chaîne légère de la myosine par la calmoduline. Le groupe I inhibent l'activité des deux enzymes avec des concentrations identiques, en interférant de manière compétitive avec le site de forte affinité du bépridil. Tandis que le groupe II inhibe la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK) avec des valeurs de K_i qui sont 5 à 10 fois plus élevées que celles du K_i de la phosphodiesterase et interfèrent de façon non-compétitive avec le site de forte affinité du bépridil, par contre ces composés entrent en compétition avec le bépridil au niveau d'un de ses sites de faible affinité. Le groupe I comprend la TFP et le groupe II, W7 et le calmidazolium

- Le groupe III inhibe l'activation de ces deux enzymes selon un mécanisme non-compétitif et aucun des composés n'entrent en compétition avec les sites de liaison du bépridil. Il est composé de dérivés dihydropyridines qui inhibe plus efficacement la PDE que la MLCK.

Un groupe IV inhibe l'activation de la phosphodiesterase avec des valeurs de $K_i \approx 10 \mu\text{M}$, mais les composés de ce groupe n'inhibent pas l'activité de la kinase des chaînes légères de la myosine. Ce groupe comprend des molécules inhibant les canaux calciques voltage dépendant tel que le vérapamil.

Le 1,4-Dihydro-2,6-diméthyl-4-(3-nitrophényl)-3,5-pyridine-dicarboxylate méthyl-6-(5-phényl-3-pyrazolyloxy)-hexylester, appelé le **CV-159**, dérivé de la dihydropyridine synthétisé en 1988, a été décrit comme inhibiteur de l'activité de la MLCK avec une valeur d'IC50 de $6.2 \mu\text{M}$ et une constante d'inhibition de $0.8 \mu\text{M}$. Le CV-159 inhibait l'activité enzymatique de la PDE calmoduline-dépendante avec une valeur d'IC50 de $0.55 \mu\text{M}$. L'interaction directe avec la calmoduline a été mise en évidence par des études par fluorescence utilisant la calmoduline marquée avec un fluorophore le dansyl (5-diméthylaminonaphtalène-1-sulfonylate). L'étude de l'interaction consiste à suivre la diminution de la fluorescence de la calmoduline dansylée en augmentant la concentration de CV-159. La valeur d'IC50 obtenue par cette méthode est de $1.2 \mu\text{M}$. Les données expérimentales de CV-159 ont permis de suggérer que le CV-159 agissait directement sur la calmoduline (Umekawa et al. 1988). En 1999, ce produit a été caractérisé par un effet neuroprotecteur sur des lésions ischémiques cérébrales du rat (Miyazaki et al. 1999).

Les caractéristiques de la liaison du **CD-349**, le 2-nitratopropyl-3-nitratopropyl-2,6-diméthyl-4-(3-nitrophényl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate, sur la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ et ses effets sur la PDE calmoduline-dépendante ont été étudiés par Tanaka et ses collaborateurs (Tanaka et al. 1990). Ils ont montré que le CD-349 inhibait la liaison du CD-349 tritié sur la calmoduline avec une valeur d'IC50 de $2.4 \mu\text{M}$. L'analyse des données expérimentales par Scatchard a révélé une valeur de K_i de $2.1 \mu\text{M}$. Le CD-349 induit une légère diminution de la

fluorescence de la sonde 2-p-toluidinylnaphtalène-6-sulfonate (TNS) liée à la calmoduline et il inhibe l'activité basale de la PDE et ainsi que l'activité de la PDE calmoduline-dépendante.

Le **DY-9760e**, décrit pour la première fois en 1997 par Sugimura et coll., prévient les neurones et les cardiomyocytes de l'**ischémie**. En fait, il inhibe l'activité de plusieurs enzymes calmoduline-dépendantes telles que la CaMKII, MLCK et la calcineurine (Sugimura et al. 1997).

Les **alcaloïdes Vinca** originaires de la plante **Catharanthus roseus** tels que la vinblastine, la vincristine, la navelbine et d'autres dérivés sont des agents antimétaboliques largement utilisés dans le traitement de la leucémie et des tumeurs solides. Ils inhibent l'assemblage des tubulines en microtubules cytosoliques, altérant la formation du fuseau mitotique et empêchant la ségrégation chromosomale, bloquant ainsi la mitose. Il a été démontré que la calmoduline est fortement concentrée pendant la formation du fuseau mitotique autour des centromères et des microtubules et elle interagit avec les tubulines et microtubules (Job et al. 1981). Cependant il a été suggéré que les alcaloïdes indoliques sont des antagonistes potentiels de la calmoduline. En 1995, Molnár et al. ont montré l'interaction directe de ces alcaloïdes *Vinca* avec la Ca^{2+}/CaM par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) et DC (dichroïsme circulaire). L'analyse quantitative des résultats du DC a montré une stœchiométrie 1:1 avec des affinités pour la vinblastine et la navelbine respectives de 0.5 μM et 3 μM et l'analyse du FRET a permis d'obtenir une constante de dissociation de la vincristine, $K_d = 3 \mu M$. Les résultats de l'ELISA par déplacement (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) ont montré que ces dérivés bis-indole inhibent l'interaction de l'anticorps anti-calmoduline avec la calmoduline avec des valeurs de IC_{50} de 90 μM , 400 μM et 430 μM respectivement pour la navelbine, la vincristine et la vinblastine (Molnar et al. 1995).

Bouvier et al. (2003) ont caractérisé l'interaction entre la calmoduline et sa cible StOP (Stable Tubule Only Polypeptide) une protéine qui se lie sur les microtubules et qui contrôle leur dynamique et leur stabilité. Il a été démontré par Pirollet et al. (1992) que la calmoduline peut se lier sur la protéine STOP et stabiliser les microtubules (Pirollet et al.

1992). Bouvier (2003) a caractérisé l'interaction de la calmoduline avec un peptide modèle de la protéine STOP (STP23), le peptide 23-mer qui correspond au motif consensus Mc (Microtubule-stabilizing motifs) (Bouvier et al. 2003).

Récemment, Makarov et al. (2007) ont publié les caractéristiques d'un nouvel alcaloïde anti-tumoral, le Vinflunine (Javlor) c'est un anti-microtubule qui a été créé en 2005 et qui est actuellement en phase III du médicament. Les auteurs ont caractérisé l'interaction entre certains dérivés alcaloïdes *Vinca*, calmoduline et STOP par une approche thermodynamique et par spectrométrie de masse (tableau 15) et ils ont pu montrer que le Vinflunine est le meilleur inhibiteur du complexe CaM-STOP parmi les alcaloïdes testés. Par conséquent, ils ont suggéré que l'interaction du Vinflunine avec la calmoduline peut influencer la dynamique des microtubules (Makarov et al. 2007).

Le KAR-2 est un dérivé bis-indolique semi-synthétique, le 3''-(beta-chloroéthyl)-2'',4''-dioxo-3,5''-spiro-oxazolidino-4-déacetoxy-vinblastine, identifié comme un agent antimitotique par Orosz et al. (1997). Le KAR-2 est caractérisé par des activités anti-tumorale et anti-microtubulaire élevées et une faible toxicité cellulaire. Sa liaison à la Ca^{2+} /CaM a été mise en évidence par des études de FRET et de DC et l'analyse des résultats a permis l'évaluation de la constante d'affinité K_d de 5 μ M. Le KAR-2 induit une réponse calcique au niveau du cytosol des neutrophiles polymorphonucléaires humains après 20 min d'incubation (Orosz et al. 1997).

Vertessy et al. (1997) ont montré par cristallographie que le KAR-2 interagit également avec la forme apo-calmoduline (Vertessy et al. 1997). En 2005, Horváth et al. ont mis en évidence la structure tridimensionnelle du complexe Ca^{2+} /CaM-KAR-2 par RMN en solution et par diffraction aux rayons-X avec une résolution de 2.12 Å° (Horvath et al. 2005), **Figure 27**.

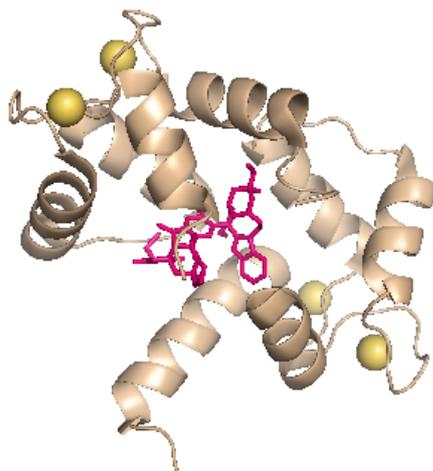


Figure 27: Structure tridimensionnelle du complexe Ca^{2+} /CaM-KAR-2.
(PBD : 1xa5).

D'après les données expérimentales obtenues par Résonance Magnétique Nucléaire et diffraction aux rayons-X, il a été montré que le KAR-2 se lie à une nouvelle structure de la calmoduline créée par les résidus d'acides aminés des deux domaines N et C-terminaux. Un autre complexe tertiaire similaire au complexe CaM-(KAR-2) peut se former lorsque la protéine lie la TFP, même avec une stœchiométrie de 1 : 2. Ces observations expliquent la spécificité du KAR-2 en tant qu'agent anti-microtubulaire interagissant avec un nouveau domaine de la calmoduline. Par conséquent, le KAR-2 n'empêche pas la liaison à la calmoduline de ses cibles physiologiques (Horvath et al. 2005), **Figure 28**.

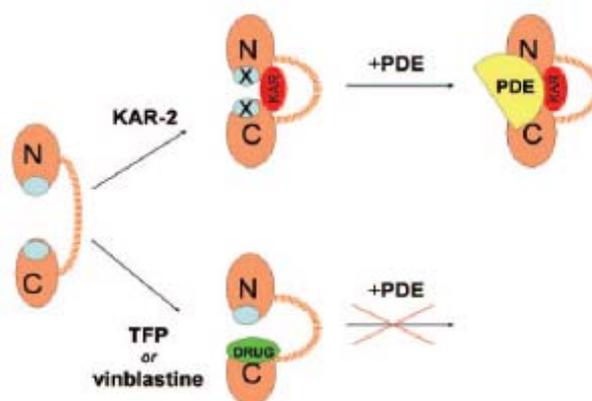


Figure 28: Différents modes de liaison du KAR-2 ou de la TFP sur la calmoduline.

Les différents mécanismes d'action de ces inhibiteurs par rapport à la PDE sont présentés schématiquement sur la figure. Les symboles N et C représentent les deux lobes N et C-term de la calmoduline. Les poches hydrophobes de la calmoduline sont représentées en bleu. Dans le cas de KAR-2, la fixation de ce composé sur calmoduline induit une activation de la CaM-PDE, par contre la TFP ou la vinblastine inhibent l'activité de la CaM-PDE (Horváth et al. 2005).

En **2000**, un nouvel antagoniste de la calmoduline, la N-(3,3-diphénylpropyl)-N'-[1-R-(3,4-bis-butoxyphényl)éthyl]-propylène-diamine (**AAA**), a été co-cristallisé avec la protéine. Les spectres de dichroïsme circulaire (DC) montrent que AAA se lie à la Ca^{2+} /CaM avec une stœchiométrie de 2:1. La structure cristalline déterminée avec une résolution de 2.64 Å° montre également une stœchiométrie 2:1 (**Figure 29**). La liaison de AAA à la calmoduline induit une fermeture de domaines de la protéine similaire à celle obtenue avec la TFP. Les deux méthodes, le dichroïsme circulaire et la cristallographie, indiquent que chacune des deux molécules AAA est ancrée dans une poche hydrophobe de la calmoduline, qui se chevauche avec les deux sites de liaison de la TFP. Les deux molécules AAA interagissent également l'une avec l'autre par des forces hydrophobes. Par essai enzymatique, il a été montré que AAA inhibe l'activité de la CaM-PDE avec une constante de dissociation apparente de 18 nM, ce qui est mesurable par rapport à l'affinité des peptides cibles de la calmoduline. Sur la base de la structure cristalline, il a été proposé que la haute affinité de liaison de ce composé sur la calmoduline est principalement due à une entropie favorable, puisque AAA établit plusieurs contacts au sein de complexe CaM-AAA (Harmat et al. 2000).

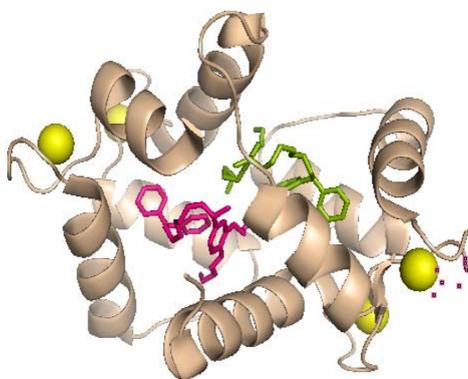


Figure 29: Co-cristallisation de calmoduline avec deux molécules AAA.
(PDB : 1QIV).

Le **HBC** (4-[3,5-Bis-[2-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl)-éthyl]-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-benzoate), est un dérivé de la curcumine développé récemment qui induit l'inhibition de la prolifération cellulaire de certaines lignées tumorales. Les études de Shim et al. (2004) ont permis d'identifier par la méthode de « phage display biopanning », le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ en tant que cible directe de ce composé à partir de librairie d'ADNc du génome humain. La liaison directe de HBC sur $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ détectée par les deux méthodes « phage display binding assay » et Surface Plasmon Resonance (SPR), a permis d'évaluer l'affinité de HBC pour la protéine, $K_d = 8.1 \mu\text{M}$. La modélisation de l'interaction par docking a montré que la structure de HBC est compatible avec la cavité de liaison d'autres inhibiteurs connus du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Shim et al. 2004), **Figure 30**.

L'étude de HBC sur des cellules cancéreuses du colon (HCT15), a révélé l'induction prolongée de la phosphorylation de l'ERK1/2 (Extracellular signal Regulated Kinase) et l'activation de l'expression du facteur $\text{p}21^{\text{WAF1}}$, conduisant à l'arrêt de la phase G_0/G_1 du cycle cellulaire. Ces résultats permettent de suggérer que HBC inhibe la progression du cycle cellulaire des cellules HCT15 par effet antagoniste sur les fonctions du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$.

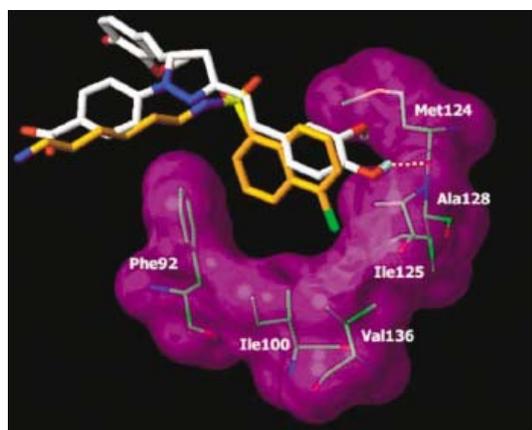


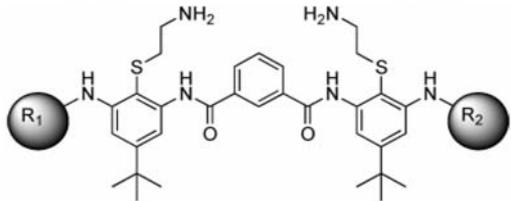
Figure 30: Modèle de docking de HBC en complexe superposé sur la structure RMN du W7.

Le HBC est représenté par la molécule en gris superposé sur la structure RMN du W7 lié au domaine C-term de la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (molécule en jaune), (Shim et al. 2004).

L'**HF-2035** est un dérivé benzènesulfonamide qui a été synthétisé en 1996 et testé pour son activité inhibitrice sur des enzymes calmoduline -dépendantes. Le HF-2035 inhibe l'activité de la CaM kinase I (CaMKI), la CaM kinase II (CaMKII) et la kinase de la chaîne légère de la myosine. Ce composé inhibe également, par compétition avec la calmoduline, l'activité de la NO synthase neuronale recombinante du rat, enzyme calmoduline-dépendante, avec une valeur de K_i de $0.78 \mu\text{M}$ alors que W7 a une activité inhibitrice faible de cette enzyme (Win et al. 1996). Les résultats des expériences sur des coupes de la carotide du lapin avec et sans endothélium ont montré que le HF-2035 inhibe la relaxation de l'endothélium induite par l'acétylcholine et le calcium ionophore A23187 avec des valeurs respectives d' IC_{50} de $1,5 \mu\text{M}$ et $2,8 \mu\text{M}$.

L'effet de l'**amantadine**, agent antiparkinsonien, a été caractérisé sur les isoenzymes CaM-PDE. L'amantadine inhibe la PDE calmoduline-dépendante du cerveau de bœuf (60 kDa), mais pas l'isoenzyme bovine de 63 kDa, ni celles du cœur et des poumons. L'inhibition de l'isoenzyme CaM-PDE (60 KDa) du cerveau par l'amantadine a été bloquée en augmentant la concentration de calmoduline ce qui suggère que l'amantadine agit en tant qu'antagoniste de la calmoduline ou bien agit de manière réversible sur l'action de la calmoduline. Les résultats de cette étude suggèrent que l'amantadine peut servir d'outil pharmacologique pour étudier le rôle physiologique de l'isozyme CaM-PDE 60 kDa dans la progression de la maladie de Parkinson et son mode d'action (Kakkar et al. 1997).

Yin et al., (2005) ont décrit la synthèse des **dérivés** d'arylamides, inhibiteurs de la calmoduline. Ces dérivés miment le domaine de liaison de la calmoduline (CaMBD) sur la MLCK des muscles lisses (smMLCK). Les auteurs ont caractérisé l'interaction de ces dérivés par polarisation de fluorescence (FP) pour évaluer l'effet inhibiteur de dérivés sur le complexe CaM-mastorpan X (Ma X), le Ma X est une tétra-décapeptide (INWKGIAAMAKLLX) utilisé comme sonde fluorescente dans les expériences de FP et a une affinité de $0,3 \text{ nM}$ pour la calmoduline. Les constantes de dissociation (K_i) de ces inhibiteurs ont été obtenues en suivant la dissociation de Ma X du complexe CaM-Ma X induite par la fixation des dérivés arylamides, voir **Tableau 7**.



entry	R ₁	R ₂	K _i (nM)
1	D-Phe	D-Phe	7.10 ± 1.48
2	D-3-PyA ^a	D-3-PyA	25.7 ± 3.42
3	D-2-Nal ^b	D-2-Nal	83.4 ± 6.2
4	L-2-Nal	L-2-Nal	> 120
5	D-3-PyA	H	> 1200

^a PyA is pyridylalanine. ^b Nal is naphthylalanine.

Tableau 7: Résultats de l'essai de polarisation de fluorescence.
(Yin et al. 2006)

Les expériences de RMN (1H, 15N)-HSQC ont permis de suggérer que le composé 1 (**Tableau 7**) se lie sur la calmoduline d'une façon analogue à celle de la smMLCK (Yin et al. 2006), **Figure 31**.

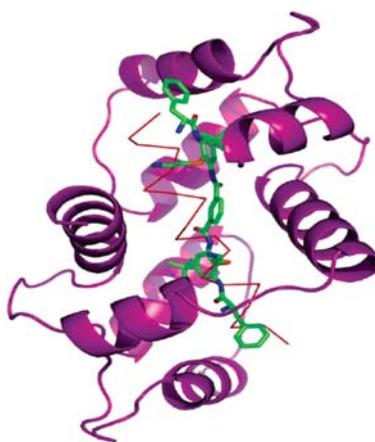


Figure 31: Complexe CaM-dérivé arylamide 1.

Ce dérivé a été modélisé en tant que peptidomimétique de l'hélice du peptide smMLCK. Il est représenté en vert et l'hélice du peptide de smMLCK en rouge, (Yin et al. 2006).

L'ensemble de ces données suggèrent que la calmoduline présente plusieurs sites de liaison pour différentes petites molécules. Selon le type de site occupé, la calmoduline ne peut plus interagir ou interagit différemment avec certaines classes d'enzymes. De la même manière qu'il a été montré que des mutations de la calmoduline vont affecter spécifiquement certaines enzymes, de petites molécules peuvent aussi en interagissant avec la calmoduline modifier l'activation d'une classe spécifique d'enzymes dépendant de la calmoduline.

L'avantage des petites molécules est de pouvoir être utilisées à un moment précis de la croissance ou de la différenciation cellulaire.

Il serait ainsi intéressant d'avoir à disposition une panoplie de molécules interagissant d'une façon différentielle avec la calmoduline afin de pouvoir les utiliser pour déchiffrer quelles voies métaboliques activées par la calmoduline sont impliquées dans un processus cellulaire donné.

C'est l'objet de cette thèse d'apporter une contribution à cet objectif. Par ailleurs, ces stratégies pourront s'appliquer à l'ensemble des calciprotéines et pourraient ainsi ouvrir la voie de nouvelles innovations thérapeutiques. C'est l'objet de l'article de revue de Médecine&Science d'explorer ces possibilités.

V. **Article : les protéines de liaison du calcium peuvent-elles être des cibles de nouveaux médicaments ?**

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Les protéines de liaison du calcium peuvent-elles être des cibles de nouveaux médicaments ?

Jacques HAIECH**, Claire PIGAULT, Rania DAGHER, Pascal VILLA, Marie-Claude KILHOFFER

M/S : médecine sciences, 2006, vol. 22, n° 12

Pages 100-102 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.erudit.org/recherche/ms/>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

**Équipe Chimio-génomique, UMR7175 CNRS et Plate-forme de Chimie Biologique Alsace-Lorraine, ULP Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74, route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex, France.

haiech@pharma.u-strasbg.fr

Chapitre II

À LA RECHERCHE DE NOUVEAUX INTERACTEURS DE LA CALMODULINE

I. Validation de l'essai de criblage et du concept « signature calcique »

A. Introduction

Le travail réalisé au cours de cette thèse sur la calmoduline, a pour objectif de caractériser précisément des petites molécules interagissant avec la calmoduline afin de les utiliser comme outils de recherche dans la compréhension du mécanisme de régulation du signal calcique cellulaire par cette protéine (**Figure 32**).

Notre **stratégie de recherche** de petites molécules interagissant spécifiquement avec la calmoduline a consisté, dans un premier temps à développer des **techniques de criblage**. Ces techniques se basent sur des méthodes de fluorescence, en particulier l'anisotropie, en utilisant des **chimiothèques de molécules fluorescentes** pour la détection de l'interaction moléculaire entre la calmoduline et les sondes fluorescentes. Nous avons pu ainsi développer un essai de mesure d'interaction "petite molécule–calmoduline" et cribler la chimiothèque « Prestwick » d'environ **1120 composés** dans le but de trouver de nouvelles molécules interagissant spécifiquement avec une conformation spécifique de la calmoduline. Ce qui nous a permis de valider notre essai de criblage par anisotropie de fluorescence et qui a fait l'objet d'une publication en 2006 (Dagher et al. 2006).

Comme **la modification de l'interaction** de la calmoduline avec ses protéines cibles est supposée affecter l'**homéostasie calcique** et les réponses cellulaires, nous avons étudié, dans un deuxième temps, les effets d'antagonistes connus de la calmoduline sur l'homéostasie calcique de cellules humaines et de cellules de plantes. Cette étude a permis de valider le concept de « signature calcique » et elle a fait l'objet d'une publication en 2009 (Dagher et al., 2009). Ainsi nous avons pu mettre en place une nouvelle méthode permettant de caractériser, au moins en partie, le signalosome calcique d'une cellule et son éventuelle modification.

Par la suite, l'interaction des isomères fluorescents issus de la chimiothèque fluorescente qui compte **1328 composés**, avec la calmoduline et ses mutants

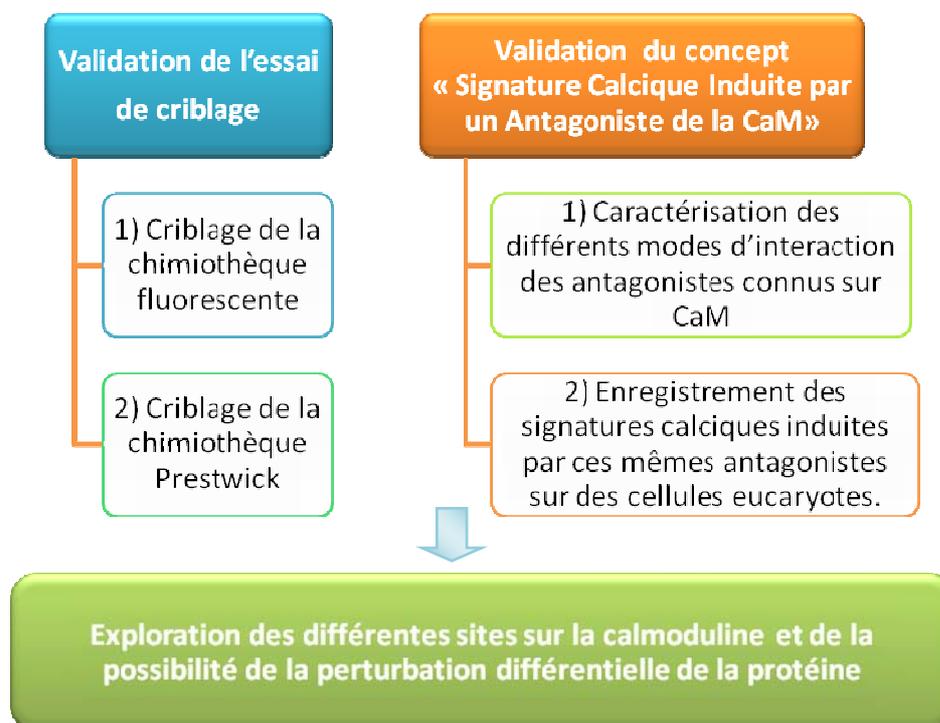
électrostatiques a été caractérisée afin d'en déterminer l'affinité et le mode d'interaction en fonction du calcium.

Après avoir validé l'essai du criblage de la chimiothèque Prestwick par déplacement de sonde fluorescente sur la calmoduline, nous avons criblé la chimiothèque de Strasbourg qui compte **5300 composés**. Ce criblage nous a permis de trouver des familles de molécules interagissant spécifiquement avec une conformation spécifique de la calmoduline. Les modes d'interaction des nouvelles molécules ont été caractérisés par des courbes doses-réponses en polarisation de fluorescence.

Ensuite, nous avons analysé l'interaction de certaines molécules par microcalorimétrie et nous avons étudié les effets de nos nouvelles molécules sur la signalisation calcique de cellules de plantes.

Nos résultats illustrent la **plasticité conformationnelle** de la calmoduline lors de la liaison de ces petits ligands et permettent de suggérer que différents mécanismes de liaison peuvent perturber de manière différentielle l'interaction de la calmoduline avec ses protéines cibles. Les données obtenues sur la caractérisation de l'interaction des sondes fluorescentes sur la calmoduline ainsi que le criblage de la chimiothèque académique de Strasbourg font l'objet de deux publications en cours de rédaction.

Notre stratégie de recherche de nouveaux interacteurs de la calmoduline est résumée dans la **Figure 32**.



- Caractérisation de la liaison des sondes fluorescentes issues du criblage de la chimiothèque fluorescente sur la calmoduline.
- Caractérisation de la liaison des « touches » issues du criblage de la chimiothèque académique de Strasbourg par déplacement de deux sondes fluorescentes sur la calmoduline.
- Classification des touches
- Perspectives d'utilisation de ces molécules pour analyser et comparer la signalisation calcique intracellulaire

Figure 32: Stratégie mise en place dans ce travail de thèse.

Stratégie mise en place dans ce travail de thèse pour valider un essai de criblage générique sur des protéines solubles, sa validation sur la calmoduline et l'utilisation de cet essai pour trouver de nouveaux interacteurs de la calmoduline.

B. Stratégie et Résultats : validation de l'essai de criblage

Dans l'objectif de mettre au point un dosage quantitatif qui permet d'identifier spécifiquement des interacteurs de la calmoduline, nous avons choisi l'anisotropie ou la polarisation de fluorescence comme méthode d'étude de l'interaction moléculaire.

Dans un premier temps, nous avons criblé par anisotropie de fluorescence une chimiothèque fluorescente de 1328 molécules sur la calmoduline. Ce criblage nous a permis de mettre en évidence une quinzaine de "touches" spécifiques. Deux de ces touches ont été resynthétisées et leurs isomères de position ont été isolés et caractérisés. Ces sondes ont servi par la suite à cribler la chimiothèque Prestwick (1120 molécules) sur la calmoduline par déplacement de la sonde fluorescente (**Figure 34**). Les nouvelles molécules trouvées serviront par la suite pour analyser le rôle de la calmoduline dans l'homéostasie calcique afin de déchiffrer ses mécanismes d'action. Ceci implique une étape de validation du concept de « signature calcique » induite par un antagoniste de la calmoduline qui fera l'objet de l'étude suivante « **Calmodulin Antagonist Induced Calcium Signature** » (**CAICS**).

1. Chimiothèque de molécules fluorescentes

La chimiothèque fluorescente est une collection de 1328 molécules fluorescentes, nommées « sondes », réparties dans deux fractions, CHPO et GH. Ces molécules marquées par un fluorophore (la lissamine), ont été conçues par l'équipe de Marcel Hibert et synthétisées dans des plaques 96-puits.

La conception de ces molécules fluorescentes repose sur la modélisation d'un pharmacophore pseudo peptidique chargé positivement lié par un bras espaceur, de longueur variable, à la lissamine Rhodamine B.

Le pharmacophore est représenté par une molécule bis-cationique caractérisée par quatre points de diversité au niveau de sa structure. Ces points de diversité sont représentés par a) deux points permettant de greffer des groupements fournissant au pharmacophore deux charges positives à pH physiologique, b) un troisième point de diversité représenté par des groupements moléculaires sélectionnés afin de couvrir les interactions intermoléculaires possibles. Finalement, le quatrième point concerne l'espaceur, il permet de faire varier la distance entre le pharmacophore et la lissamine qui est incorporée dans la sonde sous forme d'un mélange d'isomères ortho et para.

Cette diversité structurale est supposée moduler l'affinité et la spécificité de ces molécules pour les cibles destinées au criblage.

Actuellement, la chimiothèque fluorescente est mise à disposition au service du criblage de la plateforme de chimie biologie intégrative de Strasbourg (PCBIS), (<http://ifr85.u-strasbg.fr/Rubriques/PF/Chimiotheque.htm>).

2. Chimiothèque « Prestwick »

La chimiothèque Prestwick (Prestwick Chemical Library®) contient 1120 petites molécules dont 90% sont des médicaments présents sur le marché et 10% sont des alcaloïdes bioactifs ou des substances liées, (<http://www.prestwickchemical.fr>). Les études de toxicité de ces composés chez l'homme ont été effectuées.

Ces composés ont été sélectionnés pour leur diversité chimique et pharmacologique élevée ainsi que pour leur biodisponibilité et leur sécurité chez l'homme afin d'accélérer la découverte du médicament. En fait les touches trouvées suivent un programme d'optimisation par l'expertise en chimie médicinale et peuvent être testées chez l'homme.

Cette collection de molécules fait partie de la chimiothèque académique de Strasbourg au sein de la plateforme de chimie biologie intégrative de Strasbourg (PCBIS).

3. Anisotropie ou polarisation de fluorescence

Considérant sa nature ondulatoire, la lumière est définie par une onde électromagnétique constituée d'un champ électrique \mathbf{E} et d'un champ magnétique \mathbf{B} perpendiculaires entre eux et perpendiculaires à la direction de la propagation. Dans le cas de la lumière naturelle, ces deux champs oscillent dans toutes les directions tandis que la lumière polarisée est caractérisée par un champ électrique orienté dans une direction donnée.

Chaque fluorophore absorbe la lumière selon une direction préférentielle et l'émet dans une autre direction. Ainsi, les moments de transition d'absorption et d'émission sont définis respectivement par $\bar{\mathbf{M}}_a$ et $\bar{\mathbf{M}}_e$. Quand une population de fluorophore est excitée par une lumière polarisée, les molécules qui sont orientées dans une direction proche de l'orientation du champ électrique absorbent préférentiellement la lumière. Ce phénomène est appelé la photosélection.

Si une molécule excitée tourne pendant la durée de vie de l'état excité, sa lumière émise sera dépolarisée. Par conséquent, des mesures de polarisation de fluorescence peuvent fournir des informations sur la mobilité moléculaire, la taille, la flexibilité des molécules ainsi que la fluidité du milieu.

Après excitation d'un fluorophore, la fluorescence est observée perpendiculairement à la direction de propagation du faisceau incident. La lumière émise est caractérisée par les deux composantes parallèle ($I_{//}$) et perpendiculaire (I_{\perp}) au vecteur électrique du faisceau incident. Ce qui permet de définir l'intensité totale de fluorescence, **Figure 33** :

$$I_{\text{totale}} = I_{//} + 2 I_{\perp}$$

Par suite, l'état de polarisation de la fluorescence est caractérisé par

le taux de polarisation p :

$$p = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + I_{\perp})$$

ou l'anisotropie d'émission r :

$$r = p = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + 2 I_{\perp})$$

Les deux relations permettent de déduire :

$$r = 2p / (3-p).$$

Dans notre cas, les mesures d'anisotropie de la fluorescence ont été réalisées avec de la lumière incidente polarisée verticalement.

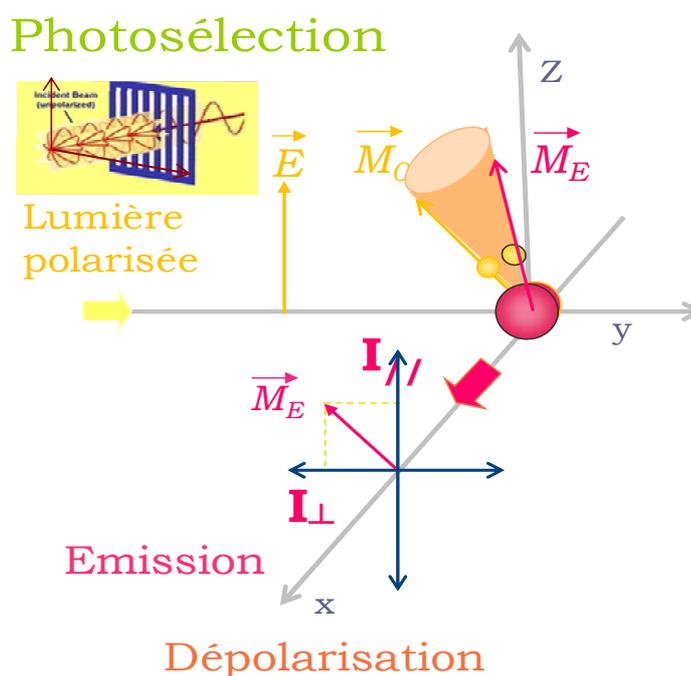


Figure 33: Principe de l'anisotropie (r) ou de la polarisation de fluorescence (p)

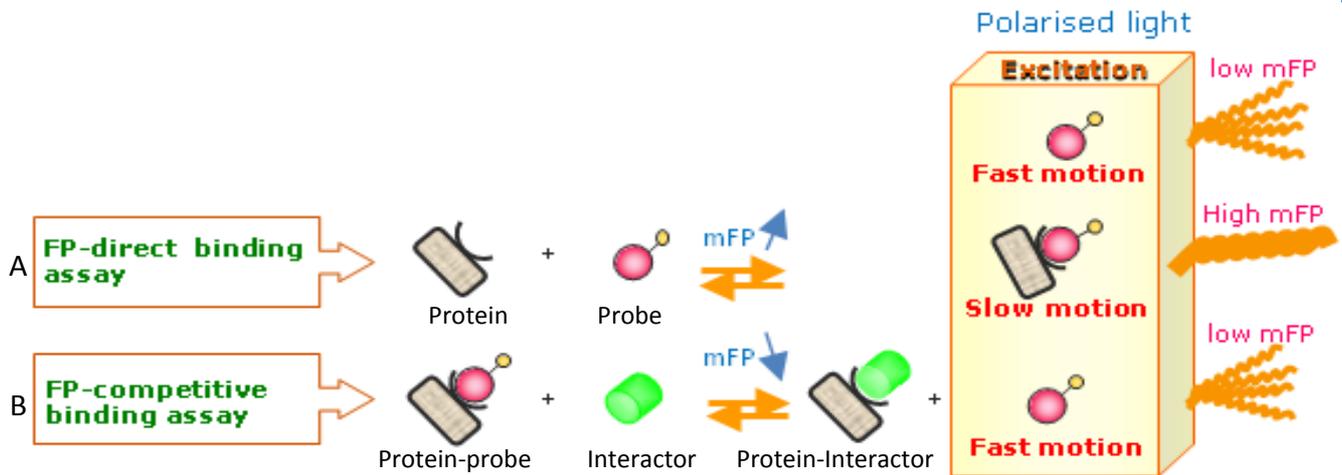


Figure 34 : Principes de la méthode de polarisation/anisotropie de Fluorescence.

Cette méthode a été utilisée dans notre essai de criblage pour l'étude de l'interaction moléculaire. La voie (A) représente le principe de criblage par anisotropie de fluorescence de la chimiothèque fluorescente sur une protéine. La voie (B) représente le principe de criblage en anisotropie par déplacement de la sonde fluorescente de la chimiothèque « Prestwick ».

4. Étude de l'interaction moléculaire par anisotropie de fluorescence

L'anisotropie de fluorescence est une méthode simple, directe et miniaturisable qui permet la détection de l'interaction protéine-sonde fluorescente en suivant les changements de la diffusion rotationnelle de la sonde sous sa forme libre ou liée. Cette méthode est adaptée à l'étude des équilibres d'association et n'exige pas la séparation des formes libre et liée impliquées dans l'équilibre puisqu'elles ont des vitesses de rotation différentes.

Le criblage de la chimiothèque fluorescente et de la chimiothèque « Prestwick » par la calmoduline par anisotropie, a été robotisé et miniaturisé dans des plaques noires 96-puits.

5. Criblage de la chimiothèque fluorescente

La procédure du criblage de la chimiothèque fluorescente consiste, tout d'abord, à mesurer le taux de polarisation des molécules fluorescentes seules. Ce taux présente une faible valeur à cause de la rotation rapide des sondes dans le milieu (**Figure 34**).

Après avoir ajouté la protéine sur les molécules fluorescentes, une deuxième mesure du taux de polarisation a été réalisée afin de détecter une interaction avec la protéine. L'interaction d'une molécule fluorescente avec sa cible est révélée par une augmentation du taux de polarisation due à la rotation lente du complexe CaM-sonde.

En 1926, **Francis Perrin** a établi la relation entre le taux de polarisation et le coefficient de diffusion rotationnelle :

$$1/r = 1/r_0(1 + 6D_r T)$$

Les conditions de validité de cette relation consistent à considérer les sondes fluorescentes comme des molécules ellipsoïdales qui présentent une durée de vie unique. Le coefficient de diffusion rotationnelle D_r est lié à la viscosité η du milieu et au volume hydrodynamique V de la sphère en mouvement par la relation de **Stokes-Einstein** :

$$D_r = RT/6V\eta$$

Où T la température absolue, et R la constante des gaz parfaits.

6. Criblage de la chimiothèque « Prestwick »

L'essai de criblage de la chimiothèque Prestwick par anisotropie ou polarisation de fluorescence consiste à mélanger la sonde avec la calmoduline dans des conditions expérimentales bien définies d'après les courbes de caractérisation de la sonde. Dans ces conditions, la fraction de la sonde liée à la calmoduline l'emporte sur la fraction libre dans le milieu et maintient un taux de polarisation relativement élevé. Après ajout des composés de la chimiothèque « Prestwick », la détection d'une interaction avec la protéine est repérée par une réduction du taux de polarisation due au déplacement de la sonde fluorescente par la molécule interagissant avec le complexe calmoduline-sonde.

C. Article: Use of a fluorescent polarization based high throughput assay to identify new Calmodulin ligands

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

**Use of a fluorescent polarization based high throughput assay to identify new
Calmodulin ligands**

Rania DAGHER, Claire PIGAULT, Dominique BONNET, Damien BOEGLIN, Christelle POURBAIX, Marie-Claude KILHOFFER, Pascal VILLA, Camille G. WERMUTH, Marcel HIBERT, Jacques HAIECH

Biochimica et Biophysica Acta, 2006, n° 1763, pages 1250-1255

Pages 118-123 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

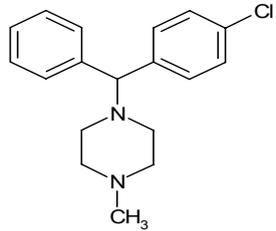
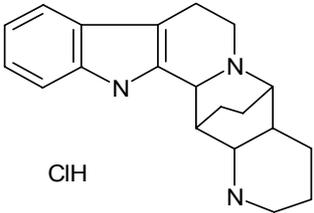
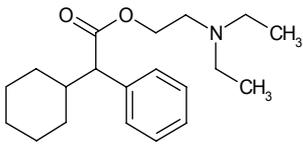
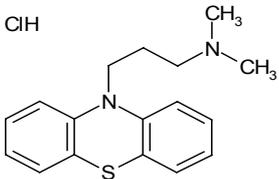
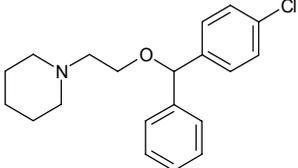
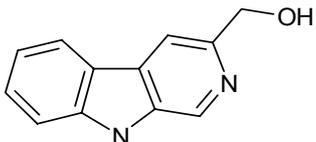
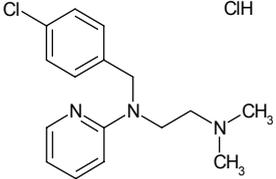
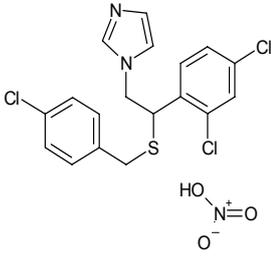
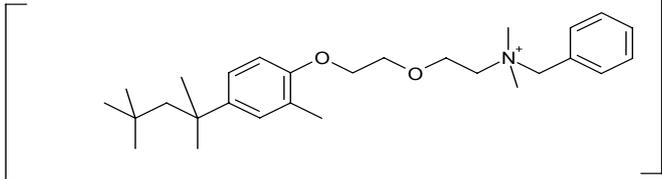
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.027>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

D. Sélection et caractérisation de « touches » de la calmoduline

Le criblage de la chimiothèque « Prestwick » par déplacement de la sonde fluorescente a permis la sélection de 11 « touches » de la calmoduline. Les structures de ces « touches » sont présentées dans le **Tableau 8**.

Noms	Structures	Noms	Structures
PCL 09G07	ClH 	PCL 09E06	ClH 
PCL 10G10	ClH 	PCL 09F04	ClH 
PCL 10H04	ClH 	PCL 11H09	
PCL 11A08	ClH 	PCL 11A11	
PCL 09G06			Cl ⁻

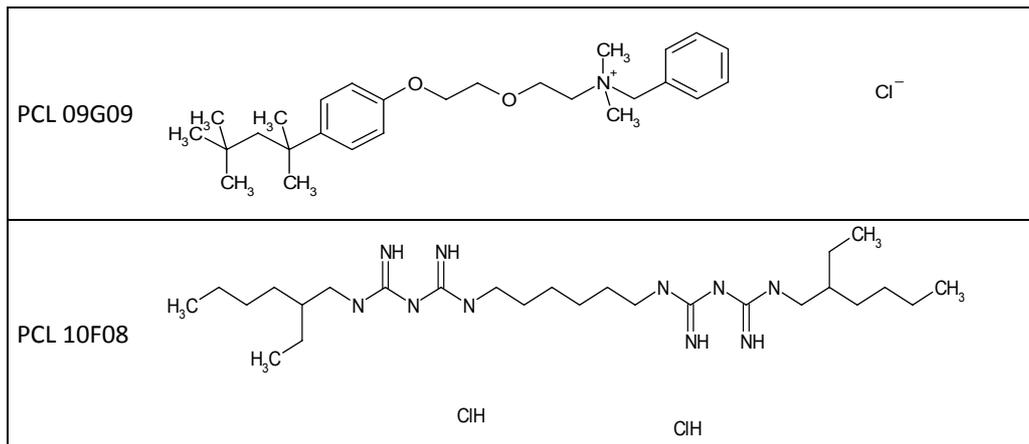


Tableau 8: Touches de la calmoduline issues du criblage de la chimiothèque Prestwick.

Les nouvelles molécules de la calmoduline ont été caractérisées biophysiquement en titrant le complexe calmoduline-sonde par des concentrations croissantes de chaque touche variant entre 0,1 et 100 μM . Les expériences de déplacement de la sonde fluorescente ont été réalisées en utilisant chacune des deux sondes liée à la calmoduline (16B05 ortho ou 17F07 ortho). Les résultats obtenus avec la sonde S1 sont présentés dans la [Figure 35](#).

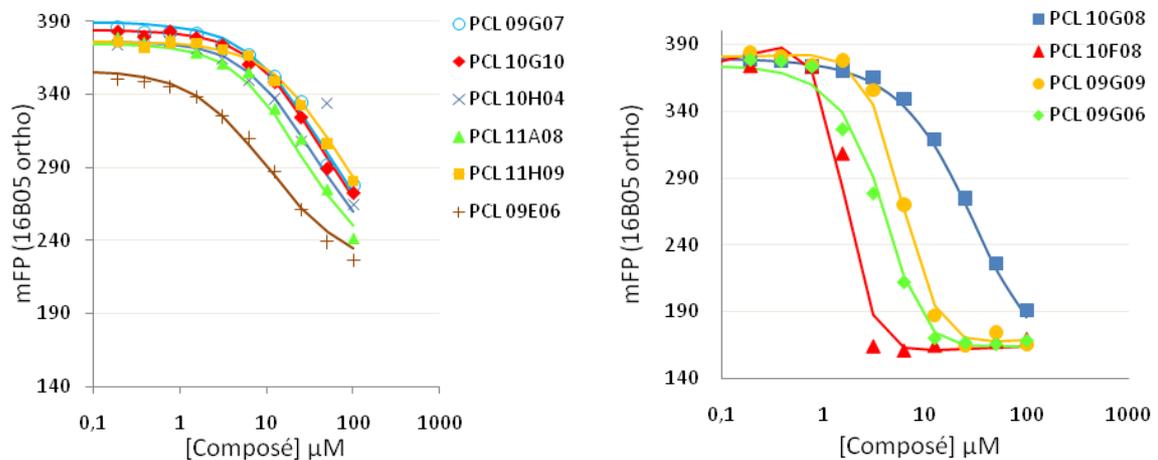


Figure 35: Expériences de déplacement de la sonde fluorescente par les nouvelles molécules.

Les différentes courbes de titration montrent que les nouvelles molécules interagissent différemment avec la calmoduline ce qui permet d'explorer différents sites d'interaction de petites molécules sur la calmoduline afin d'analyser ses mécanismes d'action moléculaires.

II. Stratégie et Résultats : validation du concept « Calmodulin Antagonist Induced Calcium Signature »

A. Introduction

Le calcium joue le rôle de second messenger au niveau intracellulaire dont les modifications de concentration induisent des réponses cellulaires par le biais d'un ensemble de protéines qui forment ce qui est communément appelé la boîte à outil du signal calcique. Le Ca^{2+} -signalosome décrit les dynamiques d'interaction ainsi que l'organisation spatio-temporelle des molécules de la boîte à outils du signal calcium. L'étude de ces Ca^{2+} -signalosomes spécifiques à chaque type cellulaire renseigne sur la génération, le décodage et la régulation des différents signaux calciques. Chacun de ces signaux possède une signature encodée dans sa dynamique spatio-temporelle et qui contrôle la spécificité des fonctions cellulaires.

Parmi les protéines impliquées dans le déchiffrement du signal calcique, la calmoduline (CaM) qui est une calcioprotéine ubiquitaire des cellules eucaryotes très largement étudiée depuis 1970. La calmoduline peut interagir au niveau cellulaire avec au moins 100 cibles de séquences variables pour réguler leurs fonctions biologiques en réponse à une stimulation calcique. L'interaction entre la calmoduline et ses cibles peut se réaliser d'une façon Ca^{2+} dépendante ou indépendante. Les études par RMN et par cristallographie réalisées sur un bon nombre de complexes CaM-cibles soulignent sa remarquable plasticité conformationnelle et sa capacité d'adapter des conformations variées dépendantes de l'entité structurale sur laquelle elle se fixe.

Parmi ses nombreuses fonctions cellulaires, nous nous sommes penchés plus particulièrement dans ce chapitre sur l'étude de son rôle dans l'homéostasie calcique en tant que médiateur calcique.

Comme la modification de l'interaction de la calmoduline avec ses protéines cibles est supposée affecter l'homéostasie calcique et les réponses cellulaires, nous avons étudié les effets d'antagonistes classiques connus de la protéine sur la réponse calcique des cellules humaines et de plantes.

D'après notre étude nous avons pu montrer que différentes signatures calciques sont induites par différents antagonistes de la calmoduline pour un même type cellulaire. Ceci suggère une perturbation différentielle des complexes CaM-cibles induites par les antagonistes de la calmoduline et témoigne de la spécificité de la boîte à outils du calcium exprimé dans une cellule donnée. Ces signatures sont aussi différentes entre les deux types. Cette différence de signature induite par les différents inhibiteurs de la calmoduline dans les cellules humaines et dans les cellules de plantes soulignent la spécificité du Ca^{2+} -signalosome dans les cellules eucaryotes.

Nos résultats permettent une vue globale d'une réponse cellulaire induite par un antagoniste donné sans description fine des mécanismes d'action moléculaire impliqués dans l'élaboration de la signature calcique. Ces données permettent de valider le concept « CAICS » et suscitent la curiosité pour le décryptage des mécanismes d'action moléculaire.

Ainsi, nous avons mis en place une nouvelle méthode permettant de caractériser, au moins en partie, le signalosome calcique d'une cellule et son éventuelle modification.

B. Article: Calcium fingerprints induced by Calmodulin interactors in eukaryotic cells

Rania Dagher¹, Christian Brière², Marie Fève¹, Maria Zeniou¹, Claire Pigault¹, Christian Mazars², Hervé Chneiweiss³, Raoul Ranjeva², Marie-Claude Kilhoffer¹ and Jacques Haiech¹

¹ UMR CNRS 7175, Université Strasbourg I, 74, route du Rhin, 67401 Illkirch, France

² UMR CNRS 5546, Université de Toulouse, BP42617 Auzeville, F-31326 Castanet-Tolosan, France

³ U894 INSERM, Université Paris-Descartes, Centre de Psychiatrie et Neurosciences 2ter, rue d'alesia 75014, Paris, France

Keywords : Fluorescence polarization; Fluorescence anisotropy; SynCaM, Fluorescent probe; Calcium fingerprint.

* Corresponding author: Jacques Haiech

Abstract

Calcium (Ca^{2+}) is an ubiquitous second messenger which promotes cell responses through transient changes in intracellular concentrations. The prominent role of Ca^{2+} in cell physiology is mediated by a whole set of proteins constituting a Ca^{2+} -signalling toolkit involved in Ca^{2+} -signal generation, deciphering and arrest. The different Ca^{2+} -signalosomes deliver Ca^{2+} -signals with spatial and temporal dynamics to control the function of specific cell types.

Among the intracellular proteins involved in Ca^{2+} -signal deciphering, calmodulin (CaM) plays a pivotal role in controlling Ca^{2+} -homeostasis and downstream Ca^{2+} -based signaling events. Due to its ubiquitous expression in eukaryotic cells and the variety of proteins it interacts with, CaM is central in Ca^{2+} -signalling networks. For these reasons, it is expected that disrupting or modifying CaM interactions with its target proteins will affect Ca^{2+} -homeostasis and cellular responses. The resulting calcium response will vary depending on which interactions between CaM and target proteins are altered by the molecules and on the specific Ca^{2+} -toolkit expressed in a given cell, even in the resting state.

In the present paper, the effect of six classical CaM interactors (W5, W7, W12, W13, bifonazole and calmidazolium) on Ca^{2+} -signalling was studied in tumor initiating cells isolated from human glioblastoma (TGNM01) and tobacco cells (BY-2) using the fluorescent Ca^{2+} -sensitive Indo-1 dye and aequorin, respectively. Various Ca^{2+} -fingerprints were obtained depending both on the CaM interactor used and the cell type investigated. These data demonstrate that interaction between the antagonists and CaM results in a differential inhibition of CaM-dependent proteins involved in Ca^{2+} -signal regulation. In addition, the distinct Ca^{2+} -fingerprints in tobacco and human tumor initiating glioblastoma cells induced by a given CaM interactor highlight the specificity of the Ca^{2+} -signalosome in eukaryotic cells.

Introduction

Cellular stimulation induces generally a cytosolic calcium signal that is the result of an exquisite balance between the activity of proteins involved in calcium entry, calcium exclusion and calcium buffering. These proteins are produced through the expression of a set of genes belonging to the calcium toolkit of an organism (Berridge et al. 2003; Berridge et al. 2000). A given cell in a given physiological state will express a subset of the calcium toolkit genes. Consequently, identical external stimuli may induce different calcium signals in distinct differentiated eukaryotic cells of the same as well as of other organisms.

For a given stimuli, the observed calcium signal is characterized by its shape and intensity in time and space. Because these characteristics are specific of the stimulus and of the physiological state of the cell, they constitute a calcium signature of the cell in a specific context (Plieth 2005; Shabir and Southgate 2008). This calcium signature is shaped by a stringent regulation of homeostasis of the cytosolic calcium which primarily involves modulation of calcium channel activity by external stimuli but also by feedback controls of calcium channels, pumps and exchangers by the cytosolic calcium concentration itself. The free cytosolic calcium concentration is detected by calcium sensor proteins able to transduce spatial and/or time modifications of the cytosolic calcium concentration into modulation of enzyme activities and/or arrangement of intracellular structures (modification of the cell shape, plasticity of the cytoskeletal meshwork). More than 200 genes in the human or the plant calcium toolkit code for proteins endowed with this property. Among these proteins, CaM is the prototype and is expressed in most of the cells of a given organism (Haiech et al. 2004). The other sensor proteins are generally restricted to specific cell types or are expressed in a given physiological context.

CaM exerts a major role both in regulating calcium homeostasis and intracellular signalling. The fact that CaM has been selected as a calcium hub along evolution may explain why CaM is ubiquitously expressed in the eukaryotic cell (Boursiac and Harper 2007; Igarashi and Watanabe 2007; Kobayashi et al. 2007; Maier and Bers 2007).

In order to decipher the role of CaM, a search for CaM interacting drugs has been started since the 70s. To address the question of CaM involvement in a given cellular function, a variety of molecules with large chemical structure diversity has been described and largely used in biological laboratories, mainly in the 80s. Recently, the use of CaM antagonists resumed due to the renewal of chemical biology. Moreover, CaM could be an interesting therapeutic target in some types of cancers and in inflammatory diseases (Khaksari et al. 2007).

However, CaM antagonists suffer from two drawbacks, namely the lack of specificity that hampers a simple interpretation of inhibitory data and the chemical diversity of these molecules that makes a simple structure activity relationship analysis difficult, if not impossible (Hidaka et al. 1978; Hidaka et al. 1981a).

In order to circumvent the non-specificity of CaM antagonist effects, twin molecules have been designed: one molecule with high affinity for CaM and its counterpart with lower affinity. Two such couples, namely W5/W7 and W12/W13, have been largely used to investigate CaM functions (Tanaka et al. 1982a; Tanaka et al. 1982c)

Moreover, the fact that a large variety of chemical structures may bind to CaM illustrates the plasticity of CaM, with its ability to adapt its shape to different molecules (Osawa et al. 1998). The plasticity of CaM implies the formation of a large palette of conformations that recognize different protein domains and small molecules. The co-crystallisation of CaM with various small molecules exquisitely illustrates this paradigm.

We reasoned that the differential binding properties of low M_w drugs to CaM would affect the association of CaM with its target proteins (Tanaka et al. 1982b) and result in differential biological outcomes.

CaM appears to be a calcium hub in the cell and is involved in the regulation of the calcium cytoplasmic homeostasis. The induced calcium signature may be attributable to a differential effect of antagonists onto the CaM-regulated calcium entry and/or calcium extrusion mechanisms in the cell (Kaplan et al. 2006a). Therefore, a specific CaM antagonist might be able to trigger a specific calcium signature that will be a fingerprint of part of the expressed calcium toolkit in a given cell. If this calcium signature is most specifically due to a perturbation of CaM dependent regulated mechanisms, we anticipate a correlation between the CaM antagonists binding properties and the observed calcium signature induced by the same antagonists.

We have addressed the relevance of our working hypothesis by studying the effects of selected couples of CaM antagonists on the potential perturbation of the homeostasis of free cytosolic calcium in animal and plant cell lines.

In this paper, we describe firstly the CaM binding properties and mechanisms of three couples of molecules (calmidazolium/bifonazole, W5/W7 and W12/W13). Then, we compare the calcium signatures induced by those molecules in two cell types, a cancer mammalian cell line (TGNM01, human cancer initiating cells) and a plant cell line (tobacco BY-2 cells).

The biophysical-based approach used to compare the binding mechanism of CaM antagonists to CaM suggests that these drugs are not functionally equivalent. We show further that CaM is mainly a regulator of cytoplasmic calcium homeostasis. We hypothesize that such a central function may explain why CaM is expressed in all eukaryotic cells and not restricted to specific cell types. Finally, we show, that one can use the tool set of CaM antagonists not only to perturb CaM function but also to fingerprint the expressed calcium toolkit of a given eukaryotic cell. This fingerprint is a biomarker that may be used to follow the modification of the expression profile of a calcium toolkit upon proliferation and/or differentiation of the eukaryotic cell.

Experimental Section

Materials

All chemicals were obtained from commercial suppliers and used without further purification. DMSO, KCl, Hepes, calmidazolium and EGTA were purchased from Sigma. W5 and W7 were from Merck, W12 and W13 were from VWR, bifonazole was from Axxora Platform, Tris was from Aldrich and CaCl₂ from Fluka. Ultra pure water (Milli Q instrument from Millipore Corp. MA, USA) was used for the aqueous solutions.

The assays were carried out with synthetic CaM (SynCaM), a hybrid between mammalian and plant CaM (Roberts et al. 1985). When necessary, Ca²⁺ was removed from SynCaM using trichloroacetic acid precipitation as described (Haiech et al. 1981).

Fluorescent probe CHPO 199-5-B05 ortho isomer (16B05 ortho) was selected from the fluorescent polarization screening assay applied to CaM and characterized biophysically (Dagher et al. 2006).

Spectroscopic measurements

Steady-state absorption spectra were recorded on a Shimadzu spectrophotometer to determine the protein and fluorescent probe 16B05 ortho isomer concentrations. Extinction coefficients of 1500 and 88000 M⁻¹.cm⁻¹ were used for SynCaM and the lissamine-tagged probe, respectively. All spectra were corrected for lamp intensity variations and background. All the measurements were carried out at 20°C.

Fluorescence polarization (FP) titration of CaM antagonists

FP-titrations were performed using Victor3 apparatus (Perkin–Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA) and carried out at 25°C. Binding assays were conducted in Corning Costar 96-well black polystyrene flat-bottomed plates (Model 3686; Corning, Acton, MA). The FP-titrations were performed by adding to each well, successively, 15 µL of a mixture of SynCaM (2 µM) and the 16B05 ortho isomer probe (200 nM) in the assay buffer (50mM Hepes, 150 mM KCl, CaCl₂ 10 µM pH 7.5) and 15 µL of CaM-antagonists, in the same buffer with final concentrations ranging from 0.5 to 500 µM. The plate was shaken and incubated for 5 min at room temperature. The polarization degrees (FP) were measured with an excitation wavelength set at 530 nm (bandwidth 7 nm) and an emission wavelength set at 610 nm (bandwidth 10 nm). For each plate, FP were measured versus control wells containing 16B05 ortho isomer probe bound to CaM and the unbound 16B05 ortho isomer probe alone (unbound probe).

Probe displacement by different concentrations of CaM antagonists was monitored by steady-state fluorescence polarization. The equilibrium binding between a fixed concentration of the fluorescent probe and its free increasing concentration, as a result of the probe displacement by CaM-antagonists, was monitored by fluorescence polarization and equilibrium parameters were determined by non linear curve fitting. The different models are described in the results and discussion section.

Data analysis

The polarization degree is defined by the equation $FP = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + I_{\perp})$ where FP is the fluorescence polarization degree, $I_{//}$ and I_{\perp} are the fluorescence intensities of the vertically ($//$) and horizontally (\perp) polarized emission when the sample is excited with vertically polarized light. For each plate, background correction was done by subtracting blank parallel and perpendicular components (means of 8 wells containing only buffer) from the respective intensities.

The fluorescence polarization measurements were often expressed in anisotropy because its values can be combined additively. Anisotropy values (A) were obtained from polarization (P) as follows:

$$A = \frac{2P}{3 - P}$$

Isothermal titration microcalorimetry of CaM antagonists

ITC measurements were carried out at 25 °C using a VP-ITC titration calorimeter. All solutions were thoroughly degassed by magnetic stirring under vacuum before use. The sample cell was loaded with 1.4 mL of 10 µM or 30 µM SynCaM in 50 mM Hepes, 150 mM KCl, 1 mM CaCl₂ buffer pH 7.5. The reference cell contained distilled water. Titration was carried out using a 300-µL syringe filled with one of the CaM antagonists: 1 mM W12 and W13, 0.5 mM calmidazolium dissolved in Hepes/KCl/CaCl₂ buffer containing 1% DMSO and 0.25 mM bifonazole in Hepes/KCl/CaCl₂ buffer containing 0.5 % DMSO, under continuous stirring at 300 rpm. Injections were started after baseline stabilization. Each titration experiment consisted of 50 consecutive injections of 3µL volume and 5.1s duration for each, with a 3 min interval between injections. The heat of dilution was measured by injecting the CaM the antagonist into the buffer solution without protein. The enthalpy change for each injection was calculated by integrating the area under the peaks for the recorded time course of power change and then subtracting the one of the control titration. Data were analyzed using MicroCal Origin software and were fitted to obtain thermodynamic parameters for the CaM-antagonists interactions with SynCaM binding site(s) using the different models proposed by the Origin software (see the section results and discussion).

Plant cell cultures

The transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv BY-2) cells expressing cytosolic apo-aequorin were grown in suspension under agitation (130 rpm) at 25°C in darkness in Linsmaier & Skoog (LS) medium supplemented with 30 g / L of sucrose and 1 mg / mL of 2,4-dichlorophenylacetic acid, pH 5.8 (Pauly et al. 2001). Subculturing was done every 2 weeks with a 2% inoculum of a 14 days old culture.

Luminescence measurements of [Ca²⁺]_{cytosolic} in plant cells

Aequorin light emission of tobacco cells was measured using a digital Sirius luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Germany). Tobacco BY-2 cell suspensions were collected during the exponential growth phase, washed twice and resuspended at a 20% packed cell volume in buffer (2 mM MES KOH, 175 mM mannitol, 0.5 mM K₂SO₄, 0.5 mM CaCl₂, pH 5.8). *In vivo* reconstitution of the aequorin was performed by incubating an appropriate volume of washed cells with 2.5 µM coelenterazine (Calbiochem, Bad Soden, Germany) under agitation for at least 3 hrs in

the dark. A variable amount (50 μL to 100 μL) of reconstituted cells was transferred to a luminometer cuvette and luminescence was recorded every second during the experiment. At the end of the experiment, the remaining reconstituted aequorin was discharged by addition of 300 μL of lysing buffer (100 mM CaCl_2 , 10% ethanol (v/v) and 2% Nonidet P-40 (v/v)). The emitted light intensity was converted into Ca^{2+} concentrations by using the calibration formula of Allen et al. (Plieth 2006) :

$$[\text{Ca}^{2+}] = [(L_0/L_{\text{max}})^{(1/3)} + [K_{\text{TR}}(L_0/L_{\text{max}})^{(1/3)}] - 1]/[K_{\text{R}} - [K_{\text{R}}(L_0/L_{\text{max}})^{(1/3)}]$$

where $[\text{Ca}^{2+}]$ is the calculated Ca^{2+} concentration, L_0 the luminescence intensity (RLU per second), L_{max} the total amount of luminescence present in the entire sample over the course of the experiment, K_{R} the association constant for the first Ca^{2+} ion to bind, and K_{TR} the binding constant of the second Ca^{2+} ion to bind to aequorin. The luminescence data were determined using K_{R} and K_{TR} values of $7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and 118 M^{-1} , respectively.

Measurement of cytosolic calcium in TGNM01 cells.

TGNM01 cells have been isolated from a form of human glioblastoma, a malignant glial-neuronal tumor (Varlet et al. 2004). These cells present the characteristics of tumor initiating cells: long-term self-renewal independent of anchorage in a define medium, clonality, reproduction of the original tumor after intracerebral graft of less than 100 viable cells in immunodeficient mice. Cells were grown in suspension using T75 flasks and NS34 culture medium essentially made of DMEM/F12 plus N2, B27 and G5 supplements (Invitrogen). In this medium, cells grow as neurospheres. To measure cytosolic calcium concentration changes, the cells were loaded with the membrane-permeable Ca^{2+} fluorescent probe Indo- 1 AM (Fluoprobes) which is cleaved to Indo-1 by intracellular esterases, allowing intracellular Ca^{2+} measurements. The day before the experiment, TGNM01 neurospheres were mechanically dissociated. Typically, TGNM01 neurospheres from a 10 mL culture were harvested, centrifuged at 800 rpm for 10 minutes, resuspended in 1 mL of NS34 medium and dissociated by gently pulling up and down the cell suspension (about 100 times) with a 1 mL pipette. After addition of 9 mL of NS34 medium, the dissociated cells were placed back in the incubator overnight. The next day, the cell culture was centrifuged, the supernatant was discarded and the cells were washed with PBS. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in 8 mL of HEPES/BSA buffer (137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl_2 , 1.25 mM CaCl_2 , 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, 10 mM HEPES, 0.4 mM NaH_2PO_4 , BSA 1g/l, pH 7.4) containing 40 μL of a 1 mM INDO-1 AM solution in DMSO (in the dark). The mixture was transferred in a T75 flask and incubated for 45 min at 37°C . Thereafter, the mixture was centrifuged, the supernatant was discarded and the cell pellet was washed twice with PBS and HEPES/BSA buffer and then resuspended in HEPES/BSA buffer (10^6

Indo-1 loaded cells per mL). Ca^{2+} measurements were performed on a Flexstation using 200 μL of Indo-1 loaded cells per well. Excitation was set at 338 nm and emission was recorded at 401 and 475 nm, respectively. Baseline was recorded for 30 seconds before addition of the compounds. At the end of the experiment, digitonin was added in each well at a final concentration of 100 μM to give the maximum of the fluorescence signal.

Results and discussion

Structural characteristics of CaM antagonists

Figure 1 depicts the structure of the CaM antagonists and the fluorescent probe used in this work. Most of the CaM antagonists present a naphthalen, a biphenyl or a tricyclic pharmacophore. In the present study aiming to further understand CaM antagonists, we have decided to use two twin molecules derived from naphtalesulfonamide (W7/W5 and W13/W12), and two diphenyl derivatives (bifonazole and calmidazolium). The fluorescent probe that binds to CaM and that will be used in the fluorescence polarization assay is composed of a naphthalen and a tricyclic derivative (the lissamine moiety of the molecule). The lissamine moiety of the molecule is involved in the binding of the probe to CaM as the ortho derivative has an affinity for CaM 10 times higher than the para derivative of the probe.

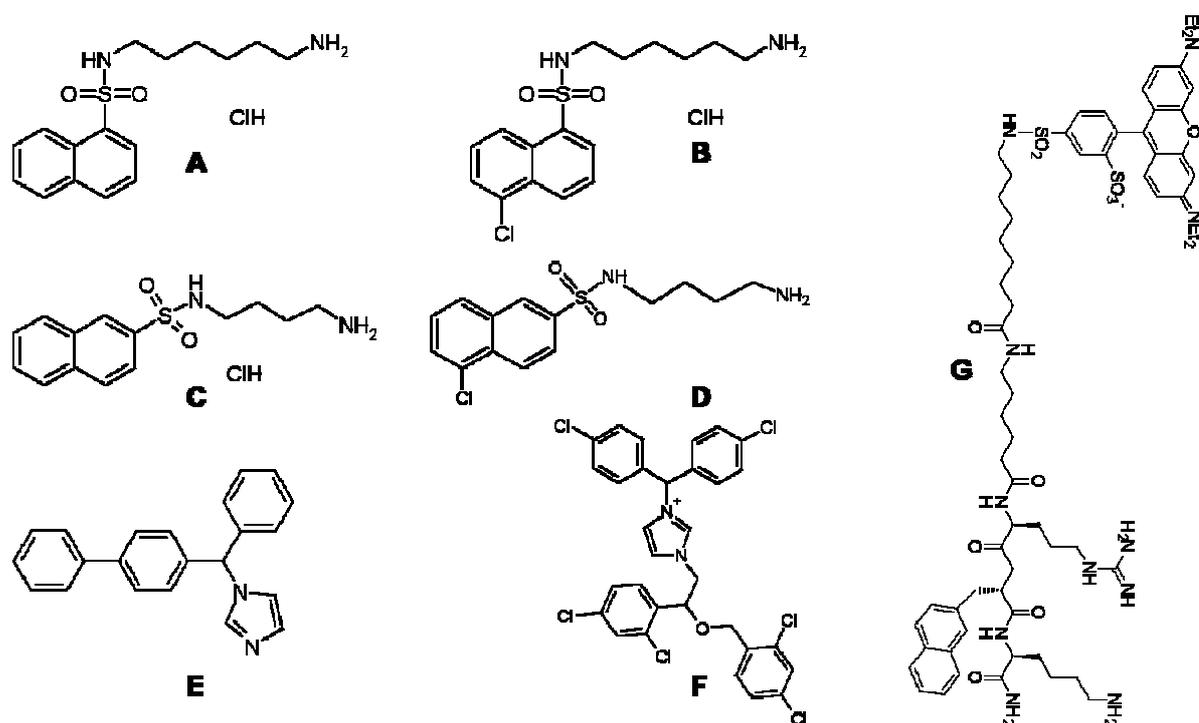


Figure 1 : Structure of W5 (A), W7 (B), W12 (C), W13 (D), Bifonazole (E), calmidazolium (F) and the fluorescent probe used in the anisotropy assay (G). The fluorescent probe interacts probably with two domains of CaM.

Characterization of calmidazolium, bifonazole, W5, W7, W12 and W13 binding to CaM by microcalorimetry

The binding stoichiometry and affinity of the antagonists for CaM were determined using isothermal titration calorimetry. ITC curves were fitted using a model with one binding site or a model with two independent binding sites. Results are summarized in Table I and figure 2. With the exception of W5, all the selected compounds bind to a high affinity site on CaM (dissociation constants ranging from 1.7 μM to 10 μM). The use of the second model improved the fitting for W7 and W13 which also bind to a low affinity site (dissociation constant higher than 100 μM) similar to the affinity site of W5.

Co-crystallisation of W7 with CaM has shown the formation of a complex with two molecules of W7 for one CaM (Osawa et al. 1998). Our data seems to imply that one site presents a higher affinity than the other one.

Compounds	K1 (M^{-1})	K2(M^{-1})	ΔH1 (Cal.mol^{-1})		ΔH2 (Cal.mol^{-1})	
			ΔS1 ($\text{Cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)		ΔS2 ($\text{Cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)	
Calmidazolium	1.34 10^5	NA	-2.6 10^3	14.9	NA	NA
Bifonazole	1.43 10^5	NA	-4.7 10^3	7.8	NA	NA
W5	8.87 10^3	NA	-4.1 10^3	4.4	NA	NA
W12	1.47 10^5	NA	-6.0	1.31	NA	NA
W7	$2.7 \cdot 10^5$	$3.35 \cdot 10^2$	-8.18 10^3	-2.63	-1.18 10^4	-28
W13	5.77 10^5	$8 \cdot 10^3$	-9.3 10^3	-4.8	-3.9 10^3	4.75

Table I: Isothermal titration calorimetry curves have, for calmidazolium, bifonazole, W5 and W12, been fitted with a one site model. A model with two independent sites has been used to fit the data for W7 and W13. The association constants for one or two sites (K1 and K2) with the enthalpy and entropy changes associated with the binding for each site are reported in the table.

Binding of calmidazolium, bifonazole, W5 and W12 to CaM is enthalpy and entropy driven whereas binding of W7 and W13 to the high affinity sites is only enthalpy driven. Enthalpy changes

are generally associated to ionic interactions either between ligand and protein or between protein residues due to conformational modifications. On the other hand, entropy modifications are associated to changes in the number of bound water molecules. It is interesting to note that besides W5 that exhibits a lower affinity for CaM, all the other compounds present similar high affinities for this protein (even W12 which is only a weak inhibitor of CaM). The affinity constants determined by microcalorimetry are similar to the ones reported by Hidaka et al. (Hidaka et al. 1981a).

The affinity of W12 for CaM is similar to the one of bifonazole and of calmidazolium. However, W12 has a weaker potentiality to inhibit CaM dependent enzymes. Therefore, the difference in activity is difficult to explain based only on the difference in affinity of the compound for CaM. Consequently, either the microcalorimetry approach does not allow to encompass all the steps of the binding mechanism between a molecule and CaM, or the conformations induced by the antagonists are different triggering differential inhibition of the various target proteins.

Nevertheless, in the naphthalenesulfonamide series, the most potentially inhibitory drugs (W7 and W13) present negative entropy upon binding, suggesting a conformational change different from their twinned molecules (W5 and W12).

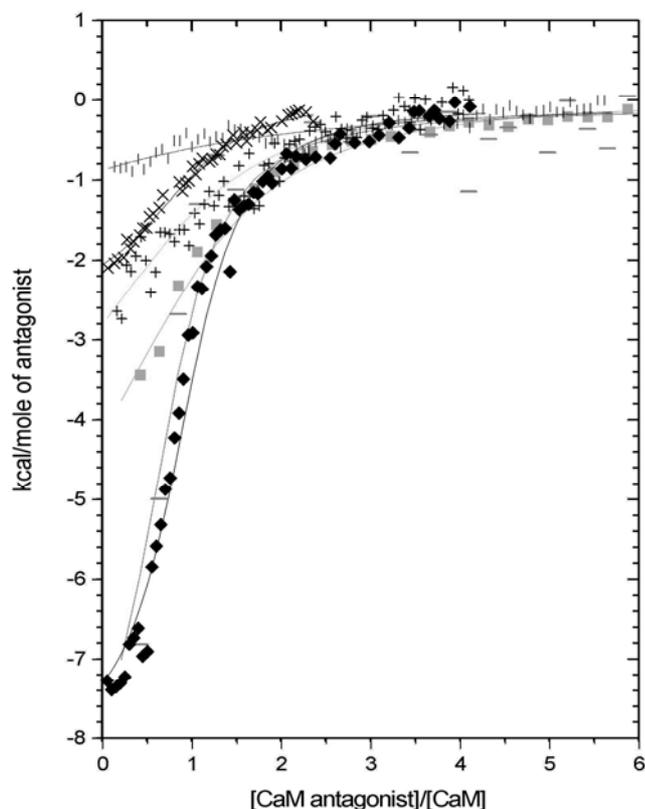


Figure 2: Isothermal calorimetry titration of SynCam (VU1) with different CaM antagonists. Enthalpy changes ΔH are measured as a function of mol antagonist bound per mol CaM. At high concentrations ($\geq 30 \mu\text{M}$, calmidazolium is precipitating). Experimental conditions are described in the experiemntal section. Symbols are \times for calmidazolium, $+$ for bifonazole, \blacklozenge for W7, $-$ for W13, l for W5 and \blacksquare for W12.

Characterization by fluorescence anisotropy of the binding mode of CaM antagonists to CaM.

To characterize the binding mode of the CaM antagonists, we used the fluorescent anisotropy assay previously described (Dagher et al. 2006). A fluorescent probe that binds to CaM with high affinity in a calcium dependent manner was competed with the different CaM antagonists. The binding of this probe was monitored by fluorescence anisotropy. This probe binds to two sites on CaM (one high affinity site with dissociation constant $K_d \sim .16\mu\text{M}$ and one low affinity site with K_d higher than $20 \mu\text{M}$) (data not shown). To analyze the binding of CaM antagonists, a competitive assay was set in which the concentration of CaM was kept at $1\mu\text{M}$, the concentration of the probe at $0.1 \mu\text{M}$ and the concentration of the calmodulin antagonists varied from 0.5 to $500 \mu\text{M}$. Under these conditions, the probe binds to the high affinity site. Monitoring the fluorescence anisotropy change of

the probe during titration of the CaM-probe complex with the different CaM antagonists gives information on whether the antagonists bind to the same site as the fluorescent probe or to a different site.

The experimental data were first analyzed considering model A in figure 3. In this model, the fluorescent probe binds to CaM on two different sites. The model is characterized by three parameters : k_1 the microscopic binding constant for the fluorescent probe, k_2 the microscopic binding constant for the CaM antagonist and c , a coupling factor which quantifies the coupling between the site of the probe and the site of the antagonist. If c equals 0, there is a direct competition between the probe and the antagonist for CaM binding. If c equals 1, the two sites are independent. Alternatively, a value of c higher than 1 indicates a positive cooperativity between the two sites and lower than 1, a negative cooperativity.

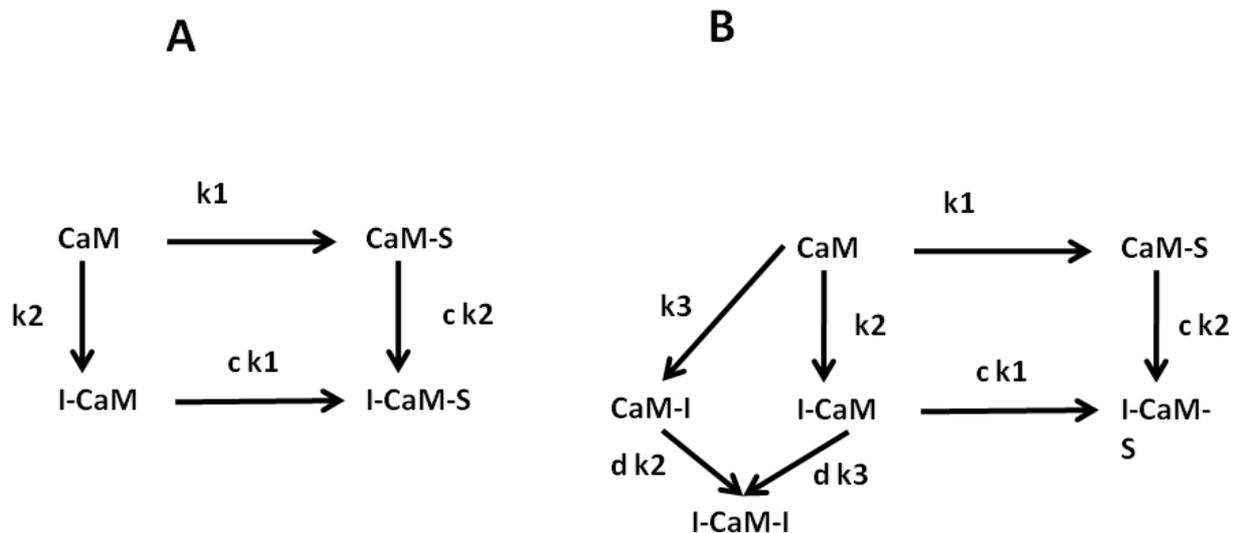


Figure 3: A) Model of CaM with one binding site for the fluorescent probe (S) and one binding site for an antagonist (I). k_1 and k_2 are the site association constants for the fluorescent probe and the CaM antagonist, respectively. B) Model of CaM with one binding site for the fluorescent probe (S) and two binding sites for the antagonist (I). k_1 is the site association constant for the fluorescent probe (S), k_2 and k_3 are the site association constants for the antagonists (I), c is the coupling factor between the probe binding site and the antagonist binding site, and d is the coupling factor between the two CaM antagonist binding sites.

Model (A) is described by the following equations (Roehrl et al. 2004):

$$(1) \quad v_x = \frac{k_1 \cdot x + c \cdot k_1 \cdot k_2 \cdot x \cdot y}{1 + k_1 \cdot x + k_2 \cdot y + c k_1 \cdot k_2 \cdot x \cdot y} \quad \text{where } v_x \text{ is the number of probes per CaM, } x = [S], \text{ the concentration of free probe and } y = [I] \sim [I]_{\text{total}} \text{ the total antagonist concentration.}$$

$$(2) \quad v_x \cdot Ct + x = St \quad \text{where } Ct \text{ is the total concentration of CaM and } St \text{ the total concentration of fluorescent probe}$$

$$(3) \quad A_{\text{obs}} = A_f \cdot \frac{x}{St} + A_b \cdot v_x \cdot \frac{Ct}{St}$$

A_{obs} is the observed anisotropy of the probe, A_f is the anisotropy of the free probe and A_b is the anisotropy of the bound probe assuming that the quantum yield of the probe does not change upon binding and that the fluorescence anisotropy of the probe is not affected by the binding of the antagonist.

To fit data obtained for bifonazole, W5 and W12, we used model A (1 site for the antagonist). The values of k_1 (site association constant of the probe), A_f and A_b are measured in a separate experiment [17]. The value of k_2 corresponds to the association constant K_1 determined in Table I.

Model A did not allow to fit data obtained with calmidazolium, W7 and W13. We therefore used model B (figure 3) which considers a second site for the antagonist (I) with a possible coupling mechanism (represented by the parameter c) between one antagonist binding site and the probe site and between the two antagonist binding sites (represented by parameter d).

To represent model B, equation (1) has to be replaced by the following equation:

$$(4) \quad v_x = \frac{k_1 \cdot x + c \cdot k_1 \cdot k_2 \cdot x \cdot y}{1 + k_1 \cdot x + k_2 \cdot y + k_3 \cdot y + d \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot y^2 + c k_1 \cdot k_2 \cdot x \cdot y}$$

As for W7 and W13, microcalorimetry data have been fitted using a model with two independent sites, the values of K_1 and K_2 determined in that experiment (Table I) were used for k_2

and k_3 in equation 4. k_1 , the probe association constant is the same as in model A. The value of the parameter d is 1 as the two sites are independent.

However, neither model A nor model B allowed to fit the calmidazolium data. We therefore replaced equation (1) by equation (5), derived from a Hill equation (model C).

$$(5) \quad v_x = \frac{k_1 * x * (1 + (k_3 * y)^m)}{1 + (k_2 * y)^n + k_1 * x * (1 + (k_3 * y)^m)}$$

with k_1 representing the association constant between the fluorescent probe and CaM (same value as in model A or B), k_2 (respectively n) the mean association constant for the binding of calmidazolium to CaM (respectively the hill coefficient), k_3 (respectively m) the binding of calmidazolium to the complex CaM-fluorescent probe (respectively the hill coefficient of this complex).

Model C implicates four main complexes, namely CaM alone, CaM with the fluorescent probe, CaM with at least n molecules of calmidazolium and CaM with one molecule of fluorescent probe and at least m molecules of calmidazolium. Moreover, we need to assume that the anisotropy (Ab') of the fluorescent probe in the last complex (CaM-One fluorescent probe- m calmidazolium molecules) is intermediary between the anisotropy of the free probe (Af) and the anisotropy of the probe bound to CaM without calmidazolium (Ab).

Taking into account these considerations, equation (3) has to be replaced by equation (6).

$$(6) \quad A_{obs} = Af * \frac{x}{St} + \frac{k_1 * x * (Ab + Ab' * (k_3 * y)^m)}{1 + (k_2 * y)^n + k_1 * x * (1 + (k_3 * y)^m)} * \frac{Ct}{St}$$

Figure 4 shows the displacement plots of the fluorescent probe 16B5 by the different CaM antagonists.

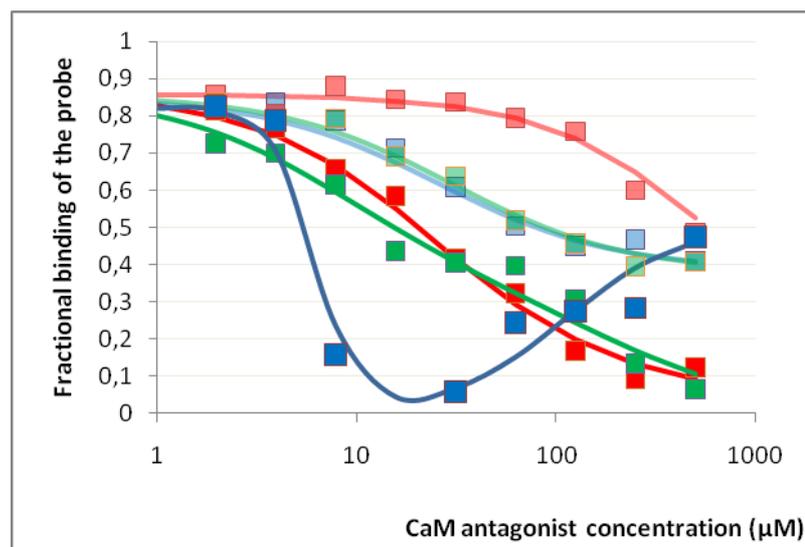


Figure 4: Displacement of the fluorescent probe 16B5-ortho by CaM antagonists. Experimental conditions are described in the experimental section. Plots have been normalized to indicate the fractional binding of the probe to its site (ordinate) as a function of CaM antagonist concentrations (abscissa). Calmidazolium/bifonazole (dark and light blue curves), W7/W5 (dark orange and light orange curves) and W13/W12 (dark green and light green curves).

The different experimental plots have been fitted with the parameters reported in Table II using model A for bifonazole, W5 and W12, model B for W7 and W13 and model C for calmidazolium.

Compounds	k1 (μM^{-1})	k2 (μM^{-1})	k3 (μM^{-1})	c	n	m
Bifonazole	6,25	0,142	NA	0,149	NA	NA
W5	6,25	0,009	NA	0	NA	NA
W12	6,25	0,147	NA	0,1	NA	NA
W7	6,25	0,27	0,0007	0,015	NA	NA
W13	6,25	0,578	0,008	0,09	NA	NA
Calmidazolium	6,25	0,25	0,076	NA	4	5,5

Table II. Parameters used to fit the experimental data to model A for bifonazole, W5 and W12, model B for W7 and W13 and model C for calmidazolium.

The zero or close to zero value for parameter c (W5 and W7) suggests that the probe and the twinned molecules W7/W5 compete for the same site of CaM. A value of c close to 0.1 for bifonazole, W12 and W13 suggests that the binding sites of these compounds are not identical to the probe binding site.

Taking into account the fit of the data for calmidazolium, we have to assume that at least four calmidazolium molecules bind to CaM in the absence of probe and that at least six calmidazolium molecules bind to CaM in the presence of the fluorescent probe with high positive cooperativity. Although it has been shown that CaM exhibits four binding sites for trifluoperazine (another CaM antagonist), this has not been shown for calmidazolium. Our observation suggests possible synergistic effects between different CaM antagonists.

Based on their binding mechanisms, the CaM antagonists fall into at least three classes of compounds:

- 1) the calmidazolium class shows a complex mechanism of competition with the fluorescent probe,
- 2) the W7 and W5 class competes directly with the fluorescent probe,
- 3) the W13, W12 and bifonazole class seems to bind to a site that overlaps with the binding site of the fluorescent probe.

The relative order of potency estimated by the ability of the drugs (used at a concentration of 125 μ M) to displace the fluorescent probe is as follows: calmidazolium, W7 and W13 (70 % and more) bifonazole and W12 (around 50 %) and W5 (less than 25 %).

Differential induction of calcium signatures in human cancer stem cells and in tobacco cells

Due to their chemical and radioresistance, human cancer stem cells have been shown to be involved in the reborn of tumors. TGNM01 cell line has been isolated from a high grade primary brain tumor and demonstrated to fulfil all the characteristics of so-called tumor stem cells or tumor initiating cells (Patru et al submitted). They are also highly resistant to drug such as the alkylating temozolomide with less than 40% of cell death up to 1mM after 7 days of incubation (Mihalescu-Maingot M and Chneiweiss H, unpublished data). As calcium signaling plays a central role in

proliferation and differentiation of eukaryotic cells, we have selected this cell line to analyze the calcium signatures induced by the six CaM antagonists used in our study.

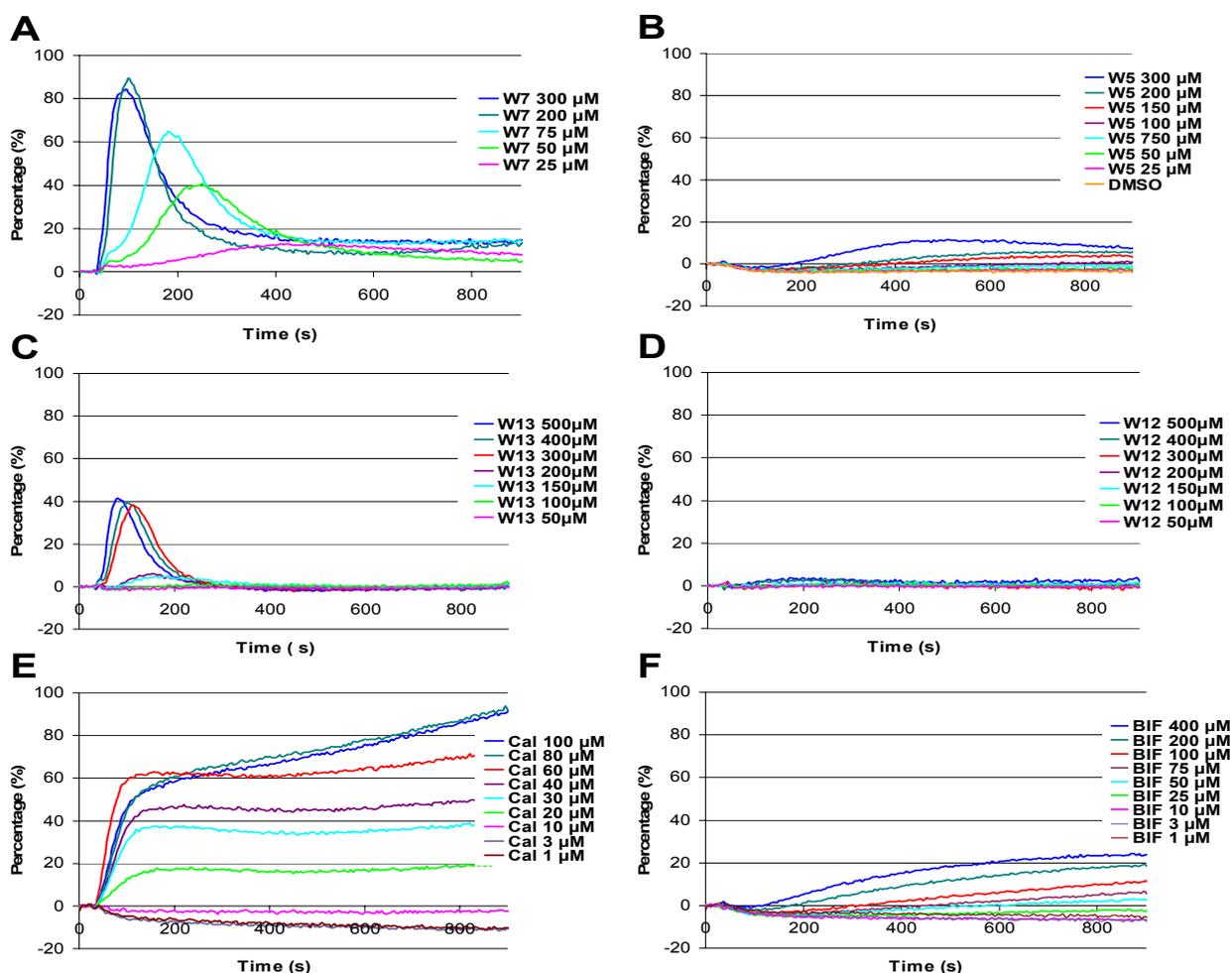


Figure 5: Calcium signal induced in TGNM01 cells by CaM antagonists at different concentrations. (A) W7, (B) W5, (C) W13, (D) W12, (E) Calmidazolium and (F) Bifonazole. TGNM01 cells were loaded with Indo-1 as indicated in the experimental section. Indo-1 fluorescence changes at 405 nm and 475 nm were monitored as a function of time. Ordinate represents the percent change of the fluorescence intensity ratio (I_{405}/I_{475}) relative to the maximum change of the ratio observed when digitonin was added at $t = 930$ s. Abscissa represents the time of recording (in seconds). CaM antagonists were injected at $t = 30$ s. Fluorescence was corrected for background. For CaM antagonists solubilized in DMSO (calmidazolium, bifonazole and W5), the final concentration of DMSO in the well is 1%. Experiments have been done at least three times for each CaM antagonist.

Water insoluble CaM antagonists (calmidazolium, bifonazole and W5) were solubilized in DMSO so as to maintain its final concentration to 1% in the reaction mixture. As shown in figure 5B addition of 1% DMSO to TGNM01 cells did not *per se* perturb the intracellular calcium homeostasis.

Among the intracellular CaM antagonists tested, three of them (W7, W13, calmidazolium) induced a strong calcium signal, one (bifonazole) a moderate one, whereas W5 and W12 had no

visible (or a very slight) effect even at 300 μM (figure 5), or even at 500 μM for W12 (data not shown).

Further analysis of the curves indicates differences in the calcium signals induced. Indeed, bifonazole and calmidazolium at low concentration triggered a slight cytoplasmic calcium decrease. This calcium behavior will be called calcium signature 1.

On the other hand, bifonazole and calmidazolium up to 60 μM induce a concentration dependent increase of cytoplasmic calcium starting after a delay of ~ 150 seconds. This will be called calcium signature 2. It is likely that these effects are not related to a perturbation of CaM as they are not seen with W7 and W13. At concentrations of calmidazolium above 60 μM , a concentration independent steady increase of cytosolic calcium is observed. For TGNM01 cells, this effect may be attributed to a detergent effect of calmidazolium.

W7 and W13, but also calmidazolium trigger a transient calcium wave with a maximum around 120 to 130 seconds. The parameters of this calcium transient increase (amplitude, weight, time of maximum amplitude) depend on the antagonist and its concentration (Figure 5). Increasing antagonist concentration enhances the amplitude of the calcium wave (up to a certain level) and shortens the time necessary to reach the maximum amplitude. The calcium wave observed corresponds to calcium signature 3. The concentration independent steady increase of the basal cytosolic calcium concentration observed for W7 was not taken into account as it locates within the error interval. Using this typology, each CaM antagonist-induced calcium signal (CAICS) may be described as the composition of a subset of those calcium signatures (see table III).

compounds	calcium signatures
W7	3
W13	3
calmidazolium	1;2;3
bifonazole	2

Table III: Encoding of the calcium signal induced by the CaM antagonists. For each compound and each concentration used, the calcium signal is considered as the sum of a subset of three calcium signatures (see text).

Next, we have addressed the question of whether CaM antagonists would determine specific calcium fingerprints in a different eukaryotic system, the tobacco BY2 cells. Figure 6 reports the calcium signals induced by the six CaM antagonists in these cells.

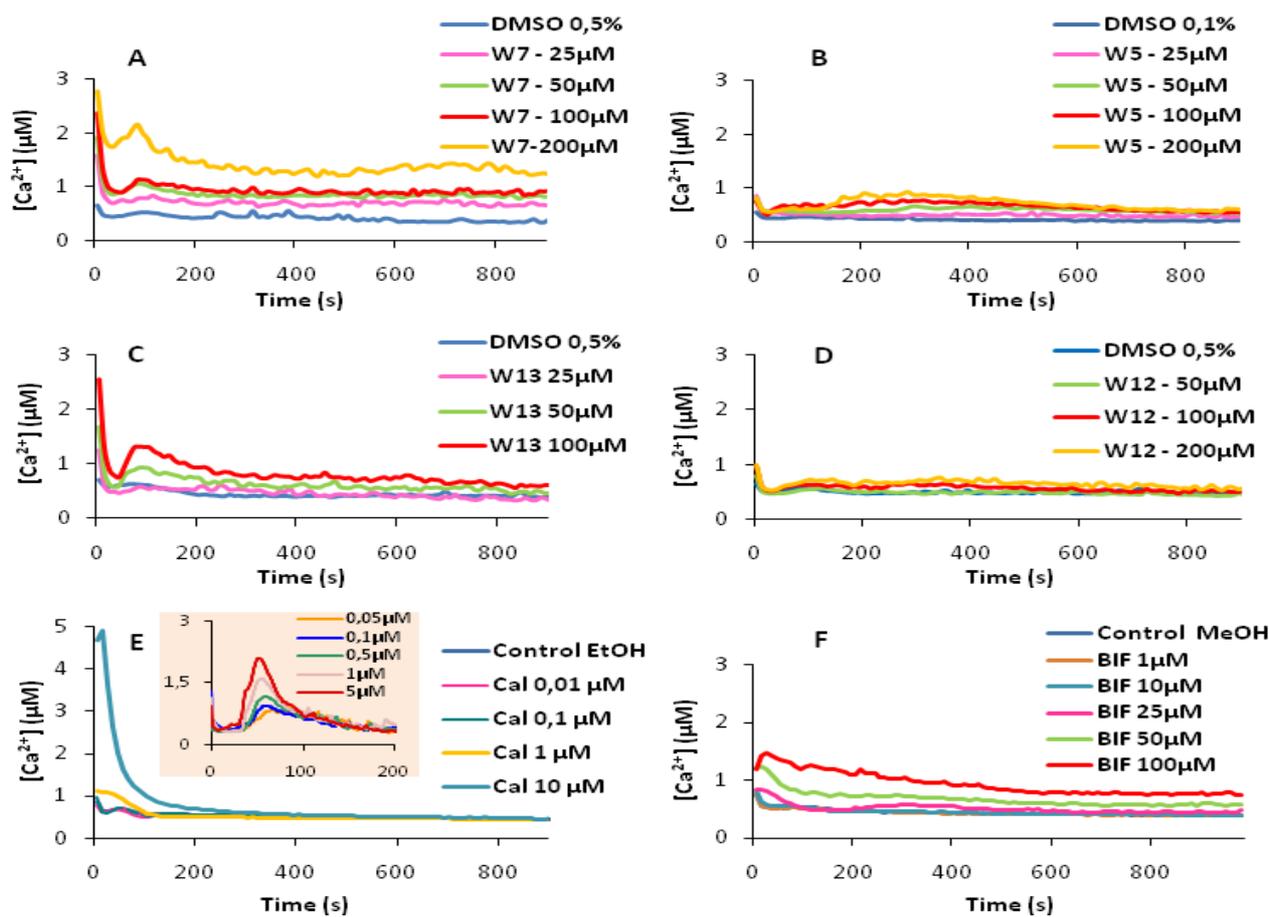


Figure 6: Calcium signal induced in tobacco BY2 cells by CaM antagonists at different concentrations. (A) W7, (B) W5, (C) W13, (D) W12, (E) calmidazolium and (F) bifonazole. Each curve is the mean of three experiments. Experimental conditions are described in the experimental section. As calmidazolium exhibit only a rapid increase, experiment has been realized with an automatic injector in order to follow this early calcium transient (see insert).

CaM antagonists also induce cytosolic calcium concentration changes in tobacco plant cells, although the parameters characterizing these changes appear to be different from those described for TGNM01 cells.

In the plant cell system, CaM antagonists do not induce a lowering of the cytoplasmic calcium concentrations as in human TGNM01 cells. Hence, calcium signature 1 defined previously for TGNM01 cells is absent.

W7, W13 and bifonazole seem to induce a slight increase in the basal cytoplasmic calcium concentration similar to calcium signature 2. A one striking difference is that calmidazolium does not induce this signature in plant cells.

A calcium transient around 100 seconds similar to calcium signature 3 in TGNM01 cells is observed for W7, W13, calmidazolium and to a lower extent for bifonazole.

Specific to the plant cell is also the rapid transient increase in response to W7, W13 and with lower amplitude to calmidazolium and bifonazole. The amplitude of this calcium transient is dependent on the concentrations of the CaM antagonists (calcium signature 4).

W5 seems to induce a weak transient increase with maximum amplitude in the 200-300 s range. That is only seen with W5 and is therefore probably not linked to CaM.

Table IV summarizes these results on plant cells.

compounds	calcium signatures
W7	2,3,4
W13	2,3,4
calmidazolium	4
bifonazole	2,3,4

Table IV: Encoding of the calcium signal induced by the CaM antagonists. For each compound and each concentration used, the calcium signal is considered as the sum of a subset of three calcium signatures (see text).

Data presented clearly show that the CaM antagonist-induced calcium signals (CAICS) are different between the two cell lines:

- Calcium signature 1 (decrease in the basal cytosolic calcium concentration) is specific to mammalian cells.
- On the other hand, calcium signature 4 is specific to the plant cells.
- Two types of calcium signatures are similar between the two cell lines: a transient calcium wave (calcium signature 3) and an increase of the basal calcium cytosolic concentration (calcium signature 2).
- In both cell lines, W7, W13 and calmidazolium seem to lead to significant CAICS. These same compounds were the most efficient in the competition with the fluorescent probe (figure 4).

➤ Each antagonist has a specific impact on the characteristics of a given calcium signature (amplitude and duration of a calcium wave, level of increase or decrease of the cytosolic calcium concentration), a reflection of the complex mode of action of CaM inside the cell.

Conclusion

The thermodynamic characteristics of classical CaM antagonists binding to CaM have been determined allowing to pinpoint the specificity of each CaM antagonist and to illustrate the ability of CaM to adapt its binding mechanism to the subtle modification of a given pharmacophore.

Collectively, the results described in the present paper also show for the first time that:

a) CaM antagonists induce a calcium signal (CAICS) in human cells as already shown in plants where they have been used to modulate calcium-dependent gene expression (Kaplan et al. 2006b),

b) CAICS are due to a perturbation of CaM or CaM-like proteins as the counterpart of W7 and W13 (respectively W5 and W12) do barely modify the cytoplasmic calcium concentration either in human or plant cells,

c) Effects of calmidazolium are probably mediated by CaM as the calcium signal induced harbors calcium signatures induced by W7 or W13,

d) The induced calcium signal is qualitatively different between human cells and plant cells, therefore validating the use of CaM antagonists-induced calcium signals to fingerprint at least part of the expressed calcium toolkit of a given cell line,

e) For a same cell line, the CaM antagonists-induced calcium signals (CAICS) are qualitatively and quantitatively different depending on the antagonist used. This suggests a differential perturbation of CaM that results in a different induced calcium signal,

f) From the limited set of CaM antagonists, it appears that the capability of a CaM antagonist to induce a significant calcium signal is not correlated to its affinity to CaM but to its ability to displace efficiently the fluorescent probe used in this study from CaM. This observation suggests that the fluorescent probe used may bind to CaM in a manner similar to CaM targets involved in the generation of the CaM antagonist-induced calcium signal.

These CaM antagonist-induced calcium signals (CAICS) may be due to induced calcium release from different intracellular stores and to the inhibition or the activation of calcium pumps or calcium exchangers directly or indirectly through perturbation of CaM interactions with different cellular targets. It is worth noting that, in contrast to animal cells, plant cells express not only a number of typical CaM isoforms but also a large family of CaM-related proteins (CML) able to bind calcium ions (Ranty et al. 2006) and which might be targets for CaM antagonists. The CAICS give insight into the global response of the cellular calcium homeostasis system without, for the time being, a fine description of the underlying molecular mechanisms. At first, CAICS may be used as a fingerprint of the general “calcium status” of a cell allowing to following the change in this “calcium status” upon modification of the cellular physiology. Some studies have reported these CAICS in porcine aortic endothelium cells using W7 and calmidazolium (Watanabe et al. 1999). The characteristics of these CAICS appear different from those described in our study, thus validating our concept of fingerprint. In this report, the authors suggest an effect of CaM in regulating the calcium uptake in cytoplasmic stores. In *Dictyostelium* cells, calmidazolium but not W7 induces a transient cytoplasmic calcium increase (Malchow et al. 2004; Schlatterer and Schaloske 1996), indicating that in these cells, the two compounds act differentially on the CaM dependent regulatory mechanism of calcium homeostasis.

Using different CaM antagonists, it is possible to trigger different calcium signals and therefore, to induce different cellular events (either different gene expression profiles or modification of the metabolome) (Kaplan et al. 2006a).

Our next goals are to extend the palette of CaM antagonists able to induce calcium signals with different shapes and to decipher the underlying molecular mechanism behind CAICS.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by ANR (project n° ANR-06-BLAN-0370) (J.H and R.R), Ligue Nationale Contre le Cancer (HC), European program HD-stem and national program INCA (J.H).

C. Conclusion

Les travaux décrits dans la littérature concernant la perturbation de l'homéostasie calcique, montrent l'utilisation d'antagonistes classiques de la calmoduline tels que le W7 et le calmidazolium (Schlatterer and Schaloske 1996 ; Watanabe et al. 1999) sur différents types cellulaires.

Dans l'objectif de valider le concept de CAICS sur des cellules humaines et de plante, nous avons étudié l'effet des antagonistes connus de la calmoduline (les dérivés naphthalènesulfonamides et les dérivés d'imidazolium) sur la variation de la concentration de calcium intracellulaire. Cette étude a consisté à caractériser la liaison des antagonistes, appartenant aux familles des dérivés naphthalènesulfonamides et dérivés imidazolium, sur la calmoduline et à enregistrer les signatures sur deux modèles de cellules eucaryotes, humaines (TGNM01) et de plante (BY-2).

La caractérisation de la liaison des antagonistes classiques sur la calmoduline par deux méthodes, biophysique et thermodynamique, a permis de mettre en évidence la présence de différents sites d'interaction pour de petites molécules. L'analyse des données biophysiques obtenues par titration du complexe calmoduline-sonde par les inhibiteurs, montre que les antagonistes se fixent sur la calmoduline selon différents modes de liaison. Ces modes de liaison sont présentés par les modèles de simulation utilisés pour le calcul des constantes de liaison des antagonistes sur la calmoduline et qui montrent différents mécanismes d'interaction notamment par rapport au nombre de sites de liaison de l'antagoniste et le couplage entre les sites de liaison de la sonde et de l'inhibiteur.

L'analyse de la liaison des antagonistes par microcalorimétrie confirment la présence de plusieurs sites de liaison de petites molécules. Par conséquent, les paramètres thermodynamiques caractéristiques de la liaison des antagonistes sur la calmoduline illustrent la plasticité conformationnelle de la protéine qui est liée à sa capacité d'adapter son mécanisme de liaison par rapport à sa cible.

Nos résultats sur les cellules, humaine et de plante, induites par les antagonistes classiques de la calmoduline montrent différentes CAICS qui dépendent de la structure chimique de chaque antagoniste. Les signatures calciques sont supposées être générées

par la perturbation de l'interaction entre la calmoduline et une de ses cibles et soulignent la spécificité du signalosome calcique pour chaque type cellulaire. Ceci suppose que ces antagonistes perturbent d'une façon différentielle certaines fonctions cellulaires de la calmoduline en inhibant l'interaction avec certaine(s) de sa ou ses cible(s). Les données obtenues permettent de valider sur les deux types cellulaires (TGNM01 et BY-2) le concept de « CAICS » qui servira comme biomarqueur pour suivre le signalosome calcique et son éventuelle modification au cours de la différenciation et/ou prolifération cellulaire.

Vue la diversité de ses cibles et la multiplicité de ses fonctions, la recherche d'inhibiteur spécifique d'une conformation donnée de la calmoduline devient d'une grande importance pour la compréhension de ses mécanismes d'action cellulaire. D'où la nécessité de la recherche de petites molécules de structures chimiques différentes qui sont supposées se fixer de façons différentes sur la calmoduline afin d'explorer les différents sites de liaison sur la protéine. Ces sites sont supposés intervenir dans les interactions de la calmoduline avec ses cibles impliquant ainsi différents mécanismes d'action qu'on souhaite étudier sur des cellules humaines et de plantes pour analyser le rôle de la calmoduline dans l'homéostasie calcique.

Chapitre III

EXPLORATION DES DIFFERENTES RÉGIONS DE LA CALMODULINE

I. Caractérisation de l'interaction des sondes fluorescentes

L'étude de l'interaction moléculaire entre une cible et son ligand ou une enzyme et son substrat a été facilitée par l'utilisation de sondes fluorescentes non covalentes (Bohnert et al. 1982). Les sondes fluorescentes utilisées pour l'exploration et la caractérisation des sites de liaison de petites molécules sur la calmoduline sont peu nombreuses. Les plus connues sont le TNS (2-p-Toluidinyl-naphtalène-6-sulfonate), l'9AC (9-Anthroylcholine) and l'ANS (8-anilino-1-naphthalènesulfonate) (LaPorte et al. 1980), (**Figure 36** et **37**). Ces sondes sont peu spécifiques de la calmoduline par exemple le TNS qui est une sonde fluorescente amphipatique présente une affinité de 10 μM pour la protéine (Tanaka and Hidaka 1980). Le TNS a été utilisé dans de nombreuses études pour explorer les mécanismes d'activation d'un certain nombre d'enzymes par la calmoduline telles que la PDE, la CaMKII et la MLCK (Huang et al. 1994).

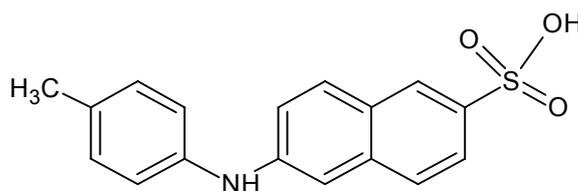


Figure 36: Structure de la sonde TNS.

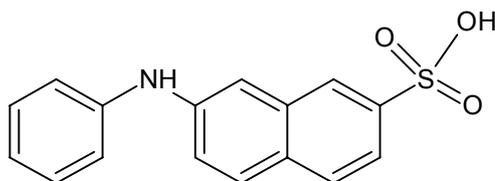
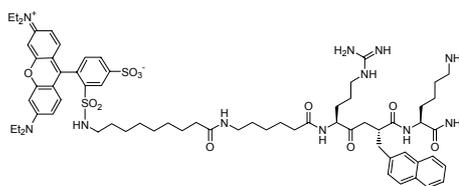


Figure 37: Structure de la sonde ANS.

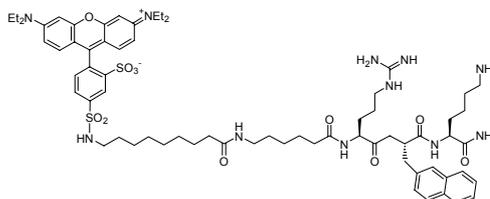
Afin d'explorer les différents sites de liaison de petites molécules sur la calmoduline, notre stratégie a consisté, dans un premier temps, à caractériser l'interaction de nos sondes fluorescentes avec la protéine en utilisant la SynCaM et des mutants électrostatiques de la calmoduline. Ces sondes ont été sélectionnées à partir du criblage de la chimiothèque fluorescente pour réaliser le criblage de la chimiothèque académique de Strasbourg par déplacement de sondes fluorescentes (**Figure 38**).

a)



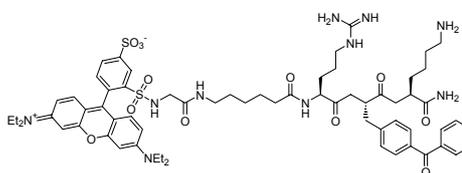
S1 = CHPO 199-5-B05 ortho

b)



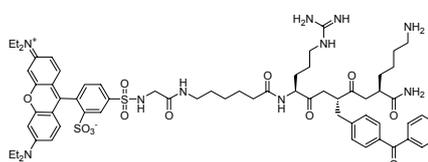
S2 = CHPO 199-5-B05 para

c)



S3 = CHPO 199-6-F07 ortho

d)



S4 = CHPO 199-6-F07 para

Figure 38: Structures des sondes fluorescentes sélectionnées par criblage de la chimiothèque fluorescente.

a) CHPO 199-5-B05 ortho (S1); b) CHPO 199-5-B05 para (S2); c) CHPO 199-6-F07 ortho (S3); d) CHPO 199-6-F07 para (S4).

Nous avons analysé la liaison de ces sondes à la calmoduline en utilisant le modèle présenté dans la **Figure 39** et discuté dans le chapitre I dans un milieu physiologique (pH 7,2 et 100 mM KCl).

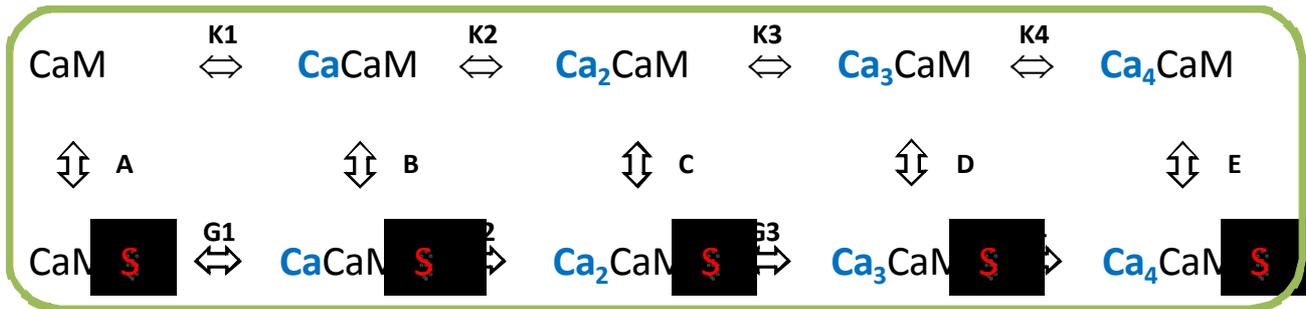


Figure 39 : Modèle séquentiel de liaison des sondes fluorescentes à la calmoduline.

Ce modèle est composé du calcium de la calmoduline (CaM) et de la sonde fluorescente (S).

S représente la sonde fluorescente (16B05 ou 17F07 ortho/para).

K_1 , K_2 , K_3 et K_4 sont les constantes macroscopiques de liaison du calcium sur les 4 principaux sites de la calmoduline en absence de la sonde.

G_1 , G_2 , G_3 et G_4 sont les constantes macroscopiques de liaison du calcium sur les 4 principaux sites de la calmoduline en présence de la sonde.

A, B, C, D et E représentent respectivement les constantes d'association de la sonde aux différentes formes de la calmoduline CaM , CaCaM , Ca_2CaM , Ca_3CaM et Ca_4CaM .

Pour déterminer l'ensemble des paramètres caractérisant la liaison de chaque sonde fluorescente à la calmoduline, nous avons déterminé la liaison du calcium à la calmoduline (SynCaM/VU1) en titrant la calmoduline par une solution de chlorure de calcium et en suivant la fixation du calcium par microcalorimétrie. Les résultats sont présentés dans la **Figure 40**.

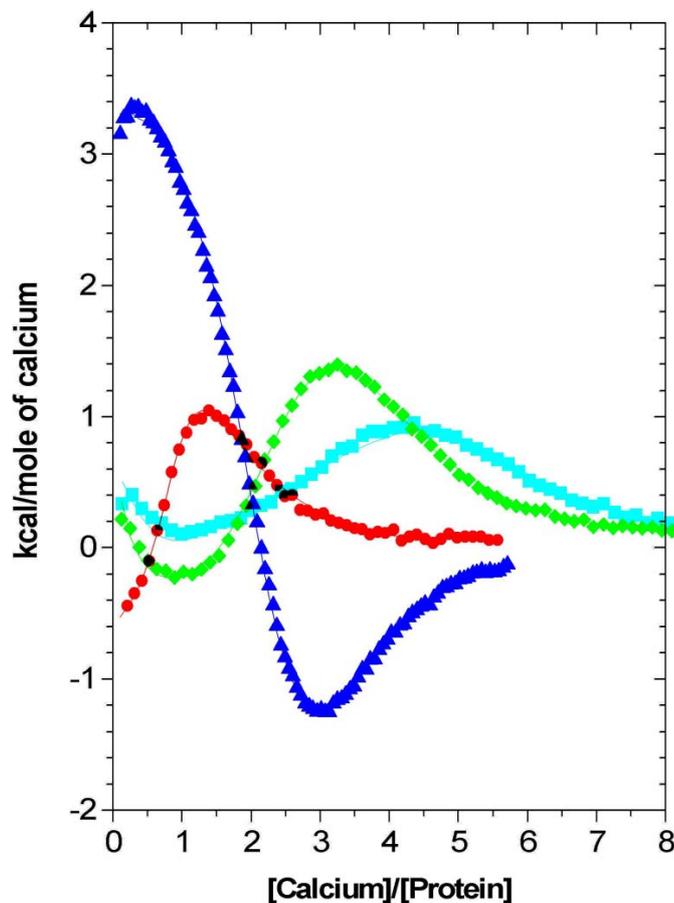


Figure 40: Courbes de titration isothermique de la SynCaM et de ses mutants électrostatiques par le calcium.

Les variations de chaleur (ΔH) sont mesurées en fonction du rapport [calcium]/[protéine]. Les symboles sont

• pour VU1, ♦ pour VU24, ▲ pour VU12 et ■ pour VU8.

Après ajustement à un modèle séquentiel à 4 sites, nous obtenons les valeurs des constantes macroscopiques de liaison du calcium aux différents mutants de calmoduline. Ces données sont présentées dans le **Tableau 9**.

	$K_1 (\mu M^{-1})$	$K_2 (\mu M^{-1})$	$K_3 (\mu M^{-1})$	$K_4 (\mu M^{-1})$
VU1	0,62	0,031	0,036	0,0200
VU24	0,34	0,346	0,066	0,0230
VU8	0,20	0,054	0,114	0,0203
VU12	0,22	0,147	0,018	0,0076

Tableau 9: Constantes d'association des 4 sites de liaison du calcium pour la calmoduline et les 3 mutants électrostatiques.

Nous avons aussi déterminé les constantes thermodynamiques caractérisant chaque site. Ces données sont présentées dans le **Tableau 10**.

	$\Delta H1$ (cal/mol)	$\Delta S1$ (cal/mol.K)	$\Delta H2$ (cal/mol)	$\Delta S2$ (cal/mol.K)	$\Delta H3$ (cal/mol)	$\Delta S3$ (cal/mol.K)	$\Delta H4$ (cal/mol)	$\Delta S4$ (cal/mol.K)
VU1	-572	24,6	4796	36,6	-3899	7,9	1743	25,5
VU24	615	27,4	-1994	18,7	3264	32,9	2554	28,5
VU8	3408	35,9	3780	36,3	-5961	-0,53	1384	22,4
VU12	634	26,4	-2736	12,5	3936	36,3	1601	25,1

Tableau 10: Caractéristiques thermodynamiques des 4 sites de liaison de la calmoduline et des mutants électrostatiques.

Nous avons ainsi déterminé les constantes K_1 , K_2 , K_3 et K_4 de notre schéma. Afin de déterminer les paramètres restant (A à E pour la fixation de la sonde et G1 à G4 pour la fixation du calcium sur le complexe calmoduline-sonde), nous avons réalisé une série d'expériences de titration de chaque sonde fluorescente par la calmoduline pour une concentration fixe en calcium libre. Pour fixer la concentration en calcium libre, nous avons utilisé des tampons calcium-EGTA calibrés.

La **Figure 41** présente les différentes titrations par SynCaM des quatre sondes fluorescentes à différentes concentrations de calcium libre.

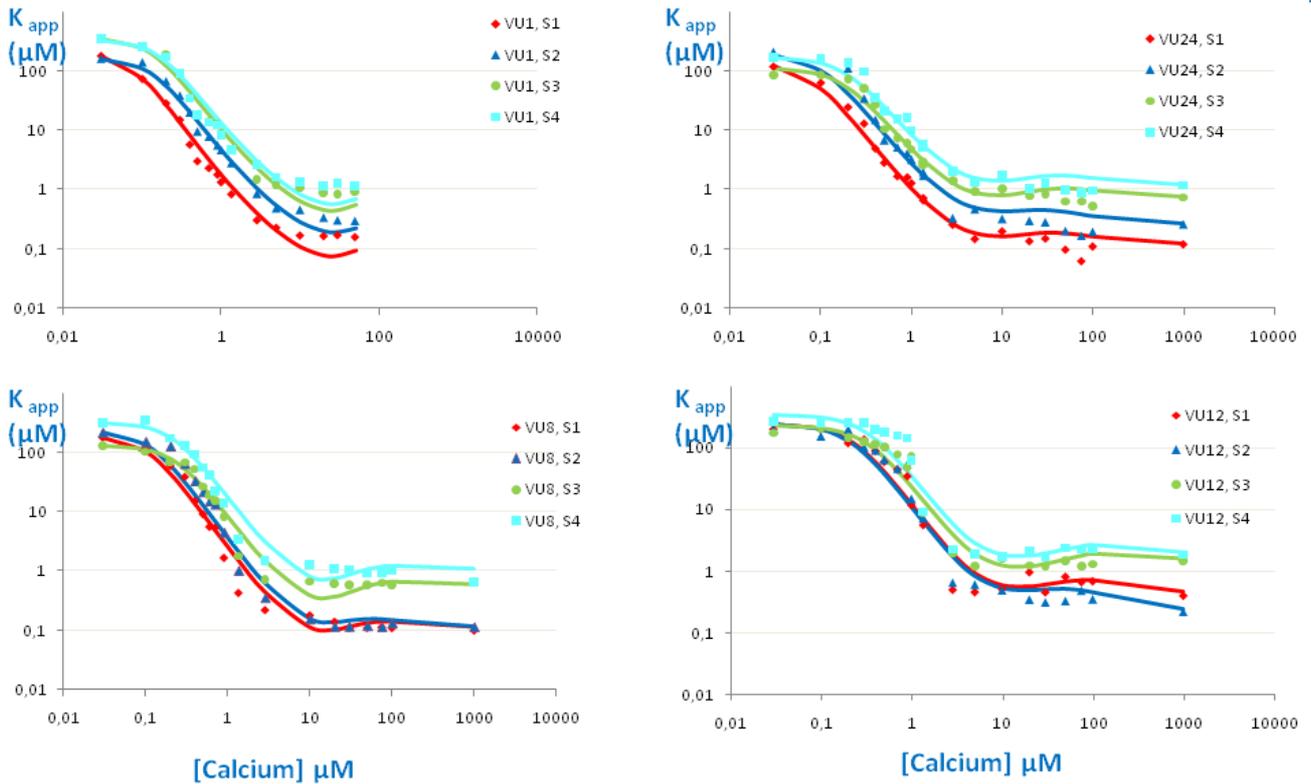


Figure 41: Différentes titrations par SynCaM des quatre sondes fluorescentes à différentes concentrations de calcium libre.

Les symboles sont \blacklozenge pour S1, \blacktriangle pour S2, \bullet pour S3 et \blacksquare pour S4.

Nous avons ensuite ajusté ces différentes courbes pour déterminer l'ensemble des constantes de liaison de chaque sonde à chaque complexe CaM-Ca_n (n=0 à 4) qui sont représentés dans les **Tableaux 11 à 14**.

VU1	A (μM^{-1})	B (μM^{-1})	C (μM^{-1})	D (μM^{-1})	E (μM^{-1})
S1	0,0047	0,0047	48	2,3	6,1
S2	0,0050	0,0050	18	1,1	3,7
S3	0,0027	0,0027	8	0,4	1,1
S4	0,0028	0,0028	7	0,3	0,9

Tableau 11: Constantes d'association des sondes S1, S2, S3 et S4 pour les différents complexes calciques de la calmoduline (SynCaM/VU1).

VU24	A (μM^{-1})	B (μM^{-1})	C (μM^{-1})	D (μM^{-1})	E (μM^{-1})
S1	0,0071	0,00707	12	0,9	8,3
S2	0,0048	0,00477	4	0,4	3,8
S3	0,0086	0,00865	2	0,2	1,3
S4	0,0057	0,00571	1	0,1	0,9

Tableau 12: Constantes d'association des sondes S1, S2, S3 et S4 pour les différents complexes calciques de la calmoduline VU24.

VU8	A (μM^{-1})	B (μM^{-1})	C (μM^{-1})	D (μM^{-1})	E (μM^{-1})
S1	0,0053	0,00525	43	47,3	9,1
S2	0,0043	0,00432	30	40,5	9,0
S3	0,0074	0,00740	12	10,1	1,7
S4	0,0031	0,00309	6	9,0	0,9

Tableau 13: Constantes d'association des sondes S1, S2, S3 et S4 pour les différents complexes calciques de la calmoduline VU8.

VU12	A (μM^{-1})	B (μM^{-1})	C (μM^{-1})	D (μM^{-1})	E (μM^{-1})
S1	0,0042	0,00425	2	0,8	2,3
S2	0,0040	0,00400	2	1,1	3,0
S3	0,0049	0,00489	1	0,5	0,7
S4	0,0033	0,00334	1	0,2	0,5

Tableau 14: Constantes d'association des sondes S1, S2, S3 et S4 pour les différents complexes calciques de la calmoduline VU12.

L'ensemble de ces données montrent que les 4 sondes se comportent de manière similaire et se lient fortement aux complexes CaM-Ca_n avec n=2, 3 et 4 avec des affinités variant entre 0,02 μM et 3,3 μM pour VU1 (Tableau 11).

Nous avons alors titré la calmoduline à forte concentration (4,5 et 7,5 μM) en présence de calcium (1 mM) avec les différentes sondes pour déterminer le nombre de sites de la sonde sur la protéine (Figure 42). Pour les 4 sondes, nous trouvons 1 site de liaison de forte affinité. Si les sondes fluorescentes se lient sur un deuxième site, l'affinité pour ce site doit être supérieure à 20 μM .

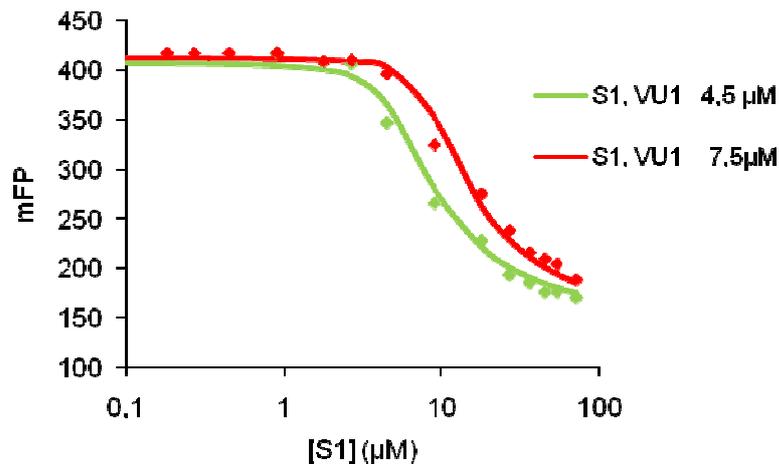


Figure 42 : Titrations par polarisation de fluorescence de la calmoduline avec la sonde S1 en présence de calcium 1 mM.

Les symboles (◆) et (♦) représentent respectivement les concentrations 4,5 et 7,5 µM de la calmoduline utilisées dans cette expérience.

De manière significative, la position de la lissamine en ortho ou para change l'affinité de la sonde pour la calmoduline, ce qui suggère que la partie lissamine intervient aussi dans la liaison de la sonde à la calmoduline.

L'hypothèse d'une interaction entre la calmoduline et les protéines cibles de la calmoduline pouvait se faire avec un nombre de calcium fixé sur la calmoduline inférieur au nombre de calcium nécessaire à l'activation de cette protéine. Pour tester cette hypothèse, nous avons voulu savoir si les complexes Sonde-CaM-Ca₂, 3 et 4 étaient identiques ou si après fixation de la sonde sur le complexe CaM-Ca₂, la fixation d'un 3^{ème} et d'un 4^{ème} calcium modifiait la conformation du complexe.

Si les complexes sont identiques, des mutations de la calmoduline devraient avoir des répercussions identiques sur les trois complexes. A l'inverse, si les complexes sont différents, il devrait exister des mutants de la calmoduline qui modifient de façon différentielle ces complexes.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'interaction calmoduline-enzyme cible fait intervenir le potentiel électrostatique de la calmoduline. Nous avons donc choisi de tester

notre hypothèse en utilisant trois mutants « électrostatiques » de la calmoduline, VU24, VU12 et VU8 (**Tableaux 12 à 14**).

Nous avons réalisé la même série d'expériences pour les trois mutants et les 4 sondes que précédemment. Nous avons alors comparé les valeurs des paramètres A à E caractérisant la liaison des différentes sondes aux différents complexes CaM-Ca_n, n=0 à 4 pour les différents mutants de la calmoduline.

Il apparaît clairement que :

- Les mutations ont des effets différentiels sur l'interaction des sondes avec les différents complexes, VU12 et VU24 avec une action importante sur l'interaction entre une sonde fluorescente et le complexe CaM-Ca₂ alors que VU8 a une action forte sur l'interaction sonde-CaM-Ca₃ et CaM-Ca₄,
- Les 4 sondes fluorescentes se comportent de manière similaire ce qui suggère qu'elles partagent un même site sur la calmoduline.

En conclusion, l'étude de l'interaction dépendant du calcium, de 4 sondes fluorescentes avec la calmoduline et les trois mutants semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle les enzymes dépendant de la calmoduline se lient à un complexe CaM-Ca_n (n=0,1 ou 2) et sont ensuite activés lors de la liaison par un complexe CaM-Ca_m (m=3 ou 4).

Afin de nous assurer que le site de fixation de ces sondes fluorescentes avait un intérêt physiologique, nous avons utilisé un peptide interagissant avec la calmoduline et dérivé du site d'interaction d'un enzyme calmoduline dépendant, la kinase des chaînes légères de la myosine de muscle lisse. Nous avons alors montré que ce peptide déplace la sonde fluorescente de la calmoduline à concentration saturante de calcium.

L'ensemble de ce travail nous permet de conclure en outre que :

- Nous pouvons utiliser la sonde S1 pour cribler des petites molécules,

- Nous pouvons utiliser les sondes S1 et S3 pour caractériser le site de fixation des molécules modifiant la fixation de S1 sur la calmoduline. En effet, comme ces deux sondes fluorescentes se fixent sur le même site de la calmoduline, la détermination de la constante d'interaction entre la calmoduline et la petite molécule en utilisant un essai utilisant soit la sonde S1 soit la sonde S3 doit donner un résultat identique si la molécule se lie sur le même site que le site de fixation des sondes fluorescentes et un résultat possiblement différent s'il se lie sur un site allostérique.

II. Nouveaux interacteurs de la calmoduline obtenus par criblage de la chimiothèque patrimoine.

Nous avons utilisé la sonde S1 pour établir un essai permettant de cribler la collection de molécules des laboratoires de Strasbourg (5300 molécules) et nous avons réalisé des courbes dose-réponse de déplacement des sondes S1 et S3 pour valider les touches issues du criblage primaire, **Figure 43**.

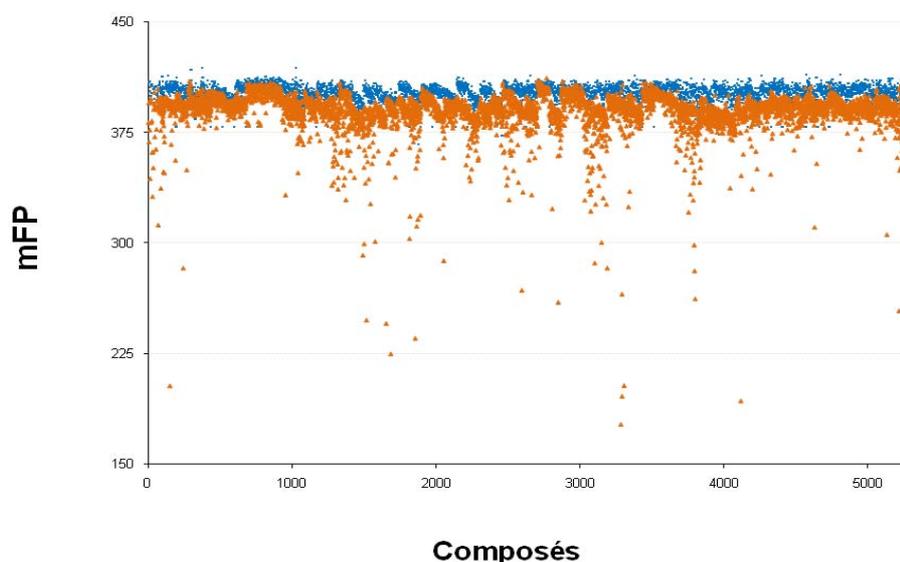


Figure 43: Criblage de la chimiothèque patrimoine de Strasbourg avec l'essai utilisant la sonde S1.

Les symboles (▲) et (▲) représentent respectivement les valeurs du taux de polarisation de fluorescence de la sonde liée sur la calmoduline avant et après ajout des composés de la chimiothèque Patrimoine.

Dans le criblage primaire, nous avons sélectionné les molécules qui déplaçaient la sonde S1 de plus de 36 %. Nous avons obtenu 41 molécules.

Nous avons alors réalisé des courbes doses-réponses où nous avons chassé la sonde S1 ou S3 par des concentrations croissantes des différentes molécules obtenues lors du criblage primaire. Nous avons analysé ces courbes en considérant que nous avons une compétition entre la sonde et la molécule et obtenu ainsi une constante apparente d'interaction entre la molécule et la calmoduline. Nous avons ainsi obtenu deux classes de molécules, des molécules (Classe I, **Tableau 15**) dont les K_i mesurés avec S1 ou S3 sont

identiques (qui sont donc supposées être en compétition directe avec S1 et S3) et des molécules (Classe II, **Tableau 16**) dont les K_i sont différents (qui sont supposées se lier sur un site allostérique du site S1/S3).

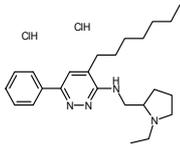
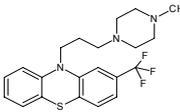
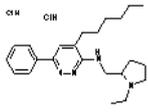
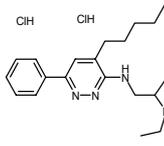
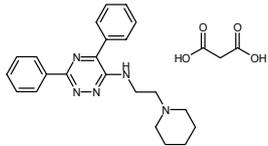
Composé	Structure	Ki-S1 (μM)	Ki-S3 (μM)
LPS 01-18-L-C06		0,68	0,67
TFP		0,81	0,81
LPS 01-18-L-D04		1,23	1,4
LPS 01-18-L-B10		4,84	4,93
LPS 02-20-L-A02		7,38	7,83

Tableau 15: Composés présentant des valeurs de K_i identiques.

Le K_i représente les constantes de déplacement de la sonde fluorescente avec la sonde S1 ou la sonde S3.

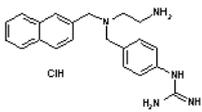
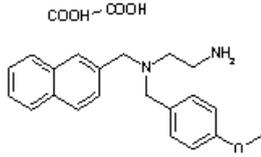
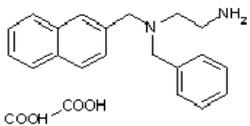
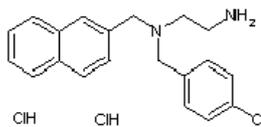
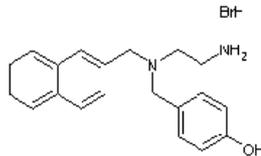
Composé	Structure	Ki-S1 (μM)	Ki-S3 (μM)
LPS 02-20-L-B03		1,2	1,56
LPS 02-10-L-A02		1,68	2,5
LPS 02-10-L-D02		2,11	3,14
LPS 02-20-L-B05		0,95	1,56
LPS 02-10-L-C08		5,1	9,49

Tableau 16: Composés présentant un Ki différent avec la sonde S1 ou la sonde S3

Nous trouvons dans chacune de ces listes une famille structurale spécifique, ce qui renforce la justesse de notre analyse.

Nous avons alors analysé dans les mêmes conditions un ensemble d'antagonistes connus de la calmoduline (TFP, W7, Calmidazolium ...).

Nous pouvons ainsi classer la TFP dans les molécules de classe I et le W7 dans les molécules de classe II. De plus, le W7 et le calmidazolium se trouvent structurellement proche des molécules de la classe II. Toutefois, le calmidazolium présente une courbe de titration différente de celle de W7 suggérant un mode de liaison et probablement des sites de liaison différents de ceux de W7.

Nous avons ainsi commencé à trouver des familles de nouveaux interacteurs de la calmoduline et mis en place une méthode permettant de classer les molécules interagissant avec la calmoduline en fonction des sites que ces molécules explorent.

III. Conditions expérimentales

Pour cette étude, nous avons utilisé les produits chimiques commerciaux sans purification supplémentaire. Le diméthylsulfoxyde (DMSO), le chlorure de potassium (KCl), le tampon Hepes, le Tris, le MOPS et l'EGTA proviennent de Sigma et le chlorure de calcium de Fluka. Les tampons calcium-EGTA calibrés (Kits #1 et #3) ont été achetés chez Invitrogen. Les solutions ont été réalisées avec de l'eau purifiée sur colonne Milli Q (Milli Q instrument de Millipore Corp. MA, USA).

Les expériences ont été réalisées sur la calmoduline synthétique (SynCaM), une protéine hybride entre la calmoduline animale et la calmoduline de plante (Roberts et al. 1985) et les mutants électrostatiques de la calmoduline VU8 (les acides aminés $^{82}\text{EEE}^{84}$ sont remplacés par $^{82}\text{KKK}^{84}$), VU12 ($^{118}\text{DEE}^{120}$ est remplacé par $^{118}\text{KKK}^{120}$) et VU24 ($^6\text{DEK}^8$ est remplacé par $^6\text{KKK}^8$). Ces mutants ont été produits et purifiés selon la méthode décrite par Craig et al (Craig et al. 1987).

Les sondes fluorescentes S1 et S2 (isomères ortho et para du composé CHPO 199-5-B05) et S3 et S4 (isomères ortho et para du composé CHPO 199-6-F07) ont été sélectionnées à partir du criblage de la calmoduline par polarisation de fluorescence et resynthétisées selon la procédure décrites précédemment (Dagher et al. 2006). Elles ont été conservées en solutions stock à 10 mM.

A. Mesures spectroscopiques

Les spectres d'absorption des protéines et des sondes fluorescentes ont été réalisés sur un spectrophotomètre Shimadzu. Les concentrations en protéines ont été calculées à l'aide des coefficients d'extinction molaires à 280nm de $1560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour VU1, $2450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour VU8, $1650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour VU12 et $1650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour VU24. Tous les spectres ont été corrigés des variations d'intensité de lampe et du bruit de fond. Toutes les mesures ont été réalisées à température ambiante.

B. Titration par polarisation de fluorescence (FP)

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur un fluorimètre Victor3 (Perkin–Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA) à 25°C. Les titrations ont été faites dans des plaques en polystyrène noire de 96 puits (Corning Costar 96-well black polystyrene Xat-bottomed plates Model 3686; Corning, Acton, MA).

Les titrations ont été réalisées en ajoutant à la calmoduline (SynCaM) ou à ses mutants des quantités croissantes de sonde fluorescente (concentration finale variant de 0.1 à 80 μM) à une concentration fixe de protéine (03 et 5 μM) dans un volume total de 30 μL dans le tampon (MOPS 30 mM, KCl 100 mM, CaCl_2 1000 μM , pH 7.2). Après agitation les plaques ont été incubées 5 min. à température ambiante. Les taux de polarisation (FP) ont ensuite été déterminés pour une excitation à 530nm (bande passante de 7 nm) et une longueur d'onde d'émission à 610nm (bande passante de 10 nm). Pour chaque plaque des puits contenant les sondes non liées ont servi de contrôles.

Pour chaque titration, le rapport à l'équilibre des concentrations de sonde fluorescente [sonde libre]/[sonde totale] a été déterminée par polarisation de fluorescence et la constante de dissociation à l'équilibre ($K_d = 1/K_{ass}$) a été calculée à partir des courbes de variation du taux de polarisation (FP) en fonction des concentrations en sonde fluorescente.

C. Détermination du taux de polarisation

Le taux de polarisation est défini par l'équation $FP = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + I_{\perp})$ dans laquelle $I_{//}$ et I_{\perp} désignent les intensités de fluorescence respectivement parallèle et perpendiculaire à la direction de vibration d'une lumière d'excitation polarisée verticalement. Pour chaque

plaque le bruit de fond a été corrigé en soustrayant des blancs (moyennes de 8 puits des composantes parallèles et perpendiculaires) des intensités respectives parallèles et perpendiculaires.

Pour certains calculs le taux de polarisation de fluorescence a été remplacé par l'anisotropie A dont les valeurs (contrairement au taux de polarisation) peuvent être additionnées. Les valeurs d'anisotropie (A) s'obtiennent à partir des valeurs de taux de polarisation P comme suit :

$$A = \frac{2P}{3 - P}$$

D. Titration par microcalorimétrie isotherme

La liaison des ions Ca^{2+} sur les principaux sites de la calmoduline et de ses mutants électrostatiques (VU8, VU12 et VU24) a été analysée par titration par microcalorimétrie (ITC) à l'aide d'un calorimètre Microcal VP-ITC. Les mesures ont été réalisées à 25°C dans un tampon MOPS 50mM, KCl 100mM à pH 7.2. Le calmoduline a été décalcifiée par précipitation par l'acide trichloroacétique selon la procédure décrite précédemment (Haiech et al. 1981).

Toutes les solutions ont été dégazées sous vide avant utilisation. Avant chaque expérience la cellule "échantillon" du microcalorimètre a été lavée plusieurs fois avec un tampon EGTA et de l'eau milliQ. Chaque mesure a été réalisée en mettant 1,4 mL de protéine en tampon MOPS 30 mM, KCl 100mM pH 7.5 dans la cellule "échantillon". Nous avons utilisé les concentrations de 75, 55 and 110 μM pour SynCaM, 55 μM pour VU8, 95 μM pour VU12 et 50 μM pour VU24, et dans le tampon MOPS sans KCl une concentration en SynCaM de 40 μM .

La cellule de référence contient de l'eau distillée. La titration a été réalisée au moyen d'une seringue de 300 μL remplie de CaCl_2 3 mM préparé dans du tampon MOPS/KCl sous agitation continue à 300 rpm.

Les injections ont été démarrées après stabilisation de la ligne de base. Chaque titration a consisté en 60 injections consécutives d'un volume de 3 μL en 5.1s chacune, avec un intervalle de 4 min. entre chaque injection. Les résultats ont été analysés avec le logiciel MicroCal Origin 5.0 et les paramètres thermodynamiques de liaison du calcium sur les

principaux sites de la protéine ont été obtenus par ajustement des courbes de titration au moyen d'un modèle à 4 sites séquentiels proposé par le logiciel Microcal Origin.

E. Détermination des constantes macroscopiques de liaison du calcium sur la SynCaM en présence des sondes fluorescentes (G_1 , G_2 , G_3 and G_4)

Nous avons développé un essai pour déterminer les constantes macroscopiques (G_1 , G_2 , G_3 and G_4) de liaison du calcium sur la SynCaM et ses mutants électrostatiques en présence des sondes fluorescentes en fonction des concentrations en calcium. Nous avons utilisé des matrices Ca^{2+} /CaM-sonde sur un robot Biomek 2000. Les mesures ont été réalisées au moyen de tampons calcium calibrés consistant en 20 solutions différentes dans du tampon MOPS 30 mM, KCl 100 mM pH 7.2, dans lesquelles les concentrations en calcium étaient de 0-0.03-0.1-0.2-0.3-0.4-0.5-0.7-0.9-1-1.35 μ M pour le Kit #1 et 0-1.35-2.85-5-10-20-30-50-75-100-1000 μ M pour le Kit #3.

Chaque sonde fluorescente S1, S2, S3 et S4 a été préparée dans les 20 différents tampons calcium à une concentration de 0.2 μ M et ont été titrées avec la calmoduline (SynCaM) et les mutants (VU8, VU12 and VU24) préparés dans les mêmes 20 tampons calcium à 20 μ M.

Les solutions protéiques ont tout d'abord été diluées avec le robot dans chaque tampon calcium pour obtenir des concentrations comprises entre 0,16 et 20 μ M. Les titrations ont été réalisées dans les plaques 96 puits (Corning Costar 96-well black) en ajoutant à chaque puits 15 μ L de la sonde fluorescente (0.2 μ M) à 15 μ L de SynCaM ou de mutant à des concentrations finales en protéine comprises entre 0.08 et 10 μ M. Après agitation les plaques ont été incubées 5 min. à température ambiante, les taux de polarisation (FP) ont ensuite été déterminés et analysés comme indiqué ci-dessus.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail s'inscrit dans l'objectif général de notre laboratoire qui est de découvrir et caractériser de petites molécules capables d'interagir avec une protéine donnée avant de les utiliser pour comprendre le rôle de cette protéine dans un système intégré (cellule ou animal).

Les briques essentielles pour mener à bien notre stratégie de laboratoire sont de :

- Développer des essais génériques, i.e. indépendants de la connaissance de la fonction de la protéine étudiée, et techniquement similaires pour toute une classe de protéine,
- Développer des collections de molécules aussi diverses que possible pour explorer le plus efficacement possible l'espace chimique.

Dans un deuxième temps, nous devons montrer que cette approche d'utilisation de petites molécules (« Chemical Biology » ou génétique chimique) est effectivement efficace pour comprendre le vivant ou au moins apporter des solutions à des problèmes biologiques non résolus.

Dans ce travail, nous avons d'abord validé une stratégie permettant de développer un essai de criblage sur une protéine soluble purifiée sans nécessairement connaître sa fonction. Cette stratégie utilise la capacité de mesurer l'interaction entre une protéine et une molécule fluorescente par anisotropie de fluorescence. Cette technique est sensible à la masse molaire du complexe auquel est liée l'étiquette fluorescente. Si la molécule fluorescente est libre ou liée à une protéine, le signal d'anisotropie de fluorescence variera.

Pour implémenter cette stratégie, il est nécessaire de disposer d'une collection de molécules fluorescentes. Dans ce travail, nous avons utilisé des molécules cationiques étiquetées par la lissamine. Ces molécules cationiques qui ont été construites pour être capable de se lier avec peu de spécificité, devraient interagir préférentiellement avec les zones acides ou anioniques d'une protéine. La calmoduline est une protéine acide et s'est révélée tout à fait adaptée pour développer un essai de criblage en suivant cette stratégie. De manière surprenante, nous avons alors réalisé que l'étiquette fluorescente, ici la lissamine, participe à l'interaction avec la calmoduline. La position de la lissamine par rapport à la molécule cationique module l'interaction avec la calmoduline.

Nous avons montré que cette stratégie pouvait s'appliquer à des familles diverses de protéines (protéines chaperonnes, récepteurs nucléaires, chemokines, ...). Toutefois, il est apparu que les protéines acides se prêtaient mal à cette stratégie et que la lissamine a un rôle moins « neutre » que ce que nous envisagions au départ.

Il faudra développer de nouvelles collections de molécules fluorescentes en augmentant leur diversité structurale (molécules anioniques, neutres, grasses,...) mais aussi en changeant l'étiquette fluorescente.

Une fois l'essai développé et caractérisé, il peut être utilisé pour cribler des collections de molécules commerciales ou académiques. Nous avons montré que ce test permettait de retrouver les molécules antagonistes déjà connues et que grâce à la diversité de la chimiothèque patrimoine de Strasbourg, nous pouvions trouver des familles de nouveaux interacteurs de calmoduline. Pour rendre encore plus efficace l'exploration de l'espace chimique, il faudra mieux caractériser les collections existantes et mieux définir le concept de diversité chimique en relation avec la capacité de trouver des touches pour un essai de criblage spécifique.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu aborder par le biais de cette approche deux problèmes encore ouverts sur la calmoduline :

- Comment la calmoduline traduit-elle un signal calcique quantitatif en un évènement cellulaire ?
- Quel est le rôle de la calmoduline dans la cellule qui expliquerait qu'elle soit exprimée partout ?

Le premier problème avait été abordé en 1981 (Haiech et al. 1981) puis en 1988 (Lukas et al. 1988) en proposant pour la première fois que lors d'un signal calcium, la calmoduline pouvait, selon le nombre de sites calcium occupés interagir avec une classe d'enzymes. Chaque enzyme interagissait avec un ensemble de domaines de la calmoduline. On avait un ensemble de point de contact entre un enzyme donné et la calmoduline qui caractérisait l'étape d'interaction.

Ensuite, les autres sites calcium de la calmoduline pouvaient être occupés, ce qui induisait un changement conformationnel du complexe calmoduline-enzyme et donc l'activation de l'enzyme. On avait donc deux étapes distinctes, une étape d'interaction et

une étape d'activation qui étaient modulées par le nombre et le type de sites calcium occupés sur la calmoduline.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre III, une utilisation couplée des sondes fluorescentes et des mutants de la calmoduline, nous a permis de dissocier une conformation d'interaction pour nos sondes fluorescentes lorsque les deux sites calcium de la partie C-terminale sont occupés, des changements de conformation qui apparaissent lors de l'occupation des sites de la partie N-terminale.

Cette étude illustre la possibilité d'un découplage entre interaction et activation d'un enzyme dépendant de la calmoduline, ce qui permet selon l'amplitude du signal calcium de déclencher la formation d'un complexe macromoléculaire et/ou l'activation de l'enzyme, première étape dans la cascade menant à un évènement cellulaire.

Nous pouvons utiliser cette méthodologie pour caractériser les complexes d'interaction des différents domaines peptidiques des protéines interagissant avec la calmoduline. Nous utiliserions dans ce cas les peptides marqués avec une étiquette fluorescente à la place de nos sondes fluorescentes. Ce type d'étude devrait permettre de définir une typologie de protéines dépendantes de la calmoduline en fonction du nombre d'ions calcium nécessaires pour l'interaction et du nombre d'ions calcium nécessaires pour les changements conformationnels (l'activation) subséquents.

Nous avons alors utilisé l'essai de criblage pour trouver de nouveaux interacteurs de la calmoduline et nous les avons caractérisés en utilisant deux sondes fluorescentes de structure différente mais qui partagent le même domaine d'interaction. Cela nous a permis de trouver de nouvelles familles chimiques de composés interagissant avec la calmoduline, soit de manière compétitive soit de manière allostérique.

Nos résultats et les résultats de la littérature indiquent que la calmoduline possède au moins 6 à 10 zones d'interaction distinctes avec des petites molécules. Nous avons fait l'hypothèse que la multiplicité de liaison des petites molécules sur la calmoduline nous permettait de penser que certaines classes de molécules pouvaient inhiber certaines classes d'enzymes. Des résultats de la littérature sur des molécules classiquement utilisées

pour inhiber la calmoduline, montraient déjà des différences entre l'inhibition de deux enzymes dépendant de la calmoduline (la phosphodiesterase et la kinase des chaînes légères de myosine).

Il est aussi connu que la calmoduline régule de manière positive (entrée de calcium) et négative (sortie de calcium) l'homéostasie calcique intracellulaire en interagissant et en modulant l'activité des canaux et des pompes calciques. Si de petites molécules modulaient de manière différentielle l'interaction de la calmoduline avec les protéines intervenant dans l'entrée ou la sortie du calcium, l'application de certains antagonistes de la calmoduline devrait modifier l'homéostasie calcique soit transitoirement soit durablement.

Nous avons testé cette hypothèse en utilisant une panoplie d'antagonistes calciques qui interagissaient avec des zones différentes de la calmoduline ou avec des affinités différentes. Nous avons alors vu que certaines molécules induisaient un signal calcique spécifique du type cellulaire donné.

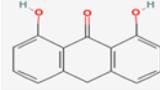
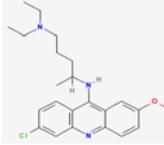
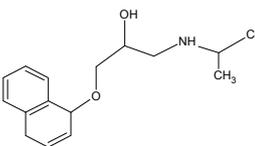
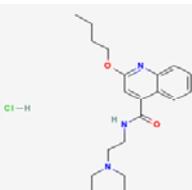
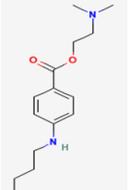
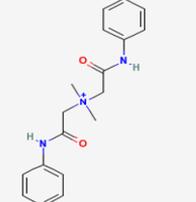
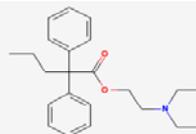
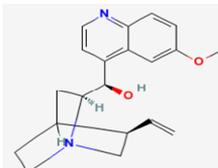
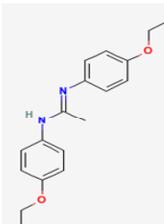
Nous en avons alors conclu :

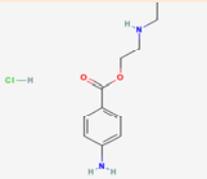
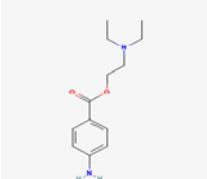
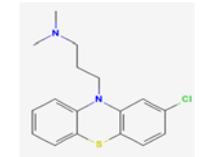
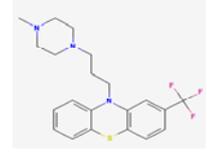
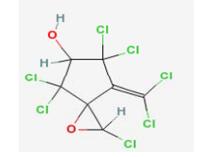
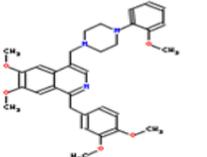
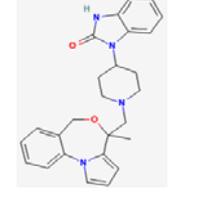
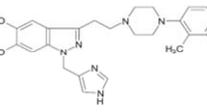
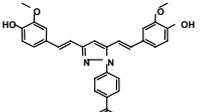
- Que nous pouvons modifier l'homéostasie calcique intracellulaire en jouant sur une inhibition différentielle de la calmoduline.
- Que la calmoduline joue un rôle central de régulateur dans l'homéostasie calcique, ce qui suggère que la calmoduline a été sélectionnée au cours de l'évolution pour jouer ce rôle central dans les cellules eucaryotes et ce qui explique pourquoi elle est exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules eucaryotes.
- Que les protéines avec lesquelles la calmoduline interagit sont différentes d'une cellule à l'autre. Ainsi, la signature calcium induite est différente selon la cellule étudiée.
- Que cette signature calcium est donc une empreinte représentative des protéines exprimées interagissant avec la calmoduline et impliquées dans l'entrée et la sortie du calcium. C'est donc une empreinte partielle qui caractérise l'expression d'un sous-ensemble de gènes impliqués dans la signalisation calcique.

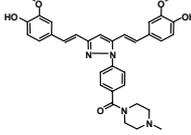
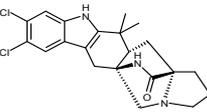
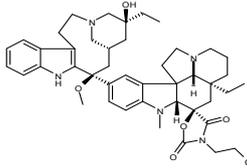
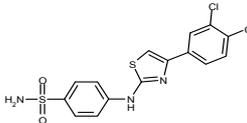
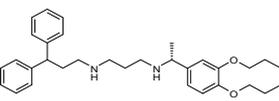
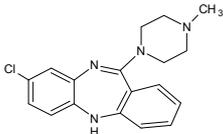
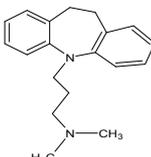
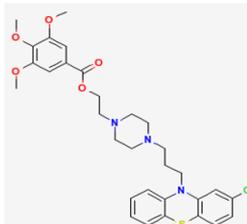
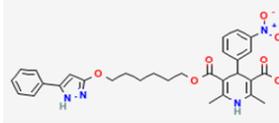
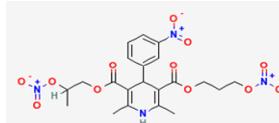
L'étape suivante du travail va être de caractériser pour une empreinte donnée les protéines impliquées dans la signalisation calcique exprimée dans la cellule étudiée.

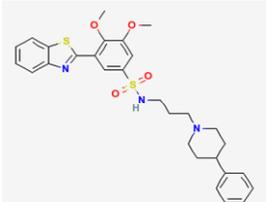
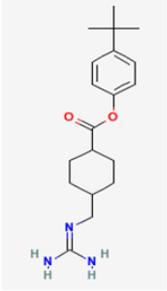
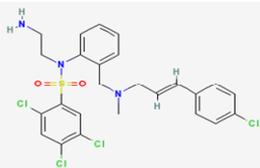
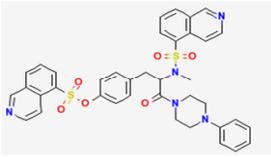
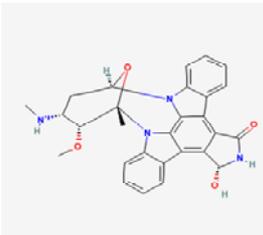
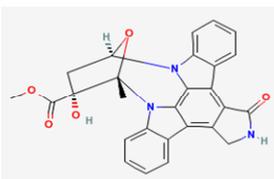
L'ensemble de ce travail nous a permis de revisiter le dogme selon lequel une molécule qui interagit avec la calmoduline est soit neutre soit létale (à l'instar de ce que l'on pensait aussi en 1985 des mutations de la calmoduline). Il apparaît maintenant que l'on peut trouver des molécules qui perturbent de manière différentielle la calmoduline. Il devient tout à fait envisageable de considérer la calmoduline comme une cible thérapeutique, en particulier dans les pathologies cancéreuses mais aussi inflammatoires (ischémie due à un accident vasculaire, asthme, ...).

ANNEXE – Tableau des antagonistes connus de la Calmoduline

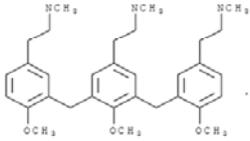
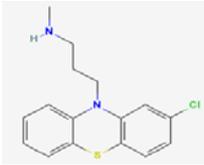
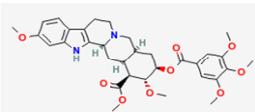
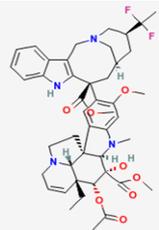
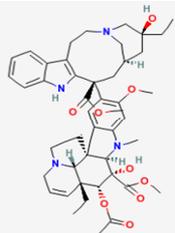
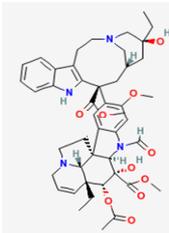
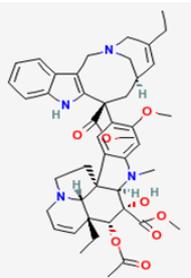
Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf. Pharmacologie
Anthralin	1,8-dihydroxy-9-anthranone		An anthracene derivative that disrupts mitochondria function and structure and is used for the treatment of dermatoses , especially proriasis. It may cause folliculitis.	1 Pharmacological Action Dermatologic Agents Pubchem substance SID: 7847300
Mepacrine	Quinacrine dihydrochloride dihydrate; N-4-(6-Chloro-2-methoxy-9-acridinyl)-N1,N1-diethyl-1,4-pentanediamine dihydrochloride dihydrate		An acridine derivative formerly used as an antimalarial but superseded by chloroquine in recent years. It has also been used as an anthelmintic and in the treatment of giardiasis and malignant effusions. It is used in cell biological experiments as an inhibitor of phospholipase A2	2 Pharmacological Action Anticestodal Agents Antimalarials Antinematodal Agents Antineoplastic Agents Enzyme Inhibitors Pubchem substance SID: 49864262
Propranolol	2-Propanol, 1-[(1-methylethylamino)-3-(1-naphthalen-yloxy)-], hydrochloride		Compound used as non-cardioselective beta-adrenergic antagonist . Propranolol has been used for myocardial infraction; arrythmia; angina pectoris; hypertension; hyperthyroidism; migraine; pheochromocytoma and anxiety but adverse effects instigate replacement by newer drugs	3 Pharmacological Action Adrenergic beta-Antagonists Anti-Arrhythmia Agents Antihypertensive Agents Vasodilator Agents Pubchem substance SID: 50023380
Dibucaine	2-butoxy-N-(2-diethylaminoethyl)quinoline-4-carboxamide		A local anesthetic of the amide type generally used for surface anesthesia. It is one of the most potent and toxic of the long-acting local anesthetics and its parenteral use is restricted to spinal anesthesia	4 Pharmacological Action Anesthetics, Local Pubchem substance SID: 49903695
Tetracaine	2-dimethylaminoethyl 4-butyl aminobenzoate		A potent local anesthetic of the ester type used for surface and spinal anesthesia	5 Pharmacological Action Anesthetics, Local Pubchem substance SID: 49886256
QX-572	bis(2-anilino-2-oxoethyl)-dimethyl azanium chloride		Lidocaine derivative, local anesthetic with antiarrhythmic activity	6 Pharmacological Action Anesthetics, Local Pubchem substance SID: 49966172
Proadifen	2-diethylaminoethyl 2,2-diphenyl pentanoate hydrochloride		An inhibitor of drug metabolism and cytochrom P-450 enzyme system activity.	7 Pharmacological Action Anesthetics, Local Pubchem substance SID: 49862780
Quinine	(R)-[(5R,7S)-5-ethenyl-1-azabicyclo [2.2.2]octan-7-yl]-(6-methoxyquinolin-4-yl)methanol		Alkaloid derived from the bark of the cinchona tree antimalarial drug. Mild antipyretic and analgesic useful in some muscular disorders (nocturnal leg cramps and myotonia congenita) because of its direct effects on muscle membrane and sodium channels .	8 Pharmacological Action Antimalarials Muscle Relaxants Central Analgesics Non-Narcotic Pubchem substance SID: 50042199
Phenacaine	N,N'-bis(4-ethoxyphenyl)ethanimidamide			9 Pharmacological Action Anesthetics, Local Pubchem substance SID: 49860302

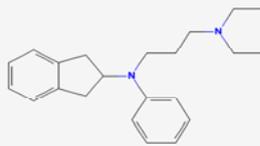
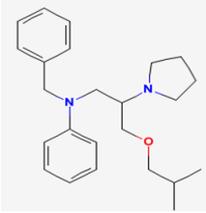
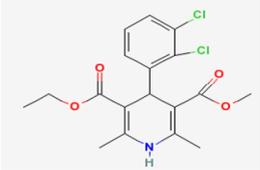
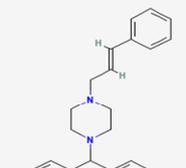
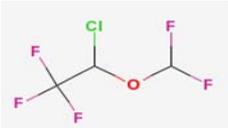
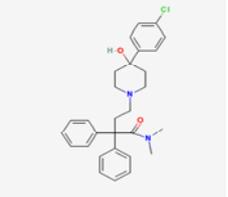
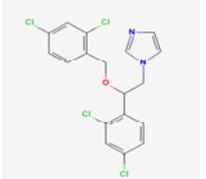
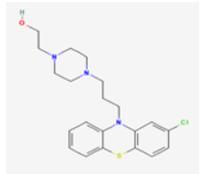
Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf. Pharmacologie
	ethyl 4-aminobenzoate hydrochloride			Anesthetics, Local Pubchem substance SID: 49967883
Procaine	2-diethylaminoethyl 4-amino benzoate		A local anesthetic of the ester type that has a slow onset and a short duration of action. It is mainly used for infiltration anesthesia, peripheral nerve block , and spinal block .	11 Pharmacological Action Anesthetics, Local Pubchem substance SID: 49885723
Chlorpromazine	3-(2-chlorophenothiazin-10-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine		The prototypical phenothiazine antipsychotic drug. Its actions are thought to be due to long-term adaptation by the brain to blocking dopamine receptors . Bovine brain calmodulin bound approximately 5 mol of drug per mol of protein with apparent half-maximal binding at 17 μM drug.	12 Pharmacological Action Antiemetics Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Pubchem substance SID: 50006354
TFP	10-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]-2-(trifluoromethyl) phenothiazine		A phenothiazine with actions similar to Chlorpromazine. It is used as an antipsychotic and an antiemetic	13 Pharmacological Action Antiemetic Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Pubchem substance SID: 50006588C
KS-504a	2,4,4,6,6-pentachloro-7-(dichloro methylidene)-1-oxaspiro[2.4]heptan-5-ol		KS-504a inhibits bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (CaM-PDE) with an IC50 value of 122 μM . Ca2(+)-dependent interaction of the compounds with CaM was shown using hydrophobic fluorescence probes. Myosin light chain kinase (MLCK) was inhibited at the lowest concentrations with an IC50 value of 6.3 μM . The inhibition mechanism was competitive with respect to CaM.	14 Calmodulin inhibitor Pubchem substance SID: 50000611
Ro 22-4839	6,7-dimethoxy-1-(3,4-dimethoxy benzyl)-4[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinylmethylisoquinoline		Ro 22-4839, a cerebral circulation improver , CaM antagonist toward MLCK . It inhibited in vitro activity of CaM-activated cyclic PDE isolated from either bovine heart or brain and ATP-induced superprecipitation of chicken gizzard actomyosin with respective IC50 values of 20 μM , 17 μM , and 2 μM .	15 Calmodulin inhibitor -
CGS 9343B	3-[1-[(4-methyl-6H-pyrrolo[1,2-a][4,1]benzoxazepin-4-yl)methyl]piperidin-4-yl]-1H-benzimidazol-2-one		CGS 9343B inhibits CaM-stimulated cyclic AMP PDE activity with an IC50 value of 3.3 μM .	16 Pharmacological Action Antidiarrheals Calmodulin inhibitor Pubchem substance SID: 50064138
DY-9760e	3-[2-[4-(3-Chloro-2 methyl phenylmethyl)-1-piperazinyl]ethyl]-5,6-dimethoxy-1-(4-imidazolyl methyl)-1H-indazole dihydro-chloride 3.5 hydrate		DY-9760 inhibits CaM-dependent enzymes, including CaM-dependent protein kinase (CaMK II and IV) II and IV, calcineurin (Cn), CaM-dependent PDE and MLCK with Ki values of 1.4 , 12 , 2 , 3.8 and 133 μM , respectively.	17 Pharmacological Action Cytoprotective agent Neuroprotective agent Cardioprotective agent
HBC	4-{3,5-Bis-[2-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-ethyl]-4,5-dihydro- pyrazol-1-yl}-benzoic acid		Curcumin appears to possess a spectrum of pharmacological properties, due primarily to its inhibitory effects on metabolic enzymes .	18 Pharmacological Action Anti-Inflammatory Agents Non-Steroidal Antineoplastic Agents

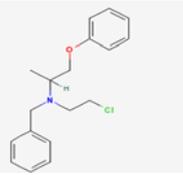
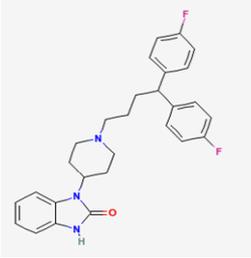
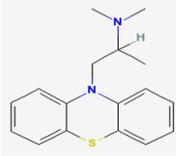
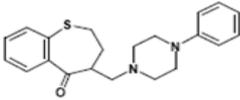
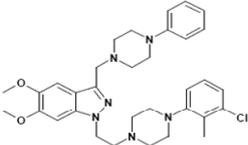
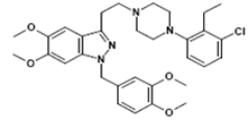
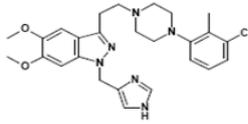
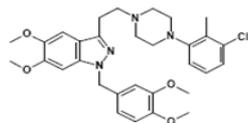
Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
HBCP	4-{3,5-bis-[2-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-vinyl]-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl)-phenyl)-(4-methyl-piperazin-1-yl)-methanone		HBCP binds to Ca(2+)/CaM in vitro and inhibits the proliferation of HCT15 colon cancer cells. HBCP induces sustained phosphorylation of ERK1/2 and subsequently activated p21(WAF1) expression in HCT15 cells. HBCP reversibly induces the G(0)/G(1) cell cycle arrest in the cells	19	Pharmacological Action Anti-Inflammatory Agents, Non-Steroidal Antineoplastic Agents
Malbrancheamide	(5aS,12aS,13aS)-8,9-dichloro-12,12-dimethyl-2,3,11,12,12a,13-hexahydro-1H,6H-5a,13a (epimino ethano) indolizino[7,6b]carbazol-14-one		Malbrancheamide is an indole alkaloid. It causes moderate inhibition of radicle growth of <i>Amaranthus hypochondriacus</i> (IC ₅₀ =0.37 μM) and inhibits the activation of the CaM-PDE1 (IC ₅₀ =3.65±0.74 μM). The inhibition mechanism is competitive with respect to CaM (K _i =47.4±5.63 μM).	20	Calmodulin antagonist
KAR-2	3''-(beta-Chloroethyl)-2'',4''-dioxo-3,5''-spiro oxazolindino-4-deacetoxy vinblastine		Semisynthetic bis-indol derivative with anti-microtubular activity whose direct binding studies (FRET, CD) provided evidence for the binding of KAR-2 to CaM. The binding affinity of KAR-2 to CaM was about 5 μM in the presence of Ca ²⁺ . KAR-2 was able to interact with apo-CaM .	21	Calmodulin antagonist Pharmacological Action Anti-microtubular Anti-tumour Pubchem substance SID: 3036824
10506-2A	4-(4-(3,4-dichloro phenyl)thiazolylamino)benzenesulfonamide		The catalytic efficiency of adenylyl cyclase activity of edema factor (EF) from <i>Bacillus anthracis</i> is enhanced by approximately 1000-fold upon its binding to mammalian CaM. 10506-2A maintain activity against EF .	22	Pharmacological Action Calmodulin inhibitor
Arylalkylamine	N-(3, 3-diphenylpropyl)-N''-[1-R-(3, 4-bis-butoxyphenyl)ethyl]-propylene-diamine		Near-UV CD spectra show that AAA binds to calmodulin with 2:1 stoichiometry in a Ca(2+)-dependent manner. The crystal structure with 2:1 stoichiometry is determined to 2.64 Å resolution. The apparent dissociation constant of AAA to CaM is 18 nM .	23	Calmodulin antagonist
Clozapine	3-chloro-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-5H-bnzo[c][1,5]benzodiazepine		A tricyclic dibenzodiazepine, atypical antipsychotic agent, it binds several types of central nervous system receptors. Clozapine is a serotonin antagonist , with strong binding to 5-HT 2A/2C receptor subtype . It also displays strong affinity to several dopaminergic . Agranulocytosis is a major adverse effect associated with administration of this agent.	24	Pharmacological Action Serotonin Antagonists Antipsychotic Agents GABA Antagonists Pubchem substance CID: 2818
Imipramine	3-(5,6-dihydrobenzo[b][1]benzazepin-11-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine		The prototypical tricyclic antidepressant . It has been used in major depression, dysthymia, bipolar depression, attention-deficit disorders, agoraphobia, and panic disorders. It has less sedative effect than some other members of this therapeutic group.	25	Pharmacological Action Antidepressive Agents, Tricyclic Adrenergic Uptake Inhibitors Pubchem substance CID: 3696
Metofenazate	2-[4-[3-(2-chlorophenothiazin-10-yl)propyl]piperazin-1-yl]ethyl 3,4,5-trimethoxybenzoate		Metofenazate completely inhibits the CaM-PDE with a K _i of 7 μM but it had not effect on maximum Ca ²⁺ stimulation of actomyosin ATPase. It increases the Ca ²⁺ sensitivity of skinned cardiac muscle with an about 10fold lower potency than TFP.	26	Pharmacological Action Phenothiazine Neuroleptic Pubchem substance CID: 9800
CV-159	O5-methyl O3-[6-[(5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)oxy]hexyl] 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydro pyridine-3,5-dicarboxylate		The IC ₅₀ value of CV-159 inhibited Ca ²⁺ /CaM activated MLC kinase was 6.2 μM . The IC ₅₀ value of inhibited CaM activated cyclic nucleotide Ca²⁺-PDE was 0.55 μM . Interaction of CV-159 with CaM was demonstrated by fluorescence studies using dansyl-CaM (5-dimethylamino naphthalene-1-sulfonylated CaM). The concentration of this drug producing 50% inhibition of dansyl-CaM fluorescence was 1.2 μM .	27	Calmodulin inhibitor Pubchem substance CID: 135211
CD-349	O3-(2-nitrooxypropyl) O5-(3-nitro oxypropyl) 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate		CD-349 showed a Ca ²⁺ -binding to CaM, in equilibrium column binding studies. CD-349 inhibited the tritiated CD-349 binding to CaM, with IC ₅₀ value of 2.4 μM . Scatchard plot analysis of the binding of CD-349 to CaM revealed that K _{app} value of CD-349 was 2.1 μM and the maximal number of binding sites (B _{max}) of CD-349 was 1.0 nmol/nmol CaM . CD-349 slightly decreased the fluorescence of TNS bound CaM .	28	Pharmacological Action Calcium Channel Blockers Pubchem substance CID: 119325

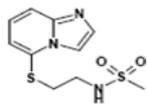
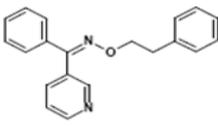
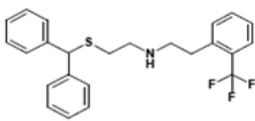
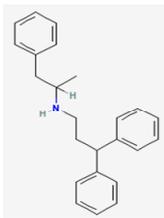
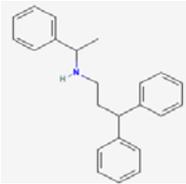
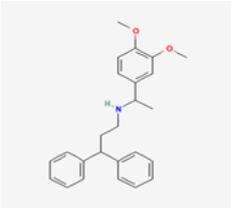
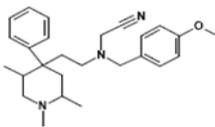
Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
HT-74	3-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4,5-dimethoxy-N-[3-(4-phenylpiperidin-1-yl)propyl]benzenesulfonamide		The Ca ²⁺ binding to CaM was inhibited significantly by 1.0 μM HT-74. Increasing CaM concentrations reversed the HT-74-induced inhibition of CaM-dependent enzymes such as MLCK and Ca ²⁺ cyclic nucleotide PDE, with K _i values of 0.5 μM and 0.4 μM, respectively. In the presence of 0.3 μM HT-74, potassium-depolarized rabbit aortic strips pre-contracted with 0.3 mM CaCl ₂ relaxed, and this relaxation was completely reversed by the addition of an excess amount of CaCl ₂ (10 mM).	29	Calmodulin inhibitor Pubchem substance CID: 126681
GMCHA	(4-tert-butylphenyl) 4-[[[diaminomethylideneamino]methyl]cyclohexane-1-carboxylate		GMCHA inhibitor of histamine release from mast cells. It suppresses platelet secretion , relaxes vascular smooth muscle and inhibits Ca ²⁺ /CaM-dependent protein phosphorylation. GMCHA suppressed the fluorescence of the CaM hydrophobic probe 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS), in the presence of the Ca ²⁺ -CaM complex, with an IC ₅₀ value of 3 μM. Increasing the CaM concentration in the presence of Ca ²⁺ overcame the GMCHA-induced inhibition of MLCK activation, with a K _i value of 2.7 μM.	30	Calmodulin inhibitor Pubchem substance CID: 71252 Pharmacological Action Histamine H1 Antagonists Protease inhibitors Trypsin Inhibitors
HF-2035	N-(2-aminoethyl)-2,4,5-trichloro-N-[2-[[[E]-3-(4-chlorophenyl)prop-2-enyl]-methylamino]methyl]phenyl]benzenesulfonamide		HF-2035 is a CaM antagonist, and was used to develop more selective inhibitors of constitutive nitric oxide synthase . HF-2035 inhibits CaMKI, CaMKII MLCK with IC ₅₀ values of 1.3 μM, 1.6 μM and 68 μM, respectively. HF-2035 also inhibits the activity of recombinant rat neuronal nitric oxide synthase (NO-synthase) with a K _i of 0.78 μM. Partially purified nitric oxide synthase of rat brain was also inhibited by HF-2035 with an IC ₅₀ of 3.2 μM.	31	Calmodulin inhibitor Pubchem substance CID: 6439511
KN-62	[4-[2-(isoquinolin-5-ylsulfonyl-methylamino)-3-oxo-3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl]phenyl]isoquinoline-5-sulfonate		KN-62 inhibited phosphorylation of exogenous substrate (chicken gizzard MLC 20-kDa) by Ca ²⁺ /CaM kinase II with K _i value of 0.9 μM. KN-62 also inhibited the Ca ²⁺ /CaM-dependent autophosphorylation of both alpha (50 kDa) and beta (60 kDa) subunits of Ca ²⁺ /CaM kinase II dose dependently in the presence or absence of exogenous substrate.	32	Ca/Calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor Pubchem substance CID: 3838
UCN-01	7-Hydroxystaurosporine		Compound that shows potent and selective inhibitory activity against protein kinase C. UCN-01 showed an in vivo antitumor effect against three human tumor xenografts [epidermoid carcinoma A431 (c-erbB-1 overexpression), fibrosarcoma HT1080 (N-ras activation), and acute myeloid leukemia HL-60 (N-ras activation)], giving a minimum treated/control ratio of 0.40 (P less than 0.01), 0.17 (P less than 0.01), and 0.61 (P less than 0.05), respectively.	33	Pharmacological Action Antineoplastic Agents Protein Kinase Inhibitors Pubchem substance CID: 72271
K 252a	(8R*,9S*,11P)-(-)-Q-hydroxy-D-methoxycarbonyl-8-methyl-2,3,9,10-tetrahydro-8,11-epoxy-1H,8H,11H-2,7b,11a-triazadibenzo[a,g]cycloocta[cde]trinden-1-one,		A metabolite from culture broth of <i>Nocardopsis</i> sp.; a neurotrophin antagonist; inhibits BDNF TrkB receptor	34	Myosin light chain inhibitor Pubchem substance SID: 24896210

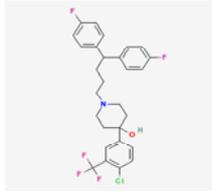
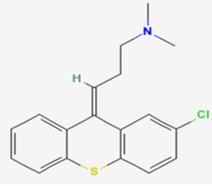
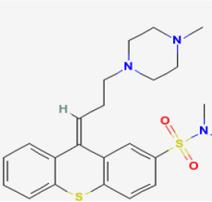
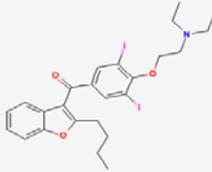
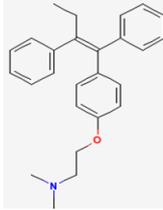
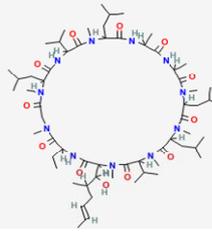
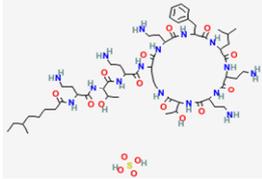
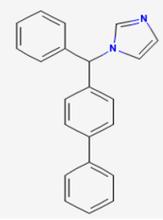
Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
Haloperidol	4-[4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxy piperidin-1-yl]-1-(4-fluoro phenyl) butan-1-one		A phenyl-piperidinyl-butyrophenone that is used primarily to treat SCHIZOPHRENIA and other PSYCHOSES . It is also used in schizoaffective disorder, DELUSIONAL DISORDERS, ballism, and TOURETTE SYNDROME (a drug of choice) and occasionally as adjunctive therapy in MENTAL RETARDATION and the chorea of HUNTINGTON DISEASE. It is a potent antiemetic and is used in the treatment of intractable HICCUPS.	35	Pharmacological Action Antiemetics Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Anti-Dyskinesia Agents Pubchem substance CID: 3559
Thioridazine	10-[2-(1-methylpiperidin-2-yl)ethyl]-2-methylsulfanylphenothiazine		A phenothiazine antipsychotic used in the management of psychoses , including schizophrenia , and in the control of severely disturbed or agitated behavior. It has little antiemetic activity. Thioridazine has a higher incidence of antimuscarinic effects, but a lower incidence of extrapyramidal symptoms, than CHLORPROMAZINE.	36	Pharmacological Action Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Pubchem substance CID: 5452
Papaverine	1-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-6,7-dimethoxyisoquinoline		An alkaloid found in opium. It is a direct-acting smooth muscle relaxant used in the treatment of impotence and as a vasodilator , especially for cerebral vasodilation. It can inhibit phosphodiesterases and it may have direct actions on calcium channels.	37	Pharmacological Action Phosphodiesterase Inhibitors Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 4680
Penfluridol	1-[4,4-bis(4-fluorophenyl)butyl]-4-[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl] piperidin-4-ol		One of the long-acting antipsychotic agents used for maintenance or long-term therapy of SCHIZOPHRENIA and other PSYCHOTIC DISORDERS .	38	Pharmacological Action Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Pubchem substance CID: 33630
Chlorprothixene	(3Z)-3-(2-chlorothioxanthen-9-ylidene)-N,N-dimethylpropan-1-amine		A thioxanthine with effects similar to the phenothiazine antipsychotics.	39	Pharmacological Action Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Pubchem substance CID: 667467
Amitriptyline	3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d] cycloheptene-5-ylidene)-N,N-dimethyl-1-propanamine hydrochloride.		Tricyclic antidepressant with anticholinergic and sedative properties. It appears to prevent the re-uptake of norepinephrine and serotonin at nerve terminals, thus potentiating the action of these neurotransmitters. Amitriptyline also appears to antagonize cholinergic and alpha-1 adrenergic responses to bioactive amines.	40	Pharmacological Action Antidepressive Agents Tricyclic Analgesics Non-Narcotic Adrenergic Uptake Inhibitor Pubchem substance CID: 2160
Desipramine	Amitriptyline HCl is 3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d] cycloheptene-5-ylidene)-N,N-dimethyl-1-propanamine hydrochloride		A tricyclic dibenzazepine compound that potentiates neurotransmission. Desipramine selectively blocks reuptake of norepinephrine from the neural synapse, and also appears to impair serotonin transport. This compound also possesses minor anticholinergic activity, through its affinity to muscarinic receptors.	41	Pharmacological Action Antidepressive Agents Tricyclic Enzyme Inhibitors Adrenergic Uptake Inhibitors Pubchem substance CID: 2995
HMN-709	2-[N-(2-aminoethyl)-N-(4-chlorobenzenesulfonyl)] amino - N - (4 - fluorocinnamyl)-N-methyl benzylamine		Membrane-permeable CaM antagonist, found to inhibit the Ca ²⁺ /CaMKI, smMLCK and Ca ²⁺ -PDE with IC50 values of 1.57, 2.29 and 0.30 μM, respectively. In addition, HMN-709 inhibited CaMKI competitively with respect to CaM (Ki=0.88 μM) and non-competitively with respect to ATP.	42	Calmodulin inhibitor

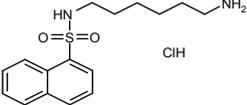
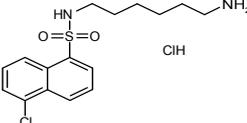
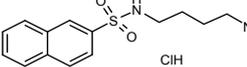
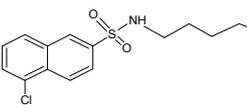
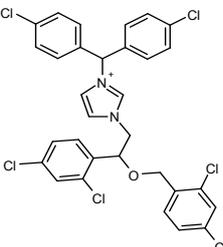
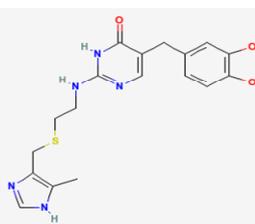
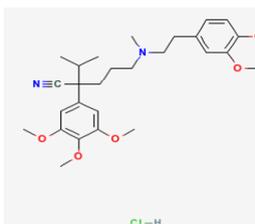
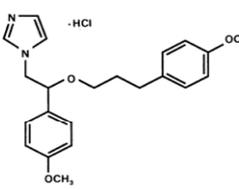
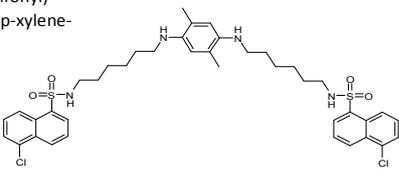
Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
Compound 48/80			is an oligomeric mixture of condensation products of N-methyl-p-methoxyphenethylamine and formaldehyde. It inhibits CaM. Compound 48/80 was found to be a potent inhibitor of the brain CaM-DBP and red blood cell Ca ²⁺ -transportase, with IC50 values of 0.3 and 0.85 μM, respectively. compound 48/80 binds to calmodulin in a Ca ²⁺ -dependent fashion.	43	Calmodulin inhibitor
Norchlorpromazine	3-(2-chlorophenothiazin-10-yl)-N-methylpropan-1-amine		An active metabolite of chlorpromazine	44	Pubchem substance CID: 62875 Calmodulin inhibitor
Réserpine	methyl 18-hydroxy-11,17-dimethoxy-3, 20-yohimban-16-carboxylate 3,4,5-trimethoxybenzoate (ester)		An alkaloid found in the roots of <i>Rauwolfia serpentina</i> and <i>R. vomitoria</i> . Reserpine inhibits the uptake of norepinephrine into storage vesicles resulting in depletion of catecholamines and serotonin from central and peripheral axon terminals. It has been used as an antihypertensive and an antipsychotic as well as a research tool, but its adverse effects limit its clinical use	45	Pharmacological Action Antihypertensive Agents Antipsychotic Agents Adrenergic Uptake Inhibitors Pubchem substance CID: 5770
Vinflunine	20',20'-difluoro-3',4'-dihydrovinorelbine aspidospermidine-3-carboxylic acid, 4-(acetyloxy)-6,7-didehydro-15-[(6R,8S)-4-(1,1-difluoroethyl)-1,3,4,5,6,7,8,9-octahydro-8-(methoxycarbonyl)-2,6-methano-2H-azecino[4,3-b]indol-8-yl]-3-hydroxy-16-me.			46	Inhibition of tubulin assembly Pubchem substance CID: 636447
Vinblastine	vincalékoblastine		Antitumor alkaloid isolated from <i>Vinca rosea</i>	47	Pharmacological Action Antineoplastic Agents, Phytogetic Tubulin Modulators Pubchem substance SID: 4985966
Vincristine			Antitumor alkaloid isolated from <i>Vinca rosea</i> .	48	Pharmacological Action Antineoplastic Agents, Phytogetic Tubulin Modulators Pubchem substance CID: 5978
Vinorelbine				49	Pharmacological Action Antineoplastic Agents, Phytogetic Pubchem substance CID: 5311497

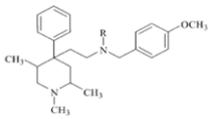
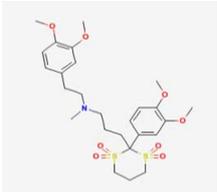
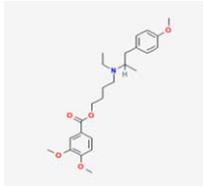
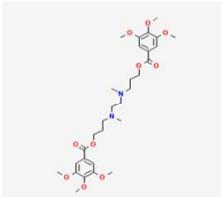
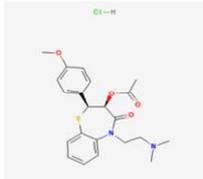
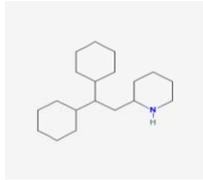
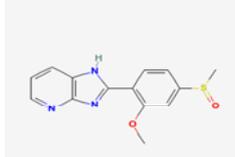
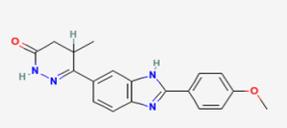
Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
Aprindine	N-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-N',N'-diethyl-N-phenylpropane-1,3-diamine		A cardiac depressant used in arrhythmias. aprindine inhibits the bovine brain CaM-PDE. In the presence of 10 nM calmodulin, the ID50 for aprindine is 18 μM. Aprindine also inhibits calmodulin-stimulated Ca-ATPase activity.	50	Pharmacological Action Anti-Arrhythmia Agents Pubchem substance CID: 2218
Bepidil	N-[3-(2-methylpropoxy)-2-pyrrolidin-1-ylpropyl]-N-(phenylmethyl)aniline		A long-acting calcium-blocking agent with significant anti-anginal activity. The drug produces significant coronary vasodilation and modest peripheral effects. It has antihypertensive and selective anti-arrhythmia activities and acts as a CaM antagonist.	51	Pharmacological Action Anti-Arrhythmia Agents Antihypertensive Agents Calcium Channel Blockers Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 2351
Felodipine	O3-ethyl O5-methyl 4-(2,3-dichloro phenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydro pyridine-3,5-dicarboxylate		A dihydropyridine calcium antagonist with positive inotropic effects. It lowers blood pressure by reducing peripheral vascular resistance through a highly selective action on smooth muscle in arteriolar resistance vessels.	52	Pharmacological Action Anti-Arrhythmia Agents Antihypertensive Agents Calcium Channel Blockers Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 3333
Flunarizine	1-[bis(4-fluorophenyl)methyl]-4-[(E)-3-phenylprop-2-enyl]piperazine		Flunarizine is a selective calcium entry blocker with calmodulin binding properties and histamine H1 blocking activity. It is effective in the prophylaxis of migraine, occlusive peripheral vascular disease, vertigo of central and peripheral origin, and as an adjuvant in the therapy of epilepsy.	53	Pharmacological Action Anticonvulsants Calcium Channel Blockers Histamine H1 Antagonists Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 941361
Fluphenazine-Mustard	10-[3-[4-(2-chloroethyl)piperazin-1-yl]propyl]-2-(trifluoromethyl)phenothiazine		A phenothiazine used in the treatment of PSYCHOSES. Its properties and uses are generally similar to those of CHLORPROMAZINE.	54	Pharmacological Action Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Pubchem substance CID: 3372
Isoflurane	2-chloro-2-(difluoromethoxy)-1,1,1-trifluoroethane		A stable, non-explosive inhalation anesthetic, relatively free from significant side effects.	55	Pharmacological Action Anesthetics, Inhalation Pubchem substance CID: 3955
Loperamide	4-[4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxy piperidin-1-yl]-N,N-dimethyl-2,2-di(phenyl)butanamide		One of the long-acting synthetic ANTIARRHEALS; it is not significantly absorbed from the gut, and has no effect on the adrenergic system or central nervous system, but may antagonize histamine and interfere with acetylcholine release locally.	56	Pharmacological Action Antidiarrheals Pubchem substance CID: 3763
Miconazole	1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-[(2,4-dichlorophenyl)methoxy]ethyl]imidazole		An imidazole antifungal agent that is used topically and by intravenous infusion	57	Pharmacological Action Antifungal Agents Pubchem substance CID: 4189
Perphenazine	2-[4-[3-(2-chlorophenothiazin-10-yl)propyl]piperazin-1-yl]ethanol		An antipsychotic phenothiazine derivative with actions and uses similar to those of CHLORPROMAZINE	58	Pharmacological Action Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Pubchem substance CID: 4748

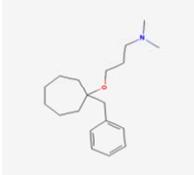
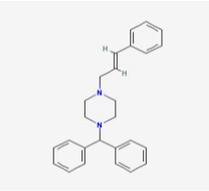
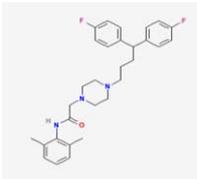
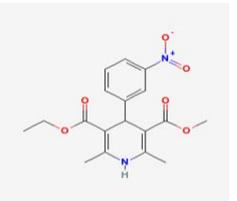
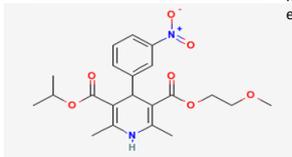
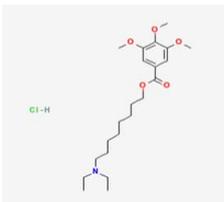
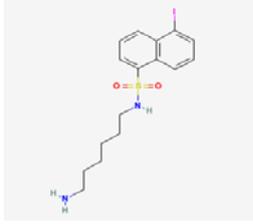
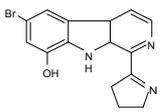
Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
Phenoxybenzamine	N-(2-chloroethyl)-1-(phenoxy)-N-(phenylmethyl)propan-2-amine		An alpha-adrenergic antagonist with long duration of action. The binding of phenoxybenzamine to CaM was determined by equilibrium dialysis, with between 1 and 2 mol of phenoxybenzamine bound to 1 mol of CaM showing maximum binding at pH 6.5. Phenoxybenzamine bound to CaM irreversibly.	59	Pharmacological Action Adrenergic alpha-Antagonists Antihypertensive Agents Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 4768
Pimozide	3-[1-[4,4-bis(4-fluorophenyl)butyl]piperidin-4-yl]-1H-benzimidazol-2-one		A diphenylbutylpiperidine that is effective as an antipsychotic agent and as an alternative to HALOPERIDOL for the suppression of vocal and motor tics in patients with Tourette syndrome. Although the precise mechanism of action is unknown, blockade of postsynaptic dopamine receptors has been postulated.	60	Pharmacological Action Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Anti-Dyskinesia Agents
	N,N-dimethyl-1-phenothiazin-10-ylpropan-2-amine hydrochloride		A phenothiazine derivative with histamine H1-blocking, antimuscarinic, and sedative properties. It is used as an antiallergic, in pruritus, for motion sickness and sedation, and also in animals	61	Pharmacological Action Antipruritics Histamine H1 Antagonists Anti-Allergic Agents
	4-(4-Phenylpiperazin-1-ylmethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1-benzo thiepin-5-one			62	Antihypertensive and antianaginal agent, calmodulin inhibitor
	1-[2-[4-(3-Chloro-2-methylphenyl) piperazin-1-yl]ethyl]-5,6-dimethoxy-3-(4-phenylpiperazin-1-ylmethyl)-1H-indazole dihydrochloride		a calmodulin inhibitor whose activity was demonstrated in vitro by inhibition of calmodulin-dependent phosphodiesterase activity (94% inhibition at 5 μM)	63	Agent for the treatment of cerebrovascular disorders
	3-[2-[4-(3-Chloro-2-ethylphenyl) piperazin-1-yl]ethyl]-1-(3,4-dimethoxy benzyl)-5,6-dimethoxy-1H-indazole		Antihypoxic and cerebroprotective agent that displays calmodulin-inhibitory activity. In mice subjected to hypobaric hypoxia, compound induced a 19.2% prolongation of survival time at a dose of 30 mg/kg p.o.	64	Antihypoxic and cerebroprotective agent
	3-[2-[4-(3-Chloro-2-methyl phenyl) piperazin-1-yl]ethyl]-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-5,6-dimethoxy-1H-indazole dihydrochloride hydrate		Neuroprotective agent, a potent CaM antagonist, demonstrated against CaM-PDE (Ki = 3.8 mcM; Ki W-7 = 8.1 μM), calcineurin (Ki = 2.0 μM; Ki W-7 = 137 μM) and CaM kinase II (Ki = 4.0 μM; Ki W-7 = 10 μM). Orally administered compound was shown a protective effects against delayed neuronal death in a transient forebrain ischemia model in gerbils (100 mg/kg 1 h or 2 and 24 h after ischemia), and against microembolism in rats (30 and 100 mg/kg 1 h before injection of microspheres).	65	Neuroprotective agent, calmodulin (CaM) antagonist
	3-[2-[4-(3-Chloro-2-methylphenyl) piperazin-1-yl]ethyl]-1-(3,4-dimethoxy benzyl)-5,6-dimethoxy-1H-indazole		CaM inhibitor whose activity was demonstrated in vitro by inhibition of cAMP-PDE activity (IC50 = 3.1 μM). Compound increased survival in a nitrogen-induced hypoxia model in mice (19.2% at 30 mg/kg p.o.). Potentially useful in the treatment of diseases caused by excessive activation of CaM such as hypertension, ischemic diseases and various brain diseases, e.g., Alzheimer's disease and Parkinson's disease.	66	Calmodulin inhibitor

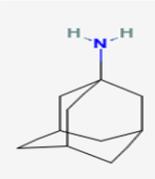
Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
	N-[2-(Imidazo[1,2-a]pyridin-5-ylthio)ethyl]methanesulfonamide		Antihypertensive and antiischemic agent, that produced 94% inhibition of calmodulin at 10 μM . It reduced blood pressure by 11.2 and 11.5% at 1 and 5 h, respectively, after oral dosing of 100 mg/kg p.o. in spontaneously hypertensive rats. In addition, compound significantly reduced the frequency of arrhythmia after coronary artery occlusion and reperfusion in rats at 10 and 30 mg/kg p.o. At the same doses, it caused a dose-dependent protective effect in a model of acute renal failure produced by ischemic following reperfusion in rat kidneys.	67	Pharmacological Action Antihypertensive and antiischemic agent.
	O-(2-Phenylethyl)phenyl-(3-pyridyl) ketone oxime		Antiischemic agent whose effectiveness is based on CaM antagonism, calcium channel antagonism and on improving the deformation of erythrocytes. CaM antagonism was evaluated by inhibiting cAMP-CaM-PDE in the presence of Ca^{2+} ($\text{IC}_{50} = 3.8 \mu\text{M}$). Calcium antagonism was tested using guinea pig caecum strips contracted by calcium chloride ($\text{pA}_2 = 6.56$).	68	Pharmacological Action Antiischemic agent
	N-[2-(Diphenylmethylthio)ethyl]-2-[2-(trifluoromethyl)phenyl] ethylamine		CaM inhibitor, more potent than the parent known compounds fendiline and prenylamine. Potentially useful in the treatment of diseases which are influenced by CaM such as ischemia, angina, asthma and gastrointestinal disorders, and for nextrecovery of the sensitivity of tumors to cytostatics.	69	Calmodulin inhibitor
Prénylamine	3,3-di(phenyl)-N-(1-phenylpropan-2-yl)propan-1-amine		A drug formerly used in the treatment of angina pectoris but superseded by less hazardous drugs. Prenylamine depletes myocardial catecholamine stores and has some calcium channel blocking activity	70	Pharmacological Action Calcium Channel Blockers Vasodilator Agents Adrenergic Agents Pubchem substance SID: 50004435
Fendiline	3,3-di(phenyl)-N-(1-phenylethyl) propan-1-amine		Coronary vasodilator; inhibits calcium function in muscle cells in excitation-contraction coupling; proposed as antiarrhythmic and antianginal	71	Pharmacological Action Calcium Channel Blockers Pubchem substance SID: 49880997
Khl 8430	N-[1-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-3,3-di(phenyl)propan-1-amine		KHL-8430 binds to the CaM-phosphofructokinase complex with an affinity constant of 0.8 μM . It liberates phosphofructokinase from CaM inhibition.	72	Calmodulin inhibitor Pubchem substance CID: 195711
	2-[N-(4-Methoxybenzyl)-N-[2-(1,2,5-trimethyl-4-phenylpiperidin-4-yl)ethyl]amino]acetoneitrile dihydrochloride		Antiarrhythmic and antianginal agent, a calcium channel blocker and CaM antagonist ($\text{IC}_{50} = 23$ and $30 \mu\text{mol/l}$ for inhibition of Ca/CaM-PDE and MLCK, respectively) able to prevent coronary ligation-induced lethality in cats when given 5 min before or immediately after induction of ventricular fibrillation (4 mg/kg i.v.). The compound was also able to completely prevent CaCl_2 -induced ventricular fibrillation and lethality at 3 mg/kg i.v. in rats, and to protect rats from epinephrine-induced ventricular arrhythmias (3 mg/kg i.v.).	73	Pharmacological Action Antiarrhythmic and antianginal agent, calcium channel blocker calmodulin antagonist

Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
Penfluridol	1-[4,4-bis(4-fluorophenyl)butyl]-4-[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]piperidin-4-ol		One of the long-acting ANTIPSYCHOTIC AGENTS used for maintenance or long-term therapy of SCHIZOPHRENIA and other PSYCHOTIC DISORDERS	81	Pharmacological Action Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Pubchem substance SID: 50017916
Chlorprothixene	(3Z)-3-(2-chlorothioxanthen-9-ylidene)-N,N-dimethylpropan-1-amine		A thioxanthine with effects similar to the phenothiazine antipsychotics.	82	Pharmacological Action Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Pubchem substance SID: 81732
Thiothixene	(9Z)-N,N-dimethyl-9-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propylidene]thioxanthen-2-sulfonamide		A thioxanthine used as an antipsychotic agent. Its effects are similar to the phenothiazine antipsychotics.	83	Pharmacological Action Antipsychotic Agents Dopamine Antagonists Pubchem substance SID: 46505564
Amiodarone	(2-butyl-1-benzofuran-3-yl)-[4-(2-diethylaminoethoxy)-3,5-diiodophenyl]methanone		An antianginal and antiarrhythmic drug. Direct interaction between amiodarone and CaM was measured by the effect of the drug on the fluorescence of 9-anthroylcholine (9AC) bound to CaM. Amiodarone decreased the fluorescence of the hydrophobic probe 9AC bound to CaM (IC50 = 5 µM).	84	Pharmacological Action Anti-Arrhythmia Agents Enzyme Inhibitors Vasodilator Agents Pubchem substance SID: 46507387
Tamoxifen	2-[4-[(Z)-1,2-di(phenyl)but-1-enyl]phenoxy]-N,N-dimethyl ethanamine		One of the SELECTIVE ESTROGEN RECEPTOR MODULATORS with tissue-specific activities. Tamoxifen acts as an anti-estrogen in the mammary tissue, but as an estrogen stimulating agent in cholesterol metabolism, bone density, and cell proliferation in the ENDOMETRIUM.	85	Pharmacological Action Estrogen Antagonists Antineoplastic Agents , Hormonal Selective Estrogen Receptor Modulators Bone Density Conservation Agents Pubchem substance CID: 2733526
Cyclosporin A	30-ethyl-33-[(E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-enyl]- 1,4,7,10,12,15,19,25,28-nonamethyl-6,9,18,24-tetrakis(2-methylpropyl)-3,21-di(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- undecazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23, 26,29,32-undecone		A cyclic undecapeptide from an extract of soil fungi. It is a powerful immunosuppressant with a specific action on T-lymphocytes. It is used for the prophylaxis of graft rejection in organ and tissue transplantation.	86	Pharmacological Action Antifungal Agents Dermatologic Agents Enzyme Inhibitors Immunosuppressive Agents Antirheumatic Agents Pubchem substance SID: 50105984
Polymyxin B	N-[4-amino-1-[[1-[4-amino-1-oxo-1-[[6,9,18-tris(2-amino ethyl)-15-benzyl-3-(1-hydroxyethyl)-12-(2-methylpropyl)- 2,5,8,11,14,17,20-hepta-oxo-1,4,7,10,13,16,19-heptaaza Cyclo tricos-21- yl]amino]butan-2-yl]amino]-3-hydroxy-1-oxobutan-2-yl]amino]-1-oxobutan-2-yl]-6-methyloctanamide;		A mixture of polymyxins B1 and B2, obtained from Bacillus polymyxa strains. Polymyxin B is used for infections with gram-negative organisms, but may be neurotoxic and nephrotoxic. Evidence for the formation of a complex between polymyxin B and CaM was obtained by PAGE under non-denaturing conditions, and by affinity chromatography of calmodulinCaM on polymyxin B-agarose.	87	Pharmacological Action Anti-Bacterial Agents Pubchem substance SID: 46507302
Bifonazole	1-[phenyl-(4-phenylphenyl)methyl]imidazole		Bifonazole is a substituted imidazole antifungal agent . It possesses a broad spectrum of activity in vitro against dermatophytes, moulds, yeasts, dimorphic fungi and some Gram-positive bacteria. the drug inhibits CaM dependent PDE with IC50 value = 14.1 ± 2.7 µM.	88	Pharmacological Action Antifungal Agents Pubchem substance CID: 2378

Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
W5	N-(6-aminohexyl)naphthalene-1-sulfonamide		ClH	89	calmodulin antagonist Pubchem substance CID: 4314
W7	N-(6-aminohexyl)-5-chloronaphthalene-1-sulfonamide		ClH	90	Pharmacological Action Enzyme Inhibitors Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 5681
W12	N-(4-aminobutyl)naphthalene-2-sulfonamide		ClH	91	calmodulin antagonist Pubchem substance CID: 4298
W13	N-(4-aminobutyl)-5-chloronaphthalene-2-sulfonamide			92	calmodulin antagonist Pubchem substance CID: 4299
Calmidazolium	1-[phenyl-(4-phenylphenyl)methyl]imidazole		An antimycotic econazole, powerful inhibitor of or red blood cell Ca-ATPase and Ca- transport into inside-out red blood cell vesicles; an antagonist of CaM.	93	Pharmacological Action Analgesics Enzyme Inhibitors Pubchem substance CID: 104834
Oxmetidine	5-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-2-[2-[(5-methyl-1H-imidazol-4-yl)methylsulfanyl]ethylamino]-3H-pyrimidin-4-one		Specific histamine H2 receptor antagonist with MW around 1.8 times that of cimetidine; differs from cimetidine by carrying an isocytosine ring instead of a cyanoguanidine in side chain	94	Pharmacological Action Anti-Ulcer Agents Histamine H2 Antagonists Pubchem substance CID: 51710
Gallopamil	5-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylmethylamino]-2-propan-2-yl-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pentanenitrile hydrochloride		Coronary vasodilator that is an analog of iproveratril (VERAPAMIL) with one more methoxy group on the benzene ring.	95	Pharmacological Action Calcium Channel Blockers Pubchem substance CID: 119442
SK&F 96365	1-(beta-[3-(p-methoxyphenyl)-propoxy]-p-methoxyphenethyl)-1H-imidazole hydrochloride		¹ H nuclear magnetic resonance (NMR) at 360 MHz shows that SK&F 96365, an antagonist of mammalian receptor-operated calcium channels, interacts with CaM. This may be inferred by a number of chemical shift changes in the spectrum of the calcium-saturated protein induced by addition of the compound.	96	Pharmacological Action Calcium Channel Blockers
(W-7)2 - 10	N,N'-bis[6-(5-chloro-1-naphthalene sulfonyl)-amino-1-hexyl]-p-xylene-diamine		Two W-7 molecules are linked between their aminohexyl termini by a linker. (W-7)2 - 10. In vitro, competitive CaMkI assays using CaMkI and NMR studies indicated that one (W-7)2 molecule binds to one CaM molecule as expected, with the two chloronaphthalene rings of (W-7)2 being anchored separately to the N- and C-terminal hydrophobic pockets of Ca2+/CaM. It inhibits CaMkI activity at an IC50 value of 0.23 μM; about 75 times more effectively than W-7.	97	calmodulin antagonist

Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
AR-2	trihydrochloride of [1,2,5-trimethyl-4-phenyl-4-beta-[N-(beta-ethyl amino)-N-4'-methoxybenzyl]-ethyl amino] piperidine		AR-2 was evaluated as calcium and CaM antagonists, and it was studied on doxorubicin (ADM) and vincristine (VCR) resistant Sarcoma-45 inoculated rats. AR-2 in dose 50 mg/kg administered with ADM (5 mg/kg) or VCR (3 mg/kg), significantly suppressed tumor growth 80% and 70%, respectively. Two rats treated with ADM/AR-2 and one treated with VCR/AR-2 were cured.	98	Anti-drug resistance in sarcoma-45
Tiapamil	N-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-3-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,1,3,3-tetraoxo-1,3-dithian-2-yl]-N-methyl propan-1-amine	$R^2 = -CH_2-CH_2-NH_2 \cdot 3HCl$ (AR-2) 	A calcium antagonist; synonym Ro 11-1781 refers to HCl	99	Pharmacological Action Anti-Arrhythmia Agents Antihypertensive Agents Calcium Channel Blockers Pubchem substance CID: 42107
Verapamil	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl-methylamino]-2-propan-2-ylpentanenitrile hydrochloride		A calcium channel blocker that is a class IV anti-arrhythmia agent.	100	Pharmacological Action Anti-Arrhythmia Agents Calcium Channel Blockers Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 62969
Mebeverine	4-[ethyl-[1-(4-methoxyphenyl)propan-2-yl]amino]butyl 3,4-dimethoxybenzoate			101	Pharmacological Action Anticonvulsants Parasympatholytics Pubchem substance CID: 4031
Hexobendine	3-[methyl-[2-[methyl-[3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)oxypropyl]amino]ethyl]amino]propyl 3,4,5-trimethoxybenzoate		A potent vasoactive agent that dilates cerebral and coronary arteries, but slightly constricts femoral arteries, without any effects on heart rate, blood pressure or cardiac output.	102	Pharmacological Action Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 5777
Diltiazem	[(2S,3S)-5-(2-dimethylaminoethyl)-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-3-yl] acetate hydrochloride	$Cl-H$ 	A benzothiazepine derivative with vasodilating action due to its antagonism of the actions of the calcium ion in membrane functions. It is also teratogenic.	103	Pharmacological Action Antihypertensive Agents Calcium Channel Blockers Cardiovascular Agents Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 62920
Perhexiline	2-(2,2-dicyclohexylethyl)piperidine		2-(2,2-Dicyclohexylethyl)piperidine. Coronary vasodilator used especially for angina of effort. It may cause neuropathy and hepatitis.	104	Pharmacological Action Calcium Channel Blockers Cardiovascular Agents Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 4746
Sulmazole	2-(2-methoxy-4-methylsulfinyl phenyl)-1H-imidazo[4,5-b]pyridine			105	Pharmacological Action Cardiotonic Agents Phosphodiesterase Inhibitors Pubchem substance CID: 5353
Pimobendane	6-[2-(4-methoxyphenyl)-3H-benzimidazol-5-yl]-5-methyl-4,5-dihydro-2H-pyridazin-3-one		Compound that produces arterial and venous dilatation in dogs.	106	Pharmacological Action Cardiotonic Agents Phosphodiesterase Inhibitors Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 4823

Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
Bencyclane	N,N-dimethyl-3-[1-(phenylmethyl)cycloheptyl]oxypropan-1-amine		A vasodilator agent found to be effective in a variety of peripheral circulation disorders . It has various other potentially useful pharmacological effects. Its mechanism may involve block of calcium channels.	107	Pharmacological Action Calcium Channel Blockers Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 5282403
Cinnarizine	1-[di(phenyl)methyl]-4-[(E)-3-phenylprop-2-enyl]piperazine		A piperazine derivative having histamine H1-receptor and calcium-channel blocking activity with vasodilating and antiemetic properties but it induces PARKINSONIAN DISORDERS .	108	Pharmacological Action Calcium Channel Blockers Histamine H1 Antagonists Pubchem substance CID: 1547484
Lidoflazine	2-[4-[4,4-bis(4-fluoro phenyl) butyl] piperazin-1-yl]-N-(2,6-dimethyl phenyl)acetamide		Coronary vasodilator with some antiarrhythmic action.	109	Pharmacological Action Calcium Channel Blockers Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 3926
Nitrendipine	O3-ethyl O5-methyl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate		A calcium channel blocker with marked vasodilator action. It is an effective antihypertensive agent and differs from other calcium channel blockers in that it does not reduce glomerular filtration rate and is mildly natriuretic, rather than sodium retentive.	110	Pharmacological Action Antihypertensive Agents Calcium Channel Blockers Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 4507
Nimodipine	O5-(2-methoxyethyl) O3-propan-2-yl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate		A calcium channel blockader with preferential cerebrovascular activity. It has marked cerebrovascular dilating effects and lowers blood pressure.	111	Pharmacological Action Antihypertensive Agents Calcium Channel Blockers Vasodilator Agents Pubchem substance CID: 4497
TMB-8	8-diethylaminoethyl 3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride		An intracellular calcium antagonist.	112	Pharmacological Action Calcium Channel Blockers Pubchem substance CID: 6917843
5-iodo-1-C ₈	N-(6-aminohexyl)-5-iodonaphthalene-1-sulfonamide		5-iodo-1-C8, an analogue of W7, is both more potent and specific than the parent compound W7, is non-toxic to cells over the range used and is also capable of inhibiting the biological activity of NK cells upon pre-treatment of the effector cells.	113	Calmodulin antagonist Pubchem substance CID: 59789
Eudistomidin-A			Eudistomidin-A, a novel indole alkaloid having calmodulin-antagonistic activity has been isolated from the Okinawan tunicate <i>Eudistoma glaucus</i> . It was shown to be the first CaM antagonist from marine origin with IC50 (20 μM) against CaM-activated brain PDE.	114	Calmodulin antagonist

Noms	Noms chimiques	Structures	Légendes	Réf.	Pharmacologie
Amantadine	adamantan-1-amine		An antiviral used in the prophylactic or symptomatic treatment of influenza A. It is also used as an antiparkinsonian agent and for postherpetic neuralgia. Amantadine inhibited bovine brain 60 kDa CaM-PDE but not the bovine brain 63 kDa. This inhibition was overcome by increasing the concentration of CaM.	115	Pharmacological Action Antiparkinson Agents Antiviral Agents Dopamine Agents Analgesics, Non-Narcotic Pubchem substance CID: 2130

REFERENCES

- An investigation of the ability of antipsoriatic drugs to inhibit calmodulin activity: a possible mode of action of dithranol (anthralin).** Toker et al.. *J Invest Dermatol.* 1986 Aug; 87(2):232-5
- Local anesthetics, mepacrine, and propranolol are antagonists of calmodulin. Local anesthetics, mepacrine, and propranolol are antagonists of calmodulin.** Volpi et al.. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Feb; 78(2):795-9
- A) Interaction of local anesthetics with calmodulin.** Tanaka and Hidaka. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981 Jul 30; 101(2):447-53
B) Antagonism of calmodulin by local anesthetics. Volpi et al.. *Mol Pharmacol.* 1981 Sep; 20(2):363-70
- Antagonism of calmodulin by local anesthetics.** Volpi et al.. *Mol Pharmacol.* 1981 Sep; 20(2):363-70
- A) Phosphodiesterase: multiple binding-sites for tricyclic drugs on calmodulin.** Reynolds and Klaxton. *Biochem Pharmacol.* 1982 Feb 1; 31(3):419-21
B) Drug-protein interactions: binding of chlorpromazine to calmodulin, calmodulin fragments, and related calcium binding proteins. Marshak et al.. *Biochemistry.* 1985 Jan 1; 24(1):144-50
- A) Binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase.** Weiss and Levin. *Mol Pharmacol.* 1977 Jul; 13(4):690-7
B) Inhibition of calmodulin-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase: multiple binding-sites for tricyclic drugs on calmodulin. Reynolds and Klaxton. *Biochem Pharmacol.* 1982 Feb 1; 31(3):419-21.
C) adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of brain. Levin and Weiss. *Mol Pharmacol.* 1976 Jul; 12(4):581-9.
- A) KS-504 compounds, novel inhibitors of Ca²⁺ and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Mollisia ventosa*.** Nakanishi et al.. *J Antibiot (Tokyo).* 1989 Dec; 42(12):1775-83
B) Calmodulin antagonistic action of KS-504a, a novel metabolite of the fungus *Mollisia ventosa*. Nakanishi et al.. *Agric Biol Chem.* 1990 Oct; 54(10):2697-702
- A) Selective calmodulin inhibition toward myosin light chain kinase by a new cerebral circulation improver, Ro 22-4839.** Nakajima and Katoh. *Mol Pharmacol.* 1987 Jul; 32(1):140-6
B) Calmodulin antagonistic action of the cerebral circulation improver 6,7-dimethoxy-1-(3,4-dimethoxybenzyl)-4-[[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]methyl]isoquinoline. Nakajima et al.. *Arzneimittelforschung.* 1987 Jun; 37(6):674-9
- CGS 9343B, a novel, potent, and selective inhibitor of calmodulin activity.** Norman et al.. *Mol Pharmacol.* 1987 May; 31(5):535-40
- A) DY-9760e, a novel calmodulin antagonist with cytoprotective action.** Suqimura et al.. *Eur J Pharmacol.* 1997 Oct 1; 336(1):99-106.
B) 3 - [2 - [4 - (3 - Chloro - 2 - methyl phenyl methyl) - 1 - piperazinyl] ethyl] - 5,6 -dimethoxy - 1 - (4-imidazolyl methyl)-1H-indazole dihydro-chloride 3.5 hydrate (DY-9760e) is neuroprotective in rat microsphere embolism: role of the cross-talk between calpain and caspase-3 through calpastatin. Han et al.. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 May; 317(2):529-36
- New curcumin derivative, HBC, interferes with the cell cycle progression of colon cancer cells via antagonization of the Ca²⁺/calmodulin function.** Shim et al.. *Chem Biol.* 2004 Oct; 11(10):1455-63
- Development of a new Ca²⁺/calmodulin antagonist and its anti-proliferative activity against colorectal cancer cells.** Shim et al.. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Aug 3; 359(3)
- Malbrancheamide (I), a New Calmodulin Inhibitor from the Fungus *Malbranchea aurantiaca*.** Martinez-Luiset al.. *Tetrahedron*, Volume 62, Issue 8, 20 February 2006, Pages 1817-1822
- A) The interaction of a new anti-tumour drug, KAR-2 with calmodulin.** Orosz et al.. *Br J Pharmacol.* 1997 Jul; 121(5):955-62
B) The structure of the complex of calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug. Horváth et al.. *J Biol Chem.* 2005 Mar 4; 280(9)

22. **Discovery of a small molecule that inhibits the interaction of anthrax edema factor with its cellular activator, calmodulin.** Lee et al.. Chem Biol. 2004 Aug; 11(8):1139-46
23. **A new potent calmodulin antagonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional studies.** Harmat et al.. J Mol Biol. 2000 Mar 31; 297(3):747-55
24. **Clozapine, a neuroleptic agent, inhibits Akt by counteracting Ca²⁺/calmodulin in PTEN-negative U-87MG human glioblastoma cells.** Shin et al.. Cell Signal. 2006 Nov; 18(11):1876-86
25. **A) Selective binding of antipsychotics and other psychoactive agents to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase.** Levin and Weiss. J Pharmacol Exp Ther. 1979 Mar; 208(3):454-9
B) Inhibition of calmodulin-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase: multiple binding-sites for tricyclic drugs on calmodulin. Reynolds and Klaxton. Biochem Pharmacol. 1982 Feb 1; 31(3):419-21
26. **Metofenazate as a more selective calmodulin inhibitor than trifluoperazine.** Tkachuk et al.. Arzneimittelforschung. 1987 Sep; 37(9):1013-7
27. **Inhibition of calmodulin functions by CV-159, a novel dihydropyridine compound.** Umekawa et al.. Biochem Pharmacol. 1988 Sep 15; 37(18):3377-81
28. **Interaction of the dihydropyridine calcium antagonist, CD-349, with calmodulin.** Tanaka et al.. Biochem Pharmacol. 1990 Sep 1; 40(5):991-6
29. **Modulation of calmodulin function and of Ca²⁺-induced smooth muscle contraction by the calmodulin antagonist, HT-74.** Tanaka et al .. Mol Pharmacol. 1986 Mar; 29(3):264-9
30. **Inhibition of human platelet secretion and of Ca²⁺, calmodulin-dependent protein phosphorylation by the antiallergic agent GMCHA.** Tanaka et al .. Biochem Pharmacol. 1988 Jul 1; 37(13):2537-42
31. **A new and potent calmodulin antagonist, HF-2035, which inhibits vascular relaxation induced by nitric oxide synthase.** Win et al .. Eur J Pharmacol. 1996 Mar 28; 299(1-3):119-26
32. **KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II.** Tokumitsu et al .. J Biol Chem. 1990 Mar 15; 265(8):4315-20
33. **Potent selective inhibition of 7-O-methyl UCN-01 against protein kinase C.** Tokahashi et al J Pharmacol Exp Ther. 1990 Dec; 255(3):1218-21
34. **K-252a, a novel microbial product, inhibits smooth muscle myosin light chain kinase.** Nakanishi et al .. J Biol Chem. 1988 May 5; 263(13):6215-9
35. **Selective binding of antipsychotics and other psychoactive agents to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase.** Levin and Weiss. J Pharmacol Exp Ther. 1979 Mar; 208(3):454-9
- 36-37. **Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of brain.** Levin and Weiss. Mol Pharmacol. 1976 Jul; 12(4):581-9
38. **A) Selective binding of antipsychotics and other psychoactive agents to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase.** Levin and Weiss. J Pharmacol Exp Ther. 1979 Mar; 208(3):454-9
B) Penfluridol, chlorprothixene and haloperidol block fast axonal transport in an order of potency consistent with a mechanism related to inhibition of calmodulin. Lavoie PA. Neuropharmacology. 1987 Sep; 26(9):1359-65
39. **A) Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of brain.** Levin and Weiss. Mol Pharmacol. 1976 Jul; 12(4):581-9
B) Penfluridol, chlorprothixene and haloperidol block fast axonal transport in an order of potency consistent with a mechanism related to inhibition of calmodulin. Lavoie PA. Neuropharmacology. 1987 Sep; 26(9):1359-65
40. **Inhibition of calmodulin-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase: multiple binding-sites for tricyclic drugs on calmodulin.** Reynolds and Klaxton. Biochem Pharmacol. 1982 Feb 1; 31(3):419-21
41. **Inhibition of the retrograde axonal transport of acetylcholinesterase by the anti-calmodulin agents amitriptyline and desipramine.** Tiberi et Lavoie. J Neurobiol. 1985 May; 16(3):245-8
42. **HMN-709, a chlorobenzene sulfonamide derivative, is a new membrane-permeable calmodulin antagonist.** Koyokura et al.. Jpn J Pharmacol. 1996 Oct; 72(2):127-35.
43. **Compound 48/80 is a selective and powerful inhibitor of calmodulin-regulated functions.** Gietzen et al.. Biochim Biophys Acta. 1983 Dec 7; 736(1):109-18
44. Pubchem substance. CID: 62875
45. Pubchem substance. CID: 5770

46. **Vinflunine, a novel microtubule inhibitor, suppresses calmodulin interaction with the microtubule-associated protein STOP.** MaKarov et al.. *Biochemistry*. 2007 Dec 25; 46(51):14899-906
- 47-49. **Anti-calmodulin potency of indol alkaloids in in vitro system.** Molnár et al.. *Eur J Pharmacol*. 1995 Oct 15; 291(2):73-82
50. **Aprindine inhibits calmodulin-stimulated phosphodiesterase and Ca-ATPase activities.** Levine and Hollier. *Cardiovasc Pharmacol*. 1983 Jan-Feb; 5(1):151-6
51. **Bepridil and cetiedil. Vasodilators which inhibit Ca²⁺-dependent calmodulin interactions with erythrocyte membranes.** Aqre et al.. *J Clin Invest*. 1984 Sep; 74(3):812-20
52. **Interaction of the antihypertensive drug felodipine with calmodulin.** Bostróm et al.. *Nature*. 1981 Aug 20; 292(5825):777-8
53. **Bepridil and flunarizine as calmodulin inhibitors.** Lugnier et al.. *Eur J Pharmacol*. 1984 Feb 10; 98(1):157-8
54. **Pharmacological properties of fluphenazine-mustard, an irreversible calmodulin antagonist.** Hait et al.. *Mol Pharmacol*. 1987 Sep; 32(3):404-9
55. Pubchem substance. CID: 3955
56. Pubchem substance. CID: 3763
57. **Direct interaction of antifungal azole-derivatives with calmodulin: a possible mechanism for their therapeutic activity.** Hegemann et al.. *Eur J Med Chem*. 2004 Feb; 39(2):161-77
58. Pubchem substance. CID: 4748
59. **A) Drug-protein interactions: isolation and characterization of covalent adducts of phenoxy benzamine and calmodulin.** Lucas et al.. *Biochemistry*. 1985 Jan 1; 24(1):151-7
B) Characteristics of the binding of phenoxybenzamine to calmodulin. Cimino and Weiss. *Biochem Pharmacol*. 1988 Jul 15; 37(14):2739-45
60. **A) Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of brain.** Levin and Weiss. *Mol Pharmacol*. 1976 Jul; 12(4):581-9
B) On the calcium receptor activating exocytosis: inhibitory effects of calmodulin-interacting drugs on rat mast cells. Ouglas and Nemeth. *J Physiol*. 1982 Feb; 323:229-44
61. **On the calcium receptor activating exocytosis: inhibitory effects of calmodulin-interacting drugs on rat mast cells.** Ouglas and Nemeth. *J Physiol*. 1982 Feb; 323:229-44
62. Mitsubishi Pharma. Patent: JP 91014576;910123. RegNo : 35956
63. Daiichi Pharmaceutical. Patent: JP 1999279156;19991012. RegNo : 111286
64. Daiichi Pharmaceutical. Patent: JP 96225535;960903. RegNo : 84044
65. Daiichi Pharmaceutical. Patent: EP 624584;941117. RegNo : 66325
66. Daiichi Pharmaceutical. Patent: EP 624584;941117. RegNo : 66324
67. Takeda. Patent: EP 471236;920219. RegNo : 41123
68. Kaken. Patent: EP 366006;19900502. RegNo : 21391
69. Akzo Nobel. EP 467435;920122. RegNo : 40539
- 70-71. **Differentiation of the drug-binding sites of calmodulin.** Zimmer and Hofmannan . *Eur J Biochem*. 1987 Apr 15; 164(2):411-20
72. **Dissimilar mechanisms of action of anticalmodulin drugs: quantitative analysis.** Orosz et al.. *Mol Pharmacol*. 1990 Dec; 38(6):910-6
73. National Academy of Science of Armenia. RegNo 86547
74. Pubchem substance. SID: 50059770
75. Pubchem substance. SID: 597367
76. **Stelletamide-A, a novel inhibitor of calmodulin, isolated from a marine sponge.** Y. Abe, et al.; *Br. J.Pharmacol*. 1997; 121: 1309
77. **Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin.** Leung et al.. *J Biol Chem*. 1984 Mar 10; 259(5):2742-7
B) Characterization of the interaction of ophiobolin A and calmodulin: P.C. Leung, et al.; *Int. J. Biochem*. 1988; 20: 1351
78. **The biology of ophiobolins:** Au et al.; *Life Sci*. 67, 733 (2000), (Review)
79. Pubchem substance. SID: 50042258
80. **Calcium and Calmodulin Antagonists Inhibit Human Malaria Parasites (Plasmodium falciparum): Implications for Drug Design.** Scheibel et al..*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Oct; 84(20):7310-4

- 81-82. **Penfluridol, chlorprothixene and haloperidol block fast axonal transport in an order of potency consistent with a mechanism related to inhibition of calmodulin.** Lavoie P.A..Neuropharmacology. 1987 Sep; 26(9):1359-65
83. **Inhibition of calmodulin by phenothiazines and related drugs: structure-activity relationships.** ProzialeckJ and Weiss. Pharmacol Exp Ther. 1982 Sep; 222(3):509-16
84. **Amiodarone is a potent calmodulin antagonist.** Nokin et al.. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1989 Apr; 339(4):367-73
85. **A) Tamoxifen is a calmodulin antagonist in the activation of cAMP phosphodiesterase.** Lam HY. Biochem Biophys Res Commun. 1984 Jan 13; 118(1):27-32
B) Inhibition of protein kinase C and calmodulin by the geometric isomers cis- and trans-tamoxifen. O'Brian et al.. Biopolymers. 1990 Jan; 29(1):97-104
86. **Cyclosporin A binding to calmodulin: a possible site of action on T lymphocytes.** Colombani et al.. Science. 1985 Apr 19; 228(4697):337-9
87. **Polymyxin B is a selective and potent antagonist of calmodulin.** Hegemannet al.. Eur J Pharmacol. 1991 May 25; 207(1):17-22
88. **Direct interaction of antifungal azole-derivatives with calmodulin: a possible mechanism for their therapeutic activity.** Hegemann et al.. Eur J Med Chem. 2004 Feb; 39(2):161-77
89. **Activity-structure relationship of calmodulin antagonists, Naphthalenesulfonamide derivatives.** Hidaka et al.. Mol Pharmacol. 1981 Nov; 20(3):571-8
90. **A novel vascular relaxing agent, N-(6--aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide which affects vascular smooth muscle actomyosin.** Hidaka et al.. J Pharmacol Exp Ther. 1978 Oct; 207(1):8-15
- 91-92. **Hydrophobic interaction of the Ca²⁺-calmodulin complex with calmodulin antagonists. Naphthalenesulfonamide derivatives.** Tanaka et al.. Mol Pharmacol. 1982 Sep; 22(2):403-7
93. **R 24571: a new powerful inhibitor of red blood cell Ca⁺⁺-transport ATPase and of calmodulin-regulated functions.** Gietzen et al.. Biochem Biophys Res Commun. 1981 Jul 30; 101(2):418-25
94. **Protein binding properties of some histamine H2 antagonists: a 1H nuclear magnetic resonance study of antihistamine-calmodulin interactions.** Reid DG. Biochim Biophys Acta. 1986 Apr 8; 886(1):18-25
95. **A 113Cd and 1H NMR study of the interaction of calmodulin with D600, trifluoperazine and some other hydrophobic drugs.** Andersson et al.. Eur J Biochem. 1983 Aug 5; 134(3):459-65
96. **Calmodulin discriminates between the two enantiomers of the receptor-operated calcium channel blocker SK&F 96365: a study using 1H-NMR and chiral HPLC.** Reid et al.. Chirality. 1990; 2(4):229-32
97. **Symmetric covalent linkage of N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7) results in novel derivatives with increased inhibitory activities against calcium/calmodulin complex.** Yokokura et al.. Drug Des Discov. 1999 Nov; 16(3):203-16
98. **Reversal of drug resistance in sarcoma-45 by the new calmodulin antagonist--trihydrochloride of [1,2,5-trimethyl-4-phenyl-4-beta-[N-(beta-ethylamino)-N-4'-methoxybenzyl]-ethylamino] piperidine (AR-2).** Alexanian and Arutyunian. Invest New Drugs. 1999; 17(2):105-10
- 9-112. **Differentiation of the drug-binding sites of calmodulin.** Zimmer and Hofmann. Eur J Biochem. 1987 Apr 15; 164(2):411- 20
- 113.**Evidence for the involvement of calmodulin in natural cytotoxicity using a range of calmodulin antagonists of varying potency and improved specificity.** Rees et al.. Biosci Rep. 1987 Oct; 7(10):771-5
- 114.**Eudistomidin-A, a novel calmodulin antagonist from the okinawan tunicate *Eudistoma glaucus*.** Kobayashi et al.. Tetrahendron Letters 1986, P27(10), 1191-1194
- 115.**Amantadine: an antiparkinsonian agent inhibits bovine brain 60 kDa calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme.** Kakkar et al.. Brain Res. 1997 Feb 28; 749(2):290-4

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ababou A, Desjarlais JR (2001) Solvation energetics and conformational change in EF-hand proteins. *Protein Sci* 10:301-12
- Akke M, Chazin WJ (2001) An open and shut case. *Nat Struct Biol* 8:910-2
- Akke M, Forsen S, Chazin WJ (1991) Molecular basis for co-operativity in Ca²⁺ binding to calbindin D9k. 1H nuclear magnetic resonance studies of (Cd²⁺)₁-bovine calbindin D9k. *J Mol Biol* 220:173-89
- Akke M, Forsen S, Chazin WJ (1995) Solution structure of (Cd²⁺)₁-calbindin D9k reveals details of the stepwise structural changes along the Apo-->(Ca²⁺)₁I1-->(Ca²⁺)₁I,II2 binding pathway. *J Mol Biol* 252:102-21
- Akke M, Skelton NJ, Kordel J, Palmer AG, 3rd, Chazin WJ (1993) Effects of ion binding on the backbone dynamics of calbindin D9k determined by 15N NMR relaxation. *Biochemistry* 32:9832-44
- Ames JB, Dizhoor AM, Ikura M, Palczewski K, Stryer L (1999) Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases. *J Biol Chem* 274:19329-37
- Andre I, Kesvatera T, Jonsson B, Akerfeldt KS, Linse S (2004) The role of electrostatic interactions in calmodulin-peptide complex formation. *Biophys J* 87:1929-38
- Andre I, Kesvatera T, Jonsson B, Linse S (2006) Salt enhances calmodulin-target interaction. *Biophys J* 90:2903-10
- Babini E, Bertini I, Capozzi F, Luchinat C, Quattrone A, Turano M (2005) Principal component analysis of the conformational freedom within the EF-hand superfamily. *J Proteome Res* 4:1961-71
- Babu YS, Sack JS, Greenhough TJ, Bugg CE, Means AR, Cook WJ (1985) Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* 315:37-40
- Bahler M, Rhoads A (2002) Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett* 513:107-13
- Barbato G, Ikura M, Kay LE, Pastor RW, Bax A (1992) Backbone dynamics of calmodulin studied by 15N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: the central helix is flexible. *Biochemistry* 31:5269-78
- Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79:1127-55
- Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-25
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* 395:645-8
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-29
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21

- Bhattacharya S, Bunick CG, Chazin WJ (2004) Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1742:69-79
- Biekofsky RR, Feeney J (1998) Cooperative cyclic interactions involved in metal binding to pairs of sites in EF-hand proteins. *FEBS Lett* 439:101-6
- Biekofsky RR, Martin SR, Browne JP, Bayley PM, Feeney J (1998) Ca²⁺ coordination to backbone carbonyl oxygen atoms in calmodulin and other EF-hand proteins: 15N chemical shifts as probes for monitoring individual-site Ca²⁺ coordination. *Biochemistry* 37:7617-29
- Biekofsky RR, Turjanski AG, Estrin DA, Feeney J, Pastore A (2004) Ab initio study of NMR 15N chemical shift differences induced by Ca²⁺ binding to EF-hand proteins. *Biochemistry* 43:6554-64
- Blanchard H, Grochulski P, Li Y, Arthur JS, Davies PL, Elce JS, Cygler M (1997) Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. *Nat Struct Biol* 4:532-8
- Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79:763-854
- Bohnert JL, Malencik DA, Anderson SR, Teller D, Fischer EH (1982) Binding of 5,5'-bis[8-(phenylamino)-1-naphthalenesulfonate] by the regulatory subunits of adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* 21:5570-6
- Bootman M, Niggli E, Berridge M, Lipp P (1997) Imaging the hierarchical Ca²⁺ signalling system in HeLa cells. *J Physiol* 499 (Pt 2):307-14
- Boschek CB, Sun H, Bigelow DJ, Squier TC (2008) Different conformational switches underlie the calmodulin-dependent modulation of calcium pumps and channels. *Biochemistry* 47:1640-51
- Boursiac Y, Harper JF (2007) The origin and function of calmodulin regulated Ca²⁺ pumps in plants. *J Bioenerg Biomembr* 39:409-14
- Bouvier D, Vanhaverbeke C, Simorre JP, Arlaud GJ, Bally I, Forge V, Margolis RL, Gans P, Kleman JP (2003) Unusual Ca(2+)-calmodulin binding interactions of the microtubule-associated protein F-STOP. *Biochemistry* 42:11484-93
- Brostrom CO, Huang YC, Breckenridge BM, Wolff DJ (1975) Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:64-8
- Brunet S, Scheuer T, Klevit R, Catterall WA (2005) Modulation of CaV1.2 channels by Mg²⁺ acting at an EF-hand motif in the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 126:311-23
- Cancela JM, Van Coppenolle F, Galione A, Tepikin AV, Petersen OH (2002) Transformation of local Ca²⁺ spikes to global Ca²⁺ transients: the combinatorial roles of multiple Ca²⁺ releasing messengers. *EMBO J* 21:909-19
- Capozzi F, Casadei F, Luchinat C (2006) EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view. *J Biol Inorg Chem* 11:949-62
- Carafoli E (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1115-22

- Carafoli E (2003) The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:326-32
- Carafoli E, Genazzani A, Guerini D (1999) Calcium controls the transcription of its own transporters and channels in developing neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 266:624-32
- Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36:107-260
- Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Paszty K, Enyedi A, Penniston JT (2001) Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca^{2+} : fast pumps reside in fast cells. *Cell Calcium* 30:49-57
- Chattopadhyaya R, Meador WE, Means AR, Quijcho FA (1992) Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 228:1177-92
- Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB (1993) Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262:740-4
- Cheung WY (1970) Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun* 38:533-8
- Chien YH, Dawid IB (1984) Isolation and characterization of calmodulin genes from *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 4:507-13
- Chin D, Means AR (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10:322-8
- Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* 80:259-68
- Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387-96
- Clapper DL, Walseth TF, Dargie PJ, Lee HC (1987) Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem* 262:9561-8
- Cohen P, Burchell A, Foulkes JG, Cohen PT (1978) Identification of the Ca^{2+} -dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *FEBS Lett* 92:287-93
- Collier RJ, Young JA (2003) Anthrax toxin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:45-70
- Collins JH (1974) Homology of myosin light chains, troponin-C and parvalbumins deduced from comparison of their amino acid sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 58:301-8
- Cook WJ, Dedman JR, Means AR, Bugg CE (1980) Crystallization and preliminary X-ray investigation of calmodulin. *J Biol Chem* 255:8152-3
- Cook WJ, Walter LJ, Walter MR (1994) Drug binding by calmodulin: crystal structure of a calmodulin-trifluoperazine complex. *Biochemistry* 33:15259-65
- Craig TA, Watterson DM, Prendergast FG, Haiech J, Roberts DM (1987) Site-specific mutagenesis of the alpha-helices of calmodulin. Effects of altering a charge cluster in the helix that links the two halves of calmodulin. *J Biol Chem* 262:3278-84

- Craske M, Takeo T, Gerasimenko O, Vaillant C, Torok K, Petersen OH, Tepikin AV (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
- Crivici A, Ikura M (1995) Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24:85-116
- Crouch TH, Klee CB (1980) Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin. *Biochemistry* 19:3692-8
- Csordas G, Thomas AP, Hajnoczky G (1999) Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J* 18:96-108
- Dagher R, Pigault C, Bonnet D, Boeglin D, Pourbaix C, Kilhoffer MC, Villa P, Wermuth CG, Hibert M, Haiech J (2006) Use of a fluorescent polarization based high throughput assay to identify new calmodulin ligands. *Biochim Biophys Acta* 1763:1250-5
- Davis TN, Urdea MS, Masiarz FR, Thorner J (1986) Isolation of the yeast calmodulin gene: calmodulin is an essential protein. *Cell* 47:423-31
- Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW (1998) Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392:198-202
- Derancourt J, Haiech J, Pechere JF (1978) Binding of calcium by parvalbumin fragments. *Biochim Biophys Acta* 532:373-5
- Drum CL, Yan SZ, Bard J, Shen YQ, Lu D, Soelaiman S, Grabarek Z, Bohm A, Tang WJ (2002) Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* 415:396-402
- Ebel H, Gunther T (1980) Magnesium metabolism: a review. *J Clin Chem Clin Biochem* 18:257-70
- Elshorst B, Hennig M, Forsterling H, Diener A, Maurer M, Schulte P, Schwalbe H, Griesinger C, Krebs J, Schmid H, Vorherr T, Carafoli E (1999) NMR solution structure of a complex of calmodulin with a binding peptide of the Ca²⁺ pump. *Biochemistry* 38:12320-32
- Evenas J, Malmendal A, Akke M (2001) Dynamics of the transition between open and closed conformations in a calmodulin C-terminal domain mutant. *Structure* 9:185-95
- Evenas J, Malmendal A, Thulin E, Carlstrom G, Forsen S (1998) Ca²⁺ binding and conformational changes in a calmodulin domain. *Biochemistry* 37:13744-54
- Falke JJ, Drake SK, Hazard AL, Peersen OB (1994) Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins. *Q Rev Biophys* 27:219-90
- Falke JJ, Snyder EE, Thatcher KC, Voertler CS (1991) Quantitating and engineering the ion specificity of an EF-hand-like Ca²⁺ binding. *Biochemistry* 30:8690-7
- Fierro L, Llano I (1996) High endogenous calcium buffering in Purkinje cells from rat cerebellar slices. *J Physiol* 496 (Pt 3):617-25

- Finn BE, Drakenberg T, Forsen S (1993) The structure of apo-calmodulin. A ^1H NMR examination of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett* 336:368-74
- Finn BE, Evenas J, Drakenberg T, Waltho JP, Thulin E, Forsen S (1995) Calcium-induced structural changes and domain autonomy in calmodulin. *Nat Struct Biol* 2:777-83
- Forsen S, Linse S, Drakenberg T, Kordel J, Akke M, Sellers P, Johansson C, Thulin E, Andersson I, Brodin P, et al. (1991) Ca^{2+} binding in proteins of the calmodulin superfamily: cooperativity, electrostatic contributions and molecular mechanisms. *Ciba Found Symp* 161:222-36
- Friedberg F, Rhoads AR (2001) Evolutionary aspects of calmodulin. *IUBMB Life* 51:215-21
- Friedberg F, Taliaferro L (2005) Calmodulin genes in zebrafish (revisited). *Mol Biol Rep* 32:55-60
- Gagne SM, Li MX, Sykes BD (1997) Mechanism of direct coupling between binding and induced structural change in regulatory calcium binding proteins. *Biochemistry* 36:4386-92
- Gellman SH (1991) On the role of methionine residues in the sequence-independent recognition of nonpolar protein surfaces. *Biochemistry* 30:6633-6
- Genazzani AA, Galione A (1997) A Ca^{2+} release mechanism gated by the novel pyridine nucleotide, NAADP. *Trends Pharmacol Sci* 18:108-10
- Gentry HR, Singer AU, Betts L, Yang C, Ferrara JD, Sondak J, Parise LV (2005) Structural and biochemical characterization of CIB1 delineates a new family of EF-hand-containing proteins. *J Biol Chem* 280:8407-15
- Gietzen K, Adamczyk-Engelmann P, Wuthrich A, Konstantinova A, Bader H (1983) Compound 48/80 is a selective and powerful inhibitor of calmodulin-regulated functions. *Biochim Biophys Acta* 736:109-18
- Gietzen K, Wuthrich A, Bader H (1981) R 24571: a new powerful inhibitor of red blood cell Ca^{++} -transport ATPase and of calmodulin-regulated functions. *Biochem Biophys Res Commun* 101:418-25
- Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca^{2+} -binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* 405:199-221
- Gilli R, Lafitte D, Lopez C, Kilhoffer M, Makarov A, Briand C, Haiech J (1998) Thermodynamic analysis of calcium and magnesium binding to calmodulin. *Biochemistry* 37:5450-6
- Godzik A, Sander C (1989) Conservation of residue interactions in a family of Ca-binding proteins. *Protein Eng* 2:589-96
- Gopinath RM, Vincenzi FF (1977) Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{ATPase}$. *Biochem Biophys Res Commun* 77:1203-9
- Grabarek Z (2005) Structure of a trapped intermediate of calmodulin: calcium regulation of EF-hand proteins from a new perspective. *J Mol Biol* 346:1351-66
- Grabarek Z (2006) Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J Mol Biol* 359:509-25

- Guo Q, Shen Y, Lee YS, Gibbs CS, Mrksich M, Tang WJ (2005) Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylyl cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J* 24:3190-201
- Hahn K, DeBiasio R, Taylor DL (1992) Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells. *Nature* 359:736-8
- Haiech J, Kilhoffer MC (2002) Deconvolution of calcium-binding curves. Facts and fantasies. *Methods Mol Biol* 173:25-42
- Haiech J, Klee CB, Demaille JG (1981) Effects of cations on affinity of calmodulin for calcium: ordered binding of calcium ions allows the specific activation of calmodulin-stimulated enzymes. *Biochemistry* 20:3890-7
- Haiech J, Moulhaye SB, Kilhoffer MC (2004) The EF-Handome: combining comparative genomic study using FamDBtool, a new bioinformatics tool, and the network of expertise of the European Calcium Society. *Biochim Biophys Acta* 1742:179-83
- Haiech J, Predeleanu R, Watterson DM, Ladant D, Bellalou J, Ullmann A, Barzu O (1988) Affinity-based chromatography utilizing genetically engineered proteins. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylyl cyclase with calmodulin. *J Biol Chem* 263:4259-62
- Hait WN, Glazer L, Kaiser C, Cross J, Kennedy KA (1987) Pharmacological properties of fluphenazine-mustard, an irreversible calmodulin antagonist. *Mol Pharmacol.* 32:404-9
- Harmat V, Böcskei Z, Náray-Szabó G, Bata I, Csutor AS, Hermeecz I, Arányi P, Szabó B, Liliom K, Vértessy BG, Ovádi J (2000) A new potent calmodulin antagonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional studies. *J Mol Biol.* 297:747-55
- Harris TK, Davidson VL (1994) Thermal stability of methanol dehydrogenase is altered by the replacement of enzyme-bound Ca²⁺ with Sr²⁺. *Biochem J* 303 (Pt 1):141-5
- Hashii M, Minabe Y, Higashida H (2000) cADP-ribose potentiates cytosolic Ca²⁺ elevation and Ca²⁺ entry via L-type voltage-activated Ca²⁺ channels in NG108-15 neuronal cells. *Biochem J* 345 Pt 2:207-15
- Hegemann L, Toso SM, Lahijani KI, Webster GF, Uitto J (1993) Direct interaction of antifungal azole-derivatives with calmodulin: a possible mechanism for their therapeutic activity. *J Invest Dermatol.* 100:343-6
- Heizmann CW (2005) The importance of calcium-binding proteins in childhood diseases. *J Pediatr* 147:731-8
- Herzberg O, Moul J, James MN (1986) A model for the Ca²⁺-induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J Biol Chem* 261:2638-44
- Hidaka H, Asano M, Iwadare S, Matsumoto I, Totsuka T, Aoki N (1978) A novel vascular relaxing agent, N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalensulfonamide which affects vascular smooth muscle actomyosin. *J Pharmacol Exp Ther* 207:8-15
- Hidaka H, Asano M, Tanaka T (1981a) Activity-structure relationship of calmodulin antagonists, Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol* 20:571-8

- Hidaka H, Nishikawa M (1980) Platelet aggregation and protein phosphorylation. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 43:1124-9.
- Hidaka H, Sasaki Y, Tanaka T, Endo T, Ohno S, Fujii Y, Nagata T (1981b) N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4354-7
- Hidaka H, Yamaki T, Naka M, Tanaka T, Hayashi H, Kobayashi R (1980) Calcium-regulated modulator protein interacting agents inhibit smooth muscle calcium-stimulated protein kinase and ATPase. *Mol Pharmacol* 17:66-72.
- Hoeflich KP, Ikura M (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 108:739-42
- Hohenester E, Maurer P, Hohenadl C, Timpl R, Jansonius JN, Engel J (1996) Structure of a novel extracellular Ca(2+)-binding module in BM-40. *Nat Struct Biol* 3:67-73
- Horvath I, Harmat V, Perczel A, Palfi V, Nyitray L, Nagy A, Hlavanda E, Naray-Szabo G, Ovadi J (2005) The structure of the complex of calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug. *J Biol Chem* 280:8266-74
- Horváth I, Harmat V, Perczel A, Pálfi V, Nyitray L, Nagy A, Hlavanda E, Náráy-Szabó G, Ovádi J (2005) The structure of the complex of calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug. *J Biol Chem.* 280:8266-74
- Houdusse A, Cohen C (1996) Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation. *Structure* 4:21-32
- Houdusse A, Love ML, Dominguez R, Grabarek Z, Cohen C (1997) Structures of four Ca²⁺-bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca²⁺-switch in the calmodulin superfamily. *Structure* 5:1695-711
- Huang S, Carlson GM, Cheung WY (1994) Calmodulin-dependent enzymes undergo a protein-induced conformational change that is associated with their interactions with calmodulin. *J Biol Chem* 269:7631-8
- Ichas F, Mazat JP (1998) From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1366:33-50
- Igarashi M, Watanabe M (2007) Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca²⁺ concentrations. *Neurosci Res* 58:226-33
- Ikura M (1996) Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 21:14-7
- Ikura M, Ames JB (2006) Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1159-64
- Ikura M, Barbato G, Klee CB, Bax A (1992) Solution structure of calmodulin and its complex with a myosin light chain kinase fragment. *Cell Calcium* 13:391-400

- Ito H (1986) Enhancement of phagocytosis by a calmodulin antagonist (W-7) in mice. *Jpn J Pharmacol* 41:131-4
- Ito H, Hidaka H (1983a) Antitumor effect of a calmodulin antagonist on the growth of solid sarcoma-180. *Cancer Lett.* 19:215-20
- Ito H, Hidaka H (1983b) Antitumor effect of calmodulin antagonist against MH-134 hepatoma, Ehrlich ascites carcinoma and B-16 melanocarcinoma in mice. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19:1183-4
- Ito H, Wang JZ, Shimura K (1991) Inhibition of lung metastasis by a calmodulin antagonist, N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7), in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Anticancer Res* 11:249-52
- Jan CR, Lu CH, Chen YC, Cheng JS, Tseng LL, Jun-Wen W (2000a) Ca(2+) mobilization induced by W-7 in MG63 human osteosarcoma cells. *Pharmacol Res* 42:323-7
- Jan CR, Yu CC, Huang JK (2000b) N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride (W-7) causes increases in intracellular free Ca²⁺ levels in bladder female transitional carcinoma (BFTC) cells. *Anticancer Res* 20:4355-9
- Jarrett HW, Penniston JT (1977) Partial purification of the Ca²⁺-Mg²⁺ ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator of 3':5' - cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 77:1210-6
- Jia J, Han Q, Borregaard N, Lollike K, Cygler M (2000) Crystal structure of human grancalcin, a member of the penta-EF-hand protein family. *J Mol Biol* 300:1271-81
- Jia J, Tarabykina S, Hansen C, Berchtold M, Cygler M (2001) Structure of apoptosis-linked protein ALG-2: insights into Ca²⁺-induced changes in penta-EF-hand proteins. *Structure* 9:267-75
- Job D, Fischer EH, Margolis RL (1981) Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4679-82
- Kakiuchi S, Yamazaki R (1970) Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). *Biochem Biophys Res Commun* 41:1104-10
- Kakkar R, Raju RV, Rajput AH, Sharma RK (1997) Amantadine: an antiparkinsonian agent inhibits bovine brain 60 kDa calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme. *Brain Res.* 749:290-4
- Kaplan B, Davydov O, Knight H, Galon Y, Knight MR, Fluhr R, Fromm H (2006a) Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca²⁺ transients reveal ABRE-related sequences as Ca²⁺-responsive cis elements in Arabidopsis. *Plant Cell* 18:2733-48
- Kaplan B, Davydov O, Knight H, Galon Y, Marc R. Knight, Fluhr R, Fromm H (2006b) Rapid Transcriptome Changes Induced by Cytosolic Ca²⁺ Transients Reveal ABRE-Related sequences as Ca²⁺-Responsive cis Elements in Arabidopsis. *Plant Cell* 18:1-16
- Kawabata S, Tsutsumi R, Kohara A, Yamaguchi T, Nakanishi S, Okada M (1996) Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors. *Nature* 383:89-92

- Kawasaki H, Kretsinger RH (1995) Calcium-binding proteins 1: EF-hands. *Protein Profile* 2:297-490
- Kawasaki H, Nakayama S, Kretsinger RH (1998) Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals* 11:277-95
- Keller CH, Olwin BB, LaPorte DC, Storm DR (1982) Determination of the free-energy coupling for binding of calcium ions and troponin I to calmodulin. *Biochemistry* 21:156-62
- Khaksari M, Shamsizadeh A, Azarang A, Mahmoodi M (2007) W-7 (a calmodulin antagonist) inhibits carrageenan-induced paw edema in intact and adrenalectomized rats. *Pak J Pharm Sci* 20:195-9
- Kilhoffer MC, Kubina M, Travers F, Haiech J (1992) Use of engineered proteins with internal tryptophan reporter groups and perturbation techniques to probe the mechanism of ligand-protein interactions: investigation of the mechanism of calcium binding to calmodulin. *Biochemistry* 31:8098-106
- Kilhoffer MC, Roberts DM, Adibi AO, Watterson DM, Haiech J (1988) Investigation of the mechanism of calcium binding to calmodulin. Use of an isofunctional mutant with a tryptophan introduced by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 263:17023-9
- Klee CB, Haiech J (1980) Concerted role of calmodulin and calcineurin in calcium regulation. *Ann N Y Acad Sci* 356:43-54
- Kobayashi C, Takada S (2006) Protein grabs a ligand by extending anchor residues: molecular simulation for Ca²⁺ binding to calmodulin loop. *Biophys J* 90:3043-51
- Kobayashi T, Yamada Y, Fukao M, Tsutsuura M, Tohse N (2007) Regulation of Cav1.2 current: interaction with intracellular molecules. *J Pharmacol Sci* 103:347-53
- Kojetin DJ, Venters RA, Kordys DR, Thompson RJ, Kumar R, Cavanagh J (2006) Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca²⁺-loaded calbindin-D(28K). *Nat Struct Mol Biol.* 13:641-7.
- Kragelund BB, Jonsson M, Bifulco G, Chazin WJ, Nilsson H, Finn BE, Linse S (1998) Hydrophobic core substitutions in calbindin D9k: effects on Ca²⁺ binding and dissociation. *Biochemistry* 37:8926-37
- Kretsinger RH (1980) Crystallographic studies of calmodulin and homologs. *Ann N Y Acad Sci* 356:14-9
- Kretsinger RH, Nockolds CE (1973) Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* 248:3313-26
- Kuboniwa H, Tjandra N, Grzesiek S, Ren H, Klee CB, Bax A (1995) Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat Struct Biol* 2:768-76
- Lansley AB, Sanderson MJ (1999) Regulation of airway ciliary activity by Ca²⁺: simultaneous measurement of beat frequency and intracellular Ca²⁺. *Biophys J* 77:629-38
- LaPorte DC, Wierman BM, Storm DR (1980) Calcium-induced exposure of a hydrophobic surface on calmodulin. *Biochemistry* 19:3814-9
- Levin RM, Weiss B (1977) Binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Mol Pharmacol* 13:690-7

- Levin RM, Weiss B (1979) Selective binding of antipsychotics and other psychoactive agents to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 208:454-9
- Li CJ, Heim R, Lu P, Pu Y, Tsien RY, Chang DC (1999) Dynamic redistribution of calmodulin in HeLa cells during cell division as revealed by a GFP-calmodulin fusion protein technique. *J Cell Sci* 112 (Pt 10):1567-77
- Li MX, Gagne SM, Tsuda S, Kay CM, Smillie LB, Sykes BD (1995) Calcium binding to the regulatory N-domain of skeletal muscle troponin C occurs in a stepwise manner. *Biochemistry* 34:8330-40
- Liao B, Paschal BM, Luby-Phelps K (1999) Mechanism of Ca²⁺-dependent nuclear accumulation of calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6217-22
- Linse S, Brodin P, Johansson C, Thulin E, Grundstrom T, Forsen S (1988) The role of protein surface charges in ion binding. *Nature* 335:651-2
- Linse S, Forsen S (1995) Determinants that govern high-affinity calcium binding. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 30:89-151
- Linse S, Helmersson A, Forsen S (1991) Calcium binding to calmodulin and its globular domains. *J Biol Chem* 266:8050-4
- Linse S, Thulin E, Sellers P (1993) Disulfide bonds in homo- and heterodimers of EF-hand subdomains of calbindin D9k: stability, calcium binding, and NMR studies. *Protein Sci* 2:985-1000
- Lipp P, Niggli E (1998) Fundamental calcium release events revealed by two-photon excitation photolysis of caged calcium in Guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 508 (Pt 3):801-9
- Lukas TJ, Haiech J, Lau W, Craig TA, Zimmer WE, Shattuck RL, Shoemaker MO, Watterson DM (1988) Calmodulin and calmodulin-regulated protein kinases as transducers of intracellular calcium signals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 1:185-93
- Maier LS, Bers DM (2007) Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 73:631-40
- Makarov AA, Tsvetkov PO, Villard C, Esquieu D, Pourroy B, Fahy J, Braguer D, Peyrot V, Lafitte D (2007) Vinflunine, a novel microtubule inhibitor, suppresses calmodulin interaction with the microtubule-associated protein STOP. *Biochemistry* 46:14899-906
- Malchow D, Lusche DF, Schlatterer C (2004) A link of Ca²⁺ to cAMP oscillations in Dictyostelium: the calmodulin antagonist W-7 potentiates cAMP relay and transiently inhibits the acidic Ca²⁺-store. *BMC Dev Biol* 4:7
- Maler L, Blankenship J, Rance M, Chazin WJ (2000) Site-site communication in the EF-hand Ca²⁺-binding protein calbindin D9k. *Nat Struct Biol* 7:245-50
- Malmendal A, Evenas J, Forsen S, Akke M (1999a) Structural dynamics in the C-terminal domain of calmodulin at low calcium levels. *J Mol Biol* 293:883-99
- Malmendal A, Evenas J, Thulin E, Gippert GP, Drakenberg T, Forsen S (1998) When size is important. Accommodation of magnesium in a calcium binding regulatory domain. *J Biol Chem* 273:28994-9001

- Malmendal A, Linse S, Evenas J, Forsen S, Drakenberg T (1999b) Battle for the EF-hands: magnesium-calcium interference in calmodulin. *Biochemistry* 38:11844-50
- Marchand S, Roux B (1998) Molecular dynamics study of calbindin D9k in the apo and singly and doubly calcium-loaded states. *Proteins* 33:265-84
- Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 322:1111-22
- Marsden BJ, Shaw GS, Sykes BD (1990) Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments. *Biochem Cell Biol* 68:587-601
- Marshak DR, Watterson DM, Van Eldik LJ (1981) Calcium-dependent interaction of S100b, troponin C, and calmodulin with an immobilized phenothiazine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6793-7
- Martin SR, Linse S, Johansson C, Bayley PM, Forsen S (1990) Protein surface charges and Ca²⁺ binding to individual sites in calbindin D9k: stopped-flow studies. *Biochemistry* 29:4188-93
- Matsumura Y, Miyawaki N, Ohno Y, Morimoto S (1984) Stimulant effects of W-7, a calmodulin-antagonist, on renin release from rat kidney cortical slices. *J Pharmacobiodyn* 7:346-9
- Maune JF, Klee CB, Beckingham K (1992) Ca²⁺ binding and conformational change in two series of point mutations to the individual Ca(2+)-binding sites of calmodulin. *J Biol Chem* 267:5286-95
- McCormack E, Tsai YC, Braam J (2005) Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci* 10:383-9
- McPhalen CA, Strynadka NC, James MN (1991) Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective. *Adv Protein Chem* 42:77-144
- Meador WE, Means AR, Quijcho FA (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* 257:1251-5
- Mellstrom B, Naranjo JR (2001) Mechanisms of Ca(2+)-dependent transcription. *Curr Opin Neurobiol* 11:312-9
- Michikawa T, Hirota J, Kawano S, Hiraoka M, Yamada M, Furuichi T, Mikoshiba K (1999) Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of the cerebellar type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 23:799-808
- Mignen O, Shuttleworth TJ (2000) I(A_{RC}), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca(2+) entry channel. *J Biol Chem* 275:9114-9
- Milos M, Schaer JJ, Comte M, Cox JA (1986) Calcium-proton and calcium-magnesium antagonisms in calmodulin: microcalorimetric and potentiometric analyses. *Biochemistry* 25:6279-87
- Minowa O, Yagi K (1984) Calcium binding to tryptic fragments of calmodulin. *J Biochem* 96:1175-82
- Mirzoeva S, Weigand S, Lukas TJ, Shuvalova L, Anderson WF, Watterson DM (1999) Analysis of the functional coupling between calmodulin's calcium binding and peptide recognition properties. *Biochemistry* 38:3936-47

- Miyazaki H, Tanaka S, Fujii Y, Shimizu K, Nagashima K, Kamibayashi M, Uehara T, Okuma Y, Nomura Y (1999) Neuroprotective effects of a dihydropyridine derivative, 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid methyl 6-(5-phenyl-3-pyrazolyl)hexyl ester (CV-159), on rat ischemic brain injury. *Life Sci.* 64:869-78
- Molnar A, Liliom K, Orosz F, Vertessy BG, Ovadi J (1995) Anti-calmodulin potency of indol alkaloids in in vitro systems. *Eur J Pharmacol* 291:73-82
- Morgan RO, Martin-Almedina S, Garcia M, Jhoncon-Kooyip J, Fernandez MP (2006) Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their evolutionary imprints. *Biochim Biophys Acta* 1763:1238-49
- Nagae M, Nozawa A, Koizumi N, Sano H, Hashimoto H, Sato M, Shimizu T (2003) The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278:42240-6
- Nakadate T, Yamamoto S, Aizu E, Kato R (1986) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity and tumor promotion by N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7) in mouse skin. *Pharmacology* 32:167-75
- Nelson MR, Chazin WJ (1998a) An interaction-based analysis of calcium-induced conformational changes in Ca²⁺ sensor proteins. *Protein Sci* 7:270-82
- Nelson MR, Chazin WJ (1998b) Structures of EF-hand Ca²⁺-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca²⁺ binding. *Biometals* 11:297-318
- Nicholson H, Becktel WJ, Matthews BW (1988) Enhanced protein thermostability from designed mutations that interact with alpha-helix dipoles. *Nature* 336:651-6
- Nishikawa M, Hidaka H (1982) Role of calmodulin in platelet aggregation. Structure-activity relationship of calmodulin antagonists. *J Clin Invest.* 69:1348-55
- Nishino H, Fujiki H, Saganuma M, Horiuchi T, Iwashima A, Sugimura T (1984) Reduction by N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7), a calmodulin antagonist, in the number of phorbol ester receptors in mouse skin. *Biochem Biophys Res Commun.* 124:726-30
- Ogawa Y, Tanokura M (1984) Calcium binding to calmodulin: effects of ionic strength, Mg²⁺, pH and temperature. *J Biochem* 95:19-28
- Ohki S, Ikura M, Zhang M (1997) Identification of Mg²⁺-binding sites and the role of Mg²⁺ on target recognition by calmodulin. *Biochemistry* 36:4309-16
- Orosz F, Vertessy BG, Salerno C, Crifo C, Capuozzo E, Ovadi J (1997) The interaction of a new anti-tumour drug, KAR-2 with calmodulin. *Br J Pharmacol* 121:955-62
- Osawa M, Dace A, Tong KI, Valiveti A, Ikura M, Ames JB (2005) Mg²⁺ and Ca²⁺ differentially regulate DNA binding and dimerization of DREAM. *J Biol Chem* 280:18008-14
- Osawa M, Swindells MB, Tanikawa J, Tanaka T, Mase T, Furuya T, Ikura M (1998) Solution structure of calmodulin-W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition. *J Mol Biol* 276:165-76

- Pauly N, Knight MR, Thuleau P, Graziana A, Muto S, Ranjeva R, Mazars C (2001) The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium* 30:413-21
- Peersen OB, Madsen TS, Falke JJ (1997) Intermolecular tuning of calmodulin by target peptides and proteins: differential effects on Ca²⁺ binding and implications for kinase activation. *Protein Sci* 6:794-807
- Pirollet F, Derancourt J, Haiech J, Job D, Margolis RL (1992) Ca²⁺-calmodulin regulated effectors of microtubule stability in bovine brain. *Biochemistry* 31:8849-55
- Plieth C (2005) Calcium: just another regulator in the machinery of life? *Ann Bot (Lond)* 96:1-8
- Plieth C (2006) Aequorin as a reporter gene. *Methods Mol Biol* 323:307-27
- Prozialeck WC, Weiss B (1982) Inhibition of calmodulin by phenothiazines and related drugs: structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther* 222:509-16
- Putkey JA, Kleerekoper Q, Gaertner TR, Waxham MN (2003) A new role for IQ motif proteins in regulating calmodulin function. *J Biol Chem* 278:49667-70
- Rabah G, Popescu R, Cox JA, Engelborghs Y, Craescu CT (2005) Solution structure and internal dynamics of NSCP, a compact calcium-binding protein. *FEBS J* 272:2022-36
- Ranty B, Aldon D, Galaud J-P (2006) Plant Calmodulins and Calmodulin-Related Proteins. *Plant Signaling and Behavior* 1:96-104
- Reid RE, Gariepy J, Saund AK, Hodges RS (1981) Calcium-induced protein folding. Structure-affinity relationships in synthetic analogs of the helix-loop-helix calcium binding unit. *J Biol Chem* 256:2742-51
- Rigden DJ, Galperin MY (2004) The Dx₂DxDG motif for calcium binding: multiple structural contexts and implications for evolution. *J Mol Biol* 343:971-84
- Robb-Gaspers LD, Thomas AP (1995) Coordination of Ca²⁺ signaling by intercellular propagation of Ca²⁺ waves in the intact liver. *J Biol Chem* 270:8102-7
- Roberts DM, Crea R, Malecha M, Alvarado-Urbina G, Chiarello RH, Watterson DM (1985) Chemical synthesis and expression of a calmodulin gene designed for site-specific mutagenesis. *Biochemistry* 24:5090-8
- Roehrl MH, Wang JY, Wagner G (2004) A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein-protein interactions by fluorescence polarization. *Biochemistry* 43:16056-66
- Scharenberg AM, Kinet JP (1998) PtdIns-3,4,5-P₃: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. *Cell* 94:5-8
- Schaub MC, Heizmann CW (2008) Calcium, troponin, calmodulin, S100 proteins: from myocardial basics to new therapeutic strategies. *Biochem Biophys Res Commun* 369:247-64

- Schlatterer C, Schaloske R (1996) Calmidazolium leads to an increase in the cytosolic Ca²⁺ concentration in *Dictyostelium discoideum* by induction of Ca²⁺ release from intracellular stores and influx of extracellular Ca²⁺. *Biochem J* 313 (Pt 2):661-7
- Schlatterer C, Schaloske R (1996) Calmidazolium leads to an increase in the cytosolic Ca²⁺ concentration in *Dictyostelium discoideum* by induction of Ca²⁺ release from intracellular stores and influx of extracellular Ca²⁺. *Biochem J.* 313 661-7
- Schumacher MA, Rivard AF, Bachinger HP, Adelman JP (2001) Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature* 410:1120-4
- Sekharudu YC, Sundaralingam M (1988) A structure-function relationship for the calcium affinities of regulatory proteins containing 'EF-hand' pairs. *Protein Eng* 2:139-46
- Shabir S, Southgate J (2008) Calcium signalling in wound-responsive normal human urothelial cell monolayers. *Cell Calcium*
- Shim JS, Lee J, Park HJ, Park SJ, Konwn JH (2004) A new curcumin derivative, HBC, interferes with the cell cycle progression of colon cancer cells via antagonization of the Ca²⁺/calmodulin function. *Chem Biol.* 11:1455-63
- Siivari K, Zhang M, Palmer AGr, Vogel HJ (1995) NMR studies of the methionine methyl groups in calmodulin. *FEBS Lett.* 366:104-8
- Simmen RC, Tanaka T, Ts'ui KF, Putkey JA, Scott MJ, Lai EC, Means AR (1985) The structural organization of the chicken calmodulin gene. *J Biol Chem* 260:907-12
- Skelton NJ, Kordel J, Akke M, Chazin WJ (1992) Nuclear magnetic resonance studies of the internal dynamics in Apo, (Cd²⁺)₁ and (Ca²⁺)₂ calbindin D9k. The rates of amide proton exchange with solvent. *J Mol Biol* 227:1100-17
- Skelton NJ, Kordel J, Akke M, Forsen S, Chazin WJ (1994) Signal transduction versus buffering activity in Ca(2+)-binding proteins. *Nat Struct Biol* 1:239-45
- Spyracopoulos L, Lavigne P, Crump MP, Gagne SM, Kay CM, Sykes BD (2001) Temperature dependence of dynamics and thermodynamics of the regulatory domain of human cardiac troponin C. *Biochemistry* 40:12541-51
- Stevens FC (1983) Calmodulin: an introduction. *Can J Biochem Cell Biol* 61:906-10
- Strobl JS, Peterson VA (1992) Tamoxifen-resistant human breast cancer cell growth: inhibition by thioridazine, pimozone and the calmodulin antagonist, W-13. *J Pharmacol Exp Ther.* 263:186-93
- Strynadka NC, Cherney M, Sielecki AR, Li MX, Smillie LB, James MN (1997) Structural details of a calcium-induced molecular switch: X-ray crystallographic analysis of the calcium-saturated N-terminal domain of troponin C at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* 273:238-55
- Strynadka NC, James MN (1989) Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 58:951-98

- Sugimura M, Sato T, Nakayama W, Morishima Y, Fukunaga K, Omitsu M, Miyamoto E, Shirasaki Y (1997) DY-9760e, a novel calmodulin antagonist with cytoprotective action. *Eur J Pharmacol.* 336:99-106
- Swindells MB, Ikura M (1996) Pre-formation of the semi-open conformation by the apo-calmodulin C-terminal domain and implications binding IQ-motifs. *Nat Struct Biol* 3:501-4
- Szebenyi DM, Moffat K (1986) The refined structure of vitamin D-dependent calcium-binding protein from bovine intestine. Molecular details, ion binding, and implications for the structure of other calcium-binding proteins. *J Biol Chem* 261:8761-77
- Szebenyi DM, Obendorf SK, Moffat K (1981) Structure of vitamin D-dependent calcium-binding protein from bovine intestine. *Nature* 294:327-32
- Tan RY, Mabuchi Y, Grabarek Z (1996) Blocking the Ca²⁺-induced conformational transitions in calmodulin with disulfide bonds. *J Biol Chem* 271:7479-83
- Tanaka M, Muramatsu M, Aihara H, Otomo S (1990) Interaction of the dihydropyridine calcium antagonist, CD-349, with calmodulin. *Biochem Pharmacol* 40:991-6
- Tanaka T, Hidaka H (1980) Hydrophobic regions function in calmodulin-enzyme(s) interactions. *J Biol Chem* 255:11078-80
- Tanaka T, Ohmura T, Hidaka H (1982a) Hydrophobic interaction of the Ca²⁺-calmodulin complex with calmodulin antagonists. Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol* 22:403-7
- Tanaka T, Ohmura T, Hidaka H (1982b) Hydrophobic interaction of the Ca²⁺-calmodulin complex with calmodulin antagonists. Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol.* 22:403-407.
- Tanaka T, Ohmura T, Yamakado T, Hidaka H (1982c) Two types of calcium-dependent protein phosphorylations modulated by calmodulin antagonists. Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol* 22:408-12
- Tang W, Sencer S, Hamilton SL (2002) Calmodulin modulation of proteins involved in excitation-contraction coupling. *Front Biosci* 7:d1583-9
- Tarabykina S, Moller AL, Durussel I, Cox J, Berchtold MW (2000) Two forms of the apoptosis-linked protein ALG-2 with different Ca²⁺ affinities and target recognition. *J Biol Chem* 275:10514-8
- Teo TS, Wang JH (1973) Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca²⁺ binding protein. *J Biol Chem* 248:5950-5
- Teo TS, Wang TH, Wang JH (1973) Purification and properties of the protein activator of bovine heart cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. *J Biol Chem* 248:588-95
- Tjandra N, Kuboniwa H, Ren H, Bax A (1995) Rotational dynamics of calcium-free calmodulin studied by 15N-NMR relaxation measurements. *Eur J Biochem* 230:1014-24
- Torok K, Wilding M, Groigno L, Patel R, Whitaker M (1998) Imaging the spatial dynamics of calmodulin activation during mitosis. *Curr Biol* 8:692-9

- Trepakova ES, Csutora P, Hunton DL, Marchase RB, Cohen RA, Bolotina VM (2000) Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275:26158-63
- Umekawa H, Yamakawa K, Nunoki K, Taira N, Tanaka T, Hidaka H (1988) Inhibition of calmodulin function by CV-159, a novel dihydropyridine compound. *Biochem Pharmacol* 37:3377-81
- Valeyev NV, Bates DG, Heslop-Harrison P, Postlethwaite I, Kotov NV (2008a) Elucidating the mechanisms of cooperative calcium-calmodulin interactions: a structural systems biology approach. *BMC Syst Biol* 2:48
- Valeyev NV, Heslop-Harrison P, Postlethwaite I, Kotov NV, Bates DG (2008b) Multiple calcium binding sites make calmodulin multifunctional. *Mol Biosyst* 4:66-73
- Van Eldik LJ, Watterson DM (1979) Characterization of a calcium-modulated protein from transformed chicken fibroblasts. *J Biol Chem* 254:10250-5
- Vandonselaar M, Hickie RA, Quail JW, L.T. D (1994) Trifluoperazine-induced conformational change in Ca(2+)-calmodulin. *Nat Struct Biol*. 1:795-801
- Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux FX, Meder JF, Chneiweiss H, Daumas-Duport C (2004) New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. *Neurosurgery* 55:1377-91: discussion 1391-2
- Vertessy BG, Bocskei Z, Harmath V, Naray-Szabo G, Ovadi J (1997) Crystallization and preliminary diffraction analysis of Ca(2+)-calmodulin-drug and apocalmodulin-drug complexes. *Proteins* 28:131-4
- Walter MF, Schultz JE (1981) Calcium receptor protein calmodulin isolated from cilia and cells of *Paramecium tetraurelia*. *Eur J Cell Biol*. 24:97-100
- Watanabe H, Takahashi R, Tran QK, Takeuchi K, Kosuge K, Satoh H, Uehara A, Terada H, Hayashi H, Ohno R, Ohashi K (1999) Increased cytosolic Ca(2+) concentration in endothelial cells by calmodulin antagonists. *Biochem Biophys Res Commun* 265:697-702
- Watterson DM, Sharief F, Vanaman TC (1980) The complete amino acid sequence of the Ca²⁺-dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. *J Biol Chem* 255:962-75
- Wawrzynczak EJ, Perham RN (1984) Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding human calmodulin. *Biochem Int* 9:177-85
- Wei JW, Hickie RA, Klaassen DJ (1983) Inhibition of human breast cancer colony formation by anticalmodulin agents: trifluoperazine, W-7, and W-13. *Cancer Chemother Pharmacol*. 11:86-90
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11024-31
- Wilson MA, Brunger AT (2000) The 1.0 Å crystal structure of Ca(2+)-bound calmodulin: an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity. *J Mol Biol* 301:1237-56

- Win NH, Ishikawa T, Saito N, Kato M, Yokokura H, Watanabe Y, Iida Y, Hidaka H (1996) A new and potent calmodulin antagonist, HF-2035, which inhibits vascular relaxation induced by nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 299:119-26
- Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 32:279-305
- Yamniuk AP, Nguyen LT, Hoang TT, Vogel HJ (2004) Metal ion binding properties and conformational states of calcium- and integrin-binding protein. *Biochemistry* 43:2558-68
- Yaney GC, Sharp GW (1990) Calmodulin and insulin secretion: use of naphthalenesulfonamide compounds. *Am J Physiol* 259:E856-64
- Yap KL, Ames JB, Swindells MB, Ikura M (1999) Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins* 37:499-507
- Yap KL, Kim J, Truong K, Sherman M, Yuan T, Ikura M (2000) Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics* 1:8-14
- Yazawa M, Ikura M, Hikichi K, Ying L, Yagi K (1987) Communication between two globular domains of calmodulin in the presence of mastoparan or caldesmon fragment. Ca²⁺ binding and 1H NMR. *J Biol Chem* 262:10951-4
- Yazawa M, Yagi K (1977) Calcium-binding subunit of myosin light chain kinase. *J Biochem* 82:287-9
- Ye Y, Lee HW, Yang W, Shealy S, Yang JJ (2005) Probing site-specific calmodulin calcium and lanthanide affinity by grafting. *J Am Chem Soc* 127:3743-50
- Yin H, Frederick KK, Liu D, Wand AJ, Degrado WF (2006) Arylamide derivatives as peptidomimetic inhibitors of calmodulin. *Org Lett* 8:223-5
- Young KW, Challiss RA, Nahorski SR, MacKrell JJ (1999) Lysophosphatidic acid-mediated Ca²⁺ mobilization in human SH-SY5Y neuroblastoma cells is independent of phosphoinositide signalling, but dependent on sphingosine kinase activation. *Biochem J* 343 Pt 1:45-52
- Yuan T, Vogel HJ (1998) Calcium-calmodulin-induced dimerization of the carboxyl-terminal domain from petunia glutamate decarboxylase. A novel calmodulin-peptide interaction motif. *J.Biol.Chem.* 273:30328-35
- Zhang M, Tanaka T, Ikura M (1995) Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nat Struct Biol* 2:758-67
- Zhang M, Vogel HJ (1994) The calmodulin-binding domain of caldesmon binds to calmodulin in an alpha-helical conformation. *Biochemistry* 33:1163-71
- Zimmer M, Hofmann F (1987) Differentiation of the drug-binding sites of calmodulin. *Eur J Biochem* 164:411-20
- Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399:159-62

AUTRES PUBLICATIONS

I. **Small Neutralizing Molecules to Inhibit Actions of the Chemokine CXCL12**

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Small Neutralizing Molecules to Inhibit Actions of the Chemokine CXCL12

Muriel Hachet-Haas, Karl Balabanian, François Rohmer, Françoise Pons, Christel Franchet, Sandra Lecat, Ken Y. C. Chow, Rania Dagher, Patrick Gizzi, Bruno Didier, Bernard Lagane, Esther Kellenberger, Dominique Bonnet, Françoise Baleux, Jacques Haiech, Marc Parmentier, Nelly Frossard, Fernando Arenzana Seisdedos, Marcel Hibert, and Jean-Luc Galzi

Journal of biological chemistry, 2008, vol. 283, n° 34, pages 23189 –23199

Pages 230-244 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M803947200>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

II. Solid-Phase Organic Tagging Resins for Labeling Biomolecules by 1,3- Dipolar Cycloaddition: Application to the Synthesis of a Fluorescent Non- Peptidic Vasopressin Receptor Ligand

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

**Solid-Phase Organic Tagging Resins for Labeling Biomolecules by 1,3-Dipolar
Cycloaddition: Application to the Synthesis of a Fluorescent Non-Peptidic Vasopressin
Receptor Ligand**

Dominique BONNET, Stéphanie RICHÉ, Stéphanie LOISON, Rania DAGHER, Marie-Céline
FRANTZ, Laure BOUDIER, Rita RAHMEH, Bernard MOUILLAC, Jacques HAIECH, Marcel
HIBERT

Chemistry - A European Journal, 2008, vol. 14, n° 20, Pages 6247 – 6254

Copyright © 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Pages 247-260 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur
commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1002/chem.200800273>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre
établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

