



HAL
open science

ROLE DE L'ACTIVITE DEPENDANTE DU CALCIUM AU COURS DU DEVELOPPEMENT ET DE LA MATURATION DES NEURONES GANGLIONNAIRES VESTIBULAIRES DE SOURIS

Laurence Autret

► **To cite this version:**

Laurence Autret. ROLE DE L'ACTIVITE DEPENDANTE DU CALCIUM AU COURS DU DEVELOPPEMENT ET DE LA MATURATION DES NEURONES GANGLIONNAIRES VESTIBULAIRES DE SOURIS. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2005. Français. NNT: . tel-00092410

HAL Id: tel-00092410

<https://theses.hal.science/tel-00092410>

Submitted on 9 Sep 2006

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

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

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Neurosciences

Formation Doctorale : Neurobiologie des Processus de Communication et d'Intégration

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement

par

Laurence AUTRET

Le 14 décembre 2005

Titre :

**ROLE DE L'ACTIVITE DEPENDANTE DU CALCIUM AU COURS DU
DEVELOPPEMENT ET DE LA MATURATION DES NEURONES
GANGLIONNAIRES VESTIBULAIRES DE SOURIS**

JURY

Mr J. VALMIER
Mr G. DESMADRYL
Mr R. GARDETTE
Mr M. VILLAZ
Mr P. LORY

Professeur, Université Montpellier II
Chargé de Recherche, CNRS Montpellier
Chargé de Recherche, CNRS Paris
Directeur de Recherche, Grenoble
Directeur de Recherche, CNRS Montpellier

Président
Directeur de Thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Neurosciences

Formation Doctorale : Neurobiologie des Processus de Communication et d'Intégration

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement

par

Laurence AUTRET

Le 14 décembre 2005

Titre :

**ROLE DE L'ACTIVITE DEPENDANTE DU CALCIUM AU COURS DU
DEVELOPPEMENT ET DE LA MATURATION DES NEURONES
GANGLIONNAIRES VESTIBULAIRES DE SOURIS**

JURY

Mr J. VALMIER	Professeur, Université Montpellier II	Président
Mr G. DESMADRYL	Chargé de Recherche, CNRS Montpellier	Directeur de Thèse
Mr R. GARDETTE	Chargé de Recherche, CNRS Paris	Rapporteur
Mr M. VILLAZ	Directeur de Recherche, Grenoble	Rapporteur
Mr P. LORY	Directeur de Recherche, CNRS Montpellier	Examineur

A papi et minou

A papa et maman

A Gaëlle et Nicolas

A la mémoire de mamie de Montpellier

Avant propos

Un grand merci...

Je remercie vivement le professeur Alain Sans pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité 432 de l'INSERM, Neurobiologie et Développement du Système Vestibulaire, afin d'y réaliser mon stage de DEA de Neurobiologie des Processus de Communication et d'Intégration. Je le remercie pour m'avoir permis, à l'issue de cette formation, de poursuivre ma thèse dans son laboratoire.

Un grand merci au professeur Jean Valmier, qui lui a succédé, de m'avoir permis de poursuivre mes travaux et de m'avoir aidé à choisir la « bonne orientation » ainsi que pour nos discussions scientifiques.

Enfin je remercie le docteur Christian Hamel directeur de l'Unité 583 de l'INSERM, Physiopathologie et Thérapie des Déficits Sensoriels et Moteurs, pour ses encouragements lors de la fin de mon doctorat.

Un grand merci au docteur Jean Luc Puel, chef d'équipe de l'équipe Physiologie et Physiopathologie de l'Oreille Interne pour ses conseils et son écoute quand le besoin se faisait sentir

Un immense merci au docteur Gilles Desmadryl qui a accepté la lourde tâche de diriger ce travail. Je le remercie de m'avoir appris les mille et une ficelles de l'électrophysiologie et de la recherche scientifique. Je le remercie pour ses encouragements et sa patience tout au long de ces nombreuses années qui ont permis l'aboutissement de ce travail.

Je remercie chaleureusement le docteur Philippe Lory d'avoir accepté de collaborer à ce travail et de m'avoir fait partager sa vision des choses et surtout ses grandes connaissances dans le domaine des canaux calciques de type T.

Un grand merci au docteur Robert Gardette pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. J'espère que cette lecture vous a donné satisfaction. Je vous remercie pour vos précisions et vos connaissances qui ont su améliorer la qualité de ce manuscrit.

Un grand merci au docteur Michel Villaz pour avoir accepté de juger ce travail et d'avoir eu la patience d'en attendre l'aboutissement. Je vous remercie pour votre vision « philosophique » sur mon travail. Je vous remercie pour vos encouragements et j'espère que la version définitive de ce travail vous donnera satisfaction. Je vous

remercie pour les discussions scientifiques que nous avons eues et qui m'ont permis de donner une autre dimension à mon travail.

Un grand merci au docteur Frédérique Scamps pour nos brainstorming, nos working, nos joking et surtout nos jogging... à quand le prochain ?? Merci pour ton aide précieuse et tes encouragements. Ne perds pas le fil des activités...électriques !!!

Un grand merci au docteur Ilana Méchaly, la biologiste moléculaire !!! Merci de m'avoir initié aux grands mystères de la RT-PCR avec une patience infinie. Merci pour ton soutien et ton amitié en toute circonstance.

Un grand merci à Chrystel Lafont qui m'a fait découvrir la culture en vert et rouge !!! Merci la miss pour avoir eu cet immense courage de répondre à la multitude de questions que j'ai pu te poser concernant le mystère de l'immunohistologie... Merci pour ton amitié précieuse, pour nos cafés longs pour toi et cappuccinos pour moi !!! Pour m'avoir écouté et pour avoir été là tout simplement...

Un grand merci à tous les anciens de l'Unité 432 de l'INSERM que j'ai le mieux connu mais aussi à tous les autres de l'Unité 583 de l'INSERM qui m'ont intégré dans un laboratoire de recherche, m'ont fait partagé leurs expériences, m'ont soutenu et encouragé et ont répondu à mes questions avec patience et pertinence.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à alléger l'ambiance du boulot, en instaurant des dîners pour se retrouver, de la musique dans les labo, des ballades en pleine nature même si parfois ce n'est pas une réussite...Bref, à donner une vie en dehors du boulot. Merci à Sylvie (la culturiste !!!), à Sylvain et tous les autres

Un petit clin d'œil et surtout un grand merci à mes collègues de Sanofi-Aventis Bagneux pour avoir relu ce manuscrit et corrigé les fautes... pour m'avoir poussé à finir cette thèse rapidement. Merci à Raphaël Santamaria et Christophe Lanneau pour avoir consacré du temps à traduire mes phrases abracadabrantesques et alléger mon discours !!!

Enfin un grand merci à tous mes amis qui m'ont fait comprendre qu'il y avait une vie en dehors du labo et des neurones...qui ont cru en moi sans trop comprendre et qui ont accepté de partager mes échecs comme mes réussites. Merci à Nounours pour la maintenance informatique sept jours sur sept et son ouïe attentive ainsi qu'à Adeline... Merci à Elsa ma « catsitter » qui m'a permis mes expéditions de fin de semaines...Merci à Jeff, Sabine, Magali, Hugues, Sarah, Dédé (pour tes pizzas excellentes) et tous les autres pour m'avoir changé les idées... Une pensée affectueuse pour Caroline mon amie qui ne comprend toujours pas que l'on puisse travailler sur d'autres modèles que les " cailloux "!!! et pour Céline qui m'a soutenu

tout au long de ces années. Merci à mes compagnons de galères, Sébastien, Pierrot, Catherine pour m'avoir fait partager leur galère et les miennes !!!

Enfin un grand merci à " l'amicale des anciens " comme dirait Laurent pour avoir su rester souder et finalement avoir vécu nos thèses ensemble... qu'est ce que l'avenir nous réserve ??? Bon courage Laurent...plus que deux jours !!!

Sans oublier les copains du labo, ceux qui vivent les mêmes choses... A Aurore qui sait tourner la vie en dérision, à Jérémie qui a toujours le mot qui faut, à Perrine qui m'a permis de développer mon côté pédagogique, à tous les autres thésards et étudiants du labo qui ont su m'apporter leur soutien quand il le fallait et à nos soirées pâtes en gros !!!

Enfin un petit mot d'encouragement et de " compassion " pour Cécile et Loïc qui sont dans les abîmes de la rédaction et la soutenance... deux choses à retenir : ce n'est jamais fini ni assez corrigé mais il faut bien se lancer un jour... bon courage à tous les deux...

Et enfin merci à Stéphane pour avoir eu le courage de tout supporter...

TABLES DES MATIERES

Avant propos.....	2
INTRODUCTION GENERALE	8
RAPPELS.....	13
I. MODELE D'ETUDE : LE SYSTEME VESTIBULAIRE	15
A. ANATOMIE	15
1) Innervation des cellules sensorielles.....	19
(a) Le système afférent.....	19
(b) Le ganglion de Scarpa	20
(c) Le système efférent.....	21
2) Organisation, structure et régionalisation	22
B. PHYSIOLOGIE DU SYSTEME VESTIBULAIRE	24
C. ONTOGENESE DU SYSTEME VESTIBULAIRE CHEZ LA SOURIS	27
1) Les cellules sensorielles.....	28
2) les cellules nerveuses.....	30
II. CANAUX IONIQUES DEPENDANTS DU POTENTIEL.....	33
1) CANAUX SODIQUES	34
(a) Généralités.....	34
(b) Au niveau du ganglion vestibulaire primaire	36
2) CANAUX POTASSIQUES.....	37
(a) Les grandes familles	37
(b) Au niveau du ganglion vestibulaire primaire	39
3) CANAUX CALCIQUES	42
(a) Généralités.....	42
(a) Les grandes familles des courants calciques et leur pharmacologie (figure 19).....	45
(b) Au niveau du ganglion vestibulaire primaire	49
(b) Au cours du développement.....	51
III. LES DIFFERENTES ISOFORMES DES CANAUX CALCIQUES DE TYPE T (COURANT LVA).....	55
IV. ROLE DES CANAUX CALCIQUES DANS LE SYSTEME NERVEUX.....	57
A. CANAUX CALCIQUES DEPENDANT DU POTENTIEL A HAUT SEUIL D'ACTIVATION (HVA).....	57
B. CANAUX CALCIQUES DEPENDANTS DU POTENTIEL A BAS SEUIL D'ACTIVATION (LVA)	58
C. CANAUX CALCIQUES A BAS SEUIL D'ACTIVATION ET DEVELOPPEMENT.....	60
MATERIELS ET METHODES	62
I. LES CELLULES : LES NEURONES VESTIBULAIRES PRIMAIRES	63
A. ANIMAUX.....	63
B. PREPARATION DE NEURONES VESTIBULAIRES PRIMAIRES FRAICHEMENT DISSOCIES	63
1) Traitement des boîtes utilisées pour l'ensemencement	63
2) Prélèvement et dissociations des ganglions vestibulaires	64
C. CULTURE DE NEURONES VESTIBULAIRES PRIMAIRES	65
1) Traitement des boîtes pour la culture.....	65
2) Dissociation enzymatique.....	65
3) Dissociation mécanique.....	66
4) Comptage et ensemencement.....	66

D. TRANSFECTION DES NEURONES VESTIBULAIRES PRIMAIRES EN CULTURE.....	67
II. ANALYSES SUR CELLULES VIVANTES.....	69
A. ELECTROPHYSIOLOGIE.....	69
1) Dispositif expérimental.....	69
2) Conditions d'enregistrements.....	70
3) Analyses des données.....	72
III. ETUDES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE.....	74
A. BIOLOGIE MOLECULAIRE : RT-PCR.....	74
1) Extraction des ARN totaux.....	74
2) Traitement DNase.....	75
3) Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc).....	75
4) Amplification PCR.....	75
B. IMMUNOHISTOLOGIE.....	76
RESULTATS ET DISCUSSION.....	78
I. CARACTERISATION DES courants calciques a bas seuil d'activation DANS LE GANGLION VESTIBULAIRE PRIMAIRE A 17 JOURS DE GESTATION.....	79
A. INTRODUCTION.....	79
B. RESULTATS.....	80
1) RT-PCR sur ganglion entier.....	80
2) Caractérisation électrophysiologique des courants calciques de type T dans les neurones vestibulaires primaires.....	81
(a) Amplitude du courant.....	82
(b) Activation et inactivation.....	83
(c) Déactivation.....	85
(d) Réactivation.....	86
3) Effet d'un stimulus mécanique : flux de milieu extracellulaire.....	88
4) Courbe dose réponse au Nickel sur courants calciques de type T des neurones vestibulaires primaires.....	91
C. DISCUSSION.....	93
1) Expression des sous-unités Ca _v 3 dans les ganglions vestibulaires.....	94
2) Caractérisation électrophysiologique des courants calciques de type T dans les neurones vestibulaires primaires.....	95
3) Sensibilité des courants calciques de type T.....	97
II. EVOLUTION DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE AU COURS DU DEVELOPPEMENT.....	99
A. INTRODUCTION.....	99
B. RESULTATS.....	100
1) Les différentes formes d'activité électrique.....	100
2) Evolution des propriétés actives et passives de la membrane.....	102
3) Etude de la dépolarisation post potentiel.....	106
4) Etude de l'épaulement de la phase de repolarisation du PA.....	109
C. DISCUSSION.....	112
1) Diminution de la durée du potentiel d'action.....	112
2) Dépolarisation post potentiel d'action.....	113
3) Epaulement lors de la phase de repolarisation du potentiel d'action.....	114
III. ROLE SUR LA NEURITOGENESE DES NEURONES VESTIBULAIRES PRIMAIRES.....	116
A. INTRODUCTION.....	116
B. RESULTATS.....	117

C. DISCUSSION	123
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	125
ANNEXE	130
BIBLIOGRAPHIE	131

INTRODUCTION GENERALE

L'oreille interne se compose de deux organes sensoriels indépendants et ayant des fonctions très différentes. Le premier organe est la cochlée qui permet l'audition. Le deuxième est le vestibule ou système vestibulaire qui participe à la fonction d'équilibration du corps, d'orientation et de positionnement du corps dans l'espace. Cette fonction est jouée en étroite synergie avec d'autres systèmes tels que le système visuel et le système proprioceptif. Ceci est possible grâce à son anatomie complexe et son principe de réception de l'information. Les macules présentes dans le saccule et l'utricle sont composées de cellules sensorielles qui vont être stimulées par les accélérations linéaires et vont donc rendre compte des déplacements horizontaux et verticaux de la tête et du corps. La gravité est le stimulus direct de ces macules qui sont donc continuellement stimulées. Les ampoules des canaux semi-circulaires contiennent des crêtes aussi composées de cellules sensorielles. Il existe trois canaux semi-circulaires pour l'orientation selon les trois axes dans l'espace. Les cellules de ces crêtes vont capter les accélérations angulaires et donc rendre compte des mouvements de rotation de la tête et du corps.

Anatomiquement les cellules sensorielles présentent à leur apex une touffe ciliaire qui est enchâssée dans la membrane otoconiale des macules, et dans la cupule des récepteurs ampullaires. Le déplacement de cette membrane va induire un déplacement des touffes ciliaires et donc une réponse électrochimique de la cellule. Cette réponse va être transmise aux noyaux vestibulaires, situés dans le bulbe rachidien. Ceci passe par l'intermédiaire des neurones vestibulaires primaires, dont les corps cellulaires forment un ganglion, le ganglion vestibulaire primaire ou ganglion de Scarpa. Les afférences primaires vestibulaires n'assurent pas seulement la transmission mais également la mise en forme et le codage de l'information. Le message qui est transmis vers les centres vestibulaires, est la résultante de toutes les informations reçues par les neurones primaires.

Les modalités de transfert de l'information entre la réception par les cellules sensorielles et l'intégration par le système nerveux central peuvent se décomposer en trois niveaux d'intégration.

Le premier niveau est le déplacement dans un compartiment liquidien de la membrane otoconiale et de la cupule. Les phénomènes physiques de ce déplacement sont appréciés par le modèle hydrodynamique (De Vries, 1951) et le modèle du pendule de torsion sur amorti (Steinhausen, 1931).

Le deuxième niveau dépend des cellules sensorielles et du déplacement de leurs touffes ciliaires. Le déplacement des touffes ciliaires va induire l'ouverture ou la fermeture de mécanorécepteurs qui laissent passer le potassium. Ce cation va conduire à la dépolarisation de la cellule ciliée. Au niveau de la cellule ciliée, des phénomènes de mécanotransduction et de traitement du message vont avoir lieu pour permettre la transmission synaptique (Hudspeth, 1989).

Le troisième niveau est le codage de l'information vestibulaire et la transmission de celle-ci par les fibres afférentes vestibulaires primaires. Elles ont des propriétés d'intégration des messages pour les coder en trains de potentiels d'action qui seront transmis aux noyaux vestibulaires centraux. Différents travaux réalisés chez les mammifères ont montré que le système afférent ne doit pas être seulement considéré comme un élément assurant la transmission de l'information mais comme un réseau intégratif assurant la mise en forme et le codage de l'information vestibulaire (Baird *et al.*, 1988; Goldberg *et al.*, 1990b).

Ces modalités de transfert du message nerveux sont d'autant plus importantes qu'elles dépendent de la mise en place du système sensoriel lors du développement de l'organisme. Une perturbation de ce développement entraînerait une mise en place anormale ou retardée du système sensoriel et donc un fonctionnement pathologique.

Les organes sensoriels se développent suivant des étapes successives de détermination, différenciation cellulaire et de maturation. Au cours du développement du système nerveux central, l'établissement de synapses et leur stabilisation sont dépendants de l'activité électrique. Or l'activité électrique au niveau des circuits neuronaux dépend de l'activité des récepteurs sensoriels et donc de leur stimulation. Cette activité électrique est indispensable à la pousse des neurites et à la connexion de ceux-ci avec les cellules sensorielles. L'activité électrique des neurones est antérieure à la formation des synapses. Le fonctionnement des récepteurs au moment de la formation des synapses est capital au maintien de la connexion synaptique. Cette activité électrique est générée par des canaux ioniques présents à la membrane plasmique des neurones. Ces canaux ioniques appartiennent à différentes familles, canaux sodiques, potassiques et canaux calciques pour les principaux. La composition en canaux ioniques que l'on trouve à la membrane peut varier au cours du développement et la résultante de l'activité de ces canaux qui est le potentiel d'action peut alors présenter des caractéristiques différentes. Cette

différence dans la répartition en canaux ioniques que l'on trouve à la membrane permet une maturation de l'organe sensoriel.

Plusieurs études ont permis la caractérisation des principales conductances dépendantes du potentiel présentes sur le soma des neurones vestibulaires primaires chez la souris nouveau né (Chabbert *et al.*, 1997; Chabbert *et al.*, 2001b ; Desmadryl *et al.*, 1997) mais aussi l'analyse de l'évolution de certaines conductances au cours du développement du vestibule (Chambard *et al.*, 1999). Cette dernière étude a surtout ciblé l'évolution, au cours du développement, des canaux calciques dépendants du potentiel. En effet, il a été montré dans de nombreux modèles que ces canaux jouaient un rôle important sur la neuritogenèse et la synaptogenèse (Al-Mohanna *et al.*, 1992; Amato *et al.*, 1996; Holliday et Spitzer, 1990; Mattson et Kater, 1987). Ces canaux permettent une entrée massive de calcium qui est un second messenger important (Berridge *et al.*, 1998) et permet l'activation de nombreux gènes (Finkbeiner et Greenberg, 1998). Ainsi les ions calcium jouent un rôle critique au cours de la formation du système nerveux.

Ces canaux calciques dépendants du potentiel peuvent être divisés en deux grandes familles (Carbone et Lux, 1984). Les premiers, appelés canaux calciques à haut seuil d'activation (High Voltage Activated ou HVA), s'ouvrent pour des potentiels de membrane de -20mV et présentent une probabilité maximale d'ouverture à environ 0mV. Les seconds, appelés canaux calciques à bas seuil d'activation (Low Voltage Activated ou LVA), s'ouvrent pour des potentiels de l'ordre de -60 mV et présentent une probabilité maximale d'ouverture à -40 mV. Au sein de ces deux grandes familles les canaux sont regroupés en sous-familles en fonction de leurs propriétés pharmacologiques.

Lors des différents travaux de cette thèse nous nous sommes intéressés tout particulièrement aux canaux calciques dépendants du potentiel et notamment ceux à bas seuil d'activation dans les neurones vestibulaires primaires de souris. L'étude ontogénique réalisée sur les neurones ganglionnaires primaires de souris a montré que les canaux calciques à bas seuil d'activation sont fortement exprimés durant la vie embryonnaire et disparaissent ensuite (Chambard *et al.*, 1999). Ces canaux sont activés par des potentiels proches du potentiel de repos de la cellule et permettent

une entrée massive de calcium à une période de forte neuritogenèse et synaptogenèse.

Ceci nous a conduit à nous interroger sur le rôle physiologique de cette conductance, et plus exactement, comment ce courant module l'activité électrique des neurones ganglionnaires primaires de souris et peut-il avoir une influence sur la mise en place de l'afférentation du système vestibulaire ?

- Dans la première partie de cette thèse, il a été indispensable de caractériser précisément le ou les canaux calciques dépendants du potentiel à bas seuil d'activation exprimés transitoirement au cours du développement. En effet, lors de la réalisation de l'étude ontogénique des canaux calciques, les différents gènes codant pour des canaux calciques à bas seuil d'activation, au nombre de trois, n'avaient pas encore été clonés (Chambard *et al.*, 1999). Ces conductances présentent des caractéristiques électrophysiologiques différentes et des propriétés fonctionnelles distinctes. Toute étude physiologique du rôle de ce courant était exclue tant que les conductances n'étaient pas identifiées. Lors de ces travaux, différentes techniques d'étude ont été utilisées, mais la plus largement utilisée est celle du patch clamp sur cellule entière.
- A la suite de cette caractérisation, nous avons ensuite réalisé une étude de l'activité électrique des neurones vestibulaires primaires isolés afin de corréler une évolution globale de la forme des potentiels d'action avec l'évolution des conductances ioniques présentes à la membrane des neurones. Ceci a été réalisé à partir de souris embryonnaires pour l'étude des conductances calciques et pour l'évolution de la forme de l'activité électrique, des animaux embryonnaires et post-nataux ont été utilisés.
- La troisième partie de ces travaux a voulu montrer le rôle que pouvait jouer cette conductance calcique à bas seuil d'activation, dont la présence est transitoire au cours du développement. L'activité électrique due à l'expression de cette conductance calcique correspond à une période du développement où au niveau du système vestibulaire, il y a une forte pousse neuritique et la formation des premiers contacts synaptiques entre les neurones vestibulaires primaires et les cellules sensorielles. Donc nous nous sommes demandés dans quelle mesure cette conductance influait sur ces événements.

RAPPELS

L'oreille un des cinq organes des sens, est constituée de trois parties (figure 1). L'oreille externe, partie visible de l'organe, se compose du pavillon et du conduit auditif externe et a pour rôle de guider le son jusqu'au tympan, membrane séparant le conduit auditif externe de la cavité de l'oreille moyenne comportant de la chaîne des osselets, qui vont transmettre les vibrations du tympan à une autre membrane, la fenêtre ovale, séparant l'oreille moyenne de l'oreille interne. L'oreille interne, se situe au sein de la partie la plus dense de l'os temporal. Elle est constituée de labyrinthes osseux et membraneux. Ceux-ci forment deux organes sensoriels distincts : la cochlée, organe de l'audition et le vestibule ou labyrinthe postérieur, organe de l'équilibration. Alors que la cochlée est mise en jeu par des vibrations de moyenne et haute fréquence (20 à 20000 hertz chez l'Homme), le vestibule est mis en jeu par des stimuli de basse fréquence (0.01 à 10 hertz)

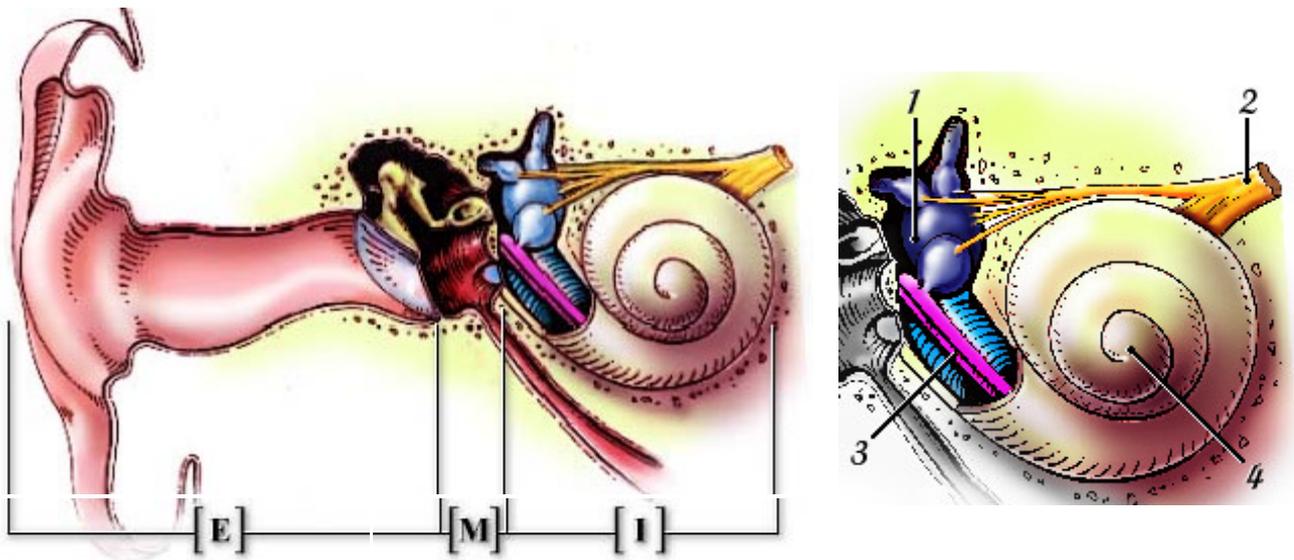


Figure 1: A gauche, schéma de l'oreille externe, moyenne et interne (<http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition/fran%E7ais/ear/ear.htm>). A droite schéma in situ de l'oreille interne. 1 le vestibule, 2 nerf vestibulaire et nerf cochléaire qui se rejoignent, 3 organe de Corti et 4 la cochlée (<http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition/fran%E7ais/ear/inear/inear.htm>).

I. MODELE D'ETUDE : LE SYSTEME VESTIBULAIRE

A. ANATOMIE

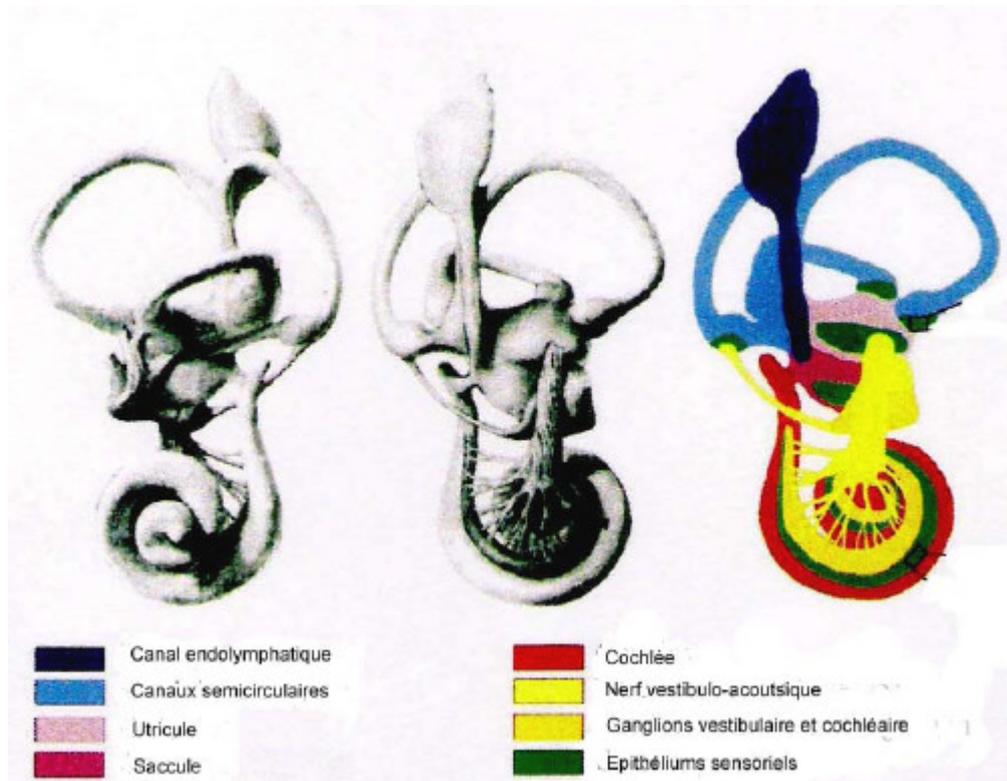


Figure 2 : Anatomie fonctionnelle de l'oreille interne mature. Le dessin de droite représente les différentes parties de l'oreille interne (Torres et Giraldez, 1998).

Le système vestibulaire correspond à une partie du labyrinthe membraneux, situé lui-même dans le labyrinthe osseux (figure 2). Il est constitué :

- de trois canaux semi-circulaires (horizontal, supérieur et postérieur), qui sont orientés suivant les trois plans de l'espace des deux côtés de la tête de telle sorte qu'il y ait une correspondance spatiale de leur orientation. Chaque canal semi-circulaire possède une partie renflée appelée ampoule qui est le véritable organe récepteur des accélérations angulaires. Les crêtes ampullaires, récepteurs sensoriels des ampoules, sont revêtues d'un épithélium sensoriel constitué de cellules sensorielles ciliées et de cellules non sensorielles de soutien. Ces cellules sensorielles sont équipées à leur pôle apical de stéréocils et d'un kinocil. Ces cils sont contenus dans une structure gélatineuse appelée cupule. Celle-ci est attachée aux parois de l'ampoule ainsi qu'aux bords de la crête. Les mouvements angulaires

de la tête entraînent des mouvements de l'endolymphe et donc un déplacement de la cupule qui va produire une déflexion des cils.

- de deux organes otolithiques, l'utricule et le saccule. Ils baignent dans la périlymphe, liquide riche en Na^+ (140mM) et faiblement pourvu en K^+ (4 à 6mM) et Ca^{2+} (1mM), et contiennent l'endolymphe, qui elle est caractérisée par sa faible concentration en Na^+ (1 à 2mM) et Ca^{2+} (0,2mM) et sa forte concentration en K^+ (140 à 150mM) (Ferrary et Sterkers, 1998). Les macules du saccule et de l'utricule contiennent des cellules sensorielles ciliées qui possèdent à leur pôle apical des stéréocils implantés dans la plaque cuticulaire et un kinocil qui est directement implanté dans le cytoplasme de la cellule. Ces cils sont enchâssés dans une masse gélatineuse protéique, la membrane otoconiale, qui contient de nombreux cristaux de carbonate de calcium, les otoconies. La présence de ceux-ci permet d'augmenter la gravité spécifique de la membrane otoconiale jusqu'à environ le double de celle de l'endolymphe. Si bien que cette membrane va être affectée par les accélérations linéaires telles que la gravité.

Les canaux semi-circulaires sont connectés avec l'utricule, lui-même en relation au saccule. Le saccule est relié avec le sac endolymphatique qui communique avec la cochlée, permettant ainsi la circulation de l'endolymphe entre les deux organes.

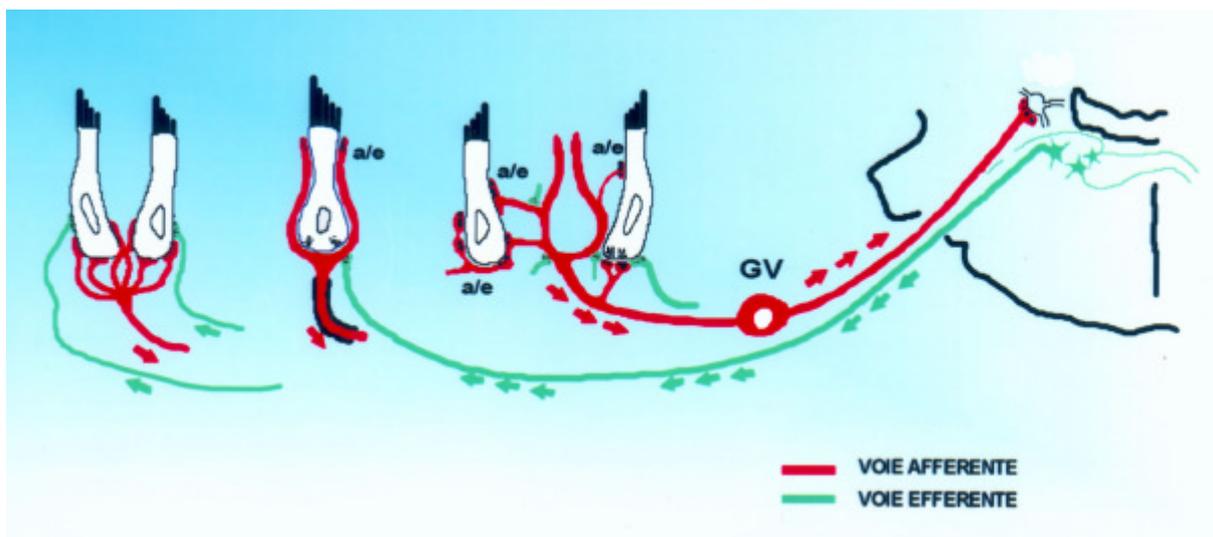


Figure 3 : Schéma de l'innervation sensorielle des cellules du système vestibulaire. GV : Ganglion vestibulaire ou ganglion de Scarpa.

Les cellules sensorielles sont innervées par des fibres afférentes primaires qui sont les prolongements des neurones dont les corps cellulaires forment le ganglion de Scarpa (figure 3). Ces neurones sont bipolaires et ont des axones myélinisés, qui vont former le nerf vestibulaire, une composante de la VIII^e paire de nerfs crâniens. Il se projette vers le tronc cérébral par le nerf vestibulaire qui passe par le conduit auditif interne ainsi que le nerf facial et le nerf auditif mais aussi les artères irriguant l'oreille interne. Les fibres se terminent dans les noyaux vestibulaires situés à la jonction bulbo-pontique. Il existe plusieurs noyaux : supérieur, latéral, médian et inférieur. Les afférences provenant des ampoules se terminent surtout dans les noyaux supérieur, latéral et médian alors que les afférences provenant des macules se terminent plutôt dans les noyaux latéral et inférieur. Les fibres vestibulaires efférentes ont leurs corps cellulaires localisés dans le tronc cérébral.

- Epithéliums sensoriels

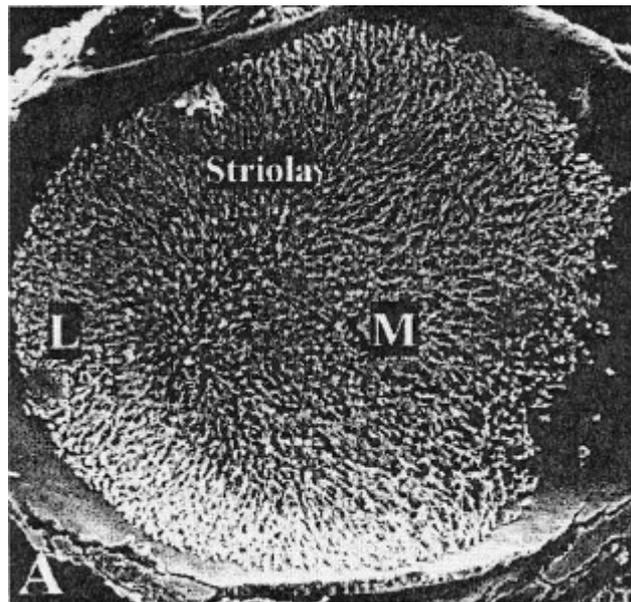


Figure 4 : Vue d'un utricule de rat en microscopie électronique à balayage. La striole divise l'utricule en deux zones, latérale (L) et médiale (M) (Dememes et al., 2001).

Les épithéliums sensoriels sont constitués de cellules sensorielles ciliées, qui sont les cellules mécanoréceptrices, et de cellules de soutien (figure 4). Les cellules sensorielles sont des cellules hautement différenciées et polarisées. Chez les

vertébrés supérieurs, elles se divisent en deux types, en fonction de leur morphologie et de leur physiologie : la cellule de type I et la cellule de type II. Ces cellules sont constituées de deux parties. La partie apicale, responsable de la réception de l'information, se compose de la plaque cuticulaire au sein de laquelle sont ancrés les stéréocils. Cette plaque est riche en actine, myosine et protéines associées, les stéréocils contiennent des filaments d'actine et sont rangés par ordre décroissant par rapport au kinocil. Le kinocil, le plus grand des cils est directement ancré dans le cytoplasme et se compose de microtubules. Il est relié à la première rangée de cils par des connexions apicales. Comme ce kinocil est enchâssé soit dans la cupule, soit dans la membrane otoconiale, un mouvement de ces structures va provoquer une inclinaison de ce kinocil, qui ainsi va provoquer l'inclinaison des autres cils. Cette inclinaison des cils va être responsable de la dépolarisation ou de l'hyperpolarisation des cellules. La partie baso-latérale de la cellule contient le noyau et les différents éléments permettant la libération de neurotransmetteur. Elle est aussi impliquée dans le contrôle du potentiel membranaire.

Les cellules sensorielles de type II sont phylogénétiquement les plus anciennes. Ces cellules sont de forme cylindrique et au niveau de leur pôle baso-latéral, les afférences forment des synapses en bouton. Les cellules de type I ont une forme particulière, en quille de bowling, et des synapses tout aussi particulières. En effet, les afférences nerveuses englobent totalement le corps de la cellule pour former un calice nerveux. Le mode de transmission synaptique induit par ce calice est jusqu'à aujourd'hui encore complexe et non encore défini.

1) Innervation des cellules sensorielles

(a) Le système afférent

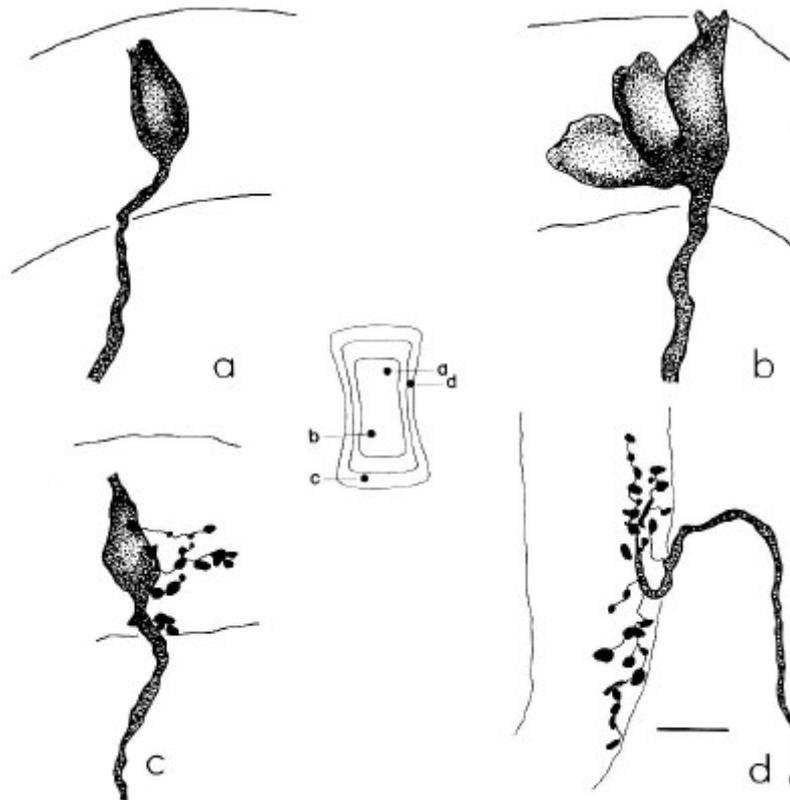


Figure 5 : Reconstitution de terminaisons calicéales simple (a) et multiple (b), d'une terminaison dimorphique (c) et d'une terminaison en bouton (d). Dans cette figure, les points marqués sur le schéma du milieu correspondent à la position respective des axones afférents marqués. Echelle : 10 μ m (Fernandez et al., 1988).

L'information sensorielle provenant des récepteurs vestibulaires est véhiculée le long de fibres nerveuses myélinisées afférentes jusqu'aux noyaux vestibulaires. Les corps cellulaires de ces fibres forment un ganglion, le ganglion de Scarpa. Les fibres nerveuses sont une branche de la VIII^e paire de nerf crânien.

Au niveau des cellules sensorielles, trois types d'afférentation sont présents (figure 5).

- Le premier mode de transmission synaptique est dit en bouton, contact synaptique classique que l'on retrouve dans le système nerveux. Ce mode d'afférentation contacte les cellules ciliées de type II.

- Le deuxième mode d'afférentation est la synapse en calice, c'est-à-dire que la terminaison nerveuse englobe la cellule sensorielle. Ce mode d'afférentation concerne les cellules ciliées de type I.

- Enfin il existe un mode d'afférentation dimorphique, où les fibres nerveuses contactent à la fois les cellules ciliées de type I et de type II. (Fernandez *et al.*, 1988 ; Fernandez *et al.*, 1990). Il a aussi été démontré que ces synapses avaient des localisations bien spécifiées au niveau des épithéliums (Baird et Lewis, 1986 ; Fernandez *et al.*, 1990 ; Goldberg *et al.*, 1990b).

(b) Le ganglion de Scarpa

Les afférences vestibulaires innervent les épithéliums sensoriels et se projettent au niveau des noyaux vestibulaires ipsilatéraux. Le ganglion de Scarpa est composé des corps cellulaires des neurones vestibulaires primaires. Il se situe à la limite de l'os du rocher au niveau du meat auditif interne (Curthoys, 1981). Les neurones qui le composent sont des neurones bipolaires qui présentent une grande diversité dans la taille des corps cellulaires. Les fibres afférentes innervant les épithéliums se divisent en deux branches, la branche supérieure innervant les crêtes ampullaires horizontale et supérieure, l'utricule et la partie antéro-supérieure du saccule, tandis que la branche inférieure innerve la crête ampullaire supérieure et le reste du saccule (Rosenbluth, 1962).

Une étude quantitative de la taille des neurones et immunocytochimique de la localisation des protéines liant le calcium (calbindine et calrétinine) et des protéines neurofilamenteuses a mis en évidence l'hétérogénéité des corps cellulaires du ganglion vestibulaire (Dememes *et al.*, 1992). En effet, les plus petits ont un diamètre de 7µm alors que les plus gros atteignent un diamètre de 33µm. De plus, les protéines étudiées sont majoritairement exprimées dans les neurones de gros diamètre, avec la protéine neurofilament. Ces neurones représentent 15,4% de la population totale du ganglion et connectent essentiellement les cellules ciliées de type I, par des terminaisons en calice (Desmadryl et Dechesne, 1992). La population de neurones la plus importante regroupe ceux qui n'expriment que la protéine neurofilament et représente 32% de la population totale. Le troisième groupe est composé de neurones n'exprimant aucune de ces trois protéines. Ce sont

essentiellement des neurones de petite taille responsables de l'innervation en boutons des cellules ciliées de type II (Desmadryl et Dechesne, 1992).

(c) Le système efférent

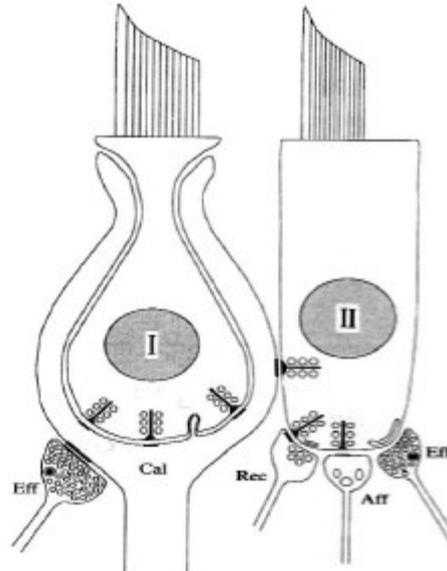


Figure 6 : Schéma des cellules sensorielles et des éléments synaptiques au sein de l'épithélium vestibulaire. I, cellule de type I ; II, cellule de type II ; cal, terminaison synaptique afférente en calice ; aff, terminaison synaptique en bouton ; eff, terminaison efférente ; rec, synapse réciproque (Lysakowski et Goldberg, 1997).

Les fibres efférentes vestibulaires ont pour origine un petit groupe diffus de neurones dont les corps cellulaires se situent au niveau du tronc cérébral sous le plancher du IV^e ventricule (Gacek et Lyon, 1974). Les cellules sensorielles des épithéliums sont contactées par les fibres efférentes (figure 6), qui forment des synapses axo-dendritiques au niveau des calices des cellules de type I et des synapses somato-dendritiques au niveau basolatéral des cellules de type II (Bagger-Sjoback, 1974; Wersall, 1972)

2) Organisation, structure et régionalisation

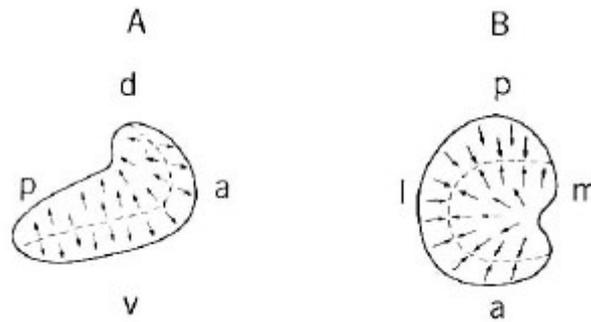


Figure 7 : carte d'orientation des touffes ciliaires pour le saccule (A) et l'utricule (B) chez le singe écureuil. Les pointillés délimitent la striole, (a) antérieur, (d) dorsal, (l) latéral, (m) médian, (p) postérieur, (v) ventral (Fernandez et al., 1972).

Au niveau de l'apex des cellules sensorielles, se trouvent les touffes ciliaires qui sont organisées par rapport au kinocil. Ces touffes ciliaires présentent une polarisation fonctionnelle. En effet, au niveau des crêtes ampullaires, les touffes ciliaires sont toutes orientées dans le même sens au sein de l'épithélium. Au niveau des macules utriculaires et sacculaires, cette polarisation est organisée à partir d'une zone centrale, appelée striole (figure 7). Au niveau de l'épithélium sacculaire, les cellules ont une organisation centripète c'est-à-dire que les plus petits cils sont le plus proche de la striole. Au niveau de l'utricule, il s'agit d'une même organisation mais inverse, c'est-à-dire que l'organisation est centrifuge, ce sont les kinocils qui sont le plus proche de la striole.

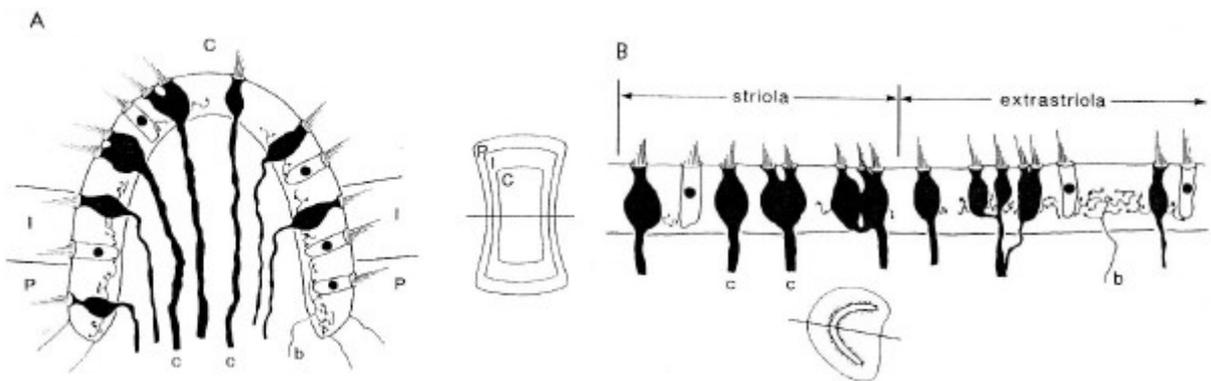


Figure 8 : (A) schéma de l'innervation afférente de la crête ampullaire. Elle est divisée en trois zones : (c) centrale, (i) intermédiaire et (p) périphérique. (B) Schéma de l'innervation de la macule utriculaire. Elle est divisée en deux zones, la striole et la zone extrastriolaire (Goldberg et al., 1990b)

De même au sein des épithéliums les deux types cellulaires ne sont pas répartis de manière aléatoire. Trois régions peuvent être définies en fonction de leur composition en cellules (figure 8). Dans la région centrale des crêtes et la région striolaire des macules, les cellules de type I sont majoritaires. Au niveau des régions périphériques des épithéliums, se trouvent essentiellement des cellules de type II. Entre ces deux zones, se trouve une région qui est composée des deux types cellulaires en proportion équivalente.

Ainsi cette répartition des types cellulaires va conduire à une organisation des différents modes d'afférentation. En effet, au niveau de la zone centrale des épithéliums, se trouvent essentiellement des synapses en calices et multi-calices, spécifiques des cellules de type I. Au niveau de la région périphérique, se trouvent les synapses en boutons. Dans la région intermédiaire, les synapses sont dimorphiques.

Au sein du ganglion vestibulaire se trouvent des neurones de différente taille. En effet, les neurones de gros diamètre innervent les cellules ciliées de type I, c'est-à-dire forment des synapses en calice et multi-calicéales. Les neurones de petit diamètre sont responsables de l'innervation en bouton. Quand aux neurones de taille intermédiaire, ils innervent les deux types cellulaires, c'est-à-dire forment des synapses dimorphiques.

Cette régionalisation se retrouve au niveau des fibres afférentes. En effet dans le VIIIe nerf crânien, les fibres de gros diamètre sont centrales, tandis que les fibres de petit diamètre sont périphériques.

Ainsi, il existe une organisation structurelle stricte où se trouve une correspondance entre type de cellule, modalité d'afférentation et taille du corps cellulaire des neurones.

B. PHYSIOLOGIE DU SYSTEME VESTIBULAIRE

Les cellules sensorielles reçoivent des stimuli primaires et les transforment en messages chimiques ou électriques afin de permettre la transmission du message au niveau de la fibre nerveuse afférente et ainsi au cerveau. Les cellules ciliées vestibulaires ont pour stimulus primaire un stimulus mécanique, mouvement des touffes ciliaires au niveau apical des cellules, ainsi le phénomène de conversion de ce signal s'appelle la mécanotransduction (Hudspeth, 1989).

Les cellules ciliées assurent trois fonctions physiologiques, qui sont la transduction mécanosensorielle, le filtrage de la réponse et la transmission synaptique (Roberts *et al.*, 1990). Des accélérations angulaires ou linéaires provoquent un déplacement de la cupule des récepteurs ampullaires ou de la membrane otoconiale des récepteurs maculaires, entraînant un déplacement des touffes ciliaires enchâssées dans ces membranes (Corey et Hudspeth, 1979a; Corey et Hudspeth, 1979b). Le phénomène de transduction, consistant en la conversion d'une stimulation mécanique en signal électrique, est réalisé au niveau du pôle apical des cellules, en contact avec l'endolymphe riche en potassium (Hudspeth, 1989). En effet, le flux de cations entrant va dépolariser la cellule sensorielle qui va convertir, en une réponse électrique, une stimulation mécanique liée au déplacement des kinocils dans le sens opposé à l'orientation des stéréocils (Eatock et Hutzler, 1992; Rennie et Ashmore, 1991). Des études ont permis de montrer l'existence à l'apex des stéréocils de canaux de transduction directement ouverts par de petits liens élastiques ou « tip links » constitués de fins filaments reliant le sommet des stéréocils adjacents (Jacobs et Hudspeth, 1990; Strassmaier et Gillespie, 2002). Lors d'une stimulation qui entraîne les stéréocils vers le kinocil, il s'agit d'une stimulation positive, ces canaux non sélectifs vont s'ouvrir et, en présence de calcium, permettre une entrée de potassium (Assad *et al.*, 1989; Ohmori, 1987). Cette entrée de potassium va donc conduire à une dépolarisation de la membrane basolatérale stimulant la libération de neurotransmetteur (Hudspeth, 1986). Si la stimulation est négative, c'est-à-dire que le déplacement des cils se fait dans l'autre sens, ces canaux non sélectifs vont être fermés induisant alors une hyperpolarisation de la membrane et donc une inhibition de la libération de neurotransmetteur. En effet, l'existence d'une activité basale des cellules ciliées au repos joue un rôle primordial

dans le codage de l'information. Au repos, 20% des canaux de mécanotransduction sont ouverts, il existe une entrée de potassium régulière qui induit une libération régulière de neurotransmetteur. Ainsi une stimulation dans un sens ou un autre des touffes ciliaires va induire une régulation de la libération basale de neurotransmetteur. Le codage de l'information sensorielle ne répond pas à la loi du tout ou rien mais dépend plutôt d'une modulation de l'activité basale des cellules sensorielles.

De nombreux travaux ont mis en évidence la nature chimique de la synapse entre les cellules sensorielles et la fibre afférente (Schessel *et al.*, 1991; Schessel et Highstein, 1981; Yamashita et Ohmori, 1990). Ce mécanisme semble différent du fait de la différence morphologique de la synapse en fonction du type de la cellule. Pour les cellules de type II, une entrée massive de calcium par les canaux calciques dépendants du potentiel provoque une libération de glutamate dans la fente synaptique. Pour les cellules ciliées de type I, l'entrée de calcium est encore discuté car l'existence de canaux calciques dépendants du potentiel n'a toujours pas été démontrée. Différentes études ont montré la présence de récepteurs glutamatergiques au niveau post synaptique sur la fibre afférente, les récepteurs AMPA (Matsubara *et al.*, 1999) et les récepteurs NMDA (Ishiyama *et al.*, 1999; Ishiyama *et al.*, 2002). Toutefois, aspartate, GABA et ATP ont aussi un effet (excitateur ou inhibiteur) sur la transmission synaptique (Aubert *et al.*, 1995; Foster *et al.*, 1995 ; Kitahara *et al.*, 1994 ; Meza *et al.*, 1992 ; Prigioni *et al.*, 1990).

L'existence d'une libération basale de neurotransmetteur a pour conséquence une activité spontanée des fibres afférentes (Rossi *et al.*, 1977 ; Schessel *et al.*, 1991 ; Schessel et Highstein, 1981 ; Yamashita et Ohmori, 1990). Les afférences vestibulaires possèdent une activité spontanée dont la fréquence varie selon les espèces. La fonction de cette activité spontanée est de permettre la modulation de la réponse vestibulaire, c'est-à-dire une augmentation ou une diminution de cette fréquence en fonction de la stimulation. Cette activité au repos pourrait avoir une influence tonique sur les centres vestibulaires.

Les études physiologiques des afférences vestibulaires ont permis d'établir des corrélations entre les propriétés de réponses et les paramètres morphologiques tels que le diamètre des axones, la taille des corps cellulaires et le schéma de prise de l'information (Baird *et al.*, 1988; Baird et Lewis, 1986 ; Goldberg et Fernandez, 1977 ;

Honrubia *et al.*, 1989 ; Honrubia *et al.*, 1981). En fonction de ces paramètres, plusieurs groupes fonctionnels ont pu être différenciés dans de nombreuses espèces :

Certaines fibres sont dites phasiques car leur activité spontanée est irrégulière et de faible fréquence (environ 10Hz). Elles ont un rôle dynamique car elles répondent dès le début du mouvement et sont responsables de la fonction cinétique du vestibule. De plus, elles présentent une adaptation, c'est-à-dire que leur activité diminue lors de stimulation prolongée. Il s'agit des fibres de gros diamètre qui forment des synapses en calice ou dimorphiques. Ces synapses sont localisées dans les régions centrales des épithéliums sensoriels (Baird *et al.*, 1988 ; Goldberg *et al.*, 1990b; Goldberg et Fernandez, 1977 ; Lysakowski *et al.*, 1988).

D'autres fibres sont dites toniques, car leur activité spontanée est régulière et de fréquence élevée (environ 50Hz) (Estes *et al.*, 1975 ; Schneider et Anderson, 1976 ; Yagi *et al.*, 1977). Elles ne présentent pas d'adaptation à des stimulations prolongées et sont responsables de la fonction statique du vestibule. Il s'agit des fibres de petit diamètre qui innervent les cellules de type II et forment des synapses en boutons ou dimorphiques. Elles sont localisées à la périphérie des épithéliums sensoriels (Baird *et al.*, 1988 ; Goldberg *et al.*, 1990a).

Entre ces deux populations, il existe des fibres qui présentent des propriétés intermédiaires. Le codage des mouvements de la tête par l'activité des fibres afférentes est plus ou moins synchrone selon les fibres (type phasique ou tonique) et les stimulations (forte ou faible intensité).

Le système efférent régule les décharges du système vestibulaire afférent vers le système nerveux central. En fait il peut aussi bien faciliter (Highstein, 1991) qu'inhiber la transmission de l'information (Goldberg et Fernandez, 1980; Rossi *et al.*, 1977), ont montré que la stimulation du système efférent induit une augmentation de la fréquence de décharge de l'activité au repos. Cette augmentation serait dix à vingt fois supérieure dans les neurones ayant une activité irrégulière.

Au niveau des terminaisons efférentes, se retrouvent comme neurotransmetteurs, d'une part l'acétylcholine (dont l'effet est inhibiteur) et d'autre part le CGRP (calcitonin gene related peptide). Une dernière étude avait suggéré que les deux actions opposées du système efférent vestibulaire étaient dues à l'existence de deux types distincts d'innervation efférente (Tanaka *et al.*, 1989), le système cholinergique,

inhibiteur, contactant directement les cellules ciliées de type II et le système peptidergique, facilitateur, contactant les calices des cellules ciliées de type I. Toutefois, en 1993, (Wackym *et al.*, 1993) démontrent la présence du CGRP dans les fibres efférentes contactant les cellules ciliées de type II, suggérant une organisation du système efférent plus complexe. Ce schéma d'innervation très complexe reste encore mal connu.

C. ONTOGENESE DU SYSTEME VESTIBULAIRE CHEZ LA SOURIS

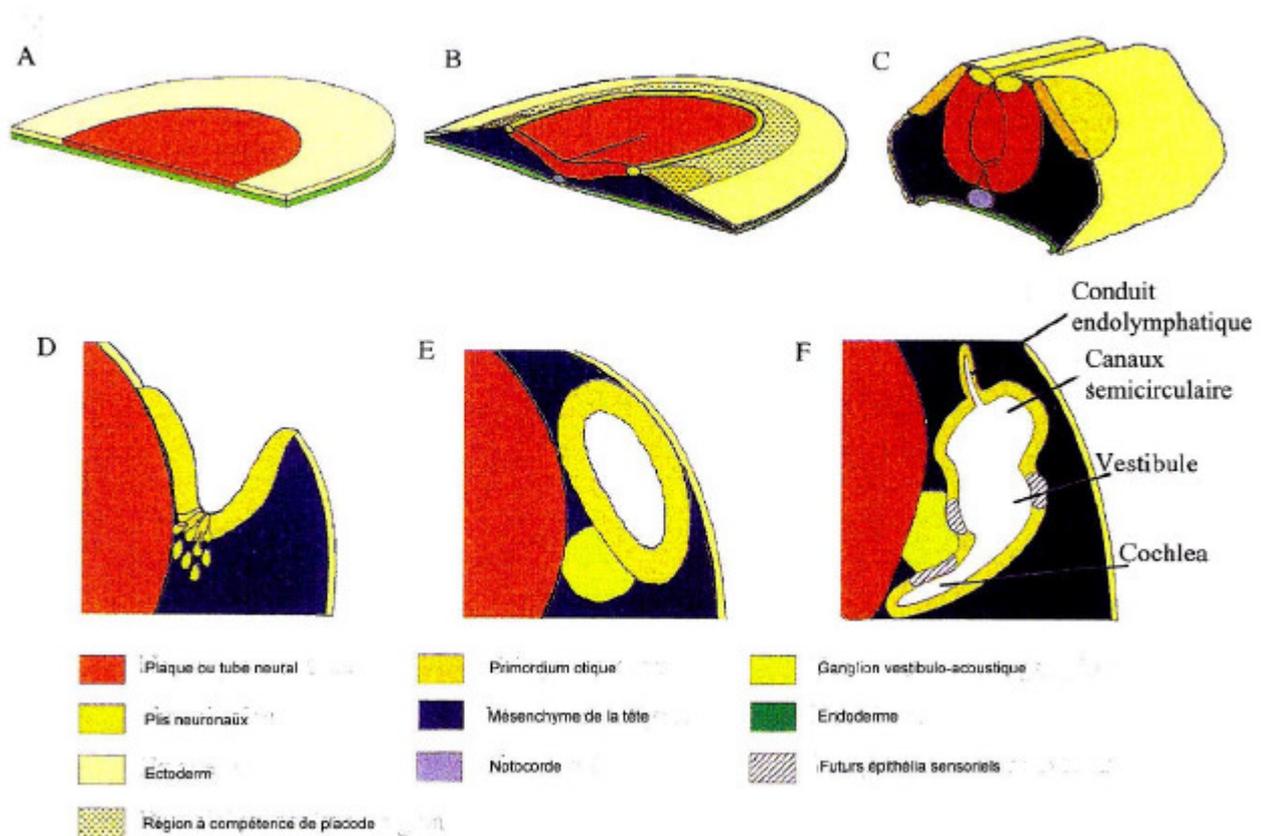


Figure 9 : Résumé du développement précoce de l'oreille interne, chez les vertébrés. (A) stade prégastrula, (B) plis rostraux avec la préplacode otique, (C) placode otique, (D) Coupe otique, (E) Vésicule otique et (F) Différenciation de l'otocyste (Torres et Giraldez, 1998).

Le développement de l'oreille interne débute à partir de la placode otique provenant de l'invagination de l'ectoderme dans la région la plus proche de la plaque neurale. Dans un premier temps, l'ectoderme apposé au tube neural va s'épaissir et

permettre l'induction de cette invagination (Khan et Marovitz, 1982). La placode otique s'invagine à E8,5 pour former dès E9, chez la souris, l'otocyste qui reste en contact avec le tube neural (Anniko M et Wikstrom, 1984 ; Marovitz *et al.*, 1977). Entre E12 et E15, par un mécanisme de mort cellulaire programmée, l'otocyste s'individualise de l'ectoderme (Marovitz *et al.*, 1977; Marovitz *et al.*, 1976). Cet otocyste est constitué de cellules épithéliales à l'origine du labyrinthe membraneux. La partie ventrale forme la cochlée tandis que la partie dorsale donne le vestibule. Après une phase de prolifération intense, l'otocyste entre dans sa phase de différenciation durant laquelle la morphogenèse des différents types cellulaires est induite. Les neurones des ganglions proviennent d'une migration précoce de l'invagination de la placode otique, avec une contribution des cellules de la crête neurale pour former les cellules de Schwann du ganglion, et apparaissent chez le rat entre E11 et E13 (Altman et Bayer, 1982). Initialement les neurones forment une même structure, le ganglion stato-acoustique qui se sépare par la suite pour former le ganglion vestibulaire (ou ganglion de Scarpa) et le ganglion cochléaire (ou ganglion de Corti). Ces différents stades de développement suivent un déroulement spatio-temporel précis avec la nécessité de signaux inducteurs provenant des tissus environnants (Torres et Giraldez, 1998) (figure 9).

1) Les cellules sensorielles

Les premières structures se mettant en place correspondent au futur labyrinthe endolymphatique chez la souris.

A E12, les canaux semi-circulaires supérieur et postérieur apparaissent ainsi que l'utricule.

A E13, le troisième canal semi-circulaire se met en place, le saccule apparaît en position ventrale par rapport à l'utricule (Anniko M. et Nordemar, 1980).

A E15, se forment les ampoules contenant les crêtes ampullaires ainsi que le canal utriculo-sacculaire.

Ainsi à E17, le canal vestibulaire membraneux a atteint sa forme mature, toutefois sa croissance et son organisation vont perdurer jusqu'à la fin du premier mois après la naissance (Dechesne C. *et al.*, 1986).

La cytodifférenciation des cellules sensorielles se déroule en cinq étapes qui se superposent plus ou moins : les mitoses terminales, la différenciation en cellules ciliées, la mise en place de leur morphologie, la mise en place de leur jonction complexe et enfin la mise en place de leur innervation. Les premières mitoses terminales débutent dès E12/13 avec un maximum à E16, et se terminent autour de la naissance. La différenciation cellulaire s'effectue en suivant un double gradient, de la face apicale vers la face basale des cellules mais aussi du sommet des crêtes ampullaires et de la striole des macules vers la périphérie des épithéliums. Cette cytodifférenciation commence à E14 par le développement des structures ciliaires et la maturation des contacts synaptiques (Mbiene *et al.*, 1984 ; Mbiene et Sans, 1986). La détermination des cellules en type I ou II commence entre E16 et E18 (Sans et Chat, 1982). Alors que cette détermination se déroule pendant la période prénatale, la maturation de leur phénotype spécifique n'a lieu que lors de la première semaine postnatale, selon le gradient orienté du centre vers la périphérie des épithéliums (Dechesne C. J. *et al.*, 1994; Desmadryl et Dechesne, 1992) (figure 10).

MATURATION DES EPITHELIUMS SENSORIELS VESTIBULAIRES

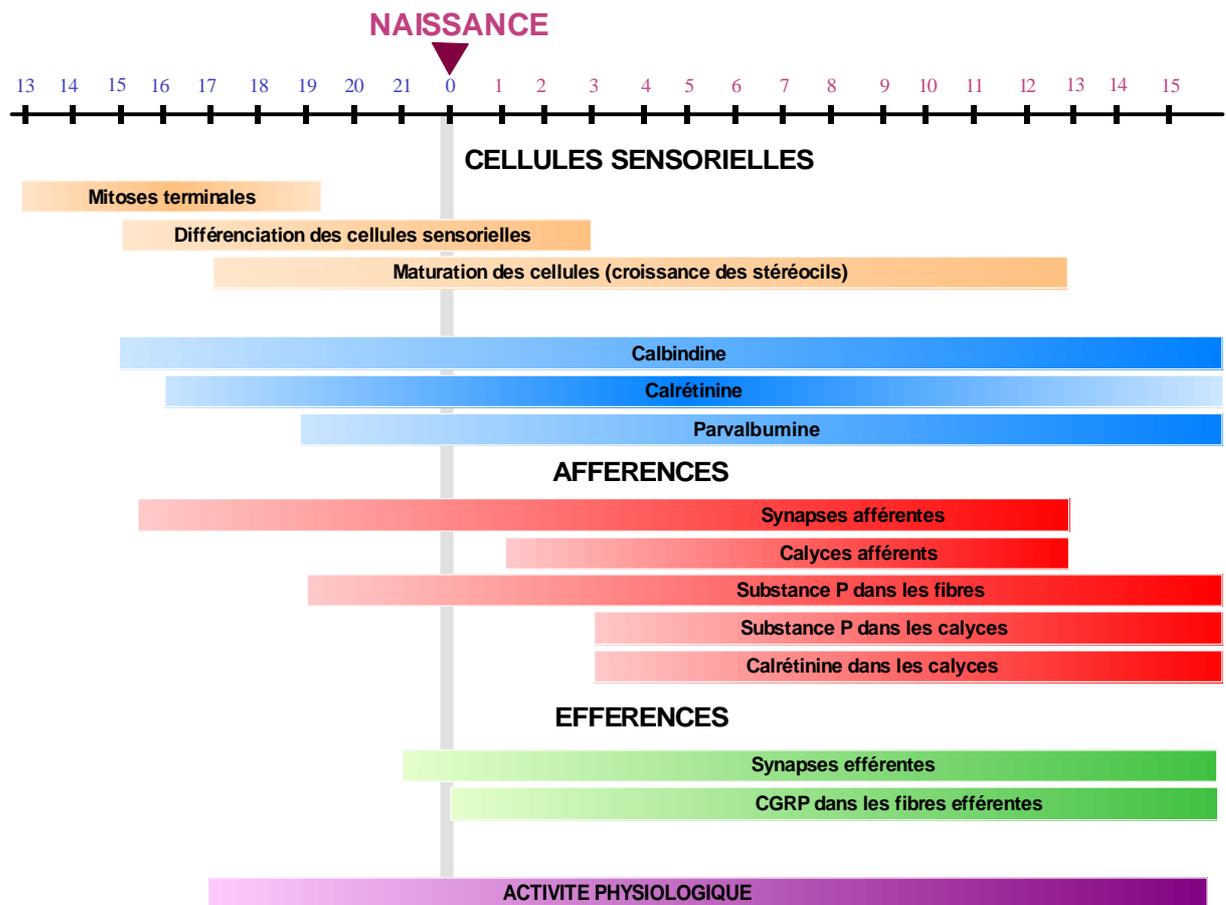


Figure 10 : Résumé schématique du développement périnatal du vestibule (Nicolas et al., 2001).

2) les cellules nerveuses

Chez la souris, les neuroblastes, à l'origine des cellules ganglionnaires ont une cytogénèse plus précoce que les cellules sensorielles, entre E11 et E13 (Ruben, 1969). La mise en place de l'afférentation nerveuse des cellules ciliées suit aussi un gradient allant du centre à la périphérie du vestibule. Les premiers stades de la synaptogénèse ont lieu avant la naissance (Anniko M. et al., 1979 ; Mbiene et al., 1988 ; Nordemar, 1983b). Cette période d'afférentation débute à E13 (Mbiene et al., 1989) et les premiers contacts synaptiques s'observent entre E14 et E16 (Anniko M. et al., 1979 ; Mbiene et al., 1988 ; Mbiene et Sans, 1986 ; Van De Water, 1988). Ces premiers contacts coïncident avec la période des mitoses terminales des cellules ciliées et cellules de soutien (Ruben, 1969 ; Sans et Chat, 1982). Entre E18 et la

naissance, les calices qui entourent les cellules ciliées de type I ne sont que partiels, les premiers calices adultes n'apparaissent qu'à P4 (Desmadryl et Dechesne, 1992 ; Nordemar, 1983b). 10 jours après la naissance, l'innervation afférente est comparable à celle de l'adulte (Dechesne C. J. *et al.*, 1987; Desmadryl et Dechesne, 1992 ; Desmadryl et Sans, 1990). La synaptogenèse passe par un stade de multi-afférentation et de multiplication du nombre de corps synaptiques dans les cellules sensorielles. La régression de cette multi-afférentation ainsi que la diminution du nombre de corps synaptiques surviennent lors de la stabilisation des synapses entre terminaisons nerveuses et cellules ciliées (Scarfone *et al.*, 1991). Lors de cette période de multi-afférentation, les contacts sont exclusivement en boutons et évoluent ensuite vers un type ou un autre d'afférentation. Même si la maturation des cellules ciliées en type I ou II est indépendante de l'innervation, les contacts synaptiques avec les fibres afférentes sont indispensables au maintien du phénotype engagé (Desmadryl et Dechesne, 1992 ; Sans et Scarfone, 1996) (figure 11).

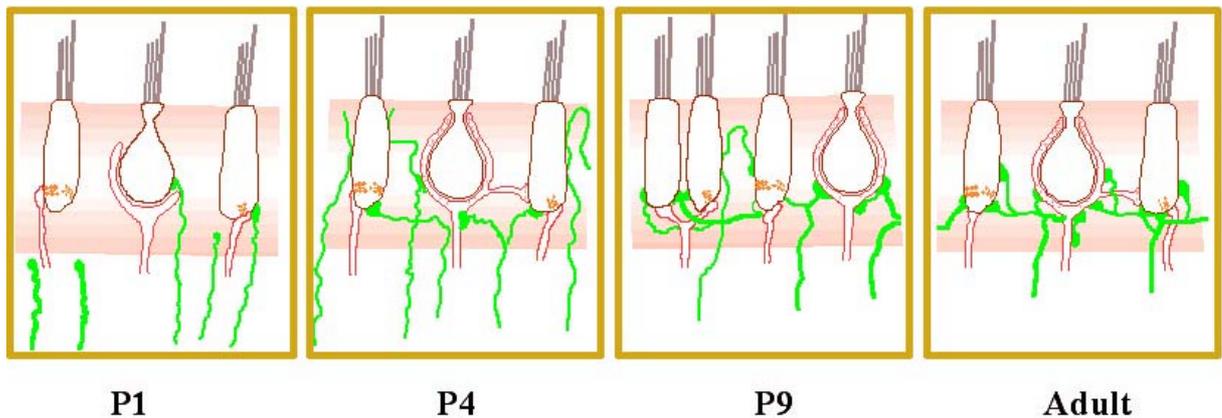


Figure 11 : schéma du développement postnatal de l'innervation afférente (rouge) et efférente (vert) des épithéliums sensoriels vestibulaires. (Dememes et al., 2001).

La myélinisation des fibres afférentes vestibulaires débute à la périphérie dès le 2^e jour postnatal chez la souris. Elle est très rapide pendant la première semaine de développement (Dechesne C. J. *et al.*, 1987). La myélinisation des corps cellulaires des neurones est plus tardive, elle commence au 9^e jour postnatal et se termine à la fin de la deuxième semaine postnatale.

La mise en place du système efférent est plus tardive et se déroule chez la souris durant la phase postnatale (Dememes et Broca, 1998; Nordemar, 1983a).

L'établissement des trois grands types de modalités d'afférentation des cellules sensorielles en fonction de leur activité apparaît au cours des 20 premiers jours postnataux. L'activité spontanée, enregistrée dans les neurones vestibulaires, apparue pendant la période périnatale présente les deux types d'activité, régulière et irrégulière, dès le 5^e jour postnatal et voit sa fréquence ainsi que le nombre de fibres ayant une activité régulière augmenter jusqu'au 20^e jour après la naissance (Curthoys, 1982 ; Desmadryl *et al.*, 1986; Desmadryl et Sans, 1990; Romand et Dauzat, 1982). Durant cette période, il existe une maturation des réponses à la dépolarisation et une évolution de la sensibilité post-synaptique (Desmadryl, 1991).

Ainsi la mise en place du système vestibulaire primaire passe par l'établissement des connexions synaptiques entre les neurones vestibulaires et les cellules sensorielles. Etant donné l'importance de l'activité électrique au niveau des neurones, il est important d'établir la composition en canaux ioniques sur le soma de ces neurones. Ceci pourra alors permettre de déterminer comment l'activité électrique régule la mise en place d'un organe fonctionnel, le système vestibulaire.

II. CANAUX IONIQUES DEPENDANTS DU POTENTIEL

Les canaux ioniques sont indispensables à la signalisation cellulaire du tissu nerveux. Ces canaux permettent la genèse et la transmission de l'activité électrique des neurones, la régulation de la libération des neurotransmetteurs, ainsi que la traduction des messages chimiques et mécaniques en message électrique.

Par la technique de l'électrophysiologie, il a pu être montré l'existence de plusieurs familles de canaux ioniques activés par le potentiel. Au sein de ces familles, des sous types de canaux ioniques ont pu être mis en évidence. Leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques sont largement étudiées et permettent de mieux comprendre le fonctionnement de la transmission neuronale et sa régulation.

Les canaux ioniques sont des protéines entièrement intégrées à la membrane, qui, à l'état ouvert, permettent la diffusion d'ions d'un côté à l'autre de la membrane, en fonction de leur gradient électrochimique. Il est donc aisé de décrire simplement ces canaux comme pouvant adopter deux états fonctionnels : ouvert, permettant le passage des ions et fermé, l'empêchant. Dans le cas des canaux ioniques activés par le potentiel, cette activation se fera par une variation du potentiel membranaire et plus généralement par un saut de potentiel.

Dans sa configuration initiale, c'est-à-dire, au repos, le canal est fermé, le passage des ions ne se fait pas. Suite à une activation, il va s'ouvrir afin de permettre aux ions de traverser la membrane. Même si le potentiel membranaire est maintenu, le canal ionique va finir par se fermer, il s'agit d'une inactivation. Lorsque le canal est inactivé, il n'a pas la possibilité de se rouvrir instantanément, un laps de temps est nécessaire afin de permettre la désinactivation, et donc que le canal retrouve un état fermé de repos.

Ces canaux ioniques activés par le potentiel sont regroupés en grandes familles en fonction des ions qui les traversent. Ainsi, il existe la famille des canaux sodiques activés par le potentiel, Na_v , la famille des canaux potassiques, K_v , et la famille des canaux calciques, Ca_v .

Depuis quelques années, des études ont été réalisées afin de déterminer la composition membranaire en canaux ioniques dépendants du potentiel des somas

des neurones vestibulaires primaires et pouvant agir et réguler l'activité électrique de ceux-ci.

1) CANAUX SODIQUES

(a) Généralités

Les canaux sodiques dépendants du potentiel jouent un rôle fonctionnel important dans la genèse de l'excitabilité électrique dans de nombreuses espèces de vertébrés mais aussi d'invertébrés. En effet ces canaux sont responsables de la phase montante du potentiel d'action dans les cellules animales. Les canaux sodiques furent les premiers enregistrés par (Hodgkin et Huxley, 1952). Ils ont démontré une activation dépendante du potentiel, une rapide inactivation et une conductance ionique sélective pour ce canal.

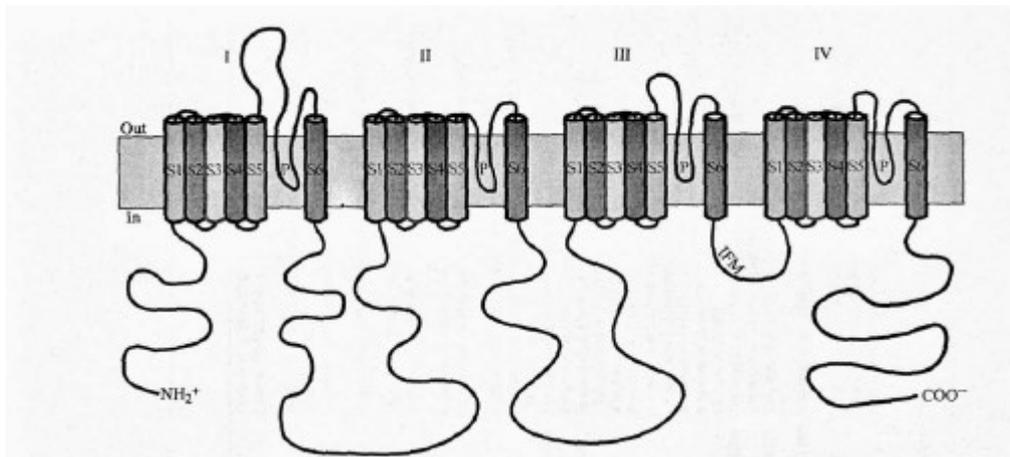


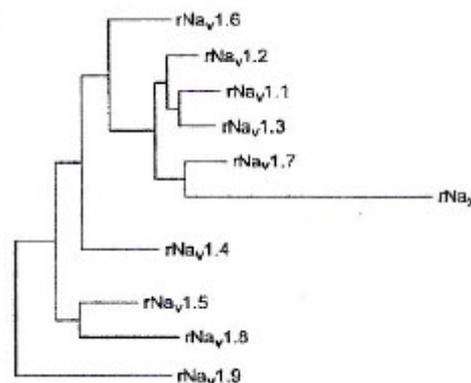
Figure 12 : Représentation schématique de la sous-unité α des canaux sodiques dépendants du potentiel. (IFM, fast inactivating particle) (Goldin, 2002 ; Goldin et al., 2000)

Nomenclature et membres

Malgré la similitude des fonctions des canaux sodiques dépendants du potentiel, ils ont été nommés de différentes manières, ce qui laisse apparaître une grande multitude de canaux différents alors que cette famille ne compte que neuf membres. En fait un grand nombre d'entre eux avait de multiples synonymes. Afin d'éliminer

toute confusion, en 2000 a été proposé une nomenclature standardisée pour ces canaux (Goldin *et al.*, 2000). Cette nomenclature est comparable à celle des canaux potassiques et des canaux calciques dépendants du potentiel. Le nom est composé du symbole chimique de l'ion les traversant (Na) avec en indice le principal régulateur physiologique (voltage) donc Na_v . Ensuite se trouve un chiffre indiquant la sous famille de gène, puis séparé par un point un chiffre indiquant l'isoforme spécifique du canal ($\text{Na}_v1.1$). Pour identifier les sous-unités issues de l'épissage alternatif des membres de la famille, une lettre minuscule suit les chiffres ($\text{Na}_v1.1a$).

Ainsi neuf isoformes des canaux sodiques dépendants du potentiel, ont été identifiées et fonctionnellement exprimées chez les mammifères (figure 13).



*Figure 13 : Les différentes sous-unités α des canaux sodiques des mammifères. Relation phylogénétique entre les différentes sous-unités α des canaux sodiques dépendants du potentiel (Goldin *et al.*, 2000). Ici chez le rat comme il est indiqué par le *r* initial. Na_x est une sous unité qui a été clonée chez le rat la souris et l'humain, mais il n'a pas encore été démontré une expression fonctionnelle de cette sous-unité.*

Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques

Les canaux sodiques dépendants du potentiel sont hautement sélectifs au sodium. Ils sont sensibles aux variations de potentiel de la membrane. Grâce à l'électrophysiologie en mode voltage imposé, leur caractérisation a été possible. Ils s'activent à des potentiels situés aux environs de -50 mV, leur pic d'activation se situe entre -30 et -20 mV. Le courant généré s'inverse vers + 50mV.

Leur fonctionnement a été caractérisé dans les neurones. Ils s'activent rapidement (quelques millisecondes), restent ouverts une milliseconde, et s'inactivent

rapidement. Leur dépolarisation ne provoque pas de nouvelle ouverture tant que le potentiel de membrane ne retrouve pas une valeur négative proche du seuil.

En 1967, il a été montré que la tétrodotoxine permettait le blocage des canaux sodiques dépendants du potentiel, avec une forte affinité (Narahashi *et al.*, 1967). Par la suite, il a été montré que ces canaux n'étaient pas tous sensibles à la TTX avec la même affinité. En effet certains membres de la famille des canaux sodiques ont été identifiés comme résistants à la TTX car des concentrations importantes étaient nécessaires pour les bloquer, il a été montré que la TTX et la Saxitoxin agissaient comme des bouchons au niveau du filtre de sélectivité situé à l'extérieur du pore (Hille, 1975).

(b) Au niveau du ganglion vestibulaire primaire

Une étude fonctionnelle réalisée, en 1997, a permis l'étude des canaux sodiques présents à la membrane des neurones vestibulaires primaires issus de souris âgées de 3 à 6 jours (Chabbert *et al.*, 1997). Cette étude a été réalisée grâce à la technique du patch clamp en mode voltage imposé, sur des cultures de neurones fraîchement dissociés. Le milieu extracellulaire contenait du tétraéthylammonium afin de bloquer les conductances potassiques et était dépourvu de calcium afin de bloquer les conductances calciques. Dans ces conditions expérimentales, un courant sodique a été identifié. Ce courant s'active pour des potentiels de -60 mV et s'inverse pour des potentiels de +50 mV. Le pic de courant est obtenu pour des dépolarisations de -30 mV. Ce courant est bloqué en absence de sodium dans le milieu extracellulaire mais aussi en présence de 100 nM de TTX. Bien que les ganglions vestibulaires soient composés de deux types de neurones, une seule conductance sodique a pu être identifiée. Ainsi, il est possible de conclure que les courants sodiques ne sont pas impliqués dans les différences de propriétés de décharges observées. Cette étude étant antérieure aux études d'identification des différentes isoformes des canaux sodiques, elle ne permet pas de conclure sur l'isoforme présente à la membrane du corps cellulaire des neurones vestibulaires primaires (figure 14).

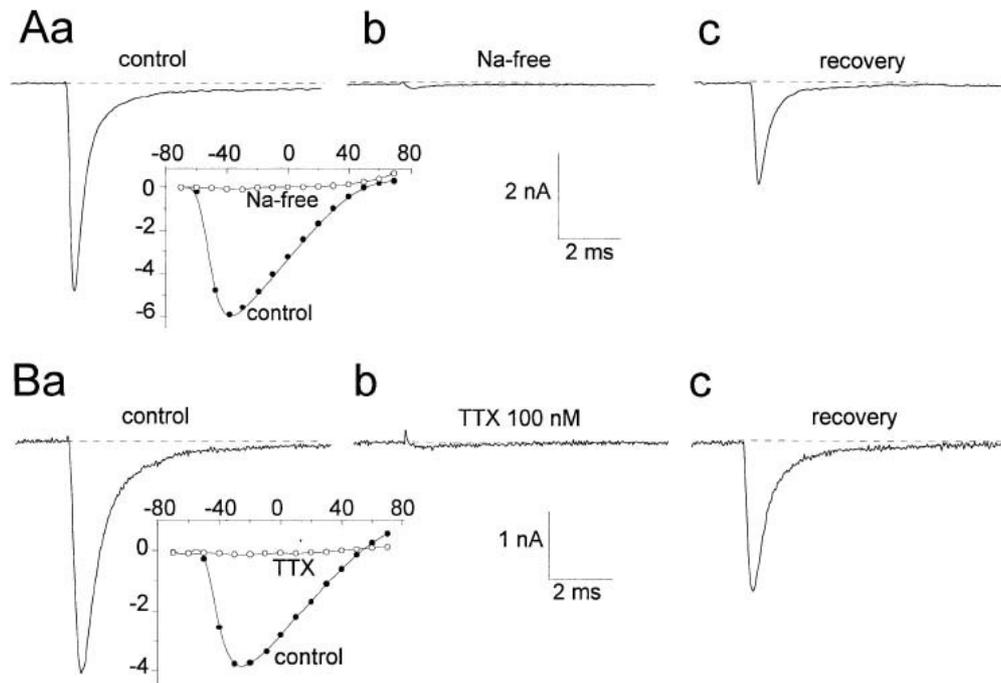


Figure 14 : Propriétés cinétiques du courant sodique enregistré dans les neurones vestibulaires. En A, mise en évidence que ce courant est sélectif et dépendant du Na^+ extracellulaire. En B, mise en évidence que ce courant est généré par une isoforme sensible à la TTX (Chabbert et al., 1997).

2) CANAUX POTASSIQUES

(a) Les grandes familles

Les canaux potassiques participent à un grand nombre d'importantes fonctions cellulaires, comme le maintien du potentiel de membrane, le contrôle de l'excitabilité électrique de la cellule et le couplage excitation/réponse. Les canaux potassiques régulent les voies électriques neuronales et cardiaques, la libération des neurotransmetteurs, la contraction musculaire, la sécrétion d'hormones et la sécrétion de fluides. Dans les cellules excitables, ces canaux participent à la modulation des signaux de transduction. Ceci ne représente que quelques fonctions physiologiques de ces canaux. Les différents types de canaux potassiques peuvent être activés par différents facteurs : le potentiel de membrane, la liaison de ligands, ou par les deux types de signaux.

Les canaux potassiques sont des multimères, dont les sous-unités α forment le pore auxquelles peut s'ajouter une sous-unité auxiliaire β qui a surtout un rôle dans

la régulation de l'activité du canal. En effet, 4 sous-unités α sont nécessaires pour former un canal qui sera homomérique ou hétéromérique. La première classification de ces canaux s'est faite par rapport à la structure de la sous-unité α . En effet il existe une grande diversité structurale de cette sous-unité. La figure 15 ci-dessous présente une des sous familles des sous-unités α de cette superfamille. Il existe au moins cinq autres sous familles qui ne sont pas illustrées ici.

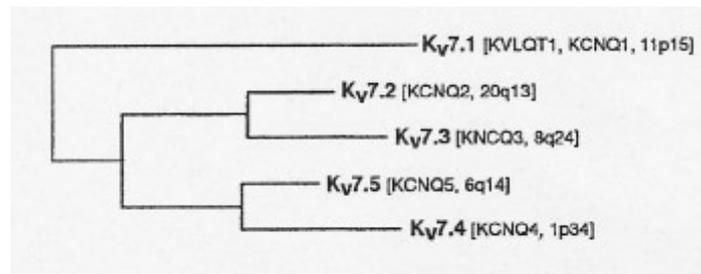


Figure 15 : Arbre phylogénétique des différentes sous unités α des canaux potassiques et la localisation chromosomique du gène (Gutman et al., 2003)

Le développement de la biologie moléculaire a permis le clonage des gènes codant pour les canaux potassiques et l'étude des propriétés biophysiques de ces canaux dans les systèmes d'expression. Ainsi il a été démontré que l'expression de ces canaux conduisait à l'enregistrement de quatre types de courants potassiques présentant des caractéristiques propres :

- En 1980, un courant de type M a été décrit dans les neurones des ganglions sympathiques de grenouille (Brown et Adams, 1980). Il régule l'excitabilité neuronale en déterminant le seuil d'excitation et les propriétés de décharge des neurones. Il est caractérisé par de lentes cinétiques d'activation et de désactivation ainsi qu'une absence d'inactivation. Il s'appelle courant de type M car il est modulé par application d'agoniste muscarinique. Son inhibition par les agonistes muscariniques entraîne une augmentation de la fréquence des potentiels d'action des neurones. Dans les années 2000, il a été montré que l'expression des sous-unités K_V7 , dans des systèmes d'expression hétérologue pouvait produire des canaux fonctionnels aux caractéristiques proches du courant de type M. (Lerche et al., 2000 ; Schroeder et al., 2000).
- Plus tard, des études électrophysiologiques ont permis de montrer l'existence d'autres courants potassiques avec des propriétés électrophysiologiques distinctes.

Une composante est dite I_H , elle est activée par des sauts de potentiels hyperpolarisants et est bloquée par 1 mM de chlorure de Césium (Galligan *et al.*, 1990).

- Les courants de type A, I_A , présentent une activation et une inactivation rapides avec une constante de temps de l'ordre de la milliseconde. Ces courants sont inactivés lorsque le potentiel de membrane est dépolarisé, vers -50 mV.

- Les courants I_K , provenant des canaux à rectification retardée, s'activent avec un délai par rapport à la dépolarisation de la membrane et montrent une inactivation lente avec des constantes de temps de l'ordre de la seconde (Everill *et al.*, 1998; Locke et Nerbonne, 1997). Ainsi l'expression des gènes codant pour les sous-unités α de la famille K_v , a permis de montrer que les propriétés biophysiques ressemblaient aux courants I_A et I_K trouvés dans les cellules (Stuhmer *et al.*, 1989). L'expression de $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v2.1$, $K_v2.2$, $K_v3.1$ et $K_v3.2$ permet d'enregistrer des courants qui ressemblent au courant classique I_K alors que $K_v1.4$, $K_v3.4$, $K_v4.1$, $K_v4.2$, et $K_v4.3$ correspondent au courant de type I_A rapidement inactivé

D'un point de vue pharmacologique, ces canaux sont sensibles plus ou moins spécifiquement à de nombreuses toxines issues de venins de nombreuses espèces (scorpions, araignées, serpents, anémones de mer et escargots de mer). Toutefois, ils peuvent être plus simplement classés en deux populations, les canaux sensibles au tétraéthylammonium et les canaux sensibles à la 4-aminopyridine.

(b) Au niveau du ganglion vestibulaire primaire

Une étude fonctionnelle de la caractérisation des conductances somatiques des neurones vestibulaires primaires a été réalisée (Chabbert *et al.*, 2001a ; Chabbert *et al.*, 2001b). Cette étude a permis d'identifier quatre conductances potassiques ayant des propriétés pharmacologiques différentes. La première décrite est appelée I_{TEA} par les auteurs car elle est insensible à la 4-amino pyridine (4AP). Elle ressemble à I_K . Cette conductance présente un haut seuil d'activation (entre -30 et -40 mV), et une durée d'activation 10 fois plus lente que les courants sensibles à la 4AP. Son potentiel de demi-activation est de -15 mV. Cette conductance a un rôle dans la limitation du phénomène de décharge dans ces neurones en maintenant le potentiel

de membrane à une valeur proche du potentiel d'équilibre des ions potassiques. Cette conductance présente des caractéristiques identiques à celle d'une conductance décrite dans le ganglion de la racine dorsale (DRG) adulte.

La deuxième conductance potassique identifiée est appelée I_{DTX} car elle est sensible à l' α -Dendrotoxine. Ce courant présente des caractéristiques similaires à I_D décrit dans la littérature. Il présente un temps de course d'activation et de désactivation rapides, avec une activation dépendante du potentiel et une inactivation partielle. Seules trois sous-unités ont été décrites dans la littérature comme étant sensibles à l' α -Dendrotoxine, $K_v1.1$, $K_v1.2$ et $K_v1.6$, or sur ces trois sous-unités, une seule est insensible au TEA, il s'agit de $K_v1.2$. Les auteurs ont donc conclu que cette sous-unité entrerait dans la composition du canal potassique, sans toutefois pouvoir exclure les autres sous-unités sensibles à l' α -Dendrotoxine.

Le troisième courant potassique caractérisé est appelé I_{BDS} et présente de nombreuses propriétés identiques à I_A . BDS (blood depressing substance) est un peptide issu du venin d'anémone de mer et bloque les courants potassiques ayant une rapide activation et inactivation (Diochot *et al.*, 1998). Ce courant présent dans les neurones vestibulaires s'active et s'inactive rapidement, il est à bas seuil d'activation et a la propriété d'avoir une inactivation rapide et complète en fonction du temps. De plus le BDS est sélectif de la forme $K_v4.3$ des canaux potassiques et la sensibilité des neurones vestibulaires à cette toxine, permet d'envisager que cette sous-unité forme une partie du canal potassique.

Ces trois conductances potassiques ont été trouvées dans tous les neurones vestibulaires enregistrés avec des variations dans leur amplitude relative, leur densité et leur distribution. I_{TEA} est prédominant car il constitue 56% du courant global. Il est intéressant de noter que les auteurs n'ont pas trouvé de corrélation entre la taille ou la capacitance des neurones enregistrés et la distribution relative de chaque courant (figure 16).

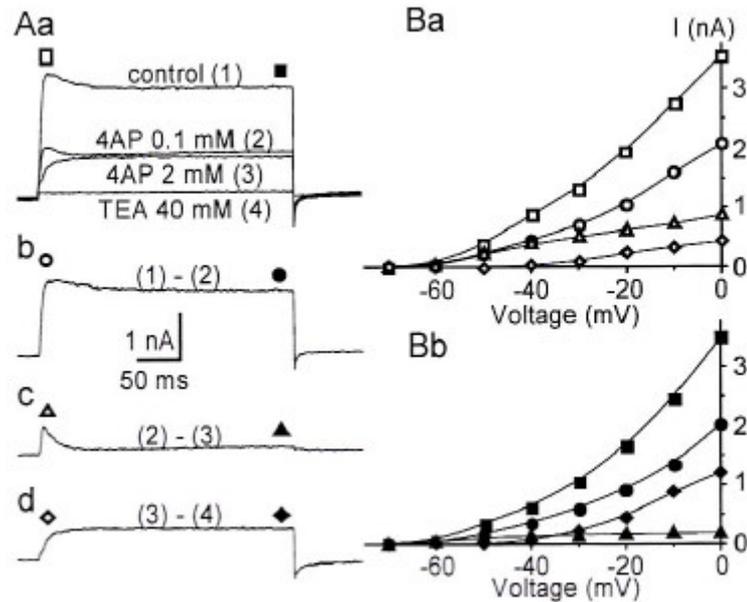


Figure 16 : les différentes conductances potassiques décrites dans les neurones vestibulaires primaires. En A les traces enregistrées en condition contrôle et en présence de 4AP 0,1mM et 2mM et de TEA 40mM. En b, c et d, soustraction des traces permettant d'identifier des courants. En B amplitude de chaque conductance en fonction du potentiel (Chabbert et al., 2001a)

La dernière conductance décrite dans ces neurones est I_h , conductance dite de la rectification retardée. Elle a une activation lente et dépendante du potentiel et une absence d'inactivation au cours du temps. Elle est sensible au chlorure de Césium et au ZD7288. Le I_h décrit dans les neurones vestibulaires primaires présente des caractéristiques qui diffèrent légèrement de ce qui est décrit dans d'autres modèles cellulaires. Il est activé pour un potentiel de membrane environ 20 mV plus hyperpolarisé que le potentiel de membrane dans ces cellules. Il n'intervient pas au potentiel de repos du neurone. Alors que dans de nombreux modèles, ce courant s'active en 1 seconde, dans les neurones vestibulaires, son activation peut prendre quelques secondes. Les auteurs envisagent un rôle de cette conductance dans la protection contre les hyperpolarisations excessives des neurones (figure 17).

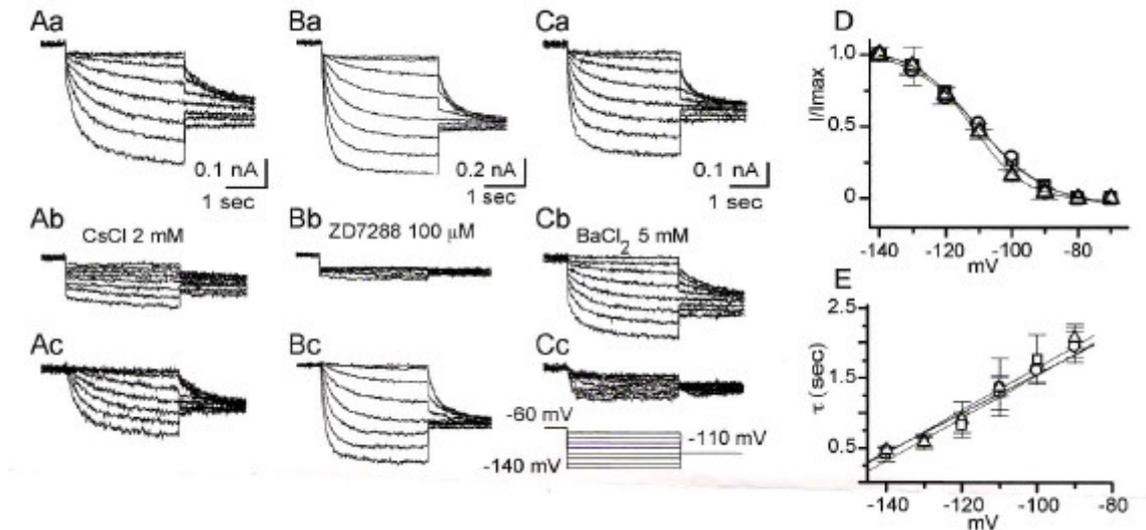


Figure 17 : Caractérisation du courant I_h obtenu dans les neurones vestibulaires primaires. Mise en évidence de la sensibilité au césium et au ZD7288 (Chabbert *et al.*, 2001b)

3) CANAUX CALCIQUES

(a) Généralités

Rôle des canaux calciques

Les canaux calciques activés par le potentiel permettent le passage d'un influx calcique en réponse à une dépolarisation de la membrane, influx qui régulent les processus intracellulaires comme la contraction, la sécrétion, la neurotransmission (Luebke *et al.*, 1993; Mccobb et Beam, 1991) et l'expression génique (Murphy *et al.*, 1991). Ces canaux ioniques sont aussi impliqués dans la régulation de la mort neuronale, la neuritogenèse et la synaptogenèse (Mattson et Barger, 1993 ; Spitzer, 1994).

Leur identification a fait suite aux travaux de Hodgkin et Huxley (1952). Fatt et Katz en 1953, ont montré que dans les fibres musculaires de crabe, l'excitabilité ne provenait pas de la présence de sodium dans le milieu extracellulaire (Fatt et Katz, 1953). Des travaux réalisés par la suite ont permis de démontrer que cette excitabilité était due à une augmentation de perméabilité membranaire pour les ions calcium.

De nombreuses études ont alors décrit des conductances calciques d'abord chez les invertébrés puis chez les vertébrés. Elles ont été décrites en premier lieu au niveau de préparations musculaires puis dans les neurones et les cellules neuroendocrines (Reuter, 1979) (Hagiwara et Byerly, 1981) (Llinas R. R., 1988), (Kostyuk, 1990). Très rapidement, il est apparu que ces conductances présentait une grande hétérogénéité dans leur perméabilité sélective aux ions (Barium/Calcium) mais aussi dans leurs cinétiques. De même plusieurs conductances pouvaient se retrouver au niveau d'un même modèle cellulaire (Kostyuk, 1990).

En 1984, deux types de conductances ont été mises en évidence : les courants calciques à haut seuil d'activation et les courants calciques à bas seuil d'activation (Carbone et Lux, 1984).

Composition et différentes sous-unités

Grâce à la purification de la sous-unité α_1S (pour squelettique), en 1987, la structure des canaux calciques a pu être identifiée (Tanabe *et al.*, 1987). Il a été montré que cette protéine avait une composition en acides aminés qui présentait 30% d'homologie avec la sous-unité α des canaux sodiques activés par le potentiel. Cette protéine est composée de quatre domaines homologues (I-IV) reliés entre eux par trois boucles intracellulaires. Chaque domaine est composé de six segments transmembranaires (S1 à S6) et le segment S4 comporte de nombreux acides aminés chargés positivement alternés avec des acides aminés hydrophobes formant ainsi le site de sensibilité au potentiel. Comme pour les canaux sodiques, la région entre S5 et S6 de chaque domaine forme le pore du canal. En effet, la sous-unité α est la sous-unité formant le canal membranaire. Par la suite, le clonage des autres sous-unités α_1 des autres canaux calciques a montré la même structure.

Par la suite des études de purification ont aussi mis en évidence l'existence de sous-unités régulatrices de la sous-unité α_1 : β , α_2 - δ et γ . Ces sous-unités modifient le comportement biophysique de la sous-unité α_1 et apparaissent comme importantes dans l'adressage de celle-ci à la membrane.

Nomenclature et membres

Les sous-unités α des mammifères sont codées par au moins dix gènes distincts. Historiquement, des noms variés ont été donnés aux produits des gènes

correspondants, donnant une nomenclature confuse et peu pratique. En 1994, il a été proposé une nomenclature unifiée basée sur la dénomination claire de la sous-unité α_1 des canaux. Elles sont référencées comme α_{1S} pour l'isoforme originale dans le muscle squelettique et de α_{1A} à α_{1E} pour celles découvertes par la suite (Birnbaumer *et al.*, 1994). Depuis quatre nouvelles sous-unités ont été découvertes et nommées de α_{1F} à α_{1I} .

Les courants calciques enregistrés dans différents types cellulaires ont diverses propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques. Ils ont été référencés selon une nomenclature alphabétique précise : Courant calcique de type L, courant calcique de type N, de type P/Q, de type R et enfin courant calcique de type T. Ainsi si de nouveaux gènes sont clonés pour la sous-unité α_1 , il devient évident que ces deux nomenclatures vont se chevaucher pouvant générer une confusion.

De plus la nomenclature alphabétique actuelle ne révèle pas les relations structurales entre ces sous-unités α_1 qui peuvent être classées en trois familles :

- 1^e famille : α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} et α_{1F}
- 2^e famille : α_{1A} , α_{1B} et α_{1E}
- 3^e famille : α_{1G} , α_{1H} et α_{1I}

Les séquences en acides aminés à l'intérieur d'une famille sont identiques à plus de 70% et sont identiques à moins de 40% entre les familles. Ainsi il apparaît que cette division en famille est phylogénétiquement ancienne.

En 2000, Ertel et coll ont proposé une nouvelle nomenclature des canaux calciques dépendants du potentiel qui est plus systématique et qui reprend la nomenclature des canaux potassiques (Ertel *et al.*, 2000). En effet, comme les canaux potassiques, ils sont renommés en fonction du symbole chimique de l'ion qui traverse le pore (Ca) avec le principal régulateur physiologique indiqué en indice (Ca_v). L'identifiant numérique qui suit correspond à la famille de gène de la sous-unité α_1 (de 1 à 3) et à l'ordre de découverte du gène dans la famille (de 1 à n). Les épissages alternatifs sont désignés par une lettre minuscule accolée aux identifiants numériques (exemple $Ca_v1.2a$) comme illustré figure 18.

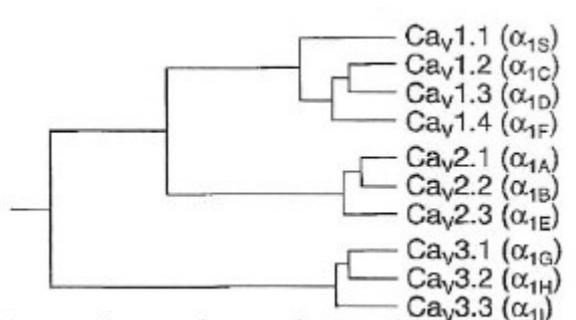


Figure 18 : Arbre phylogénétique des sous-unités α_1 des canaux calciques dépendants du potentiel (Ertel et al., 2000).

(a) Les grandes familles des courants calciques et leur pharmacologie (figure 19)

TYPE	NOM	NOM DU GENE	LOCALISATION CHROMOSOME HUMAIN	EXPRESSION TISSULAIRE PRINCIPALE	PHARMACOLOGIE
L	Ca _v 1.1	CACNA1S	1q31-32	Muscle squelettique	dihydropyridines
	Ca _v 1.2	CACNA1C	12p13.3	Cœur, cerveau, gl pituitaire	
	Ca _v 1.3	CACNA1D	3p14.3	Cerveau, pancréas, rein, ovaire, cochlée	
	Ca _v 1.4	CACNA1F	Xp11.23	rétine	
P/Q	Ca _v 2.1	CACNA1A	19p13	Cerveau, cochlée, gl pituitaire	ω -agatoxine IVA
N	Ca _v 2.2	CACNA1B	9q34	Cerveau, SN	ω -conotoxine GVIA
R	Ca _v 2.3	CACNA1E	1q25-31	Cerveau, cochlée, rétine, cœur, gl pituitaire	SNX-482
T	Ca _v 3.1	CACNA1G	17q22	Cerveau, SN	Nickel, mibefradil
	Ca _v 3.2	CACNA1H	16p13.3	Cerveau, cœur, rein, foie	
	Ca _v 3.3	CACNA1I	22q12.3-13.2	Cerveau	

Figure 19 : Les différentes sous-unités α_1 des canaux calciques dépendants du potentiel (d'après (Ertel et al., 2000))

(i) Les courants calciques de type L (HVA)

Caractéristiques des courants

Ces courants s'activent pour des potentiels dépolarisés, à partir de -10 mV, et présentent une cinétique d'inactivation très lente en présence de barium, ainsi qu'une large conductance unitaire. Leur cinétique de déactivation est rapide.

Une des caractéristiques des courants calciques de type L est leur activation pour des potentiels de membrane très peu négatifs. Ces canaux s'activent pour des potentiels de -10 mV environ et cette activation reste dans une gamme de potentiels positifs. De plus ces canaux ont des cinétiques d'activation et de déactivation rapides. Par contre les cinétiques d'inactivation sont très lentes et dépendantes du calcium, cette cinétique est encore plus lente en présence de barium. De plus la demi inactivation se situe pour des potentiels positifs. Ces canaux ont une conductance globale grande. Il est aussi important de noter que l'amplitude du courant double si l'on substitue le calcium à du barium (Hess, 1990).

Pharmacologie

Ces canaux présentent une très grande sensibilité aux dihydropyridines, telles que le BayK 8644 qui est un agoniste, c'est-à-dire qu'il augmente l'amplitude du courant entrant ou la nimodipine, la nifédipine, l'isradipine, la nicardipine qui elles sont des inhibiteurs du courant calcique de type L de manière spécifique.

(ii) Les courants calciques de type N, P/Q et R (HVA)

Caractéristiques des courants

Lors de la classification de (Carbone et Lux, 1984), ces courants faisaient parties de la famille des courants calciques à haut seuil d'activation. Les premiers à avoir été identifiés furent les courants calciques de type N (pour neither T nor L). Ces canaux s'activent pour des potentiels plus faibles (-20 mV) que les courants de type L. Leur cinétique d'inactivation se situe entre celle des courants de type L et celle des courants de type T. De la même manière, leur demi-inactivation à l'état stable se

situé à des potentiels intermédiaires. Ils s'inactivent rapidement et totalement lors d'une forte dépolarisation (Hess, 1990).

Les courants de type P/Q ont été identifiés par la suite, et présentent les mêmes caractéristiques que les courants de type N. Sauf pour la cinétique d'inactivation qui est lente pour les courants de type P et intermédiaire, entre celle des courants de type N et celle des courants de type P, pour les courants de type Q.

Les courants de type R, les derniers à avoir été identifiés, présentent les mêmes caractéristiques que les courants de cette famille, et ont des cinétiques d'inactivation très rapides (situées entre celle des courants de type T et celle des courants de type N) (Randall et Tsien, 1995).

Pharmacologie

Cette famille de courants a été identifiée par son insensibilité aux dihydropyridines (DHP), elle a été alors séparée de la famille des courants de type L. En fait ils sont sensibles à des toxines extraites de venins. En effet, les courants calciques de type N sont sensibles de façon spécifique à l' ω -Conotoxine-GVIA. Les courants de type P/Q sont sensibles à l' ω -Agatoxine-IVA de façon spécifique, mais à des concentrations différentes. En effet, les courants calciques de type P sont beaucoup plus sensibles que les courants de type Q, donc l'étude des courants de type P nécessite des concentrations plus faibles en toxines (Randall et Tsien, 1995).

Les courants de type R ont été appelés ainsi car ils semblaient résistants à toute drogue. Or récemment, une étude a montré qu'une partie des courants de type R est bloquée par le SNX-482 (Newcomb *et al.*, 1998).

(iii) Les courants calciques de type T (LVA)

Caractéristiques des courants

Une des caractéristiques des courants calciques de type T est leur activation pour des potentiels de membrane très négatifs ainsi qu'une forte inactivation à l'état stable pour ces mêmes potentiels. Ces canaux s'activent pour des potentiels de -70 mV environ et présentent un potentiel de demi-activation de -50 mV. Ils sont complètement inactivés pour des potentiels de -50 mV et présentent un potentiel de demi-inactivation de -80 mV. De plus, ces canaux ont des cinétiques d'activation et

de désactivation lentes. La cinétique d'activation est très dépendante du potentiel, ce qui explique que le pic de courant devienne de plus en plus rapide en fonction du temps et que les tracés des courants pendant les incréments se croisent, ce qui n'est pas le cas avec les autres types de courants calciques. Par contre les cinétiques d'inactivation et de réactivation sont très variables, selon les tissus étudiés. Les cinétiques d'inactivation sont plutôt lentes et décrites par une fonction monoexponentielle. La réactivation des canaux calciques de type T est aussi très variable, au point que dans la bibliographie elle est décrite soit par une fonction monoexponentielle (Carbone et Lux, 1987) soit par une double exponentielle (Bossu et Feltz, 1986). Il est aussi important de noter que l'amplitude du courant n'augmente pas si l'on substitue le calcium à du barium (Carbone et Lux, 1987). Tout ceci est illustré dans la figure ci-dessous.

Cell Type	Charge Carrier	Inactivation				Activation			Reference
		$V_{1/2}^a$	k^b	τ_h^c	$\tau_{recovery}^c$	$V_{1/2}^2$	k^b	τ_m^c	
Isolated hippocampal L-M cells	2 Ca	-94	6.3	25-10	~90 ms/-100 mV	-47	6	ttp	(35)
Isolated rat VB	3 Ca	-81	4.0	130-30	250 ms/-100mV	-57	6	15-2	(51, 52)
Isolated rat nRt	3 Ca	-80	5.3	100-80	500ms/-100mV	-50	7	11-3	(52)
Isolated rat dLGN	5 Ca	-64	7.8	70-20	750ms/-98mV	-45	6	ttp	(43)
Cat and rat dLGN in slice	1 Ca	-87	3.9	100-25	~300ms/-95mV	-60	2		(24)
Rat spinal dorsal horn in slice	2 Ba	-86	8.0	80-10		-45	7		(86)
Isolated rat basal forebrain	2.5 Ca	-49	3.9	82-16		-40	4.8	ttp	(2)
Isolated rat lateral habenula	3 Ca	-81	4.4	150, 50-30 ^d	510ms/-90mV	-58	3.4	8-2	(50)
Isolated rat dorsal horn neurons	5 Ca	-82	3.7	43-16		-50	6		(49)
Isolated rat neostriatum	5 Ca	-88	6.1		288ms/-100mV	-53	6	ttp	(48)
Isolated rat Purkinje cells	5 Ba	-93	8.2	100-25		-46	9		(84)
Xenopus neurons in culture	2 Ca	-79	6.9	55-20		-49	6	ttp	(40)
Neuroblastoma	50 Ba	-51	4.0	400-20	~150ms/-80mV	-20	11	8-2	(110)
GH3 cells	10 Ca	-71		100-20	250, 1000ms ^d /-100mV	-33	7	10-2	(44)
Chick drg	10 Ca	-78	5.0	50-20		-51	7	ttp	(32)

Charge carrier concentrations are in n-M; ^a: half-activation or inactivation voltage; ^b: slope of activation/inactivation curve, mV/efold; ^c: all values for τ (time constant) in ms. $\tau_{recovery}$ is the time constant for recovery at the indicated potential; ^d: Two exponential components; ttp: time to peak is voltage dependent.

Figure 20 : Cinétiques d'activation et d'inactivation des canaux calciques de type T en fonction de leur localisation tissulaire (Huguenard, 1996).

Pharmacologie

Il n'existe aucune pharmacologie sélective et spécifique de ces canaux. Certains bloqueurs agissent sur ces canaux mais inhibent aussi d'autres canaux ioniques. Les canaux calciques de type T sont bloqués par des ions divalents comme le nickel ou le cadmium. La concentration inhibant 50% du courant (IC_{50}) dépend de la sous-unité α_1 qui compose le canal. En effet, ces sous-unités n'ont pas toutes la même sensibilité. De plus en fonction du tissu, cette IC_{50} pourra varier aussi, il est

généralement admis que l' IC_{50} du nickel varie entre 30 et 780 μM et l' IC_{50} pour le cadmium entre 15 et 650 μM (Huguenard, 1996). Le mibéfradil inhibe aussi les courants calciques de type T avec une IC_{50} variant de 0.1 à 5 μM . Toutefois ce composé interagit aussi avec d'autres conductances ioniques, comme certains canaux chlores ou potassiques. L'amiloride est aussi un composé pharmacologique utilisé pour inhiber les courants calciques de type T. Alors que les canaux calciques de type N, P/Q peuvent être inhibés sélectivement par des toxines issues de venins d'insectes, ce n'est pas le cas pour les canaux calciques de type T. En 1998, une toxine extraite de venin de scorpion a été proposée car elle apparaissait comme spécifique, la kurtoxine (Chuang *et al.*, 1998). Par la suite, des études ont montré qu'elle avait aussi des effets sur d'autres conductances (Sidach et Mintz, 2002)

(b) Au niveau du ganglion vestibulaire primaire

Après l'étude des conductances sodiques et potassiques présentes sur le soma des neurones vestibulaires de souris, Desmadryl et coll ont recherché la présence de courants calciques dépendants du potentiel dans les neurones vestibulaires primaires de souris à P3, en utilisant la technique du patch clamp sur cellule entière (Desmadryl *et al.*, 1997). Ils ont mis en évidence la présence de courants calciques à haut seuil d'activation et de courants calciques à bas seuil d'activation. Toutefois il a été montré que la présence des courants calciques à bas seuil d'activation était restreinte aux neurones de gros diamètre.

Les neurones de petit et moyen diamètre n'expriment que des courants calciques haut seuil. Ceci a permis la caractérisation complète des courants calciques haut seuil dans les neurones vestibulaires primaires.

Une courbe courant/potentiel a été réalisée en présence de calcium et de barium et montre qu'en présence de barium celle-ci est décalée vers des potentiels plus hyperpolarisés et que les courants sont de plus grande amplitude (cette amplitude double). L'étude des courants calciques à haut seuil d'activation a été réalisée en remplaçant le calcium par du barium dans le milieu extracellulaire.

- Courant calcique de type L : l'utilisation du BayK 8644, agoniste des courants calciques de type L, augmente le courant barique entrant et l'utilisation de la

Nitrendipine, antagoniste spécifique des courants calciques de type L, indique que cette conductance est responsable de 15% du courant global.

- Courant calcique de type N : l'utilisation de l' ω -Conotoxine-GVIA, antagoniste spécifique, diminue le courant global entrant de 30%. C'est donc une composante importante dans les neurones vestibulaires primaires.

Ainsi, les neurones vestibulaires expriment des courants à haut seuil d'activation (HVA) de type N et de type L qui constituent 45% du courant IBa global. Cette contribution est celle retrouvée dans d'autres neurones centraux ou périphériques.

- Courant calcique de type P/Q : cette étude a été réalisée en présence de bloqueurs des courants de type L et N. L'utilisation de l' ω -Agatoxine-IVA à faible concentration, blocage des courants de type P spécifiquement, diminue le courant de 20% et à plus forte concentration de 55% (soit la composante de type Q)
- Courant calcique de type R : c'est le courant résiduel encore présent malgré le blocage des autres courants HVA. Lors de cette étude, le SNX-482, bloqueur spécifique d'une partie des courants de type R, n'a pas été testé.

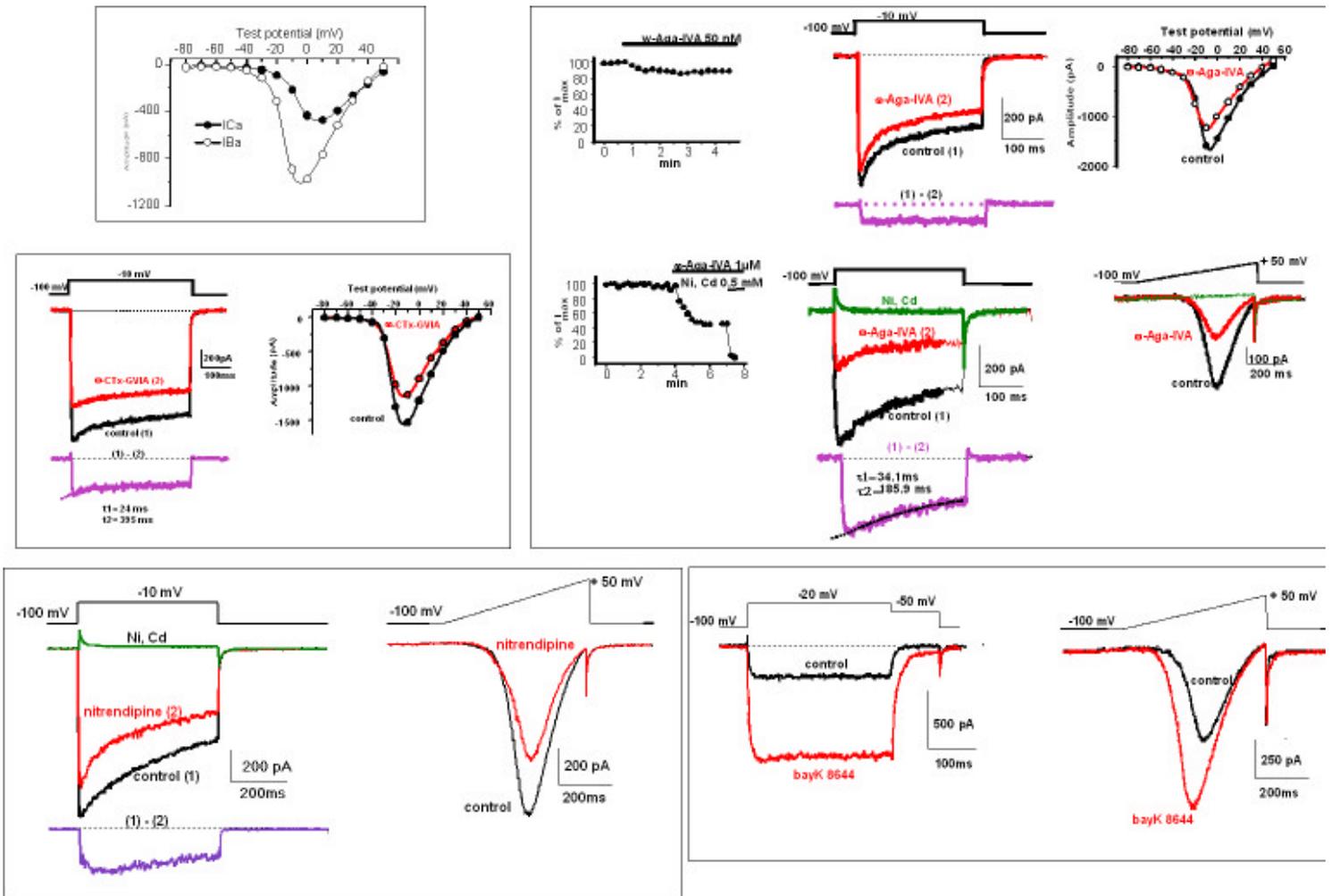


Figure 21 : Courants calciques à haut seuil d'activation dans les neurones vestibulaires primaires de souris à 3 jours. Etude des conductances présentes par utilisation des antagonistes spécifiques (Desmadryl et al., 1997).

Les neurones vestibulaires primaires de gros diamètre expriment aussi des courants calciques de type bas seuil, qui ont des propriétés électrophysiologiques similaires à celles décrites dans les neurones sensoriels périphériques.

(b) Au cours du développement

Cette étude réalisée par Chambard et coll en 1999 fait suite à l'identification des conductances calciques présentes à quelques jours postnataux (Chambard et al., 1999). Les auteurs ont étudié l'évolution des conductances calciques au cours du développement de la souris entre E14 et P4. Les courbes courant/potentiel réalisées à E14, E17 et P0 en présence de barium montrent qu'entre E17 et P0 tous les neurones vestibulaires ont des courants à haut seuil d'activation. Les courants à bas

seuil d'activation sont présents dans tous les neurones à E14 et E17 mais seulement dans 20% des neurones à la naissance. Les courants à haut seuil d'activation augmentent pendant la période du développement, indiquant soit l'augmentation d'une des composantes soit de toutes les composantes (figure 22).

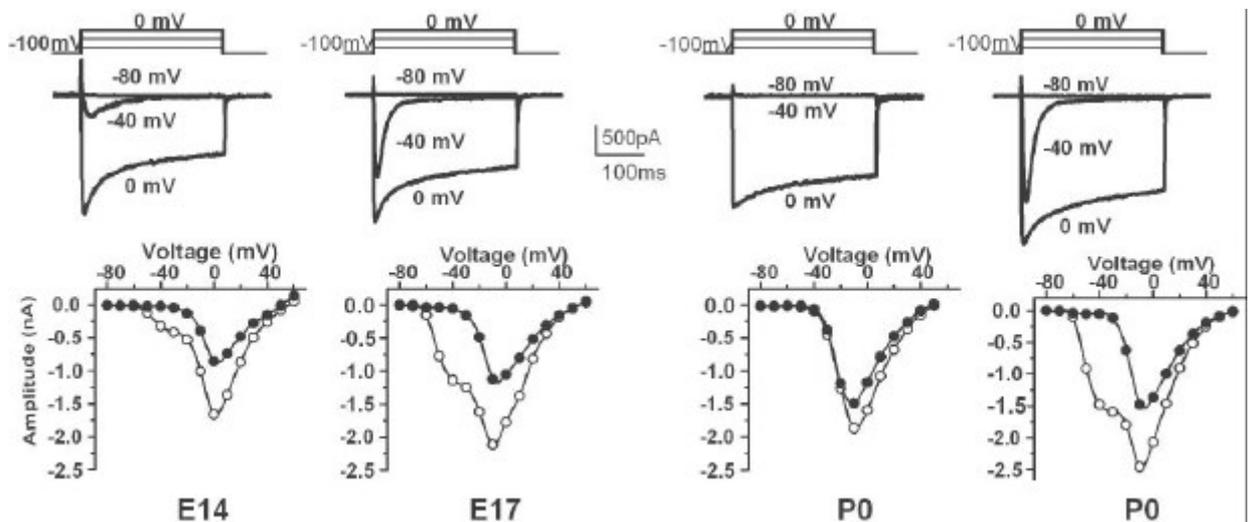


Figure 22 : Courant Barium global dans les neurones vestibulaires primaires à E14, E17 et P0. En haut se trouvent les courants typiques, enregistrés à différents potentiels. En bas se trouvent les courbes courant potentiel. Les ronds blancs représentent le courant de pic et les ronds noirs le courant de queue (Chambard et al., 1999)

Au moins quatre types des canaux calciques HVA sont présents tout au long de la période du développement étudiée avec aucune variation dans leurs propriétés cinétiques et pharmacologiques. Il s'agit des types L, N, P et Q.

Les courants de type L ne subissent pas de variation dans leur densité à la membrane du soma des neurones au cours de la période embryonnaire. La densité des courants calciques de type N augmente pendant toute la période du développement. La densité du courant calcique de type Q augmente légèrement pendant toute la période embryonnaire et se stabilise à partir de la naissance. Les courants calciques de type P ont une densité qui augmente entre E14 et E17 puis diminue ensuite. Etant donné qu'il n'y a pas de changement dans la capacitance cellulaire au cours de cette période, les variations de densité rendent compte des changements de conductances dans les neurones vestibulaires au cours du développement (figure 23).

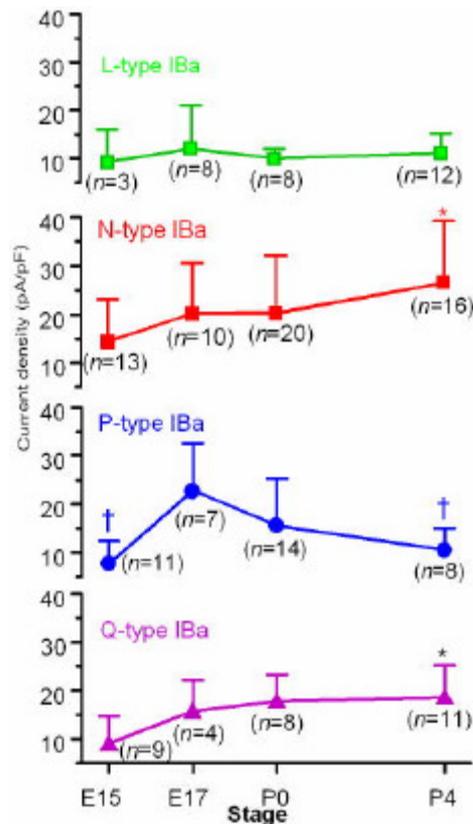


Figure 23 : Evolution de la densité des courants HVA au cours du développement des neurones vestibulaires primaires chez la souris (Chambard et al., 1999)

Les courants calciques à bas seuil d'activation (LVA) présents dans les neurones vestibulaires primaires au cours du développement, ont les mêmes propriétés que ceux décrits dans d'autres modèles de neurones sensoriels de souris (Carbone et Lux, 1987). Les caractéristiques d'activation et d'inactivation ne changent pas pendant la période du développement étudiée. Toutefois au cours de cette période, il existe un changement important dans le nombre de neurones exprimant ces courants et dans l'amplitude de ce courant. En effet, entre E14 et E17, tous les neurones expriment une conductance à bas seuil d'activation alors que cette expression se limite à seulement 20% des neurones à la naissance. De plus, la densité de courant à bas seuil d'activation est modifiée au cours de l'ontogenèse. Entre E17 et la naissance, un groupe de neurones montrent une diminution de la densité de courant, tandis que dans un second groupe de neurones, la densité de courant est importante et continue d'augmenter pendant la même période du développement (figure 24).

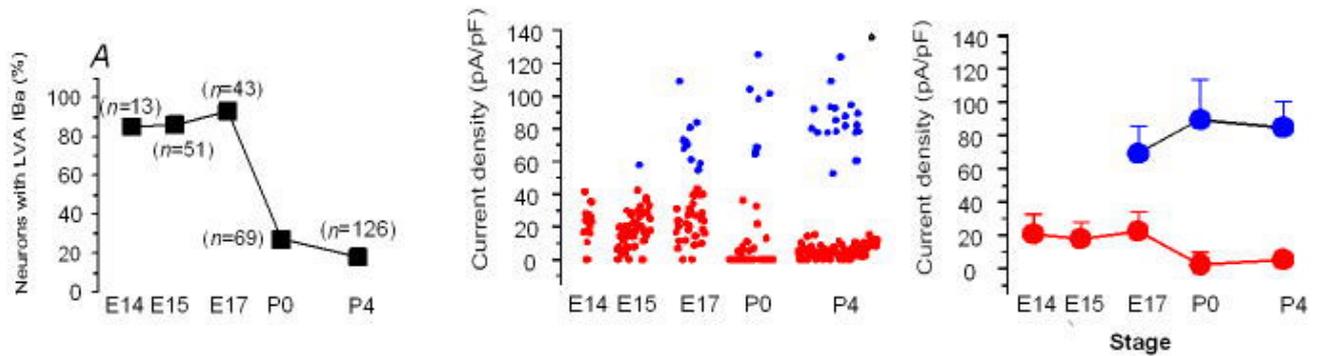


Figure 24 : Expression des courants calcium à bas seuil d'activation au cours du développement des neurones vestibulaires primaires de la souris (Chambard et al., 1999).

Depuis cette étude sur les canaux calciques de type T présents dans les neurones vestibulaires à E17, trois isoformes ont été clonées et caractérisées électrophysiologiquement. De même, de nombreuses études se sont attachées à décrire le rôle des canaux calciques dans l'organisme adulte mais aussi au cours du développement.

III. LES DIFFERENTES ISOFORMES DES CANAUX CALCIQUES DE TYPE T (COURANT LVA)

Pendant de nombreuses années, il n'était pas connu de gène pour une sous-unité $\alpha 1$ générant un courant calcique de type T. Les avancées de la biologie moléculaire et notamment de la recherche de séquences de gènes sur des banques de données ont permis de cloner trois isoformes des canaux calciques de type T. La sous-unité $\alpha 1G$ ou $Ca_v3.1$ a été la première à avoir été clonée (Perez-Reyes *et al.*, 1998) puis $\alpha 1H$ ou $Ca_v3.2$ a ensuite été clonée (Cribbs *et al.*, 1998) puis enfin une troisième sous-unité, $\alpha 1I$ ou $Ca_v3.3$, a été clonée (Monteil *et al.*, 2000). Ces sous-unités ont été largement étudiées, et présentent une grande homologie entre elles (environ 70%).

De nombreuses équipes ont recherché les localisations de ces différentes sous-unités. Talley et coll ont comparé l'expression des trois sous-unités au niveau du système nerveux de rat (Talley *et al.*, 1999). Il est apparu que $\alpha 1G$ était la sous-unité principale du cerveau et de la moelle épinière alors que $\alpha 1H$ est surtout localisée dans les neurones sensoriels. La sous-unité $\alpha 1I$ n'a pas de localisation spécifique mais est toujours associée à l'une des deux autres. Elles peuvent coexister toutes les trois dans une même structure. D'autres études ont mis en évidence la localisation de ces sous-unités dans des structures autres que le système nerveux, tels que le cœur le foie, le pancréas les reins, etc.

Il est intéressant de noter que la sous-unité $\alpha 1H$ est très exprimée au cours de la vie fœtale dans le cerveau et le cœur et de nombreux autres tissus puis disparaît chez l'adulte (Berthier *et al.*, 2002).

L'expression des canaux calciques Ca_v3 recombinants (aussi bien les isoformes humaines que de rat) dans une grande variété de systèmes d'expression hétérologues a conduit à une analyse fine de leurs propriétés biophysiques (Chemin *et al.*, 2002a ; Klockner *et al.*, 1999 ; Kozlov *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 1999a ; Lee *et al.*, 1999b ; Mcrory *et al.*, 2001 ; Perez-Reyes, 2003). En général les résultats des différentes études sont assez proches, avec des différences provenant des conditions d'enregistrement ou des variabilités de séquence. Il a ainsi été montré que ces sous-unités ont des propriétés de conductance qui diffèrent alors que d'une manière globale, elles génèrent toutes les trois un courant calcique de type T.

	Ca _v 3.1	Ca _v 3.2	Ca _v 3.3	Reference Nos.
Alias	α_{1D} Ca _v T.1	α_{1E} Ca _v T.2	α_{1I} Ca _v T.3	
Gene name	CACNA1G	CACNA1H	CACNA1I	240
Chromosomal location	17p22	10p13.3	22q12.3-13.2	90, 228, 224
Database entries*				
Human	NP_061498, Q49497	AAC07230, Q92150	NP_001125, Q9JNE6	
Rat	AAC67372, Q64836	AAC38157, Q9DQ90	NP_064469, Q97075	
Mouse	NP_062913, Q97U68	NP_67300		
Tissue expression	Brain, ovary, placenta, heart	Kidney, liver, adrenal cortex, brain, heart	Brain	90, 228, 228, 229, 324
Electrophysiology†				
Threshold, mV	-70	-70	-70	300
Peak of I _T , mV	-30	-30	-30	300
Activation kinetics, ms	1	2	7	300
Inactivation kinetics, ms	11	16	69	300
Deactivation kinetics, ms	3.0	2.2	1.1	300
$\tau_{1/2}$, ms	-72	-72	-72	300
Recovery from inactivation, ms	117	306	362	300
Conductance, pS, Ba	7.5	9	11	225, 324, 488
Pharmacology				
Nickel (EC ₅₀ , μ M)	250	12	216	230
Mibefradil (IC ₅₀ , μ M) in 10 Ba ²⁺	1.2	1.1	1.6	247
Mibefradil (IC ₅₀ , μ M) in 2 Ca ²⁺	0.27	0.14		247

Figure 25 : Comparaison des trois sous-unités clonées des canaux calciques de type T (Perez-Reyes, 2003).

Comme le résume la figure ci-dessus (figure 25), les trois sous-unités présentent quelques différences significatives dans leur différentes cinétiques. En effet, alors que Ca_v3.1 et Ca_v3.2 s'activent relativement rapidement et s'inactivent plus lentement, Ca_v3.3 s'active plus lentement (environ 7 fois par rapport aux autres sous-unités) et s'inactive encore plus lentement. Cette différence dans les cinétiques d'activation et d'inactivation des trois sous-unités est conservée dans des proportions variables quel que soit le système d'expression et la provenance de l'ADN (humain ou rat).

De la même manière il existe une différence dans la cinétique de réactivation entre les trois sous-unités. En effet alors que Ca_v3.1 se réactive rapidement, Ca_v3.2 et Ca_v3.3 se réactivent plus lentement.

Une dernière différence significative entre les sous-unités est à noter. Il s'agit de la sensibilité au Ni²⁺. Ca_v3.2 est beaucoup plus sensible que les autres sous-unités. L'IC₅₀ du Ni²⁺ pour Ca_v3.2 est de l'ordre de 10 μ M contre 250 μ M pour les autres sous-unités. Cette différence tout comme celle de la réactivation permet d'identifier le courant généré par Ca_v3.2 de celui généré par Ca_v3.1.

IV. ROLE DES CANAUX CALCIFIQUES DANS LE SYSTEME NERVEUX

Les canaux calcifiques activés par le potentiel jouent des rôles majeurs au niveau de l'organisme car ils permettent un influx calcifiique indispensable à de nombreuses fonctions cellulaires. Seules les fonctions des canaux calcifiiques du système nerveux des vertébrés sont présentées ci-dessous.

A. CANAUX CALCIFIQUES DEPENDANT DU POTENTIEL A HAUT SEUIL D'ACTIVATION (HVA)

Les neurones et cellules endocrines libèrent différentes substances dont des neurotransmetteurs, des hormones (peptides, catécholamines, acides aminés). Plusieurs études ont montré que cette libération nécessitait l'implication des canaux calcifiiques à haut seuil d'activation. En effet, il a été montré l'implication des courants de type N et P/Q dans la libération des neurotransmetteurs au niveau synaptique (Nooney et Lodge, 1996; Takahashi T. et Momiyama, 1993)). En 1998, Catterall démontre la localisation préférentielle au niveau présynaptique de $Ca_v2.1$ et $Ca_v2.2$ (Catterall, 1998). La même année des auteurs vont plus loin en démontrant l'interaction de ces canaux avec des protéines synaptiques, ceci permettant une augmentation locale de la concentration de calcium et donc une augmentation de la possibilité de libération (Walker et De Waard, 1998). Au niveau des terminaisons nerveuses des neurones magnocellulaires de l'hypothalamus ainsi qu'au niveau des cellules bipolaires de la rétine, il a été démontré l'implication des courants calcifiiques de type L permettant une libération rapide (Mennerick et Matthews, 1998)). Ceci a aussi été identifié au niveau d'autres tissus.

L'importance des canaux calcifiiques à haut seuil d'activation a été démontrée avec l'apparition des souris où les gènes codant pour ces canaux ont été génétiquement rendus invalides. En effet certaines souris ne sont pas viables, et dans certains cas cette délétion entraîne un effet létal au niveau embryonnaire. De même actuellement, il est reconnu que des mutations au niveau des gènes codant pour les canaux

calciques à haut seuil d'activation sont responsables de pathologies (telles que certaines formes de migraines, l'épilepsie ou certaines formes d'ataxie).

Gène invalidé chez la souris	Courant induit par ce gène	Effets de l'invalidation du gène	Auteurs
Ca _v 1.2	Type L	Mort des embryons avant le 15 ^e jour de gestation	(Seisenberger <i>et al.</i> , 2000)
Ca _v 1.3	Type L	Troubles auditifs et cardiaques majeurs : arythmie et cardiopathie	(Platzer <i>et al.</i> , 2000)
Ca _v 2.1	Type P/Q	Phénotype sévère d'ataxie et de dystonie. Durée de vie : environ 1 mois	(Jun <i>et al.</i> , 1999)
Ca _v 2.2	Type N	Diminution de l'activité des neurones sympathiques et augmentation du rythme cardiaque Altération des réponses nociceptives	(Ino <i>et al.</i> , 2001) (Hatakeyama <i>et al.</i> , 2001)
Ca _v 2.3	Type R	Diminution de l'activité locomotrice spontanée et diminution des réponses à la douleur inflammatoire somatique	(Saegusa <i>et al.</i> , 2000)

Le tableau ci-dessus récapitule le phénotype des souris invalidées pour les gènes des canaux calciques existantes. Ces souris apportent des informations importantes sur le rôle de chacun des canaux calciques. Par exemple, la non viabilité des souris invalidées pour le gène de Ca_v1.2 indique l'importance de ce gène, mais aussi son rôle précis. Dans ce cas, les auteurs ont pu mettre en évidence que ce gène s'exprimait au 13^e jour de la gestation où il permet la fonction cardiaque.

B. CANAUX CALCIFIQUES DÉPENDANTS DU POTENTIEL À BAS SEUIL D'ACTIVATION (LVA)

Les courants calciques à bas seuil d'activation ont été enregistrés dans la plupart des tissus, toutefois ils semblent être exprimés pendant la vie embryonnaire des

cellules ou pendant les phases de croissance des cellules suggérant des fonctions spécifiques pendant le développement.

Ces conductances ont un rôle important dans l'excitabilité des neurones de par leur bas seuil d'activation. Dans certaines structures neuronales, ces courants peuvent générer suite à une hyperpolarisation des potentiels d'action produisant des activités en bouffée (comme dans le cervelet (Llinas R. et Muhlethaler, 1988); mais aussi dans d'autres structures). Il a aussi été montré que ces courants pouvaient participer à la régénération des potentiels d'action. En effet, la dépolarisation provoquée par ces courants provoque la fermeture des conductances de type I_H (participant au maintien du potentiel de membrane) et entraîne après une bouffée de potentiel d'actions une hyperpolarisation (McCormick et Huguenard, 1992 ; McCormick et Pape, 1990). Celle-ci permet aux canaux calciques à bas seuil d'activation de se réactiver et de générer un nouveau potentiel d'action induisant des activités oscillantes (McCormick et Huguenard, 1992). Un autre point important du rôle des canaux calciques dans l'excitabilité cellulaire est leur participation aux potentiels d'action sodiques. En effet, étant donné leur cinétique de désactivation lente, ils permettent une dépolarisation soutenue pendant le potentiel d'action et donc d'en moduler la forme en rallongeant sa durée. Cette dépolarisation ayant lieu à la fin du potentiel d'action, peut entraîner l'apparition d'un nouveau potentiel d'action. Il a en effet été montré que cette dépolarisation après le potentiel d'action (appelée ADP pour after depolarization potentiel) était sensible au nickel et au cobalt dans les neurones du néocortex et du gyrus dentelé de l'hippocampe, mais aussi au niveau des neurones sensoriels du DRG et était provoquée par un courant calcique à bas seuil d'activation (Dubreuil *et al.*, 2004; Komatsu et Iwakiri, 1992 ; Zhang *et al.*, 1993). Ceci peut permettre de générer des activités électriques soutenues ou pacemaker.

De nombreuses études actuelles portent sur l'implication des canaux calciques de type T dans la douleur (Bourinet *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2001 ; Todorovic *et al.*, 2001). Cette dernière étude de 2005 montre clairement le rôle de $Ca_v3.2$ dans les phénomènes de douleur aiguë et neuropathique. Les résultats comportementaux montrent que la diminution d'expression des canaux calciques de type T au niveau des neurones des ganglions de la racine dorsale produit des effets contre la nociception thermique et mécanique.

Des souris invalidées pour les gènes $Ca_v3.1$ (Kim *et al.*, 2001) et $Ca_v3.2$ (Chen *et al.*, 2003) ont été générées. Ces animaux ne présentent pas de phénotypes sévères. La souris invalidée pour le gène $Ca_v3.2$ montre une déficience dans la relaxation des artères coronaires (Chen *et al.*, 2003) et les souris invalidées pour le gène $Ca_v3.1$ présentent une hyperalgésie à la douleur viscérale. Ainsi cette dernière sous-unité, lorsqu'elle est exprimée au niveau thalamique intervient dans le contrôle de la douleur viscérale (Kim *et al.*, 2001).

C. CANAUX CALCIQUES A BAS SEUIL D'ACTIVATION ET DEVELOPPEMENT

Dans les neurones, le calcium est impliqué dans de nombreux événements du développement, comme la croissance des neurites, la formation et l'élimination des synapses, la différenciation du phénotype (Desarmenien *et al.*, 1993 ; Gu et Spitzer, 1995; Larmet *et al.*, 1992 ; Spitzer, 1994) et la maturation physiologique (D'angelo *et al.*, 1997). Le calcium joue aussi un important rôle de second messager dans l'expression de gènes (Bading *et al.*, 1993). En effet, les entrées de calcium par les canaux calciques peuvent agir sur la transcription de gènes précoces comme c-fos, c-myc ou c-jun, qui sont des facteurs de transcription importants pour les cellules (Berninger *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1991).

Dans la plupart des neurones, les canaux calciques à bas seuil d'activation sont exprimés très tôt au cours du développement et tendent à disparaître ensuite. Ce phénomène est présent dans les neurones périphériques moteurs et sensoriels aussi bien que dans les neurones centraux comme les neurones de l'hippocampe (Bickmeyer *et al.*, 1993 ; Desmadryl *et al.*, 1998; Fedulova *et al.*, 1991 ; Fedulova *et al.*, 1994 ; Mccobb *et al.*, 1989 ; Richard *et al.*, 1991 ; Yaari *et al.*, 1987). Dans ces neurones, les canaux calciques à bas seuil d'activation apparaissent juste avant ou de manière concomitante à la mise en place des neurites. De même dans les cellules du plancher neural des embryons de rat ou dans les blastocystes obtenues à partir de cellules souches embryonnaires, sont enregistrés seulement des courants calciques à bas seuil d'activation et leur amplitude décroît avec l'âge de l'embryon (Frischknecht et Randall, 1998 ; Rohwedel *et al.*, 1994) . Ceci suggère un rôle primordial de ces courants lors de la différenciation des neuroblastes en neurones : neuritogenèse et maturation des autres conductances ioniques (Bader *et al.*, 1983).

En 1997, Gu et Spitzer, en étudiant le rôle des transitoires calciques dans le développement neuronal de *Xenopus*, montrent que la différenciation neuronale est perturbée lors du blocage de ces courants transitoires calciques (par de l'amiloride ou du nickel) (Gu et Spitzer, 1997). En fait la suppression de l'entrée de calcium va bloquer l'expression du neurotransmetteur GABA et la modulation des canaux potassiques. Le rôle de ces canaux calciques dépendants du potentiel est d'autant plus important qu'ils sont à l'origine des potentiels d'action dans les phases précoces du développement, avant l'apparition des potentiels d'action sodiques (c'est-à-dire induits par des canaux sodiques activés par le potentiel) (Holliday *et al.*, 1991).

Les travaux de Chemin et coll, en 2004, ont montré que les cellules d'un neuroblastome, NG108-15, se différenciaient grâce à la participation d'un influx calcique permis par $Ca_v3.2$. En absence de cette conductance, les cellules ne peuvent pas induire la neuritogenèse (Chemin *et al.*, 2004).

En 1988, Kater et coll émettent l'hypothèse que la neuritogenèse est déclenchée par de faibles augmentations du calcium intracellulaire (Kater *et al.*, 1988). Deux ans plus tard, en 1990, Tolkovsky et coll démontrent qu'il existe une concentration optimale de calcium dans le milieu extracellulaire pour permettre la pousse neuritique des neurones sympathiques, qui se situe entre 40 et 120 nM (Tolkovsky *et al.*, 1990).

D'après les travaux de (McCobb et Kater, 1988) ainsi que ceux de (Mynlieff et Beam, 1992), les courants calciques à bas seuil d'activation jouent un rôle dans la stabilisation des synapses et la protection contre l'apoptose cellulaire. En effet, au cours du développement les motoneurones contactent plusieurs fibres musculaires puis il y a compétition entre les fibres nerveuses et après maturation des synapses, seul un motoneurone contacte une fibre musculaire. Cette phase de dégénérescence et de mort neuronale ne survient, chez le poulet comme chez la souris, que lorsque la densité de courant calcique à bas seuil d'activation diminue et lorsque la densité des courants calciques de type L augmente. Les canaux calciques à bas seuil d'activation sont donc importants dans la neuritogenèse, la survie neuronale et la stabilisation synaptique alors que les canaux calciques de type L permettent l'apoptose cellulaire et l'élimination des synapses (Beam et Knudson, 1988).

MATERIELS ET METHODES

I. LES CELLULES : LES NEURONES VESTIBULAIRES PRIMAIRES

A. ANIMAUX

Des souris de souche Swiss (CERJ, Le Genest, France) sont utilisées dans toutes les expérimentations. Lors de l'étude effectuée sur des stades embryonnaires, le stade de gestation est déterminé par rapport à la date du bouchon vaginal. En effet les femelles sont mises en présence des mâles pendant la nuit. Au matin, l'existence d'un bouchon vaginal muqueux permet de sélectionner les femelles fécondées et de déterminer le jour 1 de la gestation (E1). Lorsque le stade de gestation est atteint, les femelles gestantes sont sacrifiées par dislocation cervicale (selon les lois de l'éthique française), l'utérus gravide est prélevé dans 8 ml de PBS-glucose. Par la suite, les embryons et les animaux postnataux (P0 à P6) sont traités de la même manière. 10 animaux sont nécessaires à chaque expérimentation.

Composition du PBS-Glucose utilisé : 10% de PBS 10X (Gibco), 33 mM de Glucose. Le pH est ajusté à 7.3 avec du NaOH 5N.

B. PREPARATION DE NEURONES VESTIBULAIRES PRIMAIRES FRAICHEMENT DISSOCIES

1) Traitement des boîtes utilisées pour l'ensemencement

Des boîtes de pétri de 35 mm (Nunc) sont traitées à la polyornithine (10 µg/ml) au minimum une nuit avant la mise en culture et au maximum 7 jours avant. Les boîtes sont mises à 37°C et 5% CO₂. La présence de la polyornithine va permettre une facilitation de la fixation des neurones sur le fond de la boîte (Mercurio, 1990; Sephel *et al.*, 1989). Avant l'ensemencement, la polyornithine est mise à sécher à température ambiante en ambiance stérile.

2) Prélèvement et dissociations des ganglions vestibulaires

Les animaux sont décapités dans du PBS stérile et les têtes sont coupées dans le plan sagittal et immergées dans du PBS+Glucose. La dissection s'effectue dans ce milieu. Les ganglions sont alors retirés après section des branches nerveuses supérieure et inférieure du nerf vestibulaire. Les ganglions alors sont collectés dans un tube en verre conique contenant 2 ml de PBS-Glucose.

Les vingt ganglions vestibulaires primaires sont récoltés et dissociés afin d'obtenir des cellules isolées.

Une première dissociation enzymatique est effectuée par traitement à la trypsine + EGTA (Gibco) à 37°C et 5 %CO₂. La concentration en trypsine et la durée de l'incubation de trypsine dépendent de l'âge de l'animal.

- E 17 : Trypsine = 0.15% pendant 6 minutes
- P0 : Trypsine = 0.25% pendant 6 minutes
- P6 : Trypsine = 0.25% pendant 8 minutes

L'action de la trypsine est arrêtée par ajout de 10 % de sérum de veau foetal.

Le milieu est ensuite remplacé par 2 ml de milieu Neurobasal (Gibco) supplémenté avec 2% de B27 (Gibco), 25 µM de glutamate (Sigma) et 0.25 mM de glutamine (Sigma).

Une deuxième dissociation, mécanique, s'effectuant à l'aide de pipettes Pasteur est alors réalisée en deux étapes. Trois pipettes Pasteur de diamètre décroissant ont leur extrémité réduite à la flamme. Une première succession d'aller retour est effectuée avec la pipette de gros diamètre (10 cycles d'aspirations rejets) puis avec la pipette de moyen diamètre (6 cycles d'aspirations rejets), suivie d'un premier ensemencement dans les boîtes préalablement traitées à la polyornithine. Une dernière série d'aspirations rejets est réalisée avec la pipette de plus petit diamètre (10 cycles d'aspirations rejets). Les boîtes sont à nouveauensemencées.

Les neurones sont enregistrés 2 à 6 heures après le dernier ensemencement et ne présentent pas de pousse neuritique. Ils sont, lors d'observation sous un microscope à contraste de phase, nettement réfringents et de forme sphérique. Le diamètre du corps cellulaire peut varier de 15 à 30 µm.

C. CULTURE DE NEURONES VESTIBULAIRES PRIMAIRES

Le sacrifice des animaux et le prélèvement des ganglions s'effectuent de la même manière que précédemment. Ce sont les techniques de dissociation qui vont être différentes. En effet, elles doivent être plus douces pour ne pas stresser les cellules et donc permettre leur survie et leur pousse en culture pendant plusieurs jours. Le milieu de culture utilisé est le même, c'est-à-dire du Neurobasal supplémenté avec du B27, glutamate et glutamine.

1) Traitement des boîtes pour la culture

Les boîtes utilisées pour la mise en culture seront des boîtes de 4 puits (Nunc), le diamètre des puits est de 14 mm. Une lamelle de verre stérilisée par un bain d'alcool absolu suivi d'un séchage à la flamme, sera déposée dans chacun des puits. Les lamelles sont détoxifiées en les laissant incuber 30 minutes dans du Neurobasal à 37°C et 5% CO₂. Un premier traitement à la polyornithine est réalisé pendant une nuit, comme précédemment. La polyornithine est mise à sécher à température ambiante en ambiance stérile et un deuxième traitement utilisant la laminine, produite au laboratoire est alors réalisé. Cette laminine (10 mg/ml) est diluée dans du Neurobasal est déposée sur les lamelles d'une nuit à 15 jours avant la mise en culture.

2) Dissociation enzymatique

Les ganglions vestibulaires primaires en suspension dans 2 ml de PBS-Glucose, vont être dissociés en 2 temps. Dans un premier temps, 1 ml de PBS est retiré et remplacé par 1 ml Collagénase A (Roche). Cette dissociation s'effectue à 37°C et 5 % de CO₂, pendant 10 min. Le milieu de dissociation est retiré et rincé 2 fois avec 900 µl de PBS sans calcium. Une deuxième dissociation enzymatique est alors réalisée à la suite, les ganglions sont mis en suspension dans 900 µl de PBS sans calcium et 100 µl de trypsine (Gibco) pendant 10 minutes à 37°C et 5 % CO₂. Ce deuxième milieu de dissociation est retiré et l'action de la trypsine est bloquée par

ajout de 100 µl de sérum de veau fœtal dans 900 µl de Neurobasal supplémenté, pendant 5 minutes à température ambiante.

Composition du PBS sans calcium utilisé : 10% de PBS sans calcium et magnésium 10X (Gibco).

3) Dissociation mécanique

Les ganglions sont repris dans 1 ml de Neurobasal supplémenté et 25 µl de Deoxyribonucléase 1 (Sigma). La dissociation enzymatique s'effectue à l'aide d'une pipette pasteur dont le diamètre est réduit à la flamme. Une série d'aspirations rejets est réalisée avec cette pipette jusqu'à ce qu'il ne reste plus d'amas cellulaires visibles.

4) Comptage et ensemencement

Les neurones sont comptés à l'aide d'une cellule à Malassez à 2 champs. Tous les neurones présents sur le quadrillage sont recensés et une moyenne entre les deux champs est effectuée afin d'avoir le moins d'erreur possible. On ensemence en moyenne 3000 neurones par puits. La laminine est rincée trois fois à l'aide du Neurobasal supplémenté. 500 µl de neurones sont ensemencés par puits. En fonction du nombre de neurones dénombrés, du Neurobasal est ajouté et les facteurs neurotrophiques sont ajoutés : 1 µg/ml de BDNF, 1 µg/ml de NT3 et $2 \cdot 10^{-5}$ M AraC (Sigma). La culture s'effectue alors à 37°C et 5 % de CO₂.

Les cultures de neurones vestibulaires contiennent différents types cellulaires, l'utilisation de l'AraC, un antimétabolite, permet l'élimination des cellules gliales par arrêt de leur prolifération. Les neurones sont repérables car rapidement des prolongements neuritiques poussent à partir du corps cellulaire.

D. TRANSFECTION DES NEURONES VESTIBULAIRES PRIMAIRES EN CULTURE

Les neurones sont transfectés avec des oligonucléotides antisens des ARNm des canaux calciques dépendants du voltage à bas seuil d'activation qui ont été caractérisés lors de la première partie de cette thèse. Ces oligonucléotides sont marqués avec un fluorochrome, la fluorescéine, afin de visualiser les cellules transfectées des autres. L'agent de transfection utilisé est un lipide cationique qui se complexe avec l'ADN et le transporte dans la cellule ainsi il facilite la pénétration de l'oligonucléotide dans les cellules. Il s'agit de la lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cette transfection est réalisée 4 heures après la mise en culture des neurones afin de leur permettre une bonne adhésion sur la lamelle de verre.

Lorsque la culture est suivie de transfection, le milieu de culture ne contient pas de glutamate. Ceci n'a pas d'incidence sur la survie et la pousse neuritique. D'autre part, les neurones sont toujoursensemencés sur 4 puits quelque soit le dénombrement. En effet le milieu de transfection et notamment la concentration des oligonucléotides et de la lipofectamine dépendent de la quantité de cellules recensées. Sachant la taille du puits et donc le volume final du mélange de transfection utile à la réalisation de celle-ci, les quantités d'ADN antisens et de lipofectamine ne dépendront que du nombre de cellules estimé par le comptage sur la cellule de Malassez.

Le volume de transfection utile est de 200 μ l, la transfection de 100000 cellules nécessite 1 μ g d'ADN antisens et 3 μ l de lipofectamine.

Les oligonucléotides et la lipofectamine sont préparés séparément et incubés 5 min à T° ambiante puis mélangés et incubés 20 min à T° ambiante. Par la suite les mix de transfection sont mis dans les puits de culture après aspiration du milieu. La transfection se fait à 37°C et 5 % de CO₂ pendant 2h à 2h30. Le milieu de transfection est remplacé par du milieu de culture (toujours sans glutamate) mais contenant les facteurs neurotrophiques. Lors de la réalisation des transfections, 4 conditions sont réalisées en même temps :

- Un puits contrôle, subissant les changements de milieu mais sans lipofectamine ni antisens

- Un puits ne contenant que de la lipofectamine permettant de vérifier qu'il n'y a pas d'effet de l'agent de transfection sur la pousse neuritique.
- Un puits ne contenant que l'antisens
- Un puits contenant l'antisens et la lipofectamine.

II. ANALYSES SUR CELLULES VIVANTES

A. ELECTROPHYSIOLOGIE

La technique du patch clamp, qui est une variante de la technique du potentiel imposé, a été originalement développée pour permettre l'enregistrement du courant traversant un seul canal. Une configuration dérivée permet l'enregistrement du courant traversant tous les canaux situés dans la membrane d'une cellule. Cette configuration dite «cellule entière» repose sur le principe suivant :

- Sceller hermétiquement sur la surface cellulaire la pointe d'une pipette (Giga Seal).

- Perforer le «patch» de membrane isolé dans la section de la pipette.

Il en résulte que le milieu intracellulaire intra pipette est isolé électriquement du milieu extracellulaire. Ceci permet l'utilisation du mode voltage imposé ou courant imposé.

1) Dispositif expérimental

L'observation des cellules se fait sur un microscope inversé (Nikon), et l'étude des courants calciques et des variations de potentiels membranaires est réalisée grâce à un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instruments). L'acquisition des données se fait par un logiciel Pclamp6 (Axon Instruments) chargé sur un ordinateur IBM PC muni d'une interface Labmaster (Axon Instruments). Les données expérimentales sont d'abord analysées grâce au logiciel Clampfit v6.02 et Clampfit v8.01 (Axon Instruments) puis sont exploitées grâce aux logiciels Excel 2000 (Microsoft) Origin 4.1 et 7 (Microcal) et Window Draw 6 ainsi que Corel Draw (Micrografx).

L'électrode d'enregistrement se compose d'un filament d'argent fixé à la tête de commande de l'amplificateur. Cette électrode ainsi que l'électrode de référence sont chlorurées avant chaque expérience afin d'éviter l'électrolyse en annulant le potentiel de jonction. L'électrode de commande et de mesure est constituée d'une pipette de verre (Tubes capillaires pour hématocrite Vitrex). Ces micropipettes de verre sont

étirées à chaud sur une étireuse (Narashige). La pointe de la micropipette est enduite de paraffine afin de diminuer la capacité de la pipette. Elle est ensuite remplie d'une solution saline dont la composition est proche de celle du milieu intracellulaire. Elle a une résistance comprise entre 2 et 3 M Ω .

2) Conditions d'enregistrements

Lors des enregistrements, le milieu de "culture" est remplacé par un milieu de mesure dont la composition est celle du milieu extracellulaire. Les cellules baignent dans cette solution saline dont la composition ionique permet l'enregistrement soit de courants calciques soit de variation de potentiel. Les différentes solutions sont présentées dans le tableau suivant.

L'enregistrement des conductances calciques est possible grâce à la présence, dans le milieu extracellulaire, de Tétréthylammonium (TEA) et de 4-aminopyridine (4AP), et dans le milieu intracellulaire de césium, qui sont des inhibiteurs des conductances potassiques. La présence de Tétrodotoxine (TTX) 1 μ M ainsi que l'absence de sodium permet l'élimination des conductances sodiques.

Lors de l'enregistrement de l'activité électrique, c'est-à-dire de potentiels d'action, aucun de ces bloqueurs de courant n'est présent afin de mesurer les variations de potentiel en condition presque physiologique.

Lorsque les enregistrements en mode potentiel imposé suivent sur une même cellule les enregistrements en mode courant imposé, sont ajoutés dans le milieu extracellulaire de la TTX du TEA et de la 4AP, ceci permet de corrélérer une forme de potentiel d'action à un courant dépendant du potentiel spécifique. L'ajout de ces inhibiteurs dans le milieu sans modifier le scellement de la pipette à la surface du neurone et le changement du mode d'enregistrement reste une étape très délicate lors de cette étude.

Milieux intracellulaires :

Composition en mM	Milieu d'enregistrement des courants calciques	Milieu d'enregistrement en mode courant imposé
Hépes	10 mM	10 mM
Glucose	10 mM	10 mM
NaCl	5 mM	5 mM
EGTA	10 mM	5 mM
Mg ²⁺ -ATP	3 mM	3 mM
Na ⁺ -GTP	1 mM	1 mM
CsCl	130 mM	-
KCl	-	135 mM
Osmolarité	302 mOsm	302 mOsm
pH	7.4	7.4

Milieux extracellulaires :

Composition en mM	Milieu d'enregistrement des courants calciques	Milieu d'enregistrement en mode courant imposé
Hépes	10 mM	10 mM
Glucose	10 mM	10 mM
KCl	5 mM	5 mM
CaCl ₂	2 mM	4 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM
TEACl	120 mM	-
NaCl	-	135 mM
Osmolarité	303 mOsm	303 mOsm
pH	7.4	7.4

Le pH est ajusté avec du CsOH pour le milieu d'enregistrement intracellulaire des conductances calciques et avec du KOH pour le milieu d'enregistrement intracellulaire en mode courant imposé.

Le pH est ajusté avec du TEA-OH pour le milieu d'enregistrement extracellulaire des courants calciques et avec du NaOH pour le milieu d'enregistrement extracellulaire en courant imposé.

Du CaCl_2 est ajouté à raison de 2 mM dans le milieu extracellulaire juste avant les enregistrements électrophysiologiques.

Lorsque des enregistrements en mode courant imposé ont été suivis d'enregistrements des courants calciques, les conductances sodiques et potassiques ont été bloquées par l'utilisation des bloqueurs spécifiques. En effet, l'ajout de 300 nM de Tétródotoxine (TTX) permet l'inhibition des conductances sodiques et l'ajout de 60 mM de tétraéthylammonium (TEA) et de 5 mM de 4-aminopyridine (4-AP) permet d'inhiber une grande partie des conductances potassiques.

3) Analyses des données

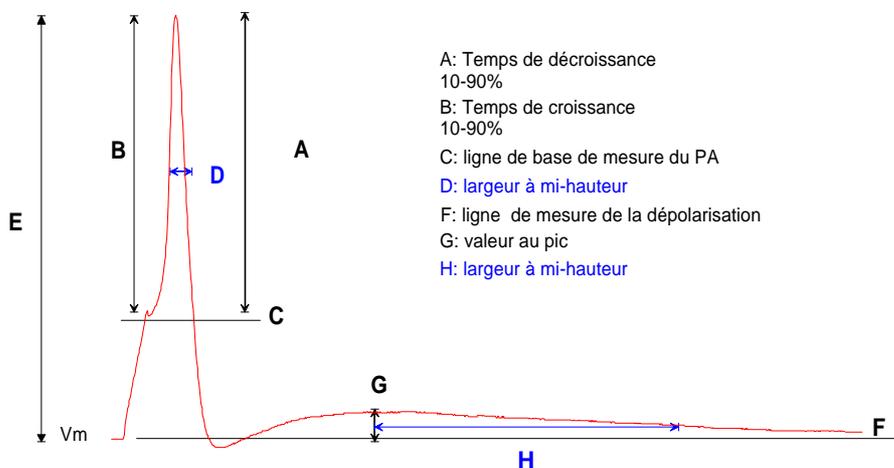
Les courbes d'activation des courants calciques de type T sont obtenues à partir d'enregistrements de la relation courant potentiel (*courbe I-V*) en utilisant l'équation $g_{max} = I_{pic} / (V_m - V_r)$ où I_{pic} représente le courant maximal, V_m le potentiel imposé et V_r le potentiel apparent de réversion du calcium. Les neurones vestibulaires primaires expriment un courant calcique haut seuil (HVA) de grande amplitude, si bien que le potentiel de réversion ne peut être qu'estimé à la valeur de 40 mV en extrapolant la partie ascendante de la courbe I-V (n=8). Les valeurs de conductance sont normalisées et ajustées par une équation standard de Boltzmann : $G/G_{max} = 1 / (1 + \exp((V_{1/2ac} - V_a) / K_a))$ où G est la conductance à un potentiel V_a , G_m la conductance maximale, $V_{1/2ac}$ le point de demi activation (situé au milieu de la courbe d'activation) et K_a la valeur de la pente d'activation.

Les courbes d'inactivation à l'état stable sont obtenues en utilisant un protocole double stimulation dans lequel la stimulation test à -40 mV est précédée d'une stimulation conditionnante de 5 s à différents potentiels de -110 mV à -20 mV. Le

courant au pic à ces différents potentiels est normalisé par rapport à l'amplitude du pic du courant T mesuré à -110 mV et la courbe d'inactivation à l'état stable est tracée par rapport au potentiel conditionnant. Les données sont ajustées avec une équation de Boltzmann de la forme $I/I_{max}=1/(1+\exp((V_i-V_{1/2inac})/K_i))$ où I est le pic de courant au potentiel V_i , I_{max} le maximum de courant au potentiel conditionnant de -110 mV, $V_{1/2inac}$ le potentiel de demi-inactivation et K_i la valeur de la pente d'inactivation. Les constantes de temps (t) de l'activation et l'inactivation sont ajustées avec une fonction exponentielle simple de la forme : $I(t)= A\exp(-t/\tau)$ où A est le courant au pic et τ la constante de temps.

Les cinétiques de réactivation sont calculées avec une équation double exponentielle de la forme : $I(t)=A_1\exp(-t/\tau_1)+A_2\exp(-t/\tau_2)+C$, où A1 et A2 représentent l'amplitude de chaque composante, τ_1 et τ_2 les constantes de temps.

L'effet de l'application de concentrations croissantes de Ni^{2+} sur l'amplitude du courant est représenté par une courbe du pourcentage d'inhibition du courant par rapport à la concentration de Ni^{2+} . Cette courbe est ajustée par une équation de Hill de la forme : $I(x)=Ax^n/(IC_{50}^n+x^n)$ où A est la réponse maximale et n le coefficient de Hill.



Les analyses des potentiels d'action et les dépolarisations post potentiel (ADP) sont réalisées en utilisant le logiciel pCLAMP (v8, Axon Instruments). Il permet la détermination de la valeur au pic et du temps à mi-hauteur du potentiel d'action. Le temps de croissance et de décroissance est mesuré de 10% à 90% de l'amplitude du potentiel d'action. La base du potentiel d'action est prise à partir du seuil d'activation. Concernant l'ADP, l'amplitude et le temps de demi-repolarisation sont mesurés. Ceci est illustré par le schéma ci-dessus.

Les résultats sont regroupés et donnés sous la forme moyenne \pm écart type. Les différences significatives sont déterminées par le test de Student.

III. ETUDES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

A. BIOLOGIE MOLECULAIRE : RT-PCR

1) Extraction des ARN totaux

Les ganglions vestibulaires (20 pour chaque stade) ont été prélevés à différents stades : 17 jours de gestation (E17), le jour de la naissance (P0) et 20 jours après la naissance (P20), afin de permettre une étude d'expression au cours du développement des sous-unités calciques de type bas seuil d'activation. Les prélèvements ont été réalisés sur de la glace dans un tube eppendorf « RNase free » à l'aide d'instruments traités au DEPC.

L'extraction est réalisée dans du Trireagent (800 μ l) selon un protocole dérivé du protocole de Chomezinski et Sacchi ((Chomczynski et Sacchi, 1987). Une dilacération des tissus est réalisée à l'aide de seringues de diamètre décroissant. Après l'ajout de 180 μ L de chloroforme, et agitation sous vortex pendant 30 s, le mélange est incubé 5 min à température ambiante et centrifugé 15 min à 15000g et à 4°C. La phase aqueuse est prélevée et transférée dans un nouveau tube «RNase free». Les ARN sont précipités dans un volume d'isopropanol à -20°C la nuit et centrifugés à 18000g pendant 20 min à 4°C. Le culot est lavé dans 1 ml d'éthanol à 75%, centrifugé à 18000g pendant 7 min à 4°C et séché à température ambiante quelques min puis resuspendu dans 20 μ l d'eau DEPC.

La quantité d'ARN totaux présente est mesurée par spectrométrie à la longueur d'onde de 260 nm et diluée à 1 μ g/ μ l (Une unité densité optique à 260 nm correspond à 40 μ g/ml d'ARN). La qualité des ARN est appréciée après visualisation des bandes 18S et 28S d'ARN ribosomal sur gel d'agarose 2%.

2) Traitement DNase

Afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique contaminant issu de l'extraction des ARN, 10 µl d'ARN totaux sont traités avec 2 unités de RQ1 Dnase (Proméga) dans un volume final de 20 µl et contenant 20U de Rnase inhibitor (Promega), 10mM de Dithiotreitol (DTT). Les tubes sont mis à incuber 1h à 37°C. La réaction est inactivée par chauffage à 75°C 5 min.

3) Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)

La réaction de reverse transcriptase (RT) est réalisée sur 2 µg d'ARN préalablement dénaturés une minute à 90°C et quenchés 2 min dans la glace puis maintenus à température ambiante. La réaction est réalisée dans un volume final de 20 µl contenant 100U de Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen), 20U de Rnase inhibitor (Promega), 10 mM de DTT, 5 µM d'amorces aléatoires ou hexamer random primers (Boehringer Mannheim), 0,5 mM de dNTP (Pharmacia) et le tampon de la RT. Les tubes sont alors placés à 37°C pendant 1h.

4) Amplification PCR

La réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 20 µl contenant 0.1 µM de chaque primers, 0.05 mM de dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, le tampon de la Taq Polymerase Platinum Taq (Invitrogen) et 2.5 U de Platinum Taq.

Le protocole d'amplification est le suivant : 94°C pendant 3 minutes suivi de 33 cycles (94°C pendant 30 secondes, 55-60°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 1 min) et d'une élongation finale de 7 min.

Les produits de PCR sont visualisés sur gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium pour vérifier la taille des produits amplifiés. La validation de l'identité des produits a été réalisée par séquençage du produit de PCR (Génome Express)

Les séquences des primers utilisés dans cette étude sont présentées ci-dessous

Pour Ca_v3.1 (GenBank accession number : NM_009783)

ACGGGAAGATACGAGTGGAC (3030-3049) et

TCATGATGGGCAGTTCCA (3357-3349)

Pour Ca_v3.2 (GenBank accession number : NM_021415.2)

GGACGGACACAACGTGAG (1024-1006)

GGTTCCAGTTGATGCAGGC (564-581)

Pour Ca_v3.3

ATGCTGGTGATCCTGCTGAAC

GCACGCGGTTGATGGCTTTGAG

Afin de réaliser les primers pour la sous unité $\alpha 1I$ chez la souris, la séquence n'étant pas connue, nous avons utilisé une partie de séquence de l'ARNm qui est commune à cette sous unité chez le rat et l'humain.

B. IMMUNOHISTOLOGIE

La technique d'immunohistologie permet le marquage spécifique des neurones en utilisant un anticorps dirigé contre une protéine neuronale : les neurofilaments. Donc une révélation des anticorps à l'aide de fluorochrome va permettre de révéler sous un microscope à fluorescence les neurones et seulement ce type cellulaire au sein d'une culture de cellules de ganglion vestibulaire primaire.

Pour cela, les cultures de neurones vestibulaires primaires sont fixées avec une solution contenant 4% de paraformaldéhyde dans du Tampon Phosphate 0.1 M, pH 7.4, pendant 30 min, puis sont rincées deux fois à l'aide de PBS 1X filtré non stérile. Le marquage peut alors être réalisé.

Dans un premier temps, une pré-incubation de 30 min dans une solution contenant 1% de triton 100X et 10% de sérum va permettre une perméabilisation des membranes et une saturation des sites non spécifiques.

Après rinçage, les cultures sont incubées avec un anticorps primaire (1/500^e) dirigé contre les protéines des neurofilaments (anti-neurofilament 200, Clone N52, monoclonal de souris, Sigma), pendant 1h30 à température ambiante. L'anticorps primaire est rincé et la culture est alors incubée avec un anticorps secondaire (1/2000). Celui-ci, produit dans une autre espèce animale que le premier, est dirigé contre les anticorps de l'espèce qui a produit le premier (anti IgG de souris produit chez l'âne). De plus cet anticorps est couplé à un marqueur fluorescent, l'Alexa 568 (Molecular Probes). Cet anticorps est rincé et les lames sont montées dans du Fluor Save (Calbiochem) puis observées au microscope à fluorescence. Les lames sont maintenues dans le noir et conservées à 4°C en dehors des observations et -20°C pour une conservation longue durée.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. CARACTERISATION DES COURANTS CALCIQUES A BAS SEUIL D'ACTIVATION DANS LE GANGLION VESTIBULAIRE PRIMAIRE A 17 JOURS DE GESTATION

A. INTRODUCTION

Cette partie du travail fait directement suite aux travaux réalisés au laboratoire sur le soma des neurones vestibulaires primaires de souris (Chambard *et al.*, 1999). Leurs résultats montrent, au cours du développement, une expression transitoire d'un courant calcique activé par le potentiel à bas seuil d'activation (famille des canaux $Ca_v3.x$) grâce à l'utilisation de la technique du patch clamp. L'expression de ce courant commence dès E15 et présente un pic à E17. Par la suite ce courant tend à disparaître après la naissance. Lors de cette étude, la seule sous-unité exprimant ce courant clonée était $Ca_v3.1$. Depuis deux autres sous-unités ont été caractérisées et clonées, ce sont $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.3$. Elles présentent des caractéristiques électrophysiologiques différentes.

Afin de déterminer le rôle physiologique de cette conductance, qui s'exprime transitoirement lors d'une phase critique du développement, il nous a semblé important de déterminer quelles sous-unités étaient responsables de ce courant dans les neurones vestibulaires primaires. Le stade de développement que nous avons choisi est 17 jours de gestation où l'on observe un pic d'expression de ce courant (Chambard *et al.*, 1999).

Dans un premier temps, une étude de biologie moléculaire, par l'utilisation de la RT-PCR, nous a semblé un bon moyen d'investigation. Cette technique permet d'identifier les ARNm présents dans l'échantillon étudié mais la présence de l'ARNm ne signifie pas toujours que la protéine est présente et active dans la membrane. Par contre, la technique d'électrophysiologie sur cellule entière permet de rendre compte de la fonctionnalité des protéines membranaires par l'étude de leurs propriétés biophysiques. Donc dans un deuxième temps une étude en patch clamp en mode potentiel imposé permettra de déterminer les sous-unités des canaux calciques de type T fonctionnelles sur le soma des neurones. L'identification des caractéristiques de ces canaux sera complétée par une étude de la sensibilité au nickel. Cet ion

divalent apparaît comme un des rares bloqueurs spécifique des canaux calciques de type T.

B. RESULTATS

1) RT-PCR sur ganglion entier

Cette technique consiste à amplifier un fragment du gène d'intérêt s'il est présent dans l'échantillon étudié. Nous avons donc utilisé des amorces pour les isoformes des canaux calciques dépendants du voltage à bas seuil d'activation. Ces isoformes sont $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.3$. Elles ont été clonées chez le rat et l'humain. Lors de cette étude la séquence des gènes était connue pour $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ chez la souris mais pas pour $Ca_v3.3$. Afin de pouvoir réaliser une amorce pour l'amplification de cette sous-unité dans notre étude sur le ganglion vestibulaire de souris, nous avons utilisé une séquence qui est conservé chez le rat et l'homme.

La caractérisation moléculaire des isoformes des canaux calciques présentes dans les neurones des ganglions vestibulaires primaires est réalisée par RT-PCR. La figure 1 montre l'électrophorèse du gel d'agarose des produits de RT-PCR obtenus sur les ganglions vestibulaires (figure1B) et sur le cortex total utilisé comme contrôle positif (figure 1A) à E17. Les trois sous-unités sont exprimées dans le cortex total. Dans les ganglions vestibulaires, l'ARNm de $Ca_v3.2$ semble être plus exprimé, toutefois des bandes correspondantes à $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.3$ sont aussi détectées. L'identité moléculaire de chaque produit de PCR a été déterminée par séquençage direct. Les contrôles négatifs utilisés qui sont l'ARN inverse non transcrit et de l'eau, sont réalisés simultanément et ne montrent pas d'amplification spécifique (résultats non montrés). Les tailles attendues pour les produits d'amplification sont 327 pb ($Ca_v3.1$), 459 pb ($Ca_v3.2$), 300 pb ($Ca_v3.3$) et 452 pb (GAPDH).

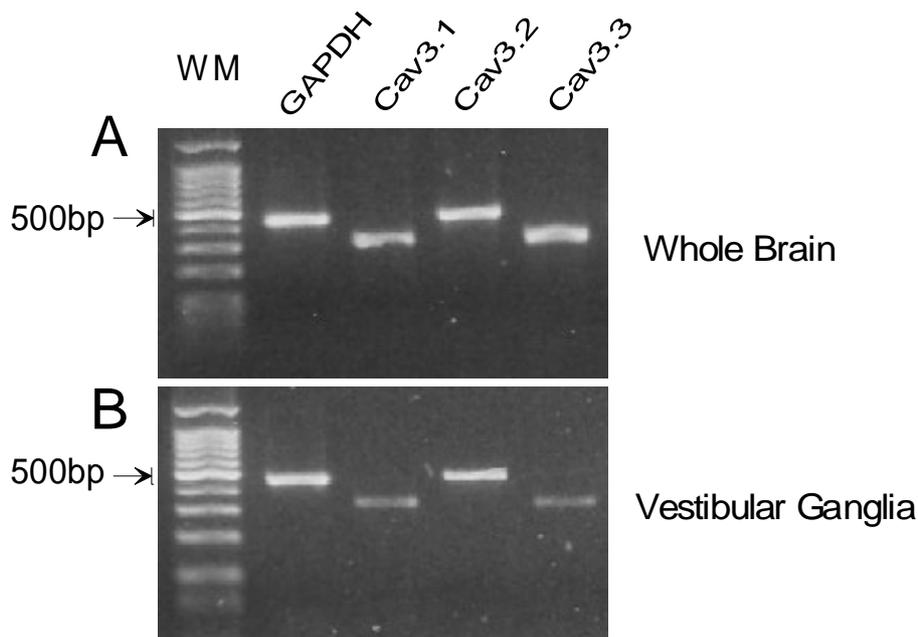


Figure 1 : Identification moléculaire des sous-unités des canaux calciques de type T exprimées dans les ganglions vestibulaires. L'électrophorèse sur gel d'agarose montre les produits d'amplification obtenus après RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques pour chaque isoforme, Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 dans les ganglions vestibulaires à E17. Le cortex total est utilisé comme contrôle positif.

Ainsi cette étude de RT-PCR montre la présence de tous les ARNm des canaux calciques à bas seuil d'activation dans le tissu d'intérêt. Par la technique du patch clamp nous avons voulu alors déterminer les sous-unités présentes et fonctionnelles sur la membrane des somas des neurones vestibulaires primaires à E17.

Cependant cette étude a été réalisée sur ganglion total, qui contient des neurones mais aussi d'autres types cellulaires comme les cellules gliales et les cellules des vaisseaux sanguins.

2) Caractérisation électrophysiologique des courants calciques de type T dans les neurones vestibulaires primaires.

Les préparations de neurones sont réalisées à E17 et utilisées entre deux et six heures. Les courants calciques à bas seuil sont enregistrés en présence de 2 mM calcium dans le milieu extracellulaire, sauf exception qui sera signalée. Ces courants sont analysés en mode voltage imposé et en présence de toxines et drogues bloquant toutes les autres conductances activées par le potentiel. Les différentes

caractéristiques de ce courant vont être analysées à l'aide de protocoles spécifiques permettant de déterminer les sous-unités fonctionnelles à la membrane des corps cellulaires des neurones.

(a) Amplitude du courant

Les cellules sont maintenues à un potentiel de -100 mV, un protocole de rampe de potentiel va nous permettre de mettre en évidence la présence ou l'absence de courant de type T. C'est à ce potentiel que seront réalisés les protocoles déterminant l'amplitude du courant. La figure 2 illustre ces enregistrements de courants calciques sur des rampes de potentiel, puis sur des protocoles de dépolarisation où la dépolarisation dépend du pic mesuré sur la rampe. En se basant sur l'amplitude des courants calciques de type T, les neurones vestibulaires primaires peuvent être divisés en deux populations (Chambard *et al.*, 1999). Le premier groupe contient les neurones ayant des courants de type T supérieur à 200 pA, et le deuxième groupe les neurones ayant des courants de type T inférieur à 60 pA. L'analyse du courant de type T pour chaque groupe, nous permet de déterminer, à partir de la rampe, le potentiel où le courant est maximal. Ainsi, dans le premier groupe, celui où les courants sont supérieurs à 200 pA, le potentiel correspondant au courant maximal est de -38.4 ± 5.5 mV (n=21). L'amplitude moyenne du courant, déterminée sur des protocoles de stimulation est de 495 ± 255 pA (n=21). Concernant la deuxième population, celle où l'amplitude des courant n'excède pas 60 pA, le potentiel correspondant au courant maximal est de -42.2 ± 4.5 mV et l'amplitude moyenne du courant est de 39 ± 13.5 pA (n=8).

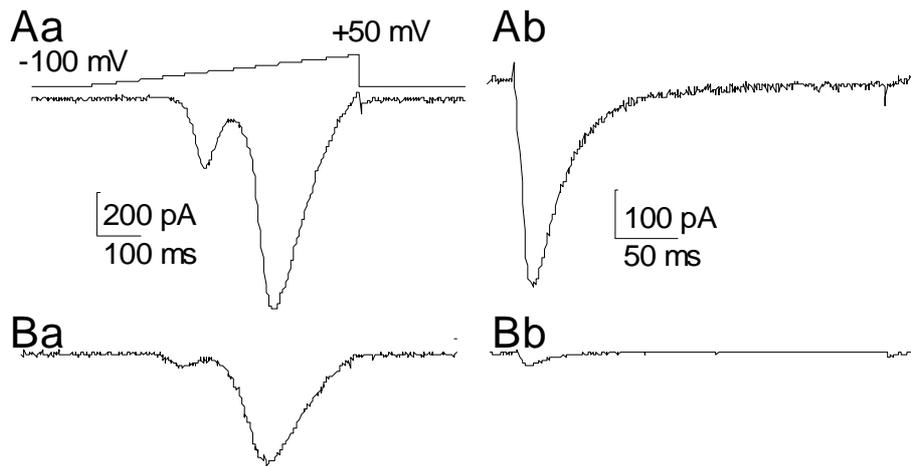


Figure 2 : Courants calciques de type T enregistrés dans les neurones vestibulaires primaires à 17 jours de gestation dans les deux populations de neurones. A gauche les rampes de potentiel typique pour les deux populations de neurones et à droite, les courants évoqués correspondant, pris au pic d'amplitude sur la rampe.

(b) Activation et inactivation

La première partie de ce travail a été de déterminer les constantes d'activation et d'inactivation de ces canaux. En effet ces paramètres apparaissent un bon moyen pour différencier les sous-unités de type T, alors que $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ présentent des cinétiques similaires assez rapides, $Ca_v3.3$ possède des cinétiques d'activation et d'inactivation six fois plus lentes (Chemin *et al.*, 2002a; Klockner *et al.*, 1999). Pour cela, notre étude s'est portée sur les cinétiques du courant de type T. Pour les neurones possédant un large courant de type T, le temps au pic de l'activation est de 14.8 ± 2.3 ms ($n=18$) et l'inactivation a une constante de temps t de 23.4 ± 2.6 ms ($n=19$). Concernant les courants de faible amplitude, le temps au pic est de 16.5 ± 2.3 ms ($n=8$) et la constante de temps d'inactivation est de 25.8 ± 4.8 ms. Malgré la différence d'amplitude des courants, ces valeurs ne présentent pas de différence significative ($p = 0.2$). La figure 3 présente la courbe courant/potentiel enregistrée dans les neurones vestibulaires dont le courant calcique de type T est de grande amplitude, pour le pic et le courant de queue ($n=20$). Les courants calciques de type T sont activés entre -60 et -50 mV alors que les courants calciques de type haut seuil sont eux activés à partir de -20 mV.

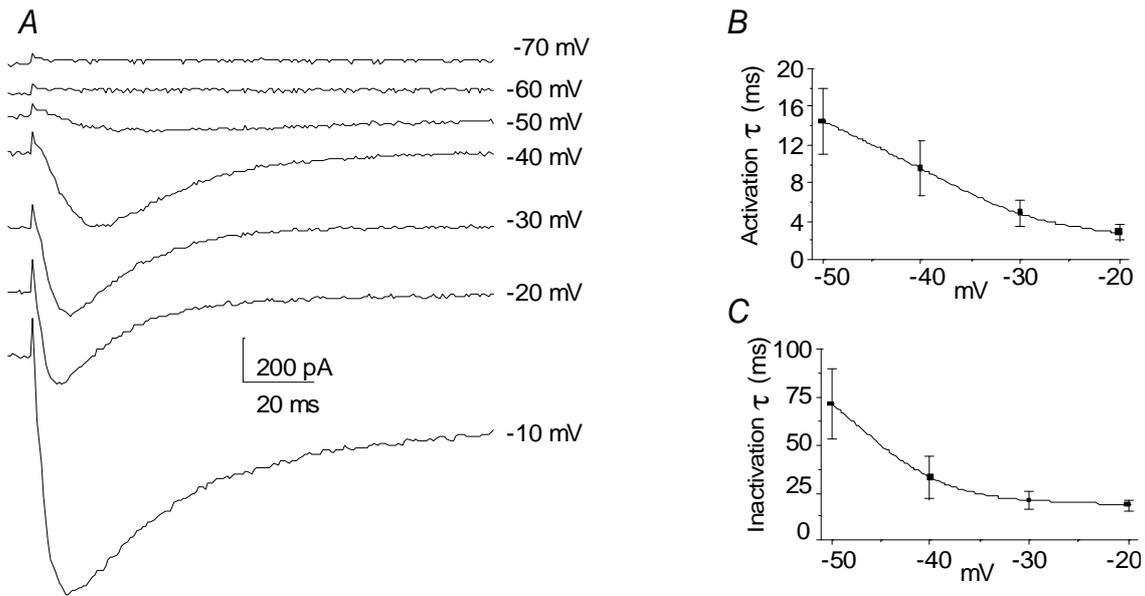


Figure 3: Propriétés d'activation et d'inactivation des courants calciques à bas seuil d'activation enregistrées dans les neurones vestibulaires primaires à 17 jours de gestation. En B et C, représentation par des ajustements de Boltzman des cinétiques d'activation et d'inactivation

Le deuxième graphe représente les courbes d'activation (figure 3B) et d'inactivation (figure 3C) du courant normalisé en fonction du potentiel. Ces courbes sont ajustées par des équations de Boltzmann, on obtient alors $V_{1/2ac} = -43.4 \pm 1.1 \text{ mV}$ et $V_{1/2inac} = -58.2 \pm 0.3 \text{ mV}$. Ceci permet de déterminer la fenêtre du courant, qui se situe entre -65 et -45 mV.

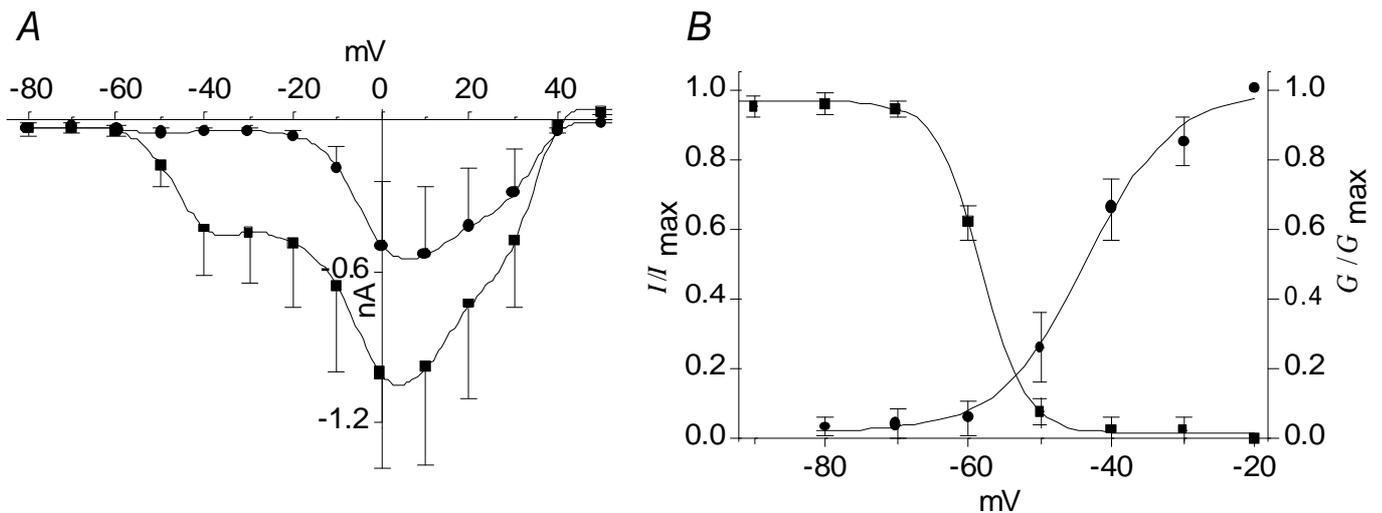


Figure 4: Propriétés d'activation et d'inactivation des courants de type T de grande amplitude. Courbe courant/potentiel du courant calcique global (les carrés sont pris au pic et les rond le courant de queue). Distribution de Boltzmann de l'activation et l'inactivation. Les équations utilisées sont présentées dans la partie matériels et méthode.

Les neurones vestibulaires primaires présentent donc des cinétiques d'activation et d'inactivation rapides, proches de celles déterminées pour Ca_v3.1 et Ca_v3.2, suggérant que ces sous-unités pourraient induire le courant de type T.

(c) Déactivation

La déactivation est une autre propriété des canaux ioniques, elle permet de différencier les trois isoformes des canaux calciques de type T. En effet Ca_v3.3 présente des cinétiques de déactivation plus rapides que celles de Ca_v3.2 et Ca_v3.1 (Chemin *et al.*, 2002a; Klockner *et al.*, 1999 ; Mcrory *et al.*, 2001). Afin d'analyser les propriétés de déactivation, les cellules sont maintenues à -100 mV, puis stimulées à -40 mV pendant 8 ms et enfin des sauts de potentiel variant de -60 à -140 mV sont appliqués. La figure 4 montre la déactivation du courant calcique de type T. Le courant de queue de déactivation est analysé par une fonction monoexponentielle. Ont été étudiées les déactivations pour les neurones des deux populations c'est-à-dire lorsque sont présents les grands courants mais aussi les petits courants. D'autre part, dans la population de neurones présentant des grands courants, les déactivations ont été étudiées en condition contrôle et après application de Ni²⁺ à 10 μM, afin de bloquer la composante hautement sensible au nickel. En condition contrôle, pour la population de neurones possédant un grand courant de type T, la constante de temps de déactivation est de 5.28 ± 1 ms à -60 mV et 0.52 ± 0.09 ms à -140 mV (n=12), ceci est illustré sur la figure 5. Sur ces mêmes neurones, après application de 10 μM de Ni²⁺, la constante de déactivation devient 8.6 ± 3.2 ms et 1.1 ± 0.19 ms (n=4) respectivement.

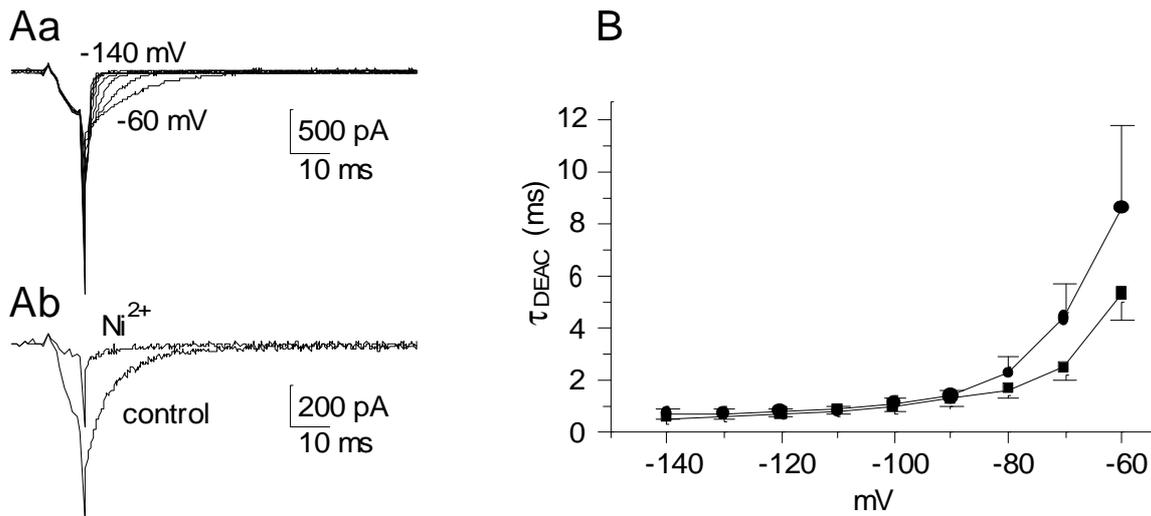


Figure 5 : propriété de désactivation des canaux calciques de type T enregistrée dans les neurones vestibulaires primaires à 17 jours de gestation. Aa représente les traces enregistrées lorsque le courant calcique est de forte amplitude, Ab représente ces mêmes traces lorsque le courant est de faible amplitude et B représente les cinétiques de désactivation.

Alors que $Ca_v3.3$ désactive rapidement, les cinétiques de désactivation enregistrées dans les neurones vestibulaires primaires sont plus lentes. Ceci suggère la présence de $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ seulement dans ce système. Il semblerait que les neurones possèdent deux sous-unités dont les propriétés diffèrent. En effet, les cinétiques de désactivation présentent des différences significatives ($p = 0.05$), ce qui laisse supposer la coexistence de deux unités ou d'un épissage alternatif d'une même sous-unité.

(d) Réactivation

Une autre des caractéristiques électrophysiologiques des canaux calciques dépendants du potentiel à bas seuil d'activation permet de différencier les sous-unités $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$. Cette caractéristique est la cinétique de réactivation. Cette dernière se mesure par application successive de deux sauts de potentiel de même intensité, seul l'intervalle de temps entre les deux sauts de potentiels va varier. Cette augmentation de temps, va permettre une augmentation du courant entrant lors du deuxième saut de potentiel. Après plusieurs secondes, le courant entrant lors du deuxième saut de potentiel va redevenir maximal. L'amplitude du courant est normalisée entre le premier saut de potentiel et le second. Il est étudié comme une fonction de la durée de l'intervalle de temps. Comme dans le cas de la désactivation,

cette caractéristique va être étudiée dans trois conditions : en contrôle dans le cas des neurones possédant un grand courant de type T, et après application de $10 \mu\text{M}$ de Ni^{2+} , toujours dans cette population et enfin en contrôle dans le cas de la population de neurones possédant un petit courant de type T.

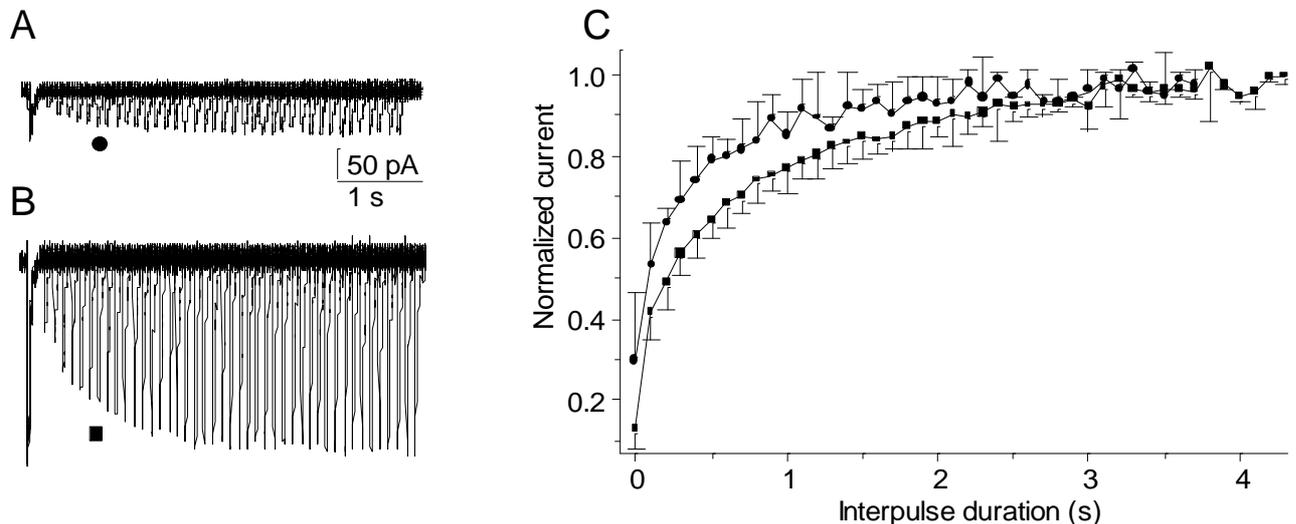


Figure 6 : propriété de réactivation des canaux calciques de type T enregistrée dans les neurones vestibulaires primaires à 17 jours de gestation. En A et B, traces enregistrées sur un neurone. En A, en présence d'un courant de forte amplitude alors qu'en B en présence d'un courant de faible amplitude. En C, amplitude du courant normalisé en fonction de la durée entre les deux stimulations, dans chacun des cas.

Les courbes des cinétiques de réactivation peuvent être analysées par une fonction monoexponentielle, ce qui permet de déterminer des constantes de temps de réactivation qui sont, pour la population de neurones avec un grand courant de type T en contrôle 571 ± 140 ms ($n=22$), en présence de $10 \mu\text{M}$ de Ni^{2+} 403 ± 148 ms et en condition contrôle pour la population de neurone avec un petit courant de type T 448 ± 171 ms. Toutefois, ces traces sont mieux analysées par une fonction double exponentielle, ce qui permet de déterminer deux composantes de cinétique de réactivation, une composante rapide et une composante lente. Les constantes de temps de réactivation, analysées par une double exponentielle, sont alors de : en condition contrôle pour la population de neurones ayant un grand courant de type T 1394 ± 255 ms pour la composante lente et 117 ± 36 ms pour la composante plus rapide ($n=22$). En présence de $10 \mu\text{M}$ de Ni^{2+} dans cette population de neurones, les constantes de temps de réactivation sont alors de 665 ms pour la composante lente et 103 ms pour la composante rapide. Enfin dans la population de neurones ayant un

courant calcique de type T de faible amplitude, les constantes de temps de réactivation sont de 932 ± 95 ms pour la composante lente et 69 ± 38 ms pour la composante rapide ($n=6$). Le coefficient de corrélation étant meilleur en présence d'une double exponentielle par rapport à une fonction mono exponentielle, ceci indique clairement que la réactivation peut se diviser en deux phase distinctes comme le suggèrent Berthier et coll (Berthier *et al.*, 2002).

Les valeurs des constantes de réactivation présentent des différences significatives entre les neurones dont le type T est de forte amplitude et les neurones dont le type T est de faible amplitude. Par contre la différence entre ces valeurs n'est plus significative, lorsque sont comparés les neurones avec un type T de faible amplitude et ceux avec un type T de forte amplitude mais en présence de $10 \mu\text{M}$ de Ni^{2+} .

Une analyse de la réactivation dans la population de neurones ayant encore du type T, au stade P5, c'est-à-dire cinq jours après la naissance, montre que les valeurs de constante de réactivation sont de 72 ± 18 ms et 1022 ± 210 ms ($n=3$), ceci n'est pas significativement différent des valeurs obtenues à E17 pour les neurones ayant un petit courant calcique de type T ($p = 0.2$).

Ces résultats électrophysiologiques suggèrent la présence fonctionnelle à la membrane des corps cellulaires des neurones de deux sous-unités calciques à bas seuil d'activation différentes. La première sous-unité, celle qui génère un courant de forte amplitude semble être $\text{Ca}_v3.2$, tandis que l'identité de l'autre sous-unité ne peut être définie avec certitude. Elle paraît présenter des caractéristiques de $\text{Ca}_v3.1$ mais pas totalement.

3) Effet d'un stimulus mécanique : flux de milieu extracellulaire

Il existe un autre point très intéressant concernant la caractérisation de $\text{Ca}_v3.2$, comme cela a été montré (Bouskila et Bostock, 1998; Shin *et al.*, 2003), il est directement activé par un stimulus mécanique. Afin d'étudier ceci, des neurones vestibulaires primaires ont été stimulés par un système de perfusion rapide dont la vitesse de libération du flux de milieu est calibrée et peut être régulée (augmentation ou diminution de la vitesse du flux). D'autre part, ce système permet la libération d'un

milieu choisi (ici est choisi le milieu d'enregistrement directement prélevé dans le bain), et de calibrer de manière fixe le volume délivré pour chacun des tests. Durant la libération du milieu, un protocole d'enregistrement des courants calciques à bas seuil d'activation est utilisé. Ce système n'a été utilisé que sur la population de neurones qui exprime un large courant calcique de type T.

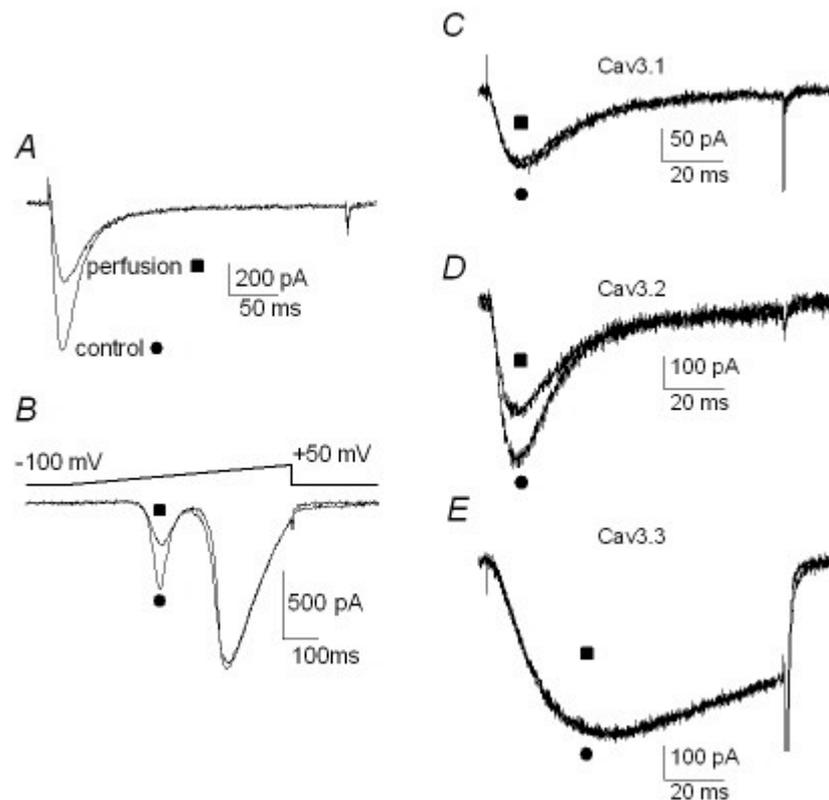


Figure 7 : effet de la perfusion du milieu extracellulaire sur l'amplitude du courant calcique de type bas seuil. En A et B, dans le cas des neurones vestibulaires primaires et en C, D et E sur des modèles d'expression pour chaque canal de type bas seuil.

Lors de cette étude, la diminution de l'amplitude des courants calciques à bas seuil d'activation est constatée, tandis que les courants calciques à haut seuil d'activation ne sont pas affectés par ce phénomène. La diminution de l'amplitude du courant peut atteindre 40% pour les vitesses de libération du milieu les plus grandes (figure 7A et 7B). Afin d'identifier les sous-unités affectées par cet effet de la perfusion, des cellules HEK-293 ont été transfectées avec un ADNc des canaux calciques de type T, ainsi qu'un gène rapporteur CD8 permettant de repérer les cellules exprimant le gène d'intérêt. Par la suite, ces cellules vont être enregistrées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Alors que $Ca_v3.1$ et

Ca_v3.3 restent insensibles à ce stimulus mécanique même pour les vitesses de libération du flux les plus élevées (figure 7C et 7^E), les canaux calciques Ca_v3.2 voient leur courant diminuer dans 11 des 12 cellules enregistrées (figure 7D). L'amplitude du courant est réduite jusqu'à 35%. Ces résultats suggèrent fortement une inactivation directe de Ca_v3.2 par un stimulus mécanique. La similitude des réponses enregistrées dans les neurones vestibulaires primaires à E17 et dans les cellules HEK-293 transfectées renforce l'hypothèse que le grand courant calcique de type T de ces neurones est sous tendu par la sous-unité Ca_v3.2. Les expérimentations concernant les canaux calciques de type T exprimés dans les cellules HEK-293 ont été réalisées en collaboration avec le Dr P. Lory dans le laboratoire de Dr J. Nargeot.

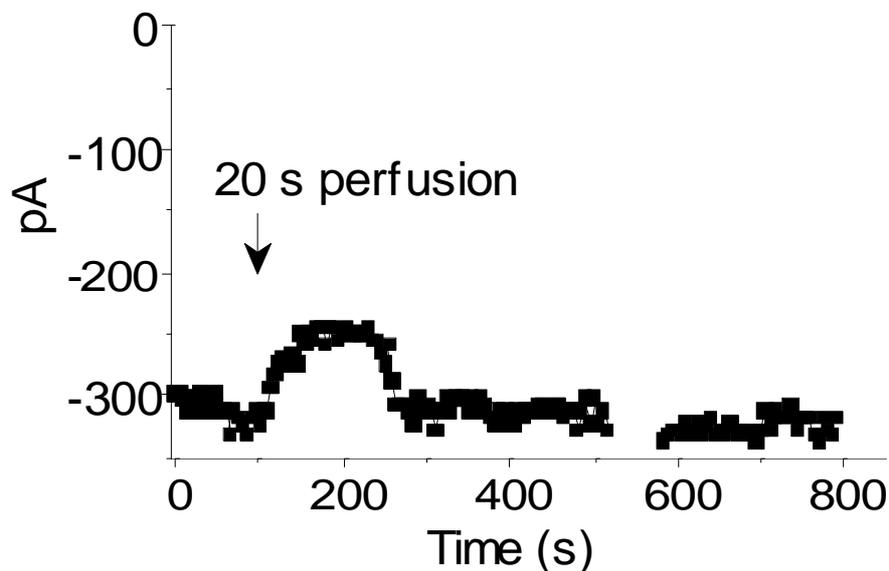


Figure 8 : Enregistrement de longue durée montrant la réversibilité de l'effet de la perfusion de milieu extracellulaire sur les neurones vestibulaires primaires. Une application du milieu d'enregistrement induit une diminution de l'amplitude du courant qui est maximale au bout de 60s qui est suivie d'une augmentation du courant jusqu'à son amplitude initiale en 220s.

Comme ceci est illustré dans la figure 8, des enregistrements de longue durée des courants calciques de type T dans les neurones vestibulaires primaires montrent que la diminution du courant induit par un flux de milieu est réversible. En effet l'amplitude du courant revient à son état initial entre 5 et 15 minutes après la perfusion, en fonction des cellules (n=4)

4) Courbe dose réponse au Nickel sur courants calciques de type T des neurones vestibulaires primaires

Le dernier point sur lequel nous avons travaillé est la sensibilité au nickel. En effet, même s'il n'existe pas de bloqueurs réellement spécifiques des canaux calciques à bas seuil d'activation (Perez-Reyes, 2003; Perez-Reyes *et al.*, 1998), ces canaux sont sensibles à certaines drogues telles que le nickel ou le mibéfradil. $Ca_v3.2$ présente une sensibilité plus grande au nickel que les autres sous-unités calciques générant un courant de type T. Comme $Ca_v3.2$ est sensible à la perfusion, la réponse mécanique est bloquée avant les tests du nickel par application d'un flux constant à faible débit de milieu extracellulaire. Lorsque l'amplitude de courant devient stable, des concentrations croissantes de nickel sont appliquées dans le bain de culture. Les figures 9 et 10 montrent la diminution de l'amplitude du courant en fonction de la concentration en Nickel appliquée ainsi que l'analyse par une équation de Hill.

Sur la figure 9, cette courbe est analysée par une équation simple de Hill sous la forme $I(x)=Ax^n/(IC_{50}I^n+x^n)$. Cette analyse permet de déterminer une concentration de demi-inhibition du courant (IC_{50}) de $13.4 \mu M$. Le coefficient de Hill est alors de 0.7 ± 0.1 .

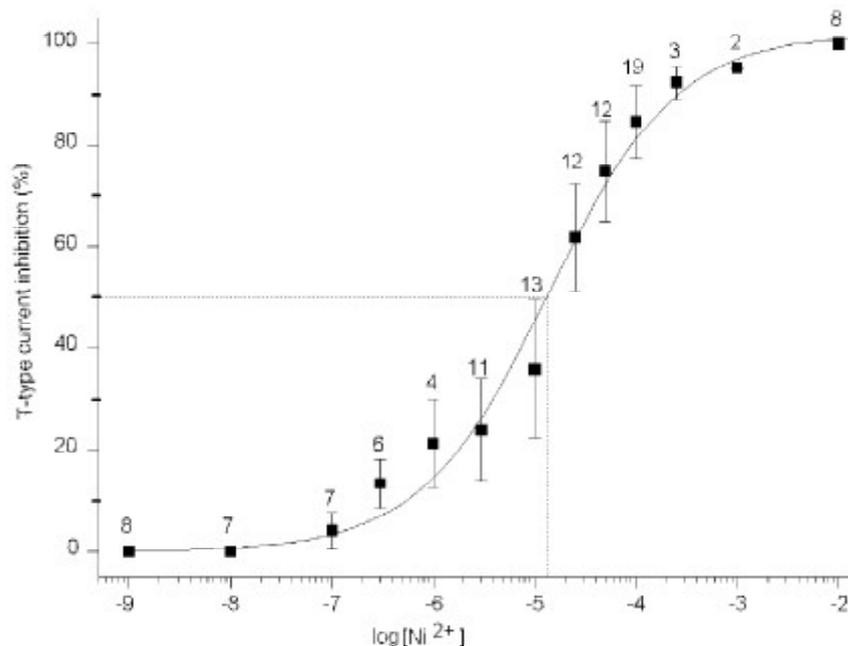


Figure 9 : Courbe représentant la diminution de l'amplitude du courant calcique de type T en fonction de la concentration en Ni^{2+} appliquée dans le milieu extracellulaire. La courbe en trait plein représente l'analyse avec une équation de Hill. Le nombre d'observations est noté au-dessus de chaque barre représentant l'écart type.

Toutefois, lorsque nous observons le tracé des points obtenus, il apparaît que cette courbe peut aussi être analysée par une équation double Hill de la forme : $I(x) = [A1 \cdot x^{n1} / (IC_{50}1^{n1} + x^{n1})] + [A2 \cdot x^{n2} / (IC_{50}2^{n2} + x^{n2})]$. Dans ce cas, A1 et A2 représentent la réponse maximale obtenue pour chacune des composantes et n1 et n2 les coefficients de Hill respectifs. Lorsque la courbe est analysée avec cette fonction, comme ceci est illustré sur la figure 10, elle révèle deux sensibilités au nickel. La première qui représente la plus grande partie du courant est de 0.23 μ M et la deuxième IC_{50} est 23 μ M. On constate que ces IC_{50} sont inférieures à celles habituellement décrites dans la bibliographie pour les différentes sous-unités calciques à bas seuil d'activation.

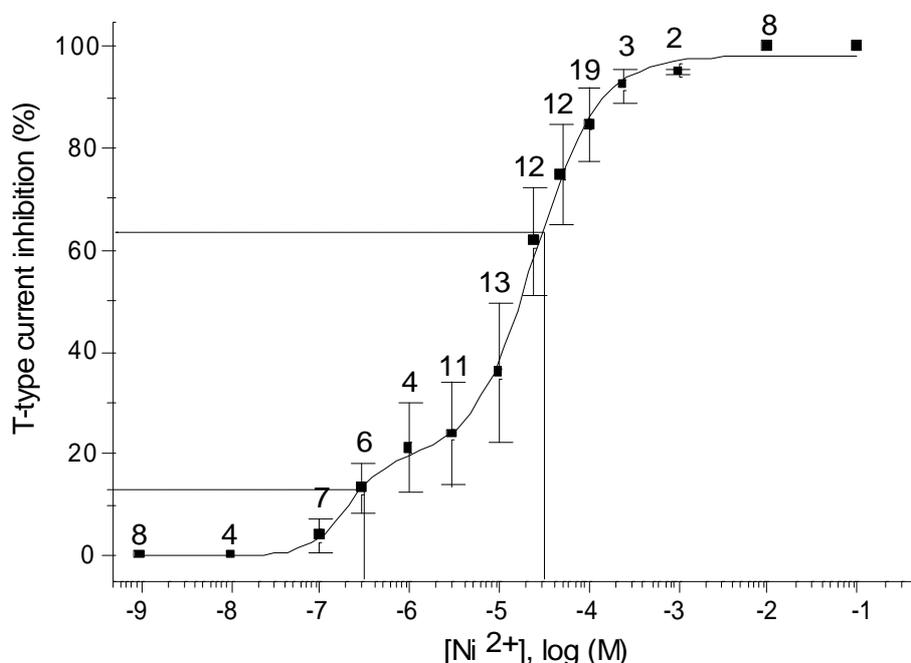


Figure 10 : Courbe représentant la diminution de l'amplitude du courant calcique de type T en fonction de la concentration en Ni^{2+} appliquée dans le milieu extracellulaire. Le trait plein liant les points représente l'analyse réalisée avec une équation double Hill.

La possibilité de cette double analyse rend plus complexe l'interprétation des résultats. En effet, deux groupes distincts de neurones ont été identifiés. Ces groupes ont des courants calciques d'amplitude différente mais aussi des caractéristiques électrophysiologiques différentes. Ceci laisse penser que nous sommes en présence d'au moins deux sous-unités différentes. Toutefois lors de l'analyse de la courbe dose réponse du nickel avec la deuxième équation les

sensibilités révélées sont plus élevées que celles enregistrées pour les modèles d'expression hétérologue des sous-unités calciques à bas seuil d'activation. Ceci avait déjà été observé par Perchenet et coll (Perchenet *et al.*, 2000).

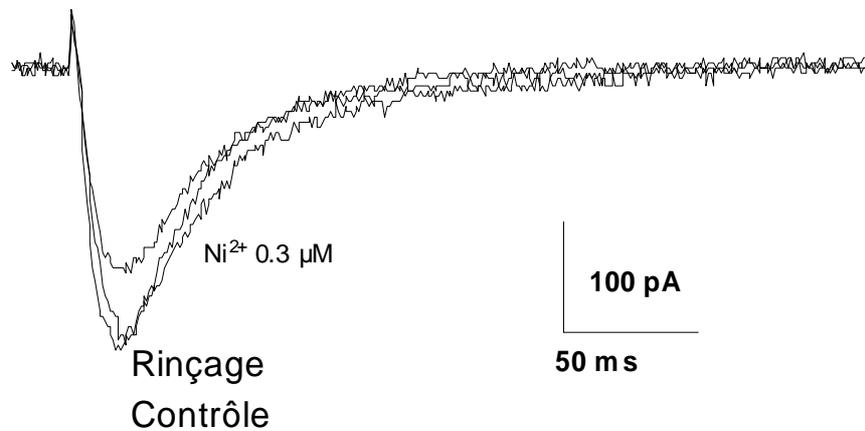


Figure 11 : L'application de Ni^{2+} $0.3 \mu M$ lors de l'enregistrement des courants calciques de type T dans les neurones vestibulaires est réversible.

L'enregistrement de la figure 11 montre que, malgré la grande affinité au nickel des canaux calciques de type T, une application de $0.3 \mu M$ de Ni^{2+} inhibe partiellement le courant calcique et est complètement réversible après rinçage (n=5)

Toute cette étude du courant calcique à bas seuil d'activation avait pour objectif d'identifier la sous-unité impliquée dans la genèse de ce courant. Il est complexe de définir exactement si plusieurs sous-unités sont impliquées. En effet, les différents résultats obtenus démontrent avec certitude la présence de $Ca_v3.2$ dans la population de neurones dont le courant calcique de type T est de forte amplitude. Toutefois, reste la population de neurones présentant un faible courant calcique, où les résultats semblent indiquer la présence de $Ca_v3.1$.

C. DISCUSSION

Dans cette première partie, nous nous sommes principalement intéressés à la caractérisation des courants calciques à bas seuil d'activation exprimés à des stades précoces de la différenciation des neurones vestibulaires primaires. Une étude préliminaire a démontré une présence transitoire d'un courant calcique de type T de grande amplitude entre E14 et E17 qui tend à disparaître ensuite (Chambard *et al.*,

1999). A P5, cette conductance se restreint aux neurones de gros diamètre (Desmadryl *et al.*, 1997). Il est à noter que, quel que soit le stade de développement, ce courant ne présente pas de différence dans ses cinétiques d'activation et d'inactivation (Chambard *et al.*, 1999). Tous ces travaux révèlent que l'expression des canaux calciques de type T est donc régulée au cours du développement, il apparaît donc majeur de caractériser les différentes sous-unités impliquées dans la genèse de ce courant. En effet, cette expression durant la période critique de poussée neuritique et de synaptogenèse pourrait influencer sur les processus ontogéniques qui déterminent le schéma d'innervations des afférences du système vestibulaire. En se basant sur leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques, nos résultats indiquent la présence fonctionnelle de deux sous-unités calciques de type T dans les neurones vestibulaires primaires. L'isoforme principale, qui génère un grand courant, est Ca_v3.2, elle est régulée temporellement au cours du développement embryonnaire. La seconde isoforme génère un courant de plus faible amplitude et qui présente de nombreuses différences en regard au courant induit par Ca_v3.2. Cette sous-unité est Ca_v3.1. Cette étude est une des premières caractérisations de la nature des sous-unités calciques de type T dans le neurone sensoriel natif.

1) Expression des sous-unités Ca_v3 dans les ganglions vestibulaires

La caractérisation moléculaire des isoformes des canaux calciques de type T exprimés dans les ganglions vestibulaires a été réalisée par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques pour chaque isoforme. Pour cette étude, nous avons utilisé des ganglions vestibulaires entiers, c'est-à-dire un tissu comportant différents types de cellules. En effet, on retrouve les corps cellulaires des neurones mais aussi des cellules gliales ainsi que des hématies et autres cellules sanguines et vasculaires. Ainsi, les ARNm amplifiés par cette technique ne proviennent pas seulement des cellules d'intérêt. D'autre part, la présence des ARNm n'est pas toujours la représentation de la fonctionnalité de la protéine. En effet, l'ARNm peut être transcrit mais non traduit en protéine, ou bien il peut être traduit en protéine mais celle-ci est présente et non fonctionnelle ou stockée dans des vésicules de réserve. Ainsi, la RT-PCR révèle la présence de l'ARNm pour les trois sous-unités Ca_v3. Cette RT-PCR a été réalisée dans des conditions où la même quantité d'ARN a été utilisée pour

chaque couple d'amorce, le gel d'électrophorèse montre une expression majoritaire de l'ARNm de la sous-unité $Ca_v3.2$. Ce résultat est à tempérer avec le fait que nous n'avons pas réalisé une RT-PCR quantitative. Il s'agit d'une estimation qualitative au vu des résultats obtenus. La nature des produits de PCR a été déterminée par séquençage direct. Elle correspond pour chacune des sous-unités à la séquence attendue avec 100% d'homologie. Les numéros d'accession à la banque de gènes sont donnés dans le chapitre matériel et méthode.

2) Caractérisation électrophysiologique des courants calciques de type T dans les neurones vestibulaires primaires.

Nos résultats ont révélé la présence de deux populations de neurones clairement séparables en fonction de l'amplitude de leur courant calcique de type T au cours du développement précoce des neurones vestibulaires primaires. La première population comprend les neurones dont le courant calcique de type T est de forte amplitude (>200 pA) alors que la deuxième population regroupe les neurones dont le courant calcique de type T est de faible amplitude (<60 pA). Cette étude a été réalisée à E17. A partir de ces résultats, il apparaissait intéressant d'étudier la nature de la ou des sous-unités calciques de type T impliquées ainsi que vérifier si le courant des deux populations était du à la même sous-unité ou deux sous-unités différentes.

Les paramètres électrophysiologiques que nous avons étudiés ont permis de différencier les sous-unités et de les caractériser. Les courants calciques de type T dans les neurones vestibulaires, dans les deux populations de neurones, ont des cinétiques d'activation et d'inactivation rapides similaires à celles décrites pour $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ tandis que $Ca_v3.3$ présente des cinétiques d'activation et d'inactivation six fois plus lentes (Chemin *et al.*, 2002a; Klockner *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 1999a ; Mcrory *et al.*, 2001). Afin d'affiner la caractérisation, nous avons étudié d'autres paramètres électrophysiologiques. Ainsi nous avons mesuré dans un premier temps les cinétiques de désactivation qui sont un autre critère majeur de séparation des sous-unités calciques de type T. En effet, les courants générés $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ désactivent plus lentement que le courant induit par $Ca_v3.3$ (Klockner *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 1999a ; Mcrory *et al.*, 2001). Les cinétiques de désactivation des courants calciques des neurones de la première population ont été étudiées et,

concernant le courant calcique global, nos résultats montrent que les courants calciques désactivent avec des cinétiques proches de celles des courants enregistrés dans des systèmes d'expression comme les cellules HEK-293 pour Ca_v3.1 et Ca_v3.2 (Chemin *et al.*, 2002a ; Klockner *et al.*, 1999 ; Kozlov *et al.*, 1999 ; Mcrory *et al.*, 2001). Toutefois, concernant cette population, la constante de temps de désactivation semble plus rapide que celle décrite pour Ca_v3.2 et semble plus proche de celle donnée pour Ca_v3.1 (Chemin *et al.*, 2002a; Klockner *et al.*, 1999). Lorsque cette large conductance est bloquée par l'application de 10 µM de Ni²⁺, la désactivation mesurée sur le courant restant est plus lente. A cette concentration de nickel, la fraction du courant induit par Ca_v3.2 est bloquée, il ne reste donc que le courant induit par Ca_v3.1. Une cinétique de désactivation plus rapide pour Ca_v3.2 que pour Ca_v3.1 a été décrite au niveau des canaux calciques de type T du cerveau de rat (Mcrory *et al.*, 2001). Lors de toutes les études réalisées pour caractériser les paramètres électrophysiologiques des courants des sous-unités calciques de type T, de nombreuses inégalités ont été mesurées, dues à la différence d'espèces ou bien à une disparité entre un courant enregistré dans un neurone natif et un système d'expression. Il est important de noter que le potentiel de demi-inactivation à l'état stable est plus positif de 15 mV dans le neurone vestibulaire que celui décrit pour les canaux clonés. Ceci pourrait être dû à des régulations spécifiques des canaux calciques de type T qui ne sont pas encore identifiées.

De la même manière, les cinétiques de réactivation ont été enregistrées. Cette dernière caractéristique électrophysiologique est celle qui permet le mieux de distinguer les courants induits par Ca_v3.2 de ceux induits par Ca_v3.1 (Chemin *et al.*, 2002a; Klockner *et al.*, 1999). Les deux populations de neurones présentent des différences significatives dans les constantes de temps de la réactivation. En effet, les neurones ayant de grands courants calciques de type T ont des constantes de temps de réactivation plus lentes que celles obtenues pour les courants de la deuxième population de neurones. Or Ca_v3.2 a une réactivation plus lente que Ca_v3.1 (Chemin *et al.*, 2002a ; Perez-Reyes *et al.*, 1998). Ceci suggère donc que le grand courant calcique de type T enregistré à E17 dans les neurones vestibulaires est produit par Ca_v3.2. Dans la population de neurones ayant des petits courants calciques de type T, les cinétiques de réactivation suggère que seule la sous-unité Ca_v3.1 est présente et fonctionnelle. De plus, les résultats obtenus après application de 10µM de Ni²⁺ suggèrent une coexistence de Ca_v3.2 et Ca_v3.1 dans les neurones

ayant un grand courant calcique de type T. Concernant l'analyse de la réactivation de $Ca_v3.2$, elle a été décrite en utilisant une double exponentielle pour les courants calciques de type T natifs dans les neurones (Bossu et Feltz, 1986 ; Takahashi K. *et al.*, 1991). dans les cellules pituitaires (Herrington et Lingle, 1992) et les fibres du muscle squelettique (Berthier *et al.*, 2002) exprimant $Ca_v3.2$. Nos résultats indiquent que la mesure de la réactivation faite dans les neurones de la première population peut être séparée en deux phases comme décrit par Berthier et coll (Berthier *et al.*, 2002).

3) Sensibilité des courants calciques de type T

Un des points importants et novateurs de cette étude a été la mise en évidence d'une sensibilité des canaux calciques de type T à la perfusion. En effet l'application d'un flux de milieu extracellulaire diminue l'amplitude du courant dans les neurones vestibulaires primaires. Cet effet est réversible quelques minutes après l'arrêt de la perfusion. Nous avons observé un mécanisme d'inhibition comparable dans des cellules HEK-293 transfectées avec la sous-unité $Ca_v3.2$ des canaux calciques de type T et non avec $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.3$. De manière similaire, il a été montré que la sous-unité $Ca_v3.3$ est insensible aux stimuli mécaniques de la membrane (Calabrese *et al.*, 2002). Une sensibilité mécanique identique des canaux calciques de type T a été observée dans les cellules pituitaires antérieures de rat ((Ben-Tabou *et al.*, 1994) mais aussi dans les neurones sensoriels de rat (Bouskila et Bostock, 1998). Les mécanismes conduisant à la diminution du courant calcique entrant lors de l'application d'un flux restent inconnus, ce d'autant que seule la sous-unité $Ca_v3.2$ est affectée par ce mécanisme.

Les courants calciques de type T n'ont pas de pharmacologie connue et spécifique. Toutefois ils sont plus inhibés par certaines drogues telles que le mibéfradil ou certains ions tels que le Nickel. De plus au sein même de la famille des canaux calciques de type T, ils n'ont pas la même sensibilité au nickel notamment, en effet, $Ca_v3.2$ présente une concentration de demi inhibition (IC_{50}) 20 fois plus faible que $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.3$ (Lee *et al.*, 1999b). Les résultats que nous avons obtenus peuvent être interprétés de deux façons différentes. En effet dans un premier cas, l'analyse de la courbe dose réponse au nickel donne une seule IC_{50} de

13.4 μM qui est comparable à celle décrite pour la sous unité $\text{Ca}_v3.2$ clonée (Lee *et al.*, 1999b). Ceci est un argument important qui confirme la présence de $\text{Ca}_v3.2$ dans les neurones vestibulaires primaires. Toutefois de manière alternative, il est tout à fait possible de décrire l'analyse de cette courbe avec deux IC_{50} , comme cela a été fait sur la figure 10. Ces deux concentrations sont alors de 10 μM et 0.23 μM , la concentration la plus élevée correspond à ce qui est décrit dans la bibliographie concernant la sous-unité $\text{Ca}_v3.2$. Par contre, concernant l' IC_{50} la plus faible, une telle valeur n'a jamais été décrite. Cependant la plupart des études menées sur les canaux calciques de type T ont été réalisées sur des modèles d'expression et non sur des canaux natifs. L' IC_{50} décrite pour $\text{Ca}_v3.2$ dans les neurones sensoriels est de 3 μM (Dubreuil *et al.*, 2004) ce qui est plus faible que celle décrite dans les systèmes d'expression. D'autre part, il a été montré que la courbe dose réponse du nickel sur $\text{ca}_v3.2$ est mieux analysée avec une courbe biphasique et cette étude propose la présence de deux sites de liaison au nickel avec des sensibilités différentes (Perchenet *et al.*, 2000). De plus la plus faible des IC_{50} trouvée dans cette étude est de 1.9 μM . Ces résultats suggèrent une différence de sensibilité au nickel entre les systèmes d'expression et les modèles natifs. Ceci peut être du à la présence du canal dans un environnement qui lui est physiologique ou à celle de mécanismes régulateurs de ces canaux qui ne sont pas encore élucidés. En effet une étude réalisée en 2003 a montré pour la première fois qu'il existait un mécanisme de régulation de la sous unité $\text{Ca}_v3.2$ (Wolfe *et al.*, 2003). Cette régulation passe par la sous-unité $\beta_2\gamma_2$ des protéines G. Cette sous-unité se fixe sur la boucle intracellulaire du canal et inhibe son fonctionnement.

Nos résultats démontrent clairement la présence de la sous-unité $\text{Ca}_v3.2$ à un stade du développement embryonnaire où la pousse neuritique et la synaptogenèse entre le système afférent et les cellules sensorielles sont massives. La suite de ce travail nous a conduit à nous interroger sur le rôle de cette conductance au niveau de l'activité électrique des neurones. D'autre part nos résultats démontrent la présence d'une seconde conductance calcique, générée par $\text{Ca}_v3.1$, cette conductance est de faible amplitude mais semble persister au cours du développement périnatal chez la souris dans une faible proportion de neurones. Enfin, ces résultats mettent la lumière sur une nouvelle caractéristique électrophysiologique et fonctionnelle de la sous-unité $\text{Ca}_v3.2$ des canaux calciques qui est la sensibilité à la perfusion.

II. EVOLUTION DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE AU COURS DU DEVELOPPEMENT

A. INTRODUCTION

1- Suite à cette caractérisation de la présence du courant calcique à bas seuil d'activation généré par la sous-unité $Ca_v3.2$, nous avons étudié son rôle au niveau de l'activité électrique des corps cellulaires des neurones vestibulaires primaires. Cette étude a été réalisée à E17 puis à P0 et P6, afin de vérifier si l'activité électrique évoluait au cours du développement. En effet les travaux de Chambard et coll, en 1997 et 1999, montraient que le courant calcique de type T disparaissait au cours du développement ainsi que le courant de type P pendant la période périnatale (Chambard *et al.*, 1999 ; Desmadryl *et al.*, 1997).

2- Les entrées de calcium au cours du développement sont indispensables. La voie principale pour permettre ces influx est celle des canaux calciques dépendants du potentiel. Le rôle des canaux au cours du développement a été clairement identifié. En effet ils contribuent à la différenciation neuronale, la survie, la neuritogenèse ainsi que la synaptogenèse (Gu et Spitzer, 1997). La présence des courants calciques ainsi que leur influence dans l'activité électrique ont été clairement établies dans de nombreux modèles de vertébrés, comme les cellules chromaffines de rat (Bournaud *et al.*, 2001), les motoneurones phréniques de rat (Martin-Caraballo et Greer, 2001) et spinaux dans différentes espèces (Perrier *et al.*, 2002), et les neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale (Spitzer *et al.*, 1994).

3- Le rôle des deux grandes familles des canaux calciques au cours du développement a été étudié. Les courants calciques à bas seuil d'activation contribuent à la genèse d'une dépolarisation post potentiel d'action (ADP) (Umemiya et Berger, 1995 ; Viana *et al.*, 1993) et à des élévations spontanées de calcium intracellulaire (Gu et Spitzer, 1993). Les courants calciques à haut seuil d'activation sont responsables de la forme en plateau des potentiels d'action (Barish, 1991), de l'hyperpolarisation post potentiel en permettant l'activation de conductances potassiques dépendantes de l'entrée de calcium (Umemiya et Berger, 1994; Viana *et al.*, 1993) ainsi que la libération de neurotransmetteur (Rosato Siri et Uchitel, 1999).

4- Au vu de ces différents éléments ainsi que de la caractérisation des courants calciques dépendants du potentiel au cours du développement périnatal des neurones des ganglions de Scarpa chez la souris, nous avons étudié leur contribution à l'activité électrique, à E17, P0 et P6. Dans un premier temps, les propriétés actives et passives de la membrane ont été étudiées et comparées au trois stades de développement préalablement indiqués. Dans un deuxième temps, les différentes formes des potentiels d'action trouvées à E17 ont été analysées afin de comprendre quel est le courant qui les génère. Cette étude apporte des preuves sur la relation entre l'ontogenèse des conductances calciques dépendantes du potentiel et la maturation des propriétés électrophysiologiques des neurones vestibulaires primaires.

B. RESULTATS

Les préparations de neurones vestibulaires sont réalisées et enregistrées après un délai de deux à six heures. Ces enregistrements sont réalisés en mode courant imposé en présence de 2 mM de calcium. Les trois stades utilisés sont E17, P0 et P6. Lors de cette étude, des activités électriques présentant des caractéristiques différentes ont été enregistrées aux différents stades. La proportion de ces différentes formes sur la population totale des neurones varie.

1) Les différentes formes d'activité électrique

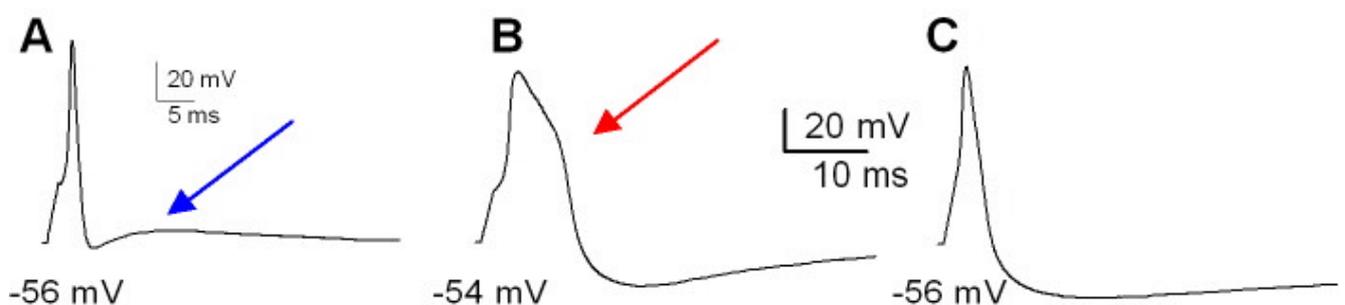
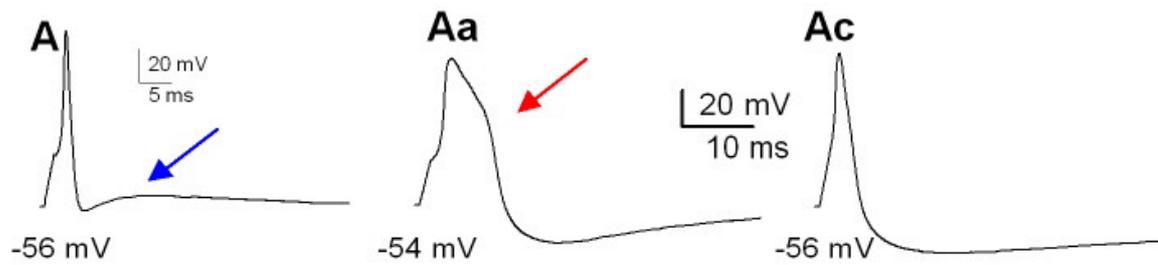


Figure 12 : les différentes formes d'activité électrique enregistrées à E17 au niveau des corps cellulaires des neurones vestibulaires. En A, un potentiel d'action suivi d'une dépolarisation post potentiel, ADP signalée par la flèche bleue. En B, un potentiel d'action avec un épaulement lors de la phase de repolarisation, celui-ci est

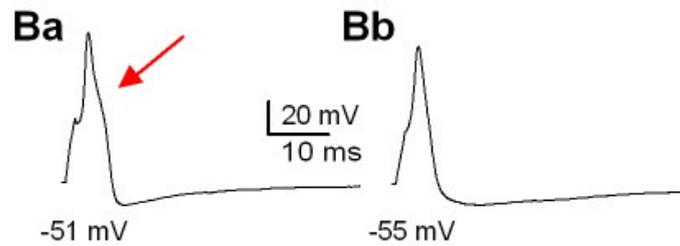
indiqué par la flèche rouge. En C une forme d'activité électrique classique avec une repolarisation rapide et une hyperpolarisation post potentiel.

Dans un premier temps, l'étude de l'activité électrique a été réalisée à E17. En effet c'est à ce stade que le courant calcique de type T est présent dans 98% des cellules. Nous avons mis en évidence trois formes d'activité électrique (figure 12). Cette différence de forme se situe au cours et à la fin de la phase de repolarisation. En effet lors de la phase de repolarisation, il existe dans un cas un épaulement, qui se traduit par une rupture de la pente de la phase de repolarisation (figure 12B). Dans un autre cas, cette différence se retrouve à la fin du potentiel d'action, où il n'est pas suivi par une hyperpolarisation post potentiel (AHP) mais par une dépolarisation post potentiel (ADP) (figure 12A). Il est intéressant de noter que la présence ou non de l'épaulement n'est pas corrélée avec la présence de l'ADP. En effet ces deux phénomènes peuvent se retrouver sur un même enregistrement sans que ce soit systématique. Ils semblent être induits par des composantes ioniques différentes. L'étude de ces différentes formes et notamment la détermination de la conductance ionique qui provoque ces modifications de l'activité électrique seront vues en détail plus loin.

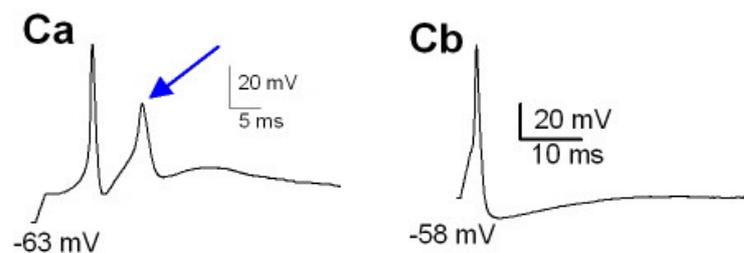
Après avoir caractérisé ces différentes formes d'activité électrique, nous avons étudié leur évolution au cours du développement (figure 13). Elles ont été obtenues à tous les stades de gestation mais dans des proportions qui varient. En effet à E17, les formes avec ADP et/ou épaulement sont majoritaires (figure 13Aa et Ab) et existent dans 95% des neurones, tandis que la forme sans épaulement ni ADP est minoritaire (figure 13Ac). A la naissance, le nombre de neurones présentant ces phénomènes a fortement diminué. En effet, ces activités électriques "particulières" ne se retrouvent que dans 20% des neurones, qui sont souvent ceux de plus gros diamètre. De plus l'épaulement retrouvé est de largeur moins importante qu'à E17 (figure 13Ba). A P6, la majorité des neurones, 98%, a un potentiel d'action dépendant du sodium et rapide (figure 13Cb), sans épaulement lors de la phase de repolarisation et avec une hyperpolarisation post potentiel évidente. Il est intéressant de noter que nous avons enregistré à tous les stades et surtout à P6 des potentiels d'action suivis d'une dépolarisation post potentiel formant un potentiel d'action calcique (figure 13Ca).



E17



P0



P6

Figure 13 : Evolution des différentes formes d'activité électrique au cours du développement périnatal. Les flèches rouges indiquent la présence de l'épaule lors de la phase de repolarisation tandis que les flèches bleues indiquent l'ADP à E17 et le potentiel d'action calcique à P6.

2) Evolution des propriétés actives et passives de la membrane

Cette étude des différentes formes d'activité électrique a conduit à une étude sur les propriétés actives et passives de la membrane des corps cellulaires des neurones. L'étude des propriétés des potentiels d'action, au cours des trois stades, montre que certaines des caractéristiques sont modifiées au cours du développement. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant des t-tests ou

des ANOVA, l'intervalle de confiance choisi est $P < 0.05$, une modification dans la valeur de cette intervalle sera signalée dans le texte.

- Propriétés passives de la membrane (tableau 1)

STADE		CAPA pF	Rm MΩ	Vm (mV)
E17	Moyenne	12.28	1051	-55.07
	±	± 3.44	466	3.70
	<i>n</i>	60	54	34
P0	Moyenne	13.23	771	-55.65
	±	4.10	387	2.71
	<i>n</i>	38	38	20
P6	Moyenne	14.33	528	-56.88
	±	5.00	281	5.70
	<i>n</i>	52	37	52

Tableau 1 : propriétés passives de la membrane au cours du développement étudiées à E17, P0 et P6. Les données présentées incluent la moyenne, l'écart type et le nombre d'observations.

Cette analyse montre que le potentiel de repos et la capacitance membranaire ne varient pas. Toutefois, la résistance membranaire diminue de façon significative au cours du développement entre E17 et P0 et entre P0 et P6. En effet cette résistance membranaire diminue de moitié entre E17 et P6 puisqu'elle passe de 1051 MΩ à E17 à 528 MΩ à P6.

- Caractéristiques des potentiels d'action

		Seuil d'activation (mV)	Valeur au pic (mV)	10-90% temps de croissance (ms)	10-90% temps de décroissance (ms)	Largeur à mi-hauteur (ms)
E17	Moyenne	-25.47	44.89	1.17	1.87	2.42
	±	5.16	7.87	0.32	0.51	0.60
	n	36	31	33	36	35
P0	Moyenne	-28.19	48.64	0.75	0.89	1.24
	±	3.94	5.62	0.27	0.30	0.40
	n	16	17	18	18	21
P6	Moyenne	-30.56	66.01	0.65	0.59	0.98
	±	7.41	14.88	0.25	0.16	0.27
	n	52	52	52	52	52

Tableau 2 : Caractéristiques des potentiels d'action enregistrés à E17, P0 et P6. Les données présentées incluent la moyenne, l'écart type et le nombre d'observations.

L'étude des caractéristiques du potentiel d'action permet de constater que les caractéristiques de celui-ci varient au cours du développement. En effet, entre E17 et P6, le seuil d'activation du potentiel d'action diminue de façon significative. La valeur au pic des potentiels d'action augmente significativement et le temps de montée du potentiel d'action diminue. Ces variations de caractéristiques sont importantes mais néanmoins plus faibles que les variations du temps de décroissance ou de la largeur à mi-hauteur du potentiel d'action. En effet le temps de repolarisation et la largeur à mi-hauteur diminuent de façon drastique et significative au cours du développement, entre E17 et P6. Le temps de repolarisation à P6 est trois fois plus faible qu'au stade E17. Ces données rendent bien compte de la maturation des neurones vestibulaires primaires. En effet, la diminution du seuil d'excitabilité indique que les neurones sont plus facilement excitable, la diminution des temps de montée et de décroissance ainsi que de la largeur à mi-hauteur du potentiel d'action indiquent une activité électrique plus rapide car un potentiel d'action qui est fortement raccourci.

- Hyperpolarisation et dépolarisation post potentiel

		HYPERPOLARISATION AHP		DEPOLARISATION ADP	
		Valeur au pic (mV)	10-90% du temps de croissance (ms)	Valeur au pic (mV)	Temps de décroissance à mi hauteur (ms)
E17	Moyenne	-44.41	3.67	13,8	13,3
	±	3.33	0.73	8,6	6,4
	n	28	33	15	13
P0	Moyenne	-44.19	1.91		
	±	6.00	0.61		
	n	18	19		

Tableau 3 : Caractéristiques de l'hyperpolarisation post potentiel ou la dépolarisation post potentiel enregistrées à E17 et P0. Les données présentées incluent la moyenne, l'écart type et le nombre d'observations.

L'activité électrique des neurones se caractérise, lors d'une stimulation suffisante (qui permet d'atteindre le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action), par la présence d'un seul potentiel d'action suivi soit par une hyperpolarisation post-potentiel (AHP) soit par une dépolarisation post-potentiel (ADP). Ces deux phénomènes ont été analysés et quantifiés. Concernant l'AHP, elle a été quantifiée à E17 et P0 et alors que l'amplitude de celle-ci ne varie pas entre ces deux stades, il est à noter un raccourcissement significatif du temps de retour au potentiel de membrane entre E17 et P0. Quand à l'ADP, elle n'a été étudiée qu'au stade embryonnaire E17, son amplitude est de $13,8 \pm 8,6$ mV et sa durée de $13,3 \pm 6,4$ ms. Le retour au potentiel de membrane est beaucoup plus long dans le cas de l'ADP que dans le cas de l'AHP. Cette différence est importante car pendant la durée de l'ADP, le potentiel de membrane est plus élevé que le potentiel de repos de la cellule, ce qui permet à une stimulation moins importante que la première de déclencher un PA.

Par la suite, nous avons cherché à caractériser la conductance impliquée dans la genèse de l'ADP.

3) Etude de la dépolarisation post potentiel

Pour les enregistrements en courant imposé dans les neurones vestibulaires primaires à E17, les potentiels d'action sont stimulés à partir de leur potentiel de repos (-55.0 ± 3.7 mV, $n=34$) en utilisant un saut de courant dépolarisant court (1.5 ms, 100 à 450 pA). La valeur du courant minimal nécessaire pour déclencher un PA ainsi que le seuil de celui-ci ne varient pas après application de $30 \mu\text{M}$ de Ni^{2+} . Il est important de noter que dans nos conditions d'enregistrement, nous n'avons jamais observé de trains de potentiel d'action même lors de longues stimulations (10s).

		POTENTIEL D'ACTION						DEPOLARISATION POST POTENTIEL	
		Déclenchement (pA)	Seuil d'activation (mV)	Valeur au pic (mV)	10-90% temps de croissance (ms)	10-90% temps de décroissance (ms)	Largeur à mi-hauteur (ms)	Valeur au pic (mV)	Temps de décroissance à mi-hauteur (ms)
Contrôle	Moyenne	248	-31.10	35.3	0.35	0.83	1.00	13.8	13.3
	\pm n	35 6	2.24 7	6.1 7	0.15 7	0.20 7	0.28* 7	8.6 15	6.4 13
Ni^{2+}	Moyenne	260	-31.17	33.8	0.34	0.83	0.98		
	\pm n	52 6	2.87 7	8.4 7	0.12 7	0.18 7	0.22* 7		

Tableau 4 : caractéristiques des potentiels d'action et de la dépolarisation post potentiel en condition contrôle et après application de $30 \mu\text{M}$ de Ni^{2+} . Les données présentées incluent la moyenne, l'écart type et le nombre d'observations.

Pour 11 des neurones étudiés, après avoir enregistré les potentiels d'action, les neurones sont passés en mode potentiel imposé en présence de 300 nM de TTX, 60 mM de TEA et 5 mM de 4-AP dans le milieu extracellulaire afin de bloquer les conductances sodiques et de réduire les conductances potassiques, comme décrit précédemment (Chabbert *et al.*, 1997 ; Chabbert *et al.*, 2001b). Dans ces conditions de potentiel imposé, lorsque les enregistrements en courant imposé ont révélé la présence d'une ADP (Figure 14A), un grand courant de type T est observé ($n=4$) (figure 14b). Lorsque les neurones ne présentent pas d'ADP voire présentent une AHP, aucun courant de type T n'est enregistré ($I = 60\text{pA}$) (donnée non montrée). L'ajout de $30 \mu\text{M}$ de Ni^{2+} dans le milieu d'enregistrement réduit la composante ADP dans tous les neurones étudiés ($n=13$) (figure 14c)

Les caractéristiques des potentiels d'action hormis la partie ADP ne sont pas significativement différentes avant et après application de $30 \mu\text{M}$ de Ni^{2+} dans le milieu d'enregistrement lorsque l'ADP est présent (Tableau 4 et figure 14C).

L'application de 30 μM de Ni^{2+} sur des neurones présentant une AHP, n'a aucun effet sur le profil du potentiel d'action et sur la composante post potentiel (figure 14D). De plus, il est possible d'obtenir une réduction significative de la composante ADP en appliquant une perfusion rapide de milieu extracellulaire dans le bain (n=8, donnée non illustrée).

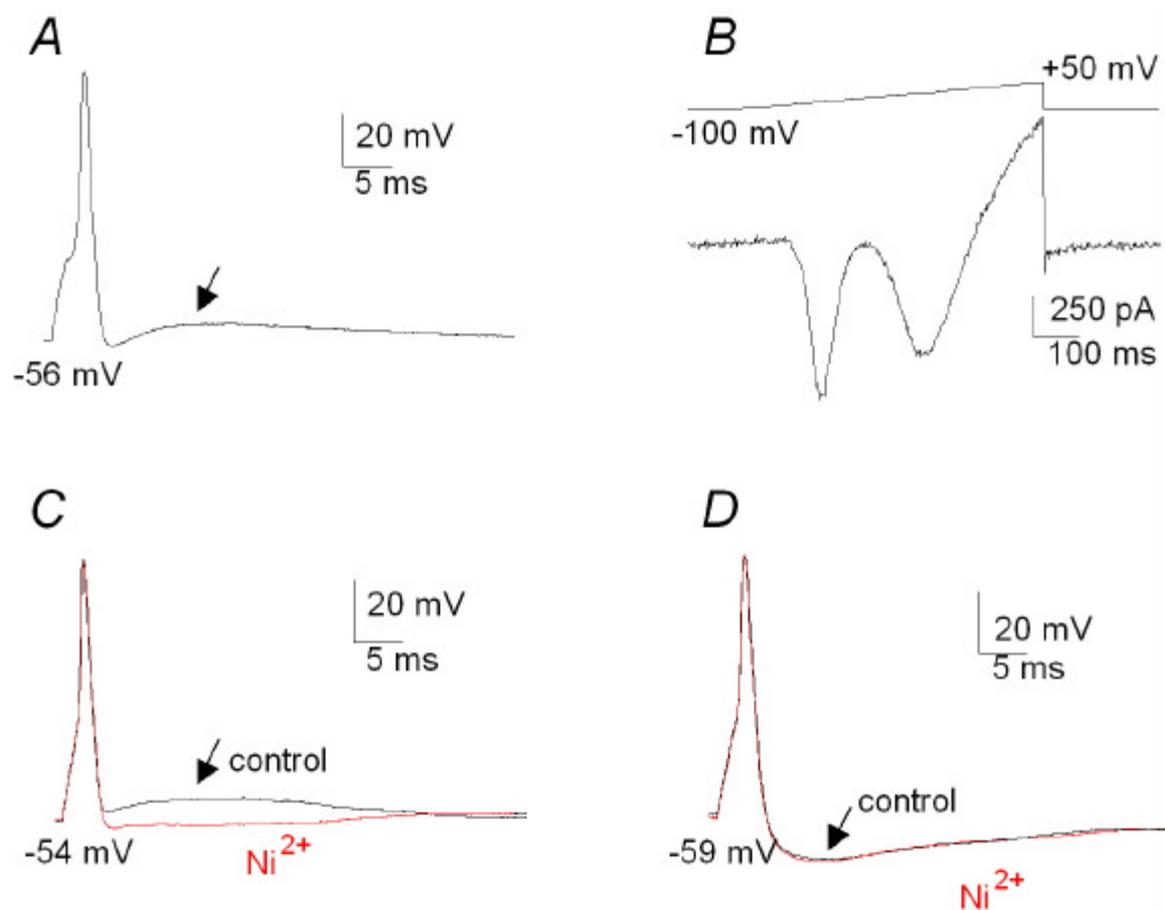


Figure 14 : Implication des courants calciques de type T dans la genèse de l'ADP. A : PA enregistré en mode courant imposé montrant un ADP (flèche) sur la phase de repolarisation. B : rampe de potentiel obtenue en potentiel imposé sur le même neurone après application de 300 nM de TTX, 60 mM de TEA et 5 mM de 4-AP afin de bloquer les courants sodiques et limiter les courants potassiques. Cette rampe révèle la présence d'un grand courant calcique de type T. Il est à noter un courant potassique résiduel dû à l'absence de Césium dans le milieu intra pipette. C : PA présentant un ADP (flèche) qui est bloqué par application de 10 μM de Ni^{2+} . D : PA présentant une AHP qui est insensible à 30 μM de Ni^{2+} .

Certains neurones enregistrés présentent un potentiel d'action sodique suivi d'un PA calcique (n=5) (figure 15A). Ces dépolarisations calciques ne sont pas affectées lors d'application de drogues bloquant la majorité des courants calciques à haut seuil d'activation fonctionnels dans les neurones vestibulaires primaires (Desmadryl *et al.*,

1997) (Chambard *et al.*, 1999). Ces drogues sont l' ω -Conotoxine-GVIA (500 nM) et l' ω -Agatoxine-IVA (300 nM) et bloquent respectivement les courants calciques de type N, P/Q (figure 15B). Après blocage des conductances sodiques par ajout de 300 nM de TTX et réduction des courants potassiques par ajout de 60 mM de TEA et 5 mM de 4-AP dans le milieu extracellulaire, les enregistrements en potentiel imposé qui suivent l'enregistrement de PA calciques en courant imposé, montrent la présence d'un très grand courant calcique de type T (Figure 15C, $I_{(T)} \sim 1400$ pA, pour le neurone illustré). Le potentiel d'action calcique reste stable même après blocage du potentiel d'action sodique par ajout de 300 nM de TTX dans le milieu extracellulaire. Celui-ci disparaît par ajout de 30 μ M de Ni^{2+} dans le milieu extracellulaire (figure 15C).

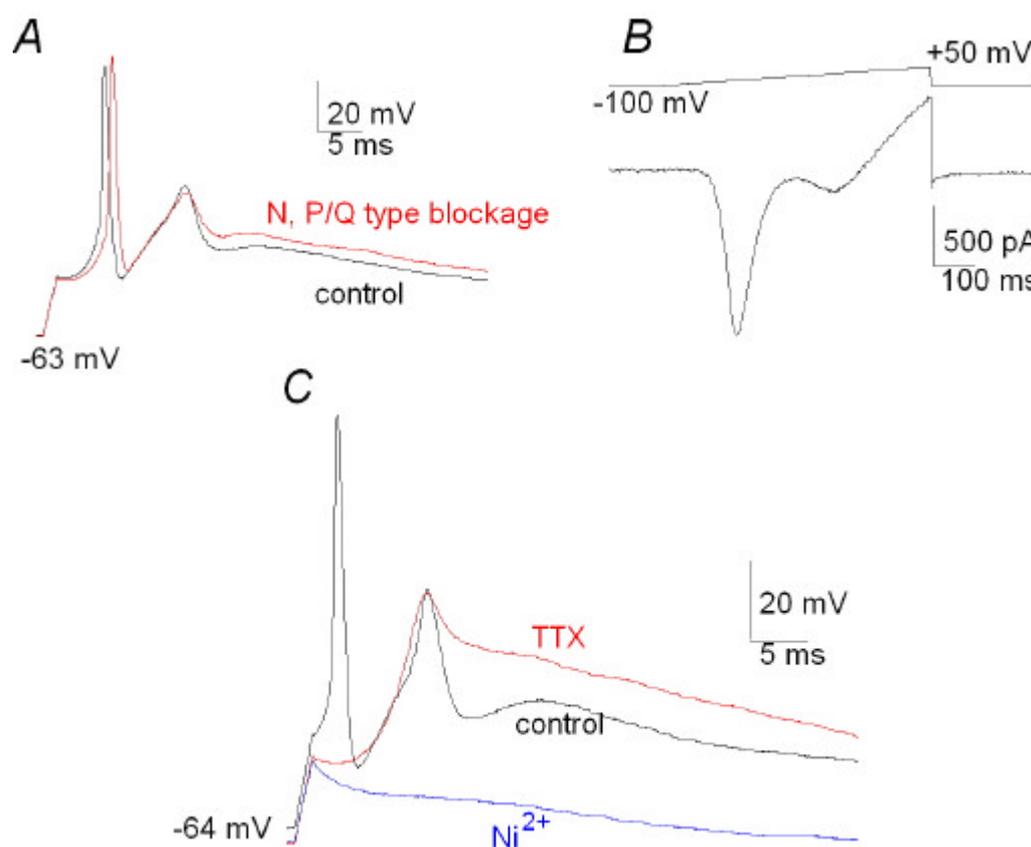


Figure 15 A : PA suivi d'un PA calcique. L'application de 500 nM d' ω -Conotoxine-GVIA et de 300nM d' ω -Agatoxine-IVA pour bloquer respectivement les conductances N, P/Q, ne modifie pas l'amplitude du potentiel d'action calcique. B : Rampe de courant enregistrée dans le même neurone montrant un courant calcique de type T de grande amplitude après blocage des conductances sodiques et potassiques. Les courants calciques de type HVA restant révèle la présence de courants de type L et R, qui ont une mince contribution au courant calcique HVA global dans les neurones vestibulaires primaires. C : PA suivi d'un PA calcique. L'application de 300 nM de TTX élimine le PA sodique sans affecter le PA calcique qui est bloqué par application de 30 μ M de Ni^{2+} .

Dans la première partie des résultats de ce manuscrit, nous avons mis en évidence que la sous-unité calcique de type T présente à la membrane du corps cellulaire du neurone à E17 et dans quelques neurones pour les stades néonataux était $Ca_v3.2$. De plus dans cette étude, nous avons mis en évidence que cette sous-unité est sensible à la perfusion. Ainsi la sensibilité au Ni^{2+} et la sensibilité à la perfusion de la dépolarisation post potentiel dans les neurones vestibulaires primaires suggèrent fortement que cette composante du potentiel d'action correspond à l'activation de la sous-unité calcique $Ca_v3.2$.

Parallèlement à l'étude de la dépolarisation post potentiel, nous avons cherché à identifier la conductance à l'origine de l'épaulement lors de la phase de repolarisation du potentiel d'action.

4) Etude de l'épaulement de la phase de repolarisation du PA

Cet épaulement est présent sur la phase de repolarisation des PA obtenu dans les neurones vestibulaires primaires au cours du développement périnatal. Il consiste en une rupture de pente de la phase de repolarisation du potentiel d'action (figure 16A). Comme le montre le tableau 2, la diminution du temps de repolarisation ainsi que la diminution de la largeur du potentiel d'action à mi-hauteur rendent compte du raccourcissement du potentiel d'action et notamment de la phase de repolarisation. Ceci est aussi visible sur la figure 16 où, entre E17 et P0 chez la souris, l'amplitude de l'épaulement diminue. Le nombre de neurones présentant cet épaulement diminue aussi durant cette période du développement. Ce phénomène n'a pas été étudié à P6.

L'étude pharmacologique et la caractérisation de cet épaulement ont été réalisées à E17 dans les neurones vestibulaires primaires de souris fraîchement dissociés. La présence de cet épaulement est indépendante de la présence ou l'absence de la dépolarisation post potentiel. Ainsi sa présence peut être concomitante de celle de l'ADP (figure 16B).

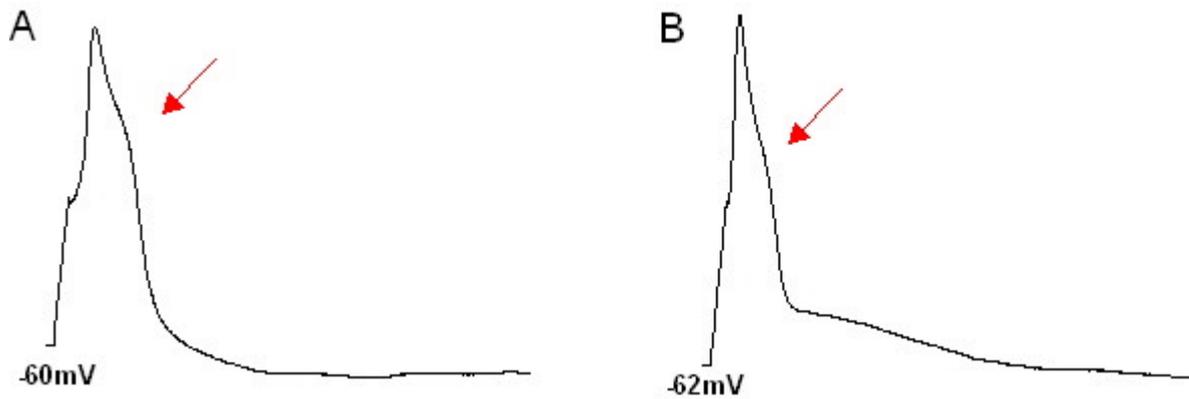


Figure 16 : Potentiels d'action enregistrés à E17 présentant un épaulement sur la phase de repolarisation. La rupture de pente est indiquée par une flèche rouge. La figure 16A montre un potentiel d'action avec épaulement et la figure 16B montre un potentiel d'action avec épaulement et ADP.

L'étude pharmacologique de cet épaulement a été réalisée électrophysiologiquement en mode courant imposé. Dans un premier temps, le nickel a été utilisé. L'application par perfusion dans le milieu extracellulaire de 10 μM de Ni^{2+} est sans effet sur l'épaulement (figure 17A) (n=15). Suite à cette application de nickel, une application de cadmium à 100 μM en perfusion dans le milieu extracellulaire a ensuite été réalisée. Ainsi comme le montre la figure 17B, l'application de nickel à 1 μM et 10 μM bloque partiellement la dépolarisation post potentiel mais n'affecte pas l'épaulement. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que les canaux calciques de type T ne sont pas impliqués dans la genèse d'un épaulement sur la phase de repolarisation du potentiel d'action. Une application de cadmium 100 μM en perfusion dans le milieu extracellulaire réduit fortement l'amplitude de l'épaulement sans modifier les autres caractéristiques du potentiel d'action (n=10). L'application de cadmium à 100 μM ayant pour effet de réduire considérablement l'amplitude de ce phénomène traduit une implication des canaux calciques à haut seuil d'activation.

Une application de cadmium à 200 μM bloque totalement cet épaulement (donnée non montrée).

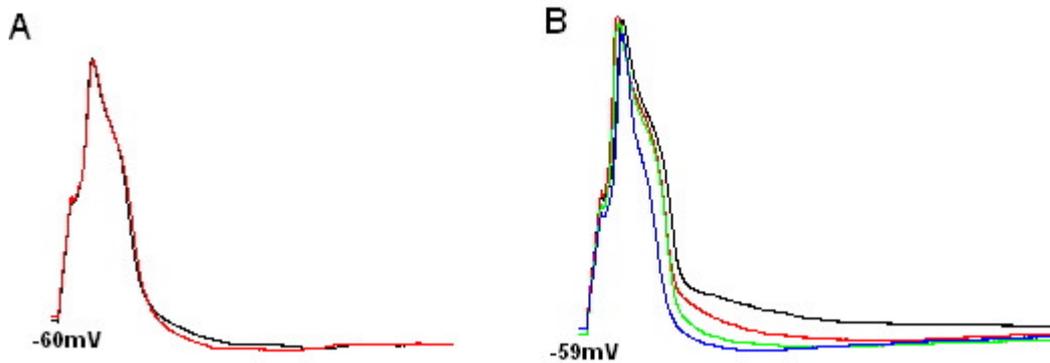


Figure 17 : Etude pharmacologique de la conductance ionique à l'origine de l'épaulement sur la phase de repolarisation du potentiel d'action. A : effet de l'application de Ni^{2+} sur le potentiel d'action sans ADP. En noir, trace contrôle et en rouge trace obtenue après application de Ni^{2+} en perfusion. B: effet de l'application de Ni^{2+} sur un potentiel d'action avec épaulement et ADP. En noir, trace contrôle, en rouge PA obtenu après application de $1 \mu M$ de Ni^{2+} . Trace Verte, PA obtenu après application de $10 \mu M$ de Ni^{2+} et en bleue, PA obtenu après application de $100 \mu M$ de Cd^{2+} .

Etant donné l'effet du cadmium sur cet épaulement, nous avons alors testé l'effet d'une application d' ω -Agatoxine-IVA, toxine connue pour ces effets inhibiteurs des courants calciques de type P et Q. Comme le montre la figure 18, une application d' ω -Agatoxine-IVA à 500 nM dans le milieu extracellulaire bloque partiellement l'épaulement de la phase de repolarisation sans modifier les autres caractéristiques du potentiel d'action (figure 18). Toutefois ce résultat est préliminaire car peu de cellules ont pu être testées. ($n=2$).

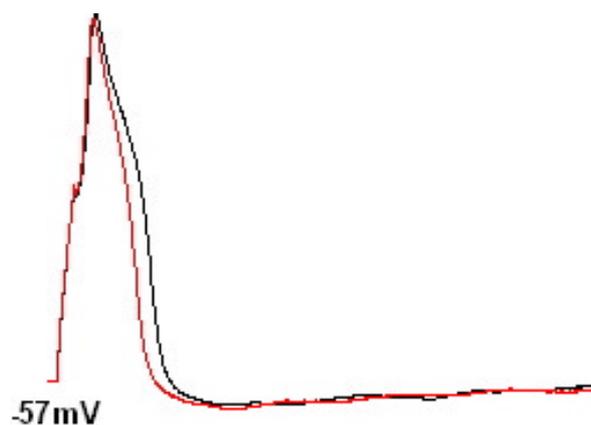


Figure 18: Etude pharmacologique du potentiel d'action avec épaulement. En noir PA contrôle et en rouge PA obtenu après application de 500 nM d' ω -Agatoxine-IVA dans le milieu extracellulaire.

C. DISCUSSION

De ces résultats, il se dégage trois points importants concernant l'activité électrique des neurones vestibulaires primaires. D'une part, la durée du potentiel d'action diminue au cours du développement périnatal, c'est-à-dire que l'activité électrique devient de plus en plus rapide. D'autre part, à E17 et dans certains cas après, il existe une dépolarisation qui suit le potentiel d'action (ADP). Nos résultats démontrent que cette dépolarisation est due à la présence d'un courant calcique à bas seuil d'activation. Ce courant, nous l'avons démontré dans la première partie de ce travail est généré par la sous-unité $Ca_v3.2$. Et enfin, nous avons caractérisé l'existence, au cours de la même période du développement, d'un épaulement sur la phase de repolarisation de potentiel d'action. Cet épaulement se traduit par une rupture de la pente de la phase de repolarisation du potentiel d'action.

1) Diminution de la durée du potentiel d'action

Cette étude réalisée au cours du développement périnatal a permis de mettre en évidence une évolution des propriétés actives de la membrane des neurones vestibulaires primaires entre E17 et P6. Au cours de cette période ont lieu une neurogenèse et une synaptogenèse importantes. L'activité électrique des neurones, au cours de cette période devient plus rapide. Cette diminution de la durée du potentiel d'action est indépendante des phénomènes décrits ci-après c'est-à-dire l'épaulement sur la phase de repolarisation et la dépolarisation post potentiel. Plusieurs conductances pourraient être impliquées dans ce phénomène. En effet, nous observons une diminution importante du temps de croissance du potentiel d'action mais aussi une augmentation significative de la valeur au pic du potentiel. Cette dépolarisation massive de la cellule est due à une entrée importante de sodium dans la cellule par les canaux sodiques dépendants du potentiel. Ainsi, il pourrait y avoir au cours de cette période une maturation des canaux sodiques ou une augmentation de leur nombre à la membrane qui faciliterait l'entrée de sodium. Seule une étude électrophysiologique pourrait nous apporter des informations. Toutefois la différence la plus importante entre E17 et P6 au niveau de la durée du potentiel d'action est la durée de la phase de repolarisation. En effet cette durée est divisée

par trois (alors que la phase de dépolarisation voit sa durée diminuée par deux). Cette repolarisation de la cellule est due à une sortie importante de potassium de la cellule par les canaux potassiques dépendants du potentiel. Une maturation de ces conductances pourrait accélérer le processus de repolarisation de la cellule. D'ailleurs des travaux réalisés sur les neurones spinaux embryonnaires de *Xenopus* mettent en évidence que la durée et la forme du potentiel d'action sont déterminées par les propriétés des courants potassiques intervenant lors de la phase de repolarisation (Spitzer et Ribera, 1998). Cette accélération peut aussi être due dans une moindre mesure à la présence des courants calciques à haut seuil d'activation.

2) Dépolarisation post potentiel d'action

Nos résultats suggèrent que les canaux calciques de type T seraient impliqués dans la phase de repolarisation du potentiel d'action en générant une dépolarisation post potentiel. Dans certains cas, cette dépolarisation peut prendre la forme d'un potentiel d'action calcique. Le rôle de $Ca_v3.2$ a été confirmé, car l'application de nickel à 10 μ M réduit considérablement la taille de l'ADP. A cette concentration, l'ADP n'est pas totalement éliminée (c'est-à-dire que l'on ne trouve pas une hyperpolarisation post potentiel comme dans les neurones sans courant calcique de type T), car seulement 40% du courant calcique de type T est bloqué. Nous n'avons pas pu utiliser des concentrations plus élevées de nickel car c'est un bloqueur non spécifique. En effet à de plus fortes concentrations, cet ion bloque les conductances calciques à haut seuil d'activation ainsi que des conductances activées par le calcium. Ainsi nous n'avons pas été en mesure d'obtenir le blocage complet de la dépolarisation post potentiel.

Au niveau des neurones centraux, il a déjà été décrit une contribution des canaux calciques de type T dans l'activité électrique. En effet l'application de faibles concentrations de nickel a mis en évidence la participation de $Ca_v3.2$ dans la genèse de l'ADP mais aussi dans les propriétés de décharge des neurones (Dubreuil *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2002). Dans les neurones des ganglions de la racine dorsale, les courants calciques de type T ont été montrés comme générant un ADP et contribuant aux décharges en bouffée des neurones (Dubreuil *et al.*, 2004; Lovinger et White, 1989). Toutefois dans les neurones sensoriels de rat, les changements dans la

phase de repolarisation induits par un flux dans le bain d'enregistrement ont été décrits et attribués aux canaux calciques de type N et T (Bouskila et Bostock, 1998).

3) Epaulement lors de la phase de repolarisation du potentiel d'action

Nos résultats montrent que la rupture de pente de la phase de repolarisation du potentiel d'action n'est pas corrélée à la présence de la dépolarisation post potentiel et n'est pas induite par les courants calciques de type T. Alors que des concentrations en nickel allant de 1 μM à 10 μM sont efficaces dans le blocage de l'ADP, elles sont sans effet sur l'épaule de la phase de repolarisation. D'autre part, l'application de 100 μM de cadmium bloque cet épaule sans toucher les autres caractéristiques du potentiel d'action. Le cadmium est un ion divalent aux effets relativement non spécifiques mais il bloque avec une bonne affinité les canaux calciques à haut seuil d'activation (Hilaire *et al.*, 1997). Ainsi ces résultats montrent que cet épaule serait généré par un ou plusieurs courants calciques de type L, N P ou Q. (Chambard *et al.*, 1999) ont réalisé une étude sur l'évolution de la densité des courants calciques à haut seuil d'activation. Ils ont montré que le courant calcique de type P présentait un pic d'expression à E17 et que le type N voyait sa densité augmenter au cours du développement périnatal. D'autre part, cet épaule est très marqué à E17, mais son amplitude devient plus faible à la naissance et tend à disparaître des neurones. Nous avons alors testé l'application de 500nM d' ω -Agatoxine IVA car le courant calcique de type P nous paraissait un bon candidat. Les premiers résultats montrent que cette application induit un blocage partiel de l'épaule sans modifier les autres paramètres du potentiel d'action. Ainsi ces résultats semblent suggérer que les canaux calciques de type P seraient impliqués dans le ralentissement de la phase de repolarisation du potentiel d'action en induisant un épaule. Toutefois des travaux réalisés sur les neurones de cerveau embryonnaire de blatte ont montré une évolution des conductances calciques à haut seuil d'activation et notamment les courants type P/Q et R en culture (Benquet *et al.*, 2002). Les auteurs montrent qu'en l'absence des conductances de type P/Q, il y a formation des neurites mais aussi une diminution de la longueur des neurites ainsi que du nombre d'embranchements secondaires. Ainsi à la lumière de nos résultats et de ces travaux, le rôle des courants calciques de type

P/Q pourrait être l'entrée massive de calcium dans la cellule afin de permettre une neuritogenèse importante et une augmentation du nombre de neurites secondaires pour faciliter la synaptogenèse. Ainsi des travaux soutiennent cette hypothèse (Heng *et al.*, 1999). Ils démontrent que les courants calciques de type P/Q modulent le nombre et la longueur des neurites sans affecter leur initiation dans les cultures de cellules de ganglion de la rétine.

Les stades auxquels nous avons mis en évidence un potentiel d'action présentant un épaulement généré par un courant calcique à haut seuil d'activation et une dépolarisation post potentielle générée par un courant calcique à bas seuil d'activation sont corrélés avec ceux où se déroulent une neuritogenèse et surtout une forte synaptogenèse. La simultanité de ces deux phénomènes soulève la question du rôle de l'entrée de calcium au cours de l'ontogenèse du système vestibulaire. En effet, les ions calcium jouent un rôle critique dans la formation du système nerveux (Al-Mohanna *et al.*, 1992 ; Amato *et al.*, 1996 ; Chemin *et al.*, 2002b ; Chemin *et al.*, 2004).

III. ROLE SUR LA NEURITOGENESE DES NEURONES VESTIBULAIRES PRIMAIRES.

A. INTRODUCTION

1- Les premiers résultats ayant conduit à cette étude ont mis en évidence que les canaux calciques de type bas seuil avaient une expression transitoire au cours du développement. Ces canaux étaient présents et fonctionnels à la membrane du corps cellulaire à E17 de façon majoritaire, c'est-à-dire dans 98% des neurones. Cette sous-unité tend ensuite à disparaître au cours du développement périnatal. En effet quelques jours après la naissance, son expression n'est retrouvée que dans quelques neurones de gros diamètre (Chambard *et al.*, 1999). Cette période où ces canaux sont présents correspond, lors de la mise en place du système vestibulaire, au moment où les projections des neurones, c'est-à-dire les neurites, entrent dans l'épithélium vestibulaire et où les premiers contacts synaptiques se mettent en place.

2- Les premières parties de mes résultats ont caractérisé la présence d'une sous-unité particulière, $Ca_v3.2$, comme régulée au cours du développement périnatal. Cette sous-unité influence l'activité électrique en modifiant la forme du potentiel d'action. En effet, nous avons pu démontrer que cette sous-unité lorsqu'elle est fonctionnelle à la membrane du corps cellulaire du neurone de la souris induit une dépolarisation post potentiel. Cette dépolarisation permet potentiellement une plus grande excitabilité de la membrane.

3- Alors que de nombreuses études mettent en évidence la présence de canaux calciques de type bas seuil au cours du développement et démontrent ainsi leur rôle fondamental dans le développement, aucun travail n'avait caractérisé les sous-unités présentes mais aussi leurs rôles précis dans les fonctions physiologiques des neurones. Cependant, en 2002, des travaux identifient la sous-unité $Ca_v3.2$ dans la lignée cellulaire NG108-15 et caractérisent son rôle au cours des stades précoces de la différenciation neuronale (Chemin *et al.*, 2002b). Cette sous-unité est impliquée, dans ce modèle cellulaire, dans l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'induction de la neuritogenèse. Elle est responsable aussi de l'expression des courants calciques de type HVA. En 2004, ces mêmes auteurs démontrent que $Ca_v3.2$ agit par un mécanisme autocrine pour promouvoir la différenciation morphologique des

neurones. Toutefois cette sécrétion de facteurs autocrines contribuant à la neuritogenèse est sans influence sur l'apparition des conductances de type HVA.

4- A la lumière de ces différents résultats, nous nous sommes intéressés au rôle de $Ca_v3.2$ dans la neuritogenèse des neurones vestibulaires primaires. Pour ce faire nous avons utilisé une stratégie antisens dirigée contre cette sous-unité sur des cultures de neurones vestibulaires primaires réalisées à E17.

B. RESULTATS

Dans un premier temps nous avons cherché à savoir si la sous-unité $Ca_v3.2$ contribuait à la neuritogenèse des neurones vestibulaires primaires. Pour cela une étude *in vivo* étant totalement inenvisageable, nous avons utilisé un modèle de neuritogenèse qui est la culture primaire de neurones vestibulaires. Etant donné l'inexistence de pharmacologie spécifique, une stratégie antisens a été mis en place afin d'éliminer cette conductance. Ceci nous a permis de comprendre que la sous-unité $Ca_v3.2$ joue un rôle important dans la neuritogenèse. En effet, en son absence, il apparaît une diminution significative de la longueur des neurites. Par électrophysiologie, nous avons vérifié que le courant n'était pas présent, afin de valider que cette diminution de la pousse neuritique était bien corrélée avec l'absence du courant calcique de type T. Pour chaque culture, quatre conditions sont réalisées simultanément pour chaque culture :

- Une condition contrôle, CTRL : le milieu de culture est un milieu classique contenant des facteurs de croissance tels que le BDNF et le NT3. Ces facteurs sont indispensables à la survie et la pousse des neurones. Toutefois afin de limiter les différences pouvant exister entre chacune des conditions, lors de la durée de la transfection, ce milieu de culture est remplacé par un milieu contrôle sans facteur de croissance.
- Une condition dite LF : c'est-à-dire que l'agent de transfection, la lipofectamine 2000 (Invitrogen) est ajoutée seule pendant la durée de la transfection. Cette condition permet de vérifier que les résultats observés ne dépendent pas du solvant mais bien d'une inhibition du canal ionique d'intérêt.

- Une condition dite AS : lors de la transfection, l'antisens dirigé contre la sous-unité $Ca_v3.2$ est utilisé seul. Ceci diminue le taux de neurones transfectés mais permet de visualiser l'effet de la transfection sans contamination par un autre facteur.
- Une condition AS+LF : L'agent de transfection et l'antisens sont mis dans la culture de neurones.

Ces quatre conditions de culture nous ont permis de vérifier pour chaque expérimentation que les résultats observés n'étaient pas des artéfacts. Les contrôles ne sont pas présentés dans les résultats.

Les antisens utilisés étaient dirigés contre la sous-unité $Ca_v3.2$ qui génère un grand courant calcique de type T et la sous-unité $Ca_v3.1$. D'autre part, un antisens contrôle que nous avons appelé Scramble a servi de témoin. En effet cet oligonucléotide a été conçu de façon à pénétrer dans les cellules mais à ne se fixer sur aucun ARNm. Ceci dans le but de vérifier que les résultats obtenus ne sont pas dus à la pénétration de l'oligonucléotide dans la cellule mais bien à l'effet de cet élément. La figure 19A et 19B montre des images, acquises avec un microscope à épi-fluorescence (microscope droit Zeiss Axiophot objectif 10X), les cellules ayant intégré l'oligonucléotide antisens pour $Ca_v3.1$ en A et Scramble en B. Cet oligonucléotide est couplé à la GFP qui émet dans le vert et les neurones sont marqués par des anticorps couplés à l'Alexa 568 qui émet dans le rouge. Lorsque les neurones ont intégré l'oligonucléotide, leur corps cellulaire est donc représenté en jaune (co-localisation des deux fluorophores). Il est important de noter que sur la figure B, l'oligonucléotide a été intégré par d'autres types cellulaires que les neurones. Il s'agit vraisemblablement de cellules gliales, mais seule une caractérisation immunologique pourrait le confirmer.

Sur la figure 19Ca1, nous pouvons constater le marquage spécifique des corps cellulaires des neurones ainsi que de leur prolongement neuritique. Sur la photo 19Ca2, nous pouvons voir le marquage des oligonucléotides antisens dans les cellules, qui apparaissent en vert. La photo 19Ca3 est une superposition des deux premières et permet de voir la colocalisation des deux marquages. Toutefois, comme il apparaît que les oligonucléotides ne sont pas uniquement dans les neurones, la photo 19Cb, montre des images en trois dimensions réalisées au microscope confocal (Biorad, objectif 63X), où l'on constate que les oligonucléotides sont bien localisés dans le corps cellulaire du neurone.

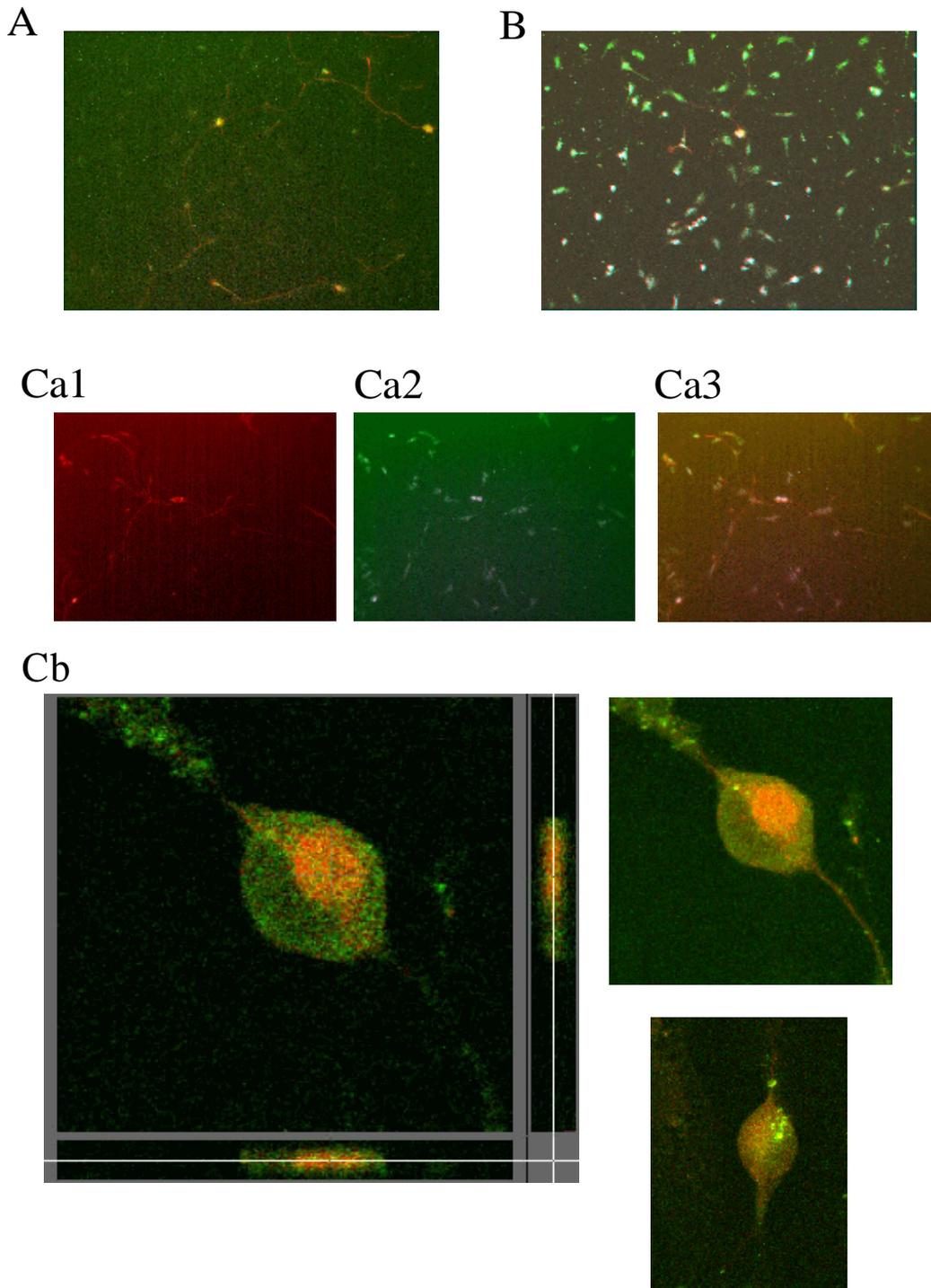


Figure 19 : Immunocytoologie des cultures de neurones vestibulaires primaires. En A neurones transfectés avec oligonucléotide antisens $Ca_v3.1$, en rouge les neurofilaments (protéines spécifiques des neurones) et en vert l'oligonucléotide. En B, neurones transfectés avec l'oligonucléotide scramble, en rouge les neurones et en vert les antisens. En Ca la première photo montre le marquage des neurones vestibulaires en rouge, la deuxième photo représente les neurones transfectés avec l'oligonucléotide antisens de $Ca_v3.2$ en vert et la troisième photo est la superposition des deux autres afin de visualiser les colocalisations de marquage. En Cb, Photos en trois dimensions d'un neurone vestibulaire transfecté avec l'oligonucléotide antisens de $Ca_v3.2$, permettant de visualiser la colocalisation de la transfection dans le neurone.

La suite de ce travail a été de mesurer la longueur totale des neurites pour chaque neurone, grâce à l'utilisation du logiciel MetaMorph (Universal Imaging), dans chacune des conditions et de vérifier si les différents éléments transfectés agissent sur la neuritogenèse.

Sur le schéma de la figure 20, sont illustrés les résultats de la mesure des neurites des neurones vestibulaires. Les résultats statistiques ont été obtenus par l'utilisation d'un t-test où $P < 0,001$. Il est important de noter que la présence de la lipofectamine lors de la transfection n'a pas d'effet significatif sur la pousse neuritique. De la même manière, la présence du scramble n'a pas d'effet sur la pousse neuritique, pas de différence significative. Ces deux contrôles permettent de confirmer que les résultats obtenus sont bien le fait du blocage spécifique de l'expression d'une protéine et non le résultat d'un artefact dû à la présence de la lipofectamine 2000. Lorsque les cellules ont été transfectées avec un oligonucléotide dirigé contre $Ca_v3.2$, nous avons constaté une diminution significative de la longueur des neurites par rapport au contrôle. Par contre, la transfection des cellules avec un oligonucléotide dirigé contre $Ca_v3.1$ ne diminue pas de façon significative la longueur des neurites. Un comptage du nombre de neurites et du nombre d'embranchements a aussi été réalisé mais il n'apparaît aucune différence significative entre chaque cas (résultats non montrés)

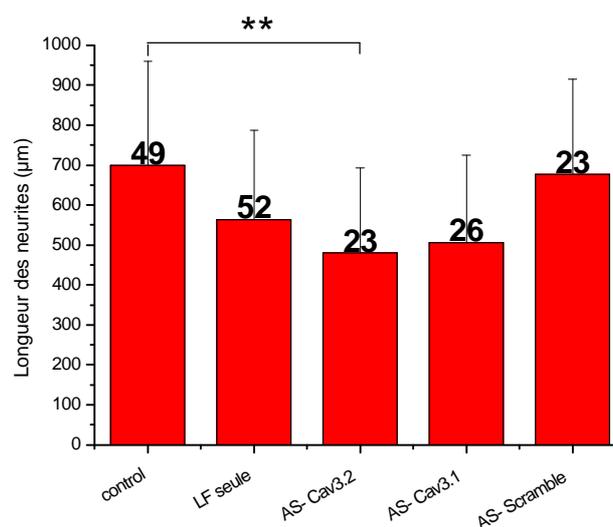


Figure 20 : Histogramme représentant la longueur des neurites, en contrôle, en présence de lipofectamine 2000 pendant la durée de la transfection, avec l'antisens $Ca_v3.2$, l'antisens $Ca_v3.1$ et avec le scramble. Les différences significatives sont marquées par **. Le test statistique utilisé est un t-test où $P < 0,001$.

Dans la troisième partie de ces résultats, nous avons vérifié par des enregistrements électrophysiologiques l'absence d'expression fonctionnelle de $Ca_v3.2$ afin de confirmer que les résultats obtenus sont bien la conséquence d'une diminution de l'expression de la sous-unité $Ca_v3.2$ et donc une diminution importante de l'entrée de calcium dans les cellules transfectées.

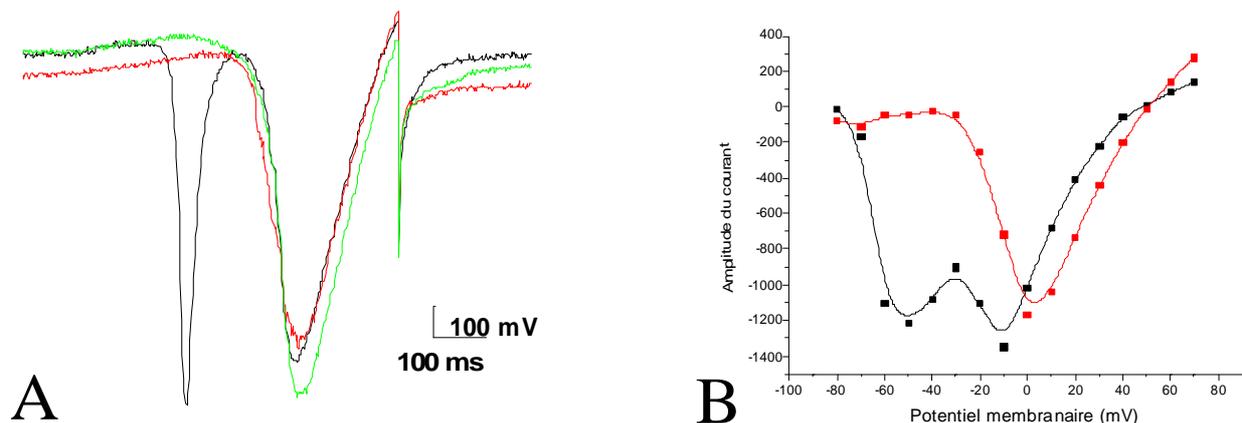


Figure 21 : En A rampes de courant enregistrées dans des neurones vestibulaires primaires à l'application d'un rampe de potentiel allant de -100 mV à $+50$ mV en 640 ms. En noir un enregistrement en condition contrôle, à 3 jours de culture, en vert lorsque la culture est incubée avec $10 \mu\text{M}$ de Nickel et en rouge après une transfection avec l'antisens $Ca_v3.2$. En B, courbe courant potentiel correspondant aux rampes précédentes. En noir courbe contrôle et en rouge après une transfection avec l'antisens $Ca_v3.2$.

Dans tous les enregistrements effectués, en présence de l'oligonucléotide ou en présence de nickel $10 \mu\text{M}$, il y a disparition totale des courants calciques de type T ($n=15$) alors que en condition contrôle un courant calcique de type T est enregistré ($n=17$), il varie de 1190 pA à 40 pA comme dans les neurones fraîchement dissociés.

Tous les neurones enregistrés ont été sélectionnés car ils apparaissaient en vert sous la lampe à fluorescence, ceci signifiant qu'ils avaient incorporé l'oligonucléotide antisens $Ca_v3.2$.

Comme il est illustré sur la figure 21, ci-dessus, lorsque un neurone est transfecté avec un oligonucléotide antisens pour $Ca_v3.2$, il y a inhibition des courants calciques à bas seuil d'activation sans toucher les courants calciques à haut seuil d'activation ($n=12$). De même lorsque les neurones sont cultivés en présence de $10 \mu\text{M}$ de nickel ($n=3$), il y a disparition des courants calciques de type T. Toutefois, peu de résultats ont été obtenus avec cette dernière méthode, car les cultures présentaient un fort taux de mort neuronale par rapport aux conditions contrôle

(n=17). Dans la figure 21B, la courbe courant potentiel dans les deux conditions permet de voir que l'absence des courants calciques à bas seuil d'activation n'influe pas sur l'amplitude des courants calciques à haut seuil d'activation.

Cette étude électrophysiologique a été réalisée sur des neurones en culture dans les quatre conditions décrites précédemment. Les résultats montrent que les courants calciques à haut seuil d'activation ne présentent pas de différence significative dans leurs amplitudes (figure 22). Les tests statistiques ont été réalisés avec un t-test et l'intervalle de confiance est déterminé par $p < 0,05$. Ainsi l'inhibition des courants calciques à bas seuil d'activation n'aurait pas d'effet sur les courants calciques à haut seuil d'activation, lorsque ceux-ci sont déjà fonctionnels à la membrane du corps cellulaire du neurone vestibulaire primaire.

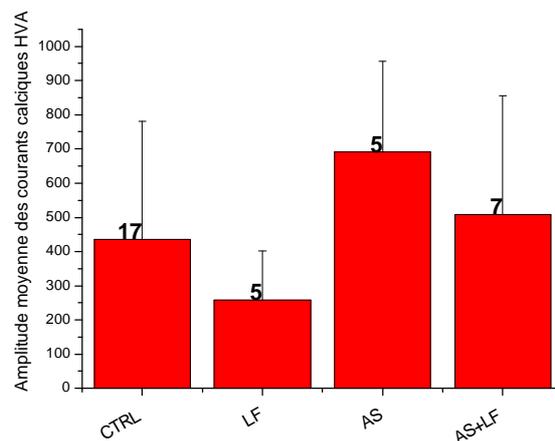


Figure 22: Histogramme représentant l'amplitude moyenne des courants calciques à haut seuil d'activation enregistrés dans les neurones vestibulaires primaires en culture. Le test statistique utilisé est un t-test où $p < 0,05$ et ne montre pas de différence significative entre chacune des conditions.

Cette étude nous a permis de déterminer le rôle fonctionnel de $Ca_v3.2$ dans le développement embryonnaire des neurones vestibulaires primaires. En effet l'inhibition de l'expression fonctionnelle de $Ca_v3.2$ induit une diminution de la longueur des neurites des neurones en culture. Nous avons pu corrélérer la diminution de la longueur des neurites avec l'absence d'expression fonctionnelle des canaux calciques de type T par mesure électrophysiologique. Cette absence d'expression de $Ca_v3.2$ n'a pas d'effet sur l'expression fonctionnelle des courants calciques à haut seuil d'activation.

C. DISCUSSION

Très peu d'études ont été réalisées sur l'implication des courants calciques de type T et plus précisément de $Ca_v3.2$ dans la neuritogenèse et la synaptogenèse précoce.

Les canaux calciques de type T sont les premiers canaux calciques dépendants du potentiel à s'exprimer au cours du développement. De plus, il est largement admis que les influx calciques jouent un rôle indispensable dans la différenciation neuronale. Une étude montre l'implication de $Ca_v3.2$ dans la pousse neuritique des cellules d'un modèle neuronal, la lignée NG 108-15 (Chemin *et al.*, 2002b). En effet cette étude révèle que cette sous-unité contribue à des changements électriques et morphologiques durant la différenciation neuronale. En effet, son expression fonctionnelle conduit à l'arrêt de la prolifération cellulaire et le début de la neuritogenèse d'une part et d'autre part les courants calciques de type T sont impliqués dans l'expression des courants calciques à haut seuil d'expression. Dans les neurones vestibulaires primaires, nous avons montré l'existence d'un courant calcique de type T de grande amplitude, nous avons aussi montré qu'il est généré par la sous-unité $Ca_v3.2$. Le but de cette étude a été de démontrer l'implication de ce phénomène au cours de la mise en place de l'afférentation vestibulaire. En accord avec les résultats de Chemin et coll, nous avons montré que le blocage de l'expression des courants calciques de type T induit par la sous-unité $Ca_v3.2$ conduisait à une diminution de la neuritogenèse. Toutefois ce blocage ne modifie pas le profil d'expression des courants calciques à haut seuil d'activation. Il a été démontré que l'expression des courants calciques à haut seuil d'activation coïncide avec l'expression des courants calciques de type T dans les cellules NG 108-15 (Chemin *et al.*, 2004). Ce sont deux événements qui sont interdépendants. Dans notre modèle il apparaît que l'expression des courants calciques à haut seuil d'expression n'est pas corrélée avec l'expression des courants calciques de type T. D'autre part dans les deux études précédemment citées, l'utilisation de cette lignée cellulaire, NG 108-15, permettant de travailler sur des cellules qui ne sont pas encore différenciées alors que les neurones vestibulaires au stade que nous avons étudié, E17, ont déjà réalisé leurs dernières mitoses terminales et sont différenciés en

neurones. Les courants calciques à haut seuil d'activation sont déjà fonctionnels à la membrane du corps cellulaire des neurones. Ainsi une implication précoce des canaux calciques de type T dans l'expression des canaux calciques à haut seuil d'activation n'a pas pu être étudiée. Toutefois cette modulation des phénomènes de neuritogenèse précoce en absence courant calcique de type T passe par une diminution des influx calciques dont l'importance n'est plus à démontrer dans le développement précoce mais aussi par une modification de la forme de l'activité électrique et notamment du profil de décharge des neurones ainsi que par d'autres éléments qui dépendent directement du calcium intracellulaire.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Comme tout travail de doctorat celui-ci a été trop court pour répondre à toutes les questions que l'on se pose et surtout il en a soulevé un grand nombre. Ces questions peuvent se regrouper en deux catégories, celles qui impliquent les propriétés des canaux calciques et celles qui découlent du développement du système vestibulaire.

Les principaux résultats présentés dans ce manuscrit portent sur la caractérisation fonctionnelle des canaux calciques dépendants du potentiel à bas seuil d'activation dans les neurones ganglionnaires vestibulaires au cours du développement embryonnaire chez la souris. Cette étude a été réalisée afin de savoir si l'expression transitoire d'un grand courant calcique de type T au cours d'une période de forte neuritogenèse et synaptogenèse intervient dans l'activité électrique pour faciliter ces phénomènes du développement.

Pour répondre à cette question, il a dans un premier temps fallu caractériser les propriétés biophysiques des canaux générant ce courant. Ainsi nous avons montré que la sous unité $Ca_v3.2$ est responsable d'un courant calcique de type T de grande amplitude. Nous avons aussi montré que cette sous-unité tend à disparaître au cours du développement embryonnaire de la souris. Ceci nous a conduit à vérifier son rôle au niveau de l'activité électrique au cours de cette période.

Par cette étude, nous avons aussi pu mettre en évidence une nouvelle caractéristique de cette isoforme, une sensibilité importante aux stimulations mécaniques. Cette dernière propriété apparaît ainsi comme un bon moyen de discriminer les trois isoformes des canaux calciques de type T. De plus, cette sensibilité particulière pourrait conduire à une régulation spécifique de cette isoforme lui conférant une fonction propre dans les neurones où elle est présente. Cette sensibilité mécanique de $Ca_v3.2$ peut être impliquée dans le développement. En effet les épines dendritiques sont capables de générer des contractions momentanées en relation avec des augmentations transitoires de la concentration intracellulaire en calcium évoquée par des potentiels d'action (Korkotian et Segal, 2001). Dans le développement des afférences vestibulaires, la sensibilité mécanique de $Ca_v3.2$ doit

réguler ces mouvements. Alors que le modèle d'innervation entre les deux types de cellules ciliées est complexe, la participation précise des courant calciques de type T dans l'ontogenèse des processus d'innervation doit encore être élucidée. Il serait très intéressant d'étudier en détail comment les canaux calciques $Ca_v3.2$ modulent la maturation des neurones vestibulaires et la synaptogenèse des cellules ciliées. Il pourrait être envisagé que cette sous-unité intervient dans le choix du type de synapse que le neurone va établir : synapse en calice ou synapse en bouton.

Cette caractéristique de $Ca_v3.2$ que nous avons mise en évidence apporte de nouvelles informations sur les propriétés biophysiques de ces canaux et il serait intéressant d'étudier plus en détail cette sensibilité mécanique.

Nous avons vérifié l'implication des conductances calciques dans l'activité électrique. Nous avons montré que $Ca_v3.2$ génère une dépolarisation post potentiel voire un potentiel d'action calcique. Ceci augmente le seuil d'excitabilité cellulaire et favorise donc l'apparition d'une activité électrique de décharge. Cette activité de décharge pourrait favoriser la pousse neuritique et le dialogue entre le cône de croissance et la cellule sensorielle. Lors de la connexion entre les deux, la présence d'une activité électrique permet la stabilisation du contact. D'autre part, cette dépolarisation post potentiel induit une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire en calcium. Ces augmentations transitoires de calcium pourraient intervenir dans les étapes de développement de l'afférentation vestibulaire en contrôlant la croissance et le guidage des axones comme il est décrit pour la moelle épinière embryonnaire (Gomez et Spitzer, 1999). La contribution de $Ca_v3.2$ dans la différenciation morphologique a été confirmée dans les cellules de la lignée NG108-15 où ce canal induit la neuritogenèse (Chemin *et al.*, 2002b).

Une deuxième sous-unité calcique de type T a aussi été mise en évidence, il s'agit de $Ca_v3.1$. L'expression de cette isoforme persiste dans une faible proportion de neurones après la naissance. Les études électrophysiologiques ne sont plus possibles au delà de P6 car la présence de la gaine de myéline ne permet pas l'approche des pipettes. Ceci ne permet donc pas de vérifier si cette expression perdure au-delà des stades étudiés et si elle est corrélée à une forme particulière de

l'activité électrique ou une taille particulière de neurones (de petit ou de gros diamètre). Les résultats présentés ici vont en faveur d'une coexistence des deux isoformes des courants calciques de type T, toutefois la faible amplitude du courant généré par $Ca_v3.1$ est surprenante. Ceci peut être dû à une localisation temporelle différente de cette sous-unité. En effet $Ca_v3.1$ peut être impliquée dans les phénomènes de différenciation précoce des cellules multipotentes en neurones comme décrit dans les cellules du rétinoblastome Y29 (Bertolesi *et al.*, 2003). Dans ces cellules, une régulation plus faible du gène $\alpha1G$ est la conséquence de la différenciation neuronale. Les mitoses terminales ont lieu à E11/E12 dans les neurones vestibulaires, le courant enregistré lors de notre étude peut représenter ce qu'il reste de ces processus de différenciation précoce.

A E17, la présence d'un épaulement sur la phase de repolarisation du potentiel d'action a été mise en évidence sur l'activité électrique des neurones. Grâce à de premiers résultats, la présence de cet épaulement a pu être corrélée avec l'expression d'un courant calcique de type P/Q. Étant donné que cet épaulement n'est présent que transitoirement au cours du développement, il pourrait être dû à une conductance calcique de type P plutôt que Q. En effet, cette dernière a été montrée comme présentant un pic d'expression à E17 puis son expression diminue à la naissance. Toutefois, ce phénomène est concomitant avec une forte période de maturation des neurones qui viennent de terminer leur mitose terminale. Il est donc envisageable que la présence de cet épaulement soit due à une immaturité de certaines conductances potassiques impliquant un déséquilibre dans les propriétés de repolarisation post potentiel. Les études portant sur la caractérisation des conductances potassiques du soma des neurones vestibulaires ont été réalisées après la naissance. Une étude sur l'évolution de ces conductances au cours du développement pourrait apporter des informations sur cette forme d'activité particulière.

Afin de comprendre le rôle de courant calcique de type T généré par $Ca_v3.2$, nous avons réalisé une étude utilisant des oligonucléotides antisens dont le but était d'inhiber la synthèse des canaux calciques $Ca_v3.2$. Ceci nous a permis de montrer

une diminution de la pousse neuritique sans modifier le nombre d'embranchements. Ce ralentissement de la pousse neuritique, grâce à des enregistrements électrophysiologiques a pu être corrélé avec l'absence du canal ionique fonctionnel. Ceci nous permet de conclure que cette sous-unité est directement impliquée dans la mise en place du système vestibulaire en permettant l'établissement de synapses entre les cellules sensorielles et les neurones. Toutefois cette étude sur le rôle physiologique de $Ca_v3.2$ au cours développement reste incomplète. L'utilisation d'un système de co-culture de neurones vestibulaires primaires et de cellules ciliées pourrait permettre de mesurer l'impact de ce courant calcique dans des conditions de neuritogenèse plus proche de ce qui se passe in vivo. En effet l'utilisation de culture de neurones seuls ne permet pas de prendre en compte le dialogue qui s'établit entre les neurones et les cellules sensorielles. L'apport de ce modèle permettrait dans un premier temps de mesurer l'évolution des courants calciques de type T en fonction de l'établissement du contact synaptique. Dans un deuxième temps il pourrait être vérifié l'implication de ces courants dans la formation des synapses et plus précisément dans le choix du type synaptique qui va être établi, c'est-à-dire type I ou type II.

ANNEXE

The involvement of $\text{Ca}_v3.2/\alpha_{1H}$ T-type calcium channels in excitability of mouse embryonic primary vestibular neurones

Laurence Autret¹, Ilana Mechaly¹, Frédérique Scamps¹, Jean Valmier¹, Philippe Lory² and Gilles Desmadryl¹

¹Institut des Neurosciences de Montpellier, INSERM U583, Hôpital Saint Eloi, 80 rue Augustin Fliche, 34091 Montpellier cedex 5, France

²Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR 5203, INSERM U661, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier cedex 5, France

Ca^{2+} influx through voltage-gated calcium channels probably influences neuronal ontogenesis. Many developing neurones transiently express T-type/ Ca_v3 calcium channels that contribute to their electrical activity and potentially to their morphological differentiation. Here we have characterized the electrophysiological properties and the functional role of a large T-type calcium current that is present in mouse developing primary vestibular neurones at embryonic day E17. This T-type current showed fast activation and inactivation, as well as slow deactivation kinetics. The overlap of activation and inactivation parameters produced a window current between -65 and -45 mV. Recovery from short-term inactivation was slow suggesting the presence of the $\text{Ca}_v3.2$ subunit. This T-type current was blocked by micromolar concentrations of Ni^{2+} and was inhibited by fast perfusion velocities in a similar fashion to recombinant $\text{Ca}_v3.2$ T-type channels expressed in HEK-293 cells. More importantly, current clamp experiments have revealed that the T-current could elicit afterdepolarization potentials during the repolarization phase of action potentials, and occasionally generate calcium spikes. Taken together, we demonstrate that the $\text{Ca}_v3.2$ subunit is likely to be the main T-type calcium channel subunit expressed in embryonic vestibular neurones and should play a key role in the excitability of these neurones during the ontogenesis of vestibular afferentation.

(Resubmitted 26 April 2005; accepted after revision 15 June 2005; first published online 16 June 2005)

Corresponding author G. Desmadryl: INSERM U583, INM, Hôpital Saint Eloi, 80 rue Augustin Fliche, 34091 Montpellier cedex 5, France. Email: desmad@univ-montp2.fr

During early neuronal differentiation, Ca^{2+} entries play a critical role in axon outgrowth, growth cone motility (Spitzer *et al.* 2000a) and neuronal excitability (Spitzer *et al.* 2000b; Martin-Caraballo & Greer, 2001). It is recognized that voltage-gated calcium channels participate in this Ca^{2+} influx (McCobb *et al.* 1989; Thompson & Wong, 1991; Lorenzon & Foehring, 1995) and contribute to neuronal differentiation (Desarmenien & Spitzer, 1991; Gu & Spitzer, 1995; Tang *et al.* 2003). Because they are expressed at the early stages of neuronal development, T-type, low-voltage-activated (LVA) calcium channels (T-channels) have long been shown to play a crucial role in neuronal differentiation (Yaari *et al.* 1987; McCobb *et al.* 1989; Thompson & Wong, 1991; Desarmenien *et al.* 1993).

To date, three different T-channel subunit isoforms, designated as $\text{Ca}_v3.1/\alpha_{1G}$, $\text{Ca}_v3.2/\alpha_{1H}$ and $\text{Ca}_v3.3/\alpha_{1I}$, have been cloned and characterized (Cribbs *et al.* 1998; Perez-Reyes *et al.* 1998; Lee *et al.* 1999a; Monteil *et al.* 2000a,b). These subunits vary in their

electrophysiological properties such as activation, inactivation and deactivation kinetics, as well as recovery properties following short-term inactivation (Klockner *et al.* 1999; Lee *et al.* 1999a; McRory *et al.* 2001a,b; Chemin *et al.* 2002a). These isoforms also display distinct sensitivity to Ni^{2+} (Lee *et al.* 1999b), show differences in their distribution in the nervous system (Talley *et al.* 1999) and, as expected, differ in their roles in physiology (for review see Perez-Reyes, 2003). Further, $\text{Ca}_v3.2$ subunit expression has been correlated with skeletal muscle (Bijlenga *et al.* 2000) and neuronal (Chemin *et al.* 2002b; Mariot *et al.* 2002) differentiation.

In the mouse embryonic peripheral vestibular system, large T-type calcium currents (T-currents) were recorded in neurones isolated between embryonic day 14 (E14) and E17 (Chambard *et al.* 1999). The proportion of neurones with a large T-current decreased drastically between E17 and postnatal day 4 (P4) (Desmadryl *et al.* 1997; Chambard *et al.* 1999). This change in T-channel expression coincides

with the neurite outgrowth which starts at E13 and E14 and reaches a maximum around E17 (Nordemar, 1983), when the first synaptic contacts with the sensory cells are observed (Anniko, 1983; Mbiene *et al.* 1988; Desmadryl & Sans, 1990). Because the presence of a large T-current at E17 is transient and occurs at a critical period of the development and maturation of vestibular neurones, we have analysed its properties and function in acutely isolated E17 vestibular neurones. Here, we demonstrate that their electrophysiological and pharmacological properties are similar to those of the T-current generated by the recombinant Ca_v3.2 subunit, and that these T-channels play an important role in the excitability of developing vestibular neurones.

Methods

Isolation of primary vestibular neurones

Pregnant Swiss mice (CERJ, Le Genest, France) were killed by inhalation of CO₂ followed by cervical dislocation in accordance with French and European guidelines. The age of the E17 fetuses was determined according to the vaginal plug day (E1). The gravid uterus was collected in sterile phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen) supplemented with glucose (33 mM). The embryos were killed by decapitation. For each experiment about 20 vestibular ganglia were dissected and collected in sterile PBS and enzymatic dissociation was performed by treatment with 0.15% EDTA-trypsin at 37°C for 6 min. The enzymatic reaction was stopped by addition of 10% fetal calf serum (Invitrogen). The culture medium contained Neurobasal Medium supplemented with 2% B-27 (Invitrogen), 25 μM glutamate and 0.5 mM glutamine. Mechanical dissociation was performed with fire-polished Pasteur pipettes of decreasing diameters. Ganglia were carefully triturated and neurones were plated onto 35 mm culture dishes (Nunc) previously coated with 10 μg ml⁻¹ polyornithine. Electrophysiological experiments were performed between 2 and 6 h after dissociation.

Ca_v3 transfection of HEK-293 cells

The culture and transfection of human embryonic kidney (HEK-293) cells were performed as previously described (Chemin *et al.* 2002a). The following cDNAs encoding for human α_{1G} (Monteil *et al.* 2000a), human α_{1I-a} (Monteil *et al.* 2000b) and human α_{1H} (Cribbs *et al.* 1998) were mixed with reporter cDNAs (GFP or CD8) using a 10 : 1 ratio. Two days after transfection, cells were re-plated at low confluence and T-currents were recorded as previously described (Chemin *et al.* 2002a).

Electrophysiological recordings

The patch-clamp technique was used in the whole-cell configuration to record ionic currents under voltage-clamp conditions and action potentials (APs) under current-clamp conditions using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Calcium currents were recorded using the following extracellular solution (mM): TEA-Cl 120, Hepes 10, glucose 10, and CaCl₂ 2, pH 7.35 (with TEA-OH). Recording pipettes (2–3 MΩ) were pulled from microhaematocrit tubes (Modulohm I/S, Herlev, Denmark) and filled with the following solution (mM): CsCl 130, Hepes 25, glucose 10, EGTA 10, Mg-ATP 3, Na-GTP 1, pH 7.35 (with CsOH). To record APs, the extracellular solution contained (mM): NaCl 135, Hepes 10, glucose 10, MgCl₂ 1, KCl 5, and CaCl₂ 2, pH 7.35 (with NaOH). The pipette solution contained (mM): KCl 135, Hepes 10, glucose 10, NaCl 5, EGTA 5, ATP-Mg 3, GTP-Na 1, pH 7.35 (with KOH). The osmolarity of the all buffers used in this study was 310 mosmol l⁻¹. Series resistances were in the range of 5–9 MΩ corrected to 85% when necessary. The membrane capacitance could be charged with a time constant of 100 μs. No online linear leakage compensation was performed. Current signals were filtered at 10 kHz, digitized and stored. The mechanical response of T-channels was studied using a velocity-controlled perfusion system (Microlab 500B/C Series Diluter, Hamilton Company, Reno, NV, USA). Calibrated pipettes with 30 μm diameter tips were placed at a distance of 1 mm from the recorded cells to deliver extracellular medium with various velocities. Application of Ni²⁺ was performed by the successive application of various concentrations of Ni²⁺ delivered by a slow flow gravity over a 100–120 s period.

Data analysis

All experimental parameters, such as the holding and test potentials, were controlled with an IBM PC equipped with a Tecmar Labmaster analog interface (Axon Instruments). Cell stimulation, data acquisition, and analysis were performed using pCLAMP software (v6, Axon Instruments). T-current activation curves were obtained from current–voltage (*I*–*V*) relationships using the equation $g_{\max} = I_{\text{peak}} / (V_m - V_R)$ where I_{peak} is the maximum current, V_m the voltage command and V_R the apparent calcium reversal potential. Since the vestibular neurones also displayed large high-voltage-activated (HVA) calcium currents (Desmadryl *et al.* 1997) we only could estimate the value of V_R at 40 mV, using an extrapolation of the ascending *I*–*V* curve ($n = 8$). Conductance values were normalized and fitted with the standard Boltzmann equation $G/G_{\max} = 1 / (1 + \exp((V_{1/2ac} - V_a)k_a))$ where G is the conductance at V_a potential, G_m the

maximum conductance, $V_{1/2ac}$ the midpoint of the activation curve and K_a the activation slope factor. Steady-state inactivation curves were obtained using a double-pulse protocol in which a -40 mV test pulse was preceded by a 5 s conditioning pulse at various voltages from -110 to -20 mV. Peak current at various potentials was normalized to the peak T-current amplitude measured from -110 mV and steady-state inactivation was plotted *versus* the conditioning potential. Data were fitted with a Boltzmann equation of $I/I_{max} = 1/(1 + \exp((V_i - V_{1/2inac})/k_i))$ where I is the peak current at V_i potential, I_{max} the maximum current for the -110 mV conditioning pulse, $V_{1/2inac}$ the half-inactivation potential and K_i the inactivation slope factor. Time constants (τ) of activation and inactivation were best fitted with a single-exponential function of the form $I(t) = A \exp(-t/\tau)$ where A was the current peak and τ the exponential time constant. Kinetics of recovery from short inactivation were calculated with a double-exponential equation of the form $I(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + C$, where A_1 and A_2 were the amplitudes of each component, τ_1 and τ_2 the time constants. The Ni^{2+} concentration-effect relationship was fitted with a Hill equation of the form

$I(x) = Ax^n/(IC_{50}1^n + x^n)$ where A was the maximum response and n the Hill coefficient. Spike and after-depolarization potential (ADP) analyses were performed using pCLAMP software (v8, Axon Instruments). The AP peak values and the half-widths were determined. Rise and decay times were measured from 10% to 90% from the bottom and the top of the events. The ADP amplitudes and half-repolarization times were measured. Pooled data are given as mean \pm s.d. Statistical significances were determined using Student's t test.

Results

Electrophysiological characteristics of the T-current in vestibular neurones

Based on the amplitude of the T-current, we previously reported that E17 primary vestibular neurones could be divided into two subpopulations (Desmadryl *et al.* 1997; Chambard *et al.* 1999). In the present study, we have focused our attention on the electrophysiological properties of the neurones with large T-current amplitudes ($I > 200$ pA in 2 mM Ca^{2+}), which represents 75% of the recorded cells (Fig. 1A). Calcium currents were recorded

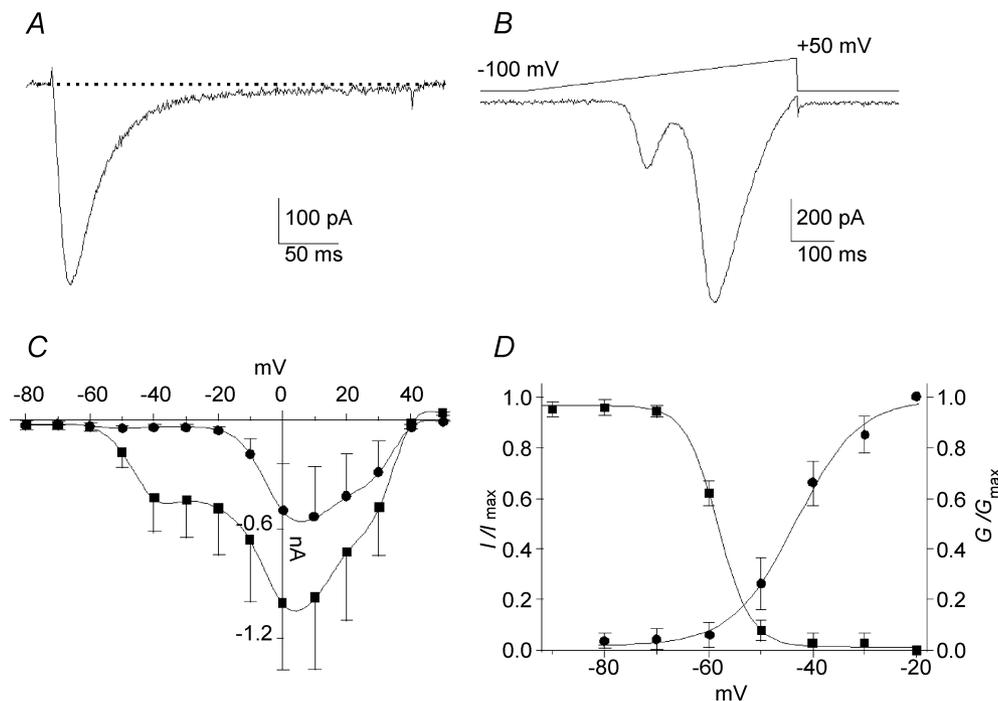


Figure 1. Calcium currents recorded in E17 primary vestibular neurones

A, typical trace of T-type current recorded in a neurone displaying large current amplitude. The current was evoked by a -35 mV pulse, at voltage eliciting the maximum amplitude determined during a voltage ramp. B, corresponding voltage ramp from -100 to $+50$ mV (640 ms duration). C, I - V relationships of global calcium current recorded from $V_h -100$ mV from -80 to $+50$ mV (■, peak current; ●, sustained current). D, steady-state activation (●) and inactivation (■) curves of T-current. The continuous lines represent the best-fits of the Boltzmann distribution. The overlap of activation and inactivation suggests a window current between -65 and -45 mV.

from a holding potential (V_h) of -100 mV. The average capacitance of this neurone population was 12.3 ± 3.4 pF ($n=60$) and the mean amplitude of the T-current measured at -40 mV was 495 ± 255 pA ($n=36$). A ramp protocol was also used to visualize LVA and HVA calcium currents (Fig. 1B). Using this protocol, the LVA/T-current presented a maximum peak amplitude at -38.4 ± 5.5 mV ($n=22$). The second peak that reflected the activation of HVA currents showed a maximum at 1.8 ± 2.3 mV ($n=24$) (Fig. 1B). Figure 1C shows I - V relationships of the global current, elicited by a series of 300 ms step commands from V_h -100 mV, for the peak and the sustained currents, the latter being measured between 250 and 300 ms after the pulse onset ($n=20$). T-current activated between -60 and -50 mV, with peak current around -40 mV, while HVA activated above -20 mV. The voltage dependency of activation and inactivation properties of the T-current are illustrated in Fig. 1D where smooth curves correspond to Boltzmann fits with $V_{1/2ac} = -43.4 \pm 1.1$ mV (slope 6.0 ± 0.9 mV, $n=23$) and $V_{1/2inac} = -58.2 \pm 0.3$ mV, (slope 3.1 ± 0.3 mV $n=5$). These activation and inactivation parameters suggest a window current between -65 and -45 mV.

Activation and inactivation kinetics of the T-current displayed classical voltage-dependent properties between -50 and -20 mV (Fig. 2A–C). At -40 mV, the time to peak of activation was 14.8 ± 2.3 ms ($n=18$) and the time constants for activation (τ_{ac}) and inactivation

(τ_{inac}) were 10.0 ± 3.6 ms ($n=20$) and 32.9 ± 11.1 ms ($n=19$), respectively. To analyse T-current deactivation, cells were held at -100 mV, stepped to -40 mV for 8 ms and then hyperpolarized from -60 to -140 mV (Fig. 2D). T-current deactivation was best fitted by a mono-exponential function. The time constant of deactivation (τ_{deac}) was 5.28 ± 1.0 ms at -60 mV and 0.52 ± 0.09 ms at -140 mV ($n=12$) as illustrated in Fig. 2E.

The recovery of T-current following short-term inactivation was investigated from V_h -100 mV using two paired-pulse protocols lasting 100 ms applied at a voltage eliciting the peak current determined during ramp stimulation. Pulses were applied with an increasing interpulse duration every 10 s, up to 4.5 s (Fig. 3A). Increased interpulse intervals were correlated with progressive increases in amplitude of the second current response. These attained maximum amplitude when the interpulse interval exceeded 3.5 s. Normalized current amplitudes calculated as the ratio of the current recorded during the second pulse to those of the conditioning pulses were plotted as function of the interpulse intervals (Fig. 3B). The relationships between the current recovery and the increasing interpulse interval could be fitted with one exponential with a time constant of recovery (τ_{rec}) of 571 ± 140 ms ($n=22$). However, a two-exponential function improved the fit of the relationships with τ_{rec} of 117 ± 36 ms and 1394 ± 255 ms ($n=22$) for, respectively, the fast and the slow components. Recovery from

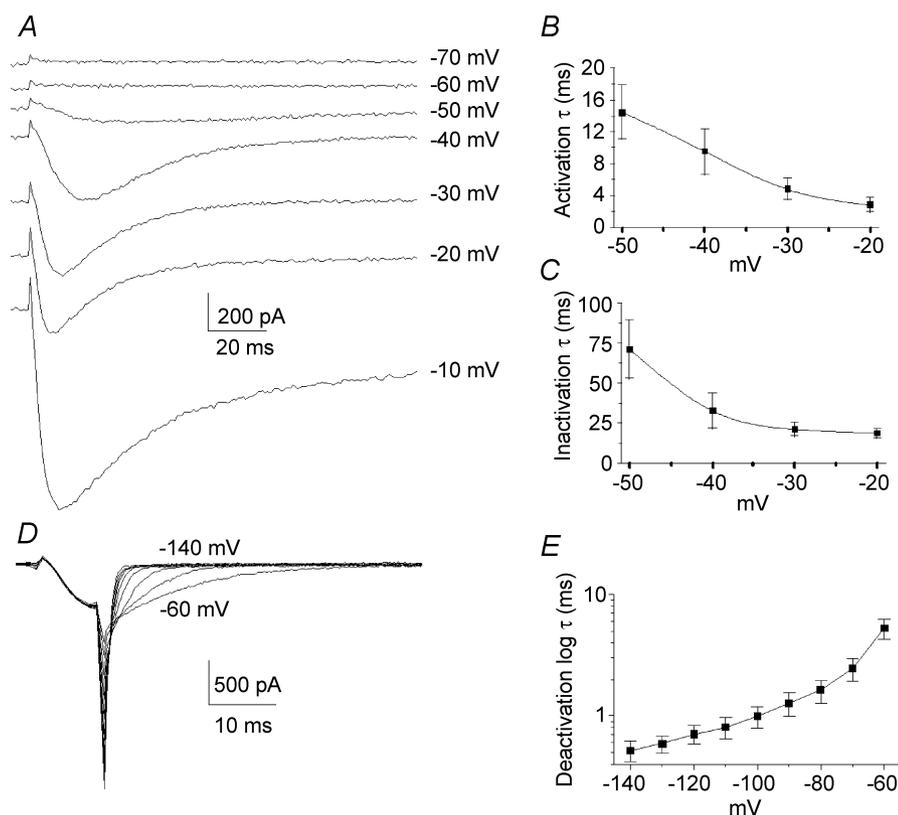


Figure 2. Activation, inactivation and deactivation properties of T-type current

A, original traces showing calcium currents at various potentials between -70 and -10 mV. The T-type current activated between -60 and -50 mV while high-voltage-activated (HVA) currents activated below -20 mV. B, time constants of activation of T-type current as function of the voltage. C, time constants of inactivation of T-type current as a function of the voltage. Both time constants of activation and inactivation were voltage dependent and present an acceleration of between -50 and -20 mV. D, original traces showing tail currents obtained by deactivating pulses from -140 mV to -60 mV. Pipette and cell capacitances were corrected and series resistances reduced to about 85%. E, plot of mean deactivating time constants of the fit of the tail currents as a function of the voltage.

inactivation for the T-current present in E17 vestibular neurones was reminiscent of that described for the $\text{Ca}_v3.2$ subunit (Chemin *et al.* 2002a).

T-current in vestibular neurones is affected by fast perfusion

It was reported that neuronal T-channels are affected by mechanical stimulation (Bouskila & Bostock, 1998). Because we routinely observed that a significant reduction of the T-current amplitude occurred when the primary vestibular neurones were subject to superfusion of extracellular medium, we have analysed the changes in T-current amplitude when stimulating the neurones with a fast perfusion device (see Methods). These experiments revealed that T-current amplitude in vestibular neurones was significantly reduced during perfusion (Fig. 4A) while HVA calcium currents were unaffected (Fig. 4B). Current amplitude reduction was velocity dependent and could reach up to 40% (average value $30 \pm 17\%$, $n = 24$) for the highest velocity ($2 \mu\text{l s}^{-1}$). Voltage ramps applied before and after the perfusion stimulation verified the absence of shift in the activation properties (Fig. 4B). When the perfusion velocity was set to $1 \mu\text{l s}^{-1}$, current amplitude reached a minimum in $78 \pm 14 \text{ s}$ ($n = 20$) after the beginning of the extracellular medium application. No change in either $I-V$ relationships (evaluated on voltage ramps) or time to peak of activation were observed before and after the perfusion ($P > 0.2$, $n = 19$). The inactivation rates appeared to be slightly slower after perfusion ($P = 0.01$, $n = 17$). As illustrated in Fig. 4C, long-term recordings subsequent to the extracellular medium application ($1 \mu\text{l s}^{-1}$) revealed that the recovery in current amplitude, i.e. return to the initial T-current amplitude, was obtained in about 7 min (ranging from 5 to 15 min, $n = 4$).

Since little is known about how recombinant T-channels are affected by perfusion velocity we have conducted similar experiments on HEK-293 cells that were transfected with Ca_v3 cDNAs. Recombinant T-currents were recorded before and after changes in flow velocities (Fig. 4D–F). Interestingly, while currents generated by the $\text{Ca}_v3.1$ (Fig. 4D) and $\text{Ca}_v3.3$ (Fig. 4F) subunits remained insensitive to such mechanical stimulus ($n = 8$ and $n = 3$, respectively), the T-current amplitude could be reduced up to 35% in cells transfected with the $\text{Ca}_v3.2$ subunit (Fig. 4E). On average, $\text{Ca}_v3.2$ current amplitude was significantly reduced by $24 \pm 9\%$ ($n = 11$). For perfusion velocity set to $1 \mu\text{l s}^{-1}$, $\text{Ca}_v3.2$ current amplitude reached a minimum in $35 \pm 10 \text{ s}$ ($n = 6$) after the beginning of perfusion. No change in $I-V$ relationships, time to peak of activation or inactivation rates were observed before and after the perfusion of recombinant Ca_v3 channels ($P > 0.2$, $n = 6$). Overall, these results

indicated that the mechanical sensitivity of the T-channels in E17 vestibular neurones was similar to that of the $\text{Ca}_v3.2$ subunit as expressed in HEK-293 cells.

Sensitivity to Ni^{2+}

The analysis of sensitivity to Ni^{2+} of the T-current in primary vestibular neurones was performed under gentle superfusion of the recording chamber. A constant low rate of flow of extracellular medium was first applied to prevent any decrease in current amplitudes due to mechanical inhibition. When the T-current amplitude was stabilized in control perfusion, Ni^{2+} was applied at various concentrations. Figure 5A illustrates the T-current

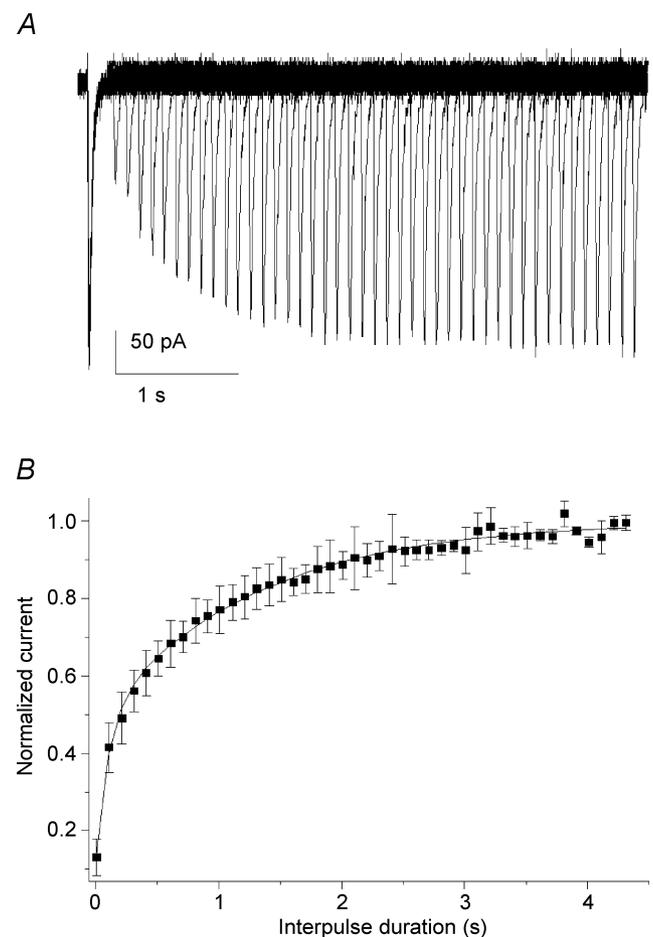


Figure 3. Time dependence of recovery following short inactivation

A, superimposed current traces obtained in an E17 vestibular neurone showing the current growth when the interval of two paired pulses (100 ms, -42 mV) increased from 0 ms up to 4.4 s (step 100 ms). B, plot of the mean normalized current amplitudes as a function of the interpulse interval. The relationships were fitted with two exponentials (continuous line). The time constants were 102 ± 13 and $1281 \pm 41 \text{ ms}$, and amplitudes 0.38 ± 0.03 and 0.53 ± 0.02 ($n = 22$) for the fast and slow components, respectively.

inhibition during $10 \mu\text{M Ni}^{2+}$ application, whereas HVA calcium currents were not changed (Fig. 5A, inset). Since our results showed a high Ni^{2+} affinity, the reversibility analysed at $0.3 \mu\text{M Ni}^{2+}$ concentration revealed a complete reversal after wash ($n = 5$; Fig. 5B). Figure 5C shows the percentage of the T-current block as a function of the Ni^{2+} concentration from 1 nM to 10 mM. The curve fitted using a one-term Hill equation gave an IC_{50} of $13.4 \mu\text{M}$.

Impact of T-current in AP profile

For current-clamp recordings in E17 primary vestibular neurones, APs were elicited from each neurone's resting potential ($-55.0 \pm 3.7 \text{ mV}$, $n = 34$) using a short depolarizing pulse (1.5 ms, 100–450 pA). The minimum current values required to trigger the APs and their thresholds were not significantly changed after $30 \mu\text{M Ni}^{2+}$ application (Table 1). The AP was characterized by a single Na^+ -dependent spike that could be followed by an ADP (see Fig. 6A and C) or, in 30% of the neurones, by an afterhyperpolarization (AHP) (Fig. 6D). It is important to stress here that, in our recording conditions, no train of consecutive APs was ever seen, even with long pulses (10 s). The ADP amplitudes ranged between 8 and 33 mV above the resting potential (Table 1), with a half-repolarization time lying between 4.1 and 21.9 ms (Table 1). In 11 recorded neurones, after AP recordings, neurones were switched to voltage-clamp

configuration in the presence of 300 nM TTX, 60 mM TEA and 5 mM 4-AP in the extracellular medium in order to block Na^+ and reduce K^+ conductances, as described earlier (Chabbert *et al.* 1997, 2001). In voltage-clamp conditions, when the current-clamp recordings had revealed the presence of an ADP (Fig. 6A) a large T-current was always observed, with a mean amplitude measured during a voltage ramp protocol of $325 \pm 383 \text{ pA}$ ($n = 5$) (Fig. 6B). Conversely, no large T-currents ($I < 60 \text{ pA}$) were recorded in any neurones that did not exhibit ADPs ($n = 6$, data not shown), but in which AHPs were present. More importantly, gentle addition of $10 \mu\text{M Ni}^{2+}$ to the bath medium of neurones reduced the ADP component (Fig. 6C) in all recorded neurones ($n = 13$). The shapes of Na^+ -dependent APs were not significantly different before and after $30 \mu\text{M Ni}^{2+}$ application when ADPs were recorded (Table 1; Fig. 6C). Application of $30 \mu\text{M Ni}^{2+}$ to neurones presenting an AHP had no effect on either the AP profiles or the post-potential component (Fig. 6D). Finally, when present, a significant reduction of the ADP components following APs was also obtained when a rapid perfusion of the extracellular medium was delivered to ADP-presenting neurones ($n = 8$, data not shown).

In some instances, recorded neurones could present an AP followed by Ca^{2+} spikes ($n = 5$) (Fig. 6E). These Ca^{2+} spikes were fully preserved when the major HVA calcium currents expressed in primary vestibular neurones, N and P/Q calcium currents (Desmadryl *et al.*

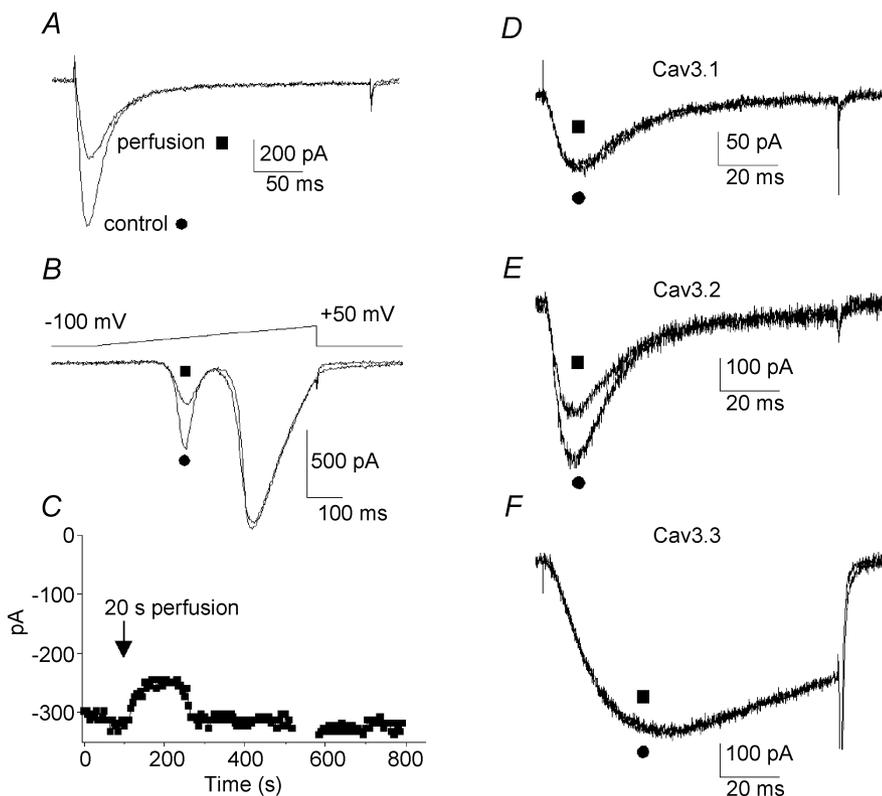


Figure 4. Mechanical responses of T-type current to the extracellular recording medium perfusion

A, original trace of T-type current recorded in E17 vestibular neurone, before (●) and after (■) application of extracellular recording medium at a velocity of $1 \mu\text{l s}^{-1}$. B, corresponding voltage ramps showing the absence of shift in I - V relationship. Note that HVA calcium currents were not reduced. C, long duration recordings showing the reversibility of the extracellular medium perfusion effect on vestibular neurones. Application of recording medium ($20 \mu\text{l}$, 20 s) induced a current decrease, which reached a minimum in about 60 s and was followed by an amplitude increase to return to the initial amplitude after about 220 s. D–F, T-currents recorded in HEK-293 cells transfected with the different $\text{Ca}_v3/\alpha 1$ T-channel subunits. Trace currents were illustrated before (●) and after (■) application of extracellular recording medium at a velocity of $1 \mu\text{l s}^{-1}$. While $\text{Ca}_v3.1/\alpha_{1G}$ (D) and $\text{Ca}_v3.3/\alpha_{11}$ (F) were insensitive to the perfusion, $\text{Ca}_v3.2/\alpha_{1H}$ (E) decreased by about 30%.

1997; Chambard *et al.* 1999), were blocked by ω -conotoxin GVIA (500 nM) and ω -agatoxin IVA (300 nM) ($n = 5$), respectively (Fig. 6E). When Na⁺ channels were blocked (300 nM TTX) and K⁺ conductances were reduced (60 mM TEA and 5 mM 4-AP) subsequent voltage-clamp recordings revealed a very large T-current (Fig. 6F, $I \sim 1400$ pA, for the illustrated neurone). The Ca²⁺ spikes remained stable when Na⁺-dependent spikes were blocked with 300 nM TTX but were abolished by 30 μ M Ni²⁺ (Fig. 6G).

Together, the Ni²⁺ sensitivity and mechanical sensitivity of the post-spike components in primary vestibular neurones strongly suggested that the occurrences following the AP were generated by the Ca_v3.2 subunit activation.

Discussion

Our results suggest that the T-channels found in embryonic primary vestibular neurones are most likely to be generated by the Ca_v3.2/ α_{1H} subunit. Although, the present study performed on native peripheral vestibular neurones did not molecularly identify the subunit carrying the large T-current, its high sensitivity to Ni²⁺, its

mechanosensitivity (similar to that obtained with the Ca_v3.2 subunit transfected in HEK-293 cells), as well as its electrophysiological properties, reveal that the T-channels recorded in vestibular neurones are comparable in most aspects to cloned Ca_v3.2 channels (for a review see Perez-Reyes, 2003). Therefore, our results strongly support the concept that the Ca_v3.2 subunit is involved in the physiology of vestibular neurones. This study also demonstrates that this T-current plays a critical role in the excitability of the vestibular neurones at E17, when ontogenesis of the peripheral vestibular system takes place.

Ni²⁺ sensitivity of native and Ca_v3.2 T-channels

High sensitivity to Ni²⁺ is a critical distinctive feature of the recombinant Ca_v3 channels since both Ca_v3.1 and Ca_v3.3 channels present a 20-fold lower sensitivity to Ni²⁺ than Ca_v3.2 (Lee *et al.* 1999b). Our data show that the block of T-current can be observed at a concentration as low as 100 nM and was reversible. Concentration dependence of the blockade of T-current by Ni²⁺ reveals an IC₅₀ of 13.4 μ M comparable to the IC₅₀ of 12 μ M reported for cloned Ca_v3.2 calcium channels (Lee *et al.* 1999b) and is in the range of the IC₅₀ of 3 μ M found in sensory

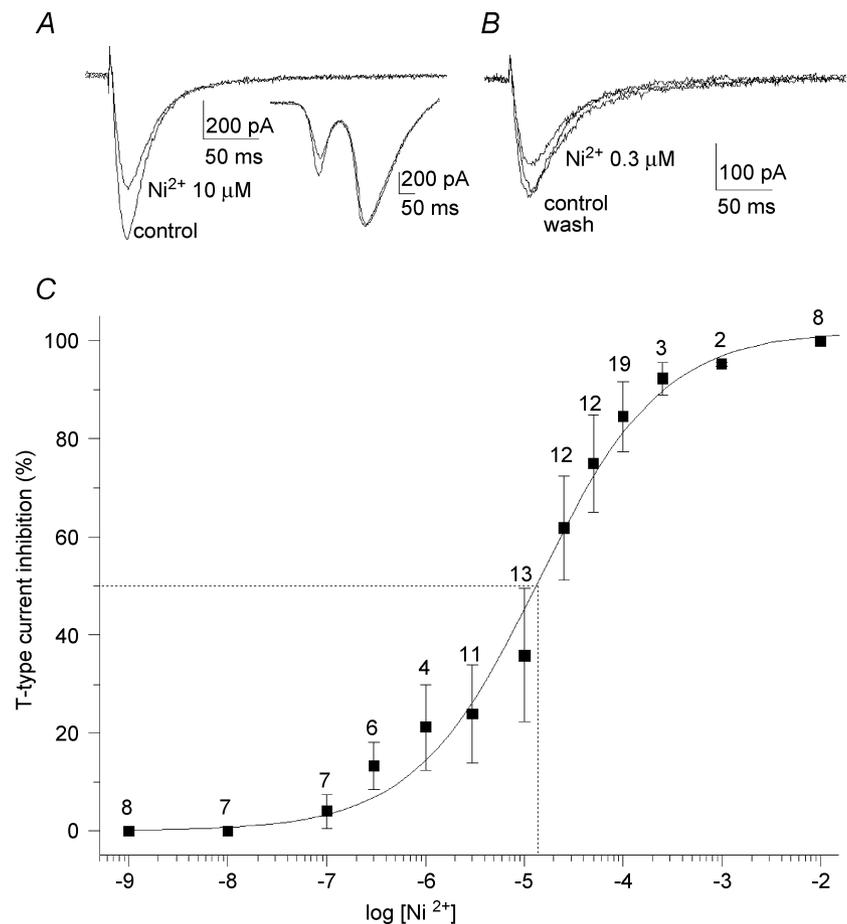


Figure 5. Effect of increasing concentration of Ni²⁺

A, effect of 10 μ M Ni²⁺ application on T-current. The HVA calcium currents were not affected (inset). *B*, reversible effect of 0.3 μ M Ni²⁺ application on T-current. *C*, concentration dependence of the blockade of T-type current by Ni²⁺. The smooth curve represents the fit of the Hill equation revealing an IC₅₀ of 13.4 μ M. The Hill coefficient was 0.7 ± 0.1 . Dotted lines illustrate the IC₅₀. The number of observations is given above the error bars. The mechanosensitivity response is not reported in the curve.

Table 1. Action potential (AP) and afterdepolarization potential (ADP) properties

	AP		ADP
	Control	Ni ²⁺	
Trigger (pA)	248 ± 35 (6)	260 ± 52 (6)	
Threshold (mV)	-31.10 ± 2.24 (7)	-31.17 ± 2.87 (7)	
Peak value (mV)	35.3 ± 6.1 (7)	33.8 ± 8.4 (7)	
10–90% rise time (ms)	0.35 ± 0.15 (7)	0.34 ± 0.12 (7)	
10–90% decay time (ms)	0.83 ± 0.20 (7)	0.83 ± 0.18 (7)	
Half-width (ms)	1.00 ± 0.28 (7)	0.98 ± 0.22 (7)	
Amplitude (mV)			13.8 ± 8.6 (15)
Half-repolarization (ms)			13.3 ± 6.4 (13)

All values are given as mean ± s.d. Values in parentheses refer to number of observations. The AP properties before and after Ni²⁺ application were never significantly different (*P* always > 0.25).

neurones (Dubreuil *et al.* 2004). Such high sensitivity to Ni²⁺ of the T-current is a strong pharmacological argument for the claim that the Ca_v3.2 channel subunit carries the large T-current present in developing primary vestibular neurones.

Mechanical sensitivity of native and Ca_v3.2 T-channels

Another novel aspect of this study is to demonstrate the sensitivity of the native and recombinant Ca_v3.2 channels to the perfusion flux. In vestibular neurones short-term application of extracellular medium produces a decrease in the T-current amplitude, and in current-clamp experiments suppresses the ADP component, suggesting a direct effect of the flux on the T-channels. These responses could be reversed several minutes after the end of the perfusion flux. We also observed a comparable mechanical inhibition of T-current on recombinant Ca_v3.2 channels expressed in HEK-293 cells while no such modulation was found with Ca_v3.1 and Ca_v3.3 channels. Similarly, Calabrese *et al.* (2002) reported that recombinant Ca_v3.3 channels were insensitive to stretch stimuli. An identical mechanosensitivity of T-current induced by a stream of bath solution has been reported in rat anterior pituitary cells (Ben-Tabou *et al.* 1994) as well as in rat sensory neurones (Bouskila & Bostock, 1998). This phenomenon was also reversible within several minutes. Since the Ca_v3.2 isotype appears to be the principal T-channel subunit in sensory neurones (Talley *et al.* 1999), our study reconciles data obtained in vestibular (sensory) neurones and in transfected HEK-293 cells. The mechanisms by which decreases in T-current occurred during fast flow perfusion are unknown. Stream flux could induce changes in cell volume and then modulate the activity of stretch channels as reported in magnocellular neurosecretory cells (Oliet & Bourque, 1993; Bourque & Oliet, 1997). This could be mediated by a combination of force transmission through cytoskeletal and biochemical constituents (for review see

Papadaki & Eskin, 1997). However, the latter hypothesis could not explain why among the three T-type Ca_v3 subunits expressed in HEK-293 cells only Ca_v3.2 is affected by the fast flow perfusion.

T-channels in vestibular neurones share properties of Ca_v3.2 subunit

The electrophysiological parameters that we have described here are complementary features to differentiate among T-type Ca_v3 subunits. The T-current in vestibular neurones showed fast activation and inactivation kinetics similar to those of Ca_v3.1 and Ca_v3.2, while the Ca_v3.3 current displayed activation and inactivation kinetics six times slower (Klockner *et al.* 1999; Lee *et al.* 1999a; McRory *et al.* 2001a,b; Chemin *et al.* 2002a). Therefore, a role for the Ca_v3.3 channels in vestibular neurones can be excluded. Deactivation kinetics is another criterion for identifying T-channel subunits since Ca_v3.1 and Ca_v3.2 currents deactivate slowly, as compared to the Ca_v3.3 current (Klockner *et al.* 1999; Lee *et al.* 1999a; McRory *et al.* 2001a,b). Our data show that the T-current deactivates with kinetics close to those of currents induced by Ca_v3.1 or Ca_v3.2 subunits (Klockner *et al.* 1999; Kozlov *et al.* 1999; Chemin *et al.* 2002a). However, the deactivation rate appeared to be faster than that reported for Ca_v3.2 and was closer to those of the Ca_v3.1 subunit (Klockner *et al.* 1999; Chemin *et al.* 2002a). Such discrepancies could reflect differences among human and rodent T-channels as previously reported in rat brain T-channels subunits expressed in HEK-293 cells (McRory *et al.* 2001a,b). Another difference from the cloned Ca_v3.2 channel was the 15 mV more positive half-steady-state inactivation voltage found in primary vestibular neurones compared to that reported in cloned channels. This could depend on disparities recorded in heterologous cell expression systems and those present in between channels native

neurones that may imply specific regulations unidentified to date.

Activation, inactivation and deactivation kinetics indicate that native T-channels present in E17 vestibular neurones are likely to correspond to either $Ca_v3.1$ or $Ca_v3.2$ isoforms. Interestingly, the demonstration that recovery from short inactivation of the $Ca_v3.2$ current was a significantly slower process than that of $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.3$ current recovery (Klockner *et al.* 1999; Chemin *et al.* 2002a) offers the possibility of distinguishing between $Ca_v3.1$ or $Ca_v3.2$ isoforms by an electrophysiological approach. The time constants of recovery from inactivation found in vestibular neurones were very slow and comparable to those reported

in $Ca_v3.2$ -transfected HEK-293 cells (Chemin *et al.* 2002a). However, the fits of the short inactivation recovery were improved by using two exponentials as previously reported for native T-currents in neurones (Bossu & Feltz, 1986; Takahashi *et al.* 1991), clonal pituitary cells (Herrington & Lingle, 1992) and skeletal muscle fibres (Berthier *et al.* 2002) expressing the $Ca_v3.2$ subunit. Our results indicate that the recovery following short inactivation could occur in two separate phases as reported by Berthier *et al.* (2002).

Role of T-current in AP profile

Our results suggest that T-channels could be implicated in AP repolarization components by inducing an ADP

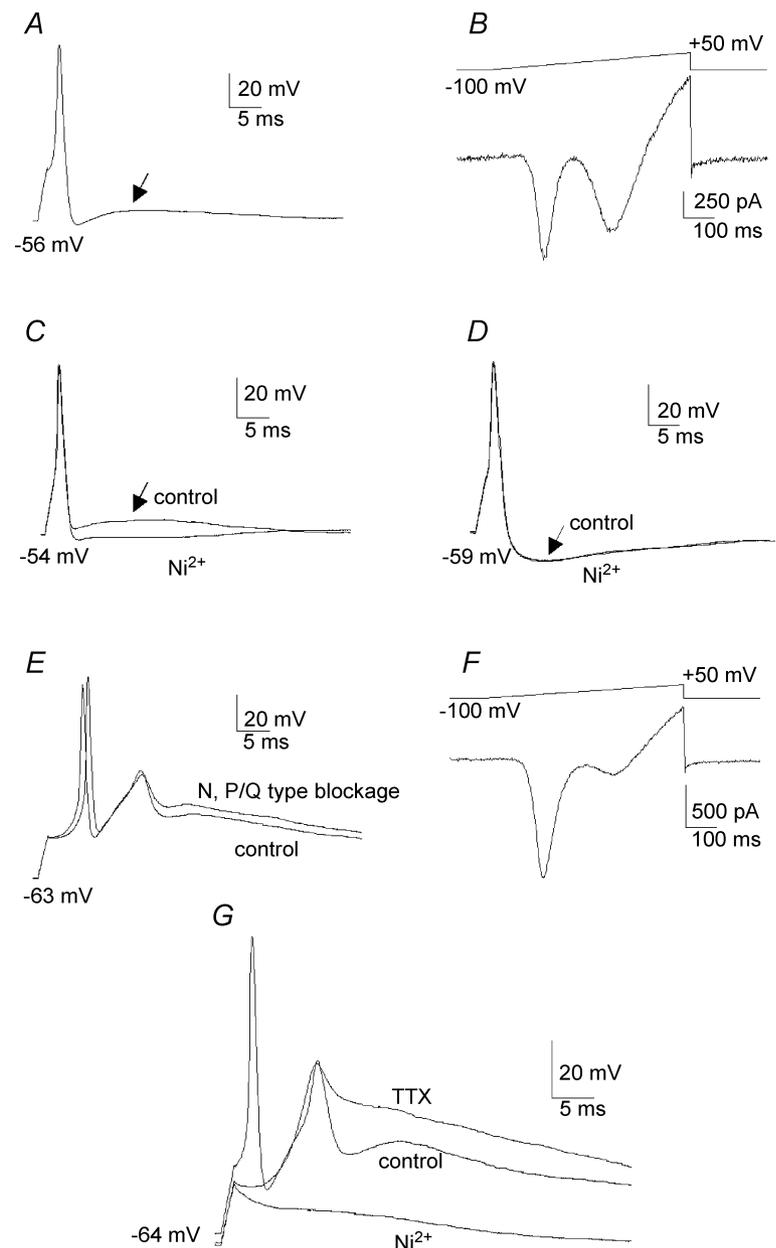


Figure 6. Implication of T-type current in AP profiles

A, action potential recorded in current clamp showing an afterdepolarization potential (ADP) (arrow) following the repolarization phase. *B*, corresponding voltage ramp recorded in the same neurone after application of TTX (300 nM), TEA (60 mM) and 4-AP (5 mM) to block the Na^+ currents and limit K^+ conductances. The voltage ramp reveals the presence of a large T-type current. It is noteworthy that the remaining K^+ conductances were presented at high voltage, mainly due to the absence of CsCl in the internal pipette medium. *C*, action potential presenting an ADP (arrow) which was blocked by the application of 10 μM Ni^{2+} . *D*, action potential presenting an afterhyperpolarization (AHP) that was insensitive to 30 μM Ni^{2+} application. *E*, Na^+ -dependent action potentials followed by Ca^{2+} spikes. Application of ω -conotoxin GVIA (500 nM) and ω -agatoxin IVA (300 nM) to block N and P/Q HVA calcium channels, respectively, did not change the calcium spike amplitude. *F*, voltage ramp recorded in the same neurone showing a high amplitude T-type current after blockage of the Na^+ and K^+ conductances. In the presence of GVIA and ω -agatoxin IVA, the remaining HVA component revealed the L- and R-type calcium currents that contribute to a small fraction of the global calcium current in primary vestibular neurones. *G*, Na^+ -dependent action potential followed by a Ca^{2+} spike. Application of TTX (300 nM) eliminated the Na^+ -dependent action potential without affecting the calcium spike which was completely abolished by the addition of 30 μM Ni^{2+} .

or, in some instances, Ca^{2+} spikes. The involvement of the $\text{Ca}_v3.2$ subunit was further confirmed since ADP could be reduced during the application of $10 \mu\text{M}$ Ni^{2+} . At this concentration, the ADP was not totally removed since the T-current diminished by about 40%. Because the HVA calcium currents were affected by higher Ni^{2+} concentration (and probably other conductances as calcium-activated currents) we were unable to carry out concentration-dependent blockage of ADP and completely abolish this component. This contribution of T-channels in central neurones has been reported and already attributed to $\text{Ca}_v3.2$ channels since a low concentration of Ni^{2+} blocked ADP and suppressed intrinsic burst firing (Su *et al.* 2002; Dubreuil *et al.* 2004). In rat dorsal root ganglion neurones, T-current was shown to generate ADP that contributes to burst firing (Lovinger & White, 1989; Dubreuil *et al.* 2004). Moreover, in rat sensory neurones, changes in the AP repolarization phase induced by the flow of bath solution have also been reported and attributed to N-type and T-channels (Bouskila & Bostock, 1998).

Physiological significance

Based on our present data, we suggest that $\text{Ca}_v3.2$ channels are functionally expressed in E17 embryonic vestibular neurones when neuronal growth and synaptogenesis between afferents and sensory hair cells occur (Desmadryl & Sans, 1990), and therefore may play a key role in these events. The involvement of $\text{Ca}_v3.2$ in morphological differentiation has been identified in the neuroblastoma–glioma NG108-15 cell line where these channels contribute to both electrical behaviour and neuritogenesis (Chemin *et al.* 2002*b*). This $\text{Ca}_v3.2$ channel activity should contribute to a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ which is likely to participate in the vestibular ontogenesis by controlling axon growth and guidance, as described for embryonic spinal cord development (Gu & Spitzer, 1993; Gomez & Spitzer, 1999). Since the afferent patterns of vestibular hair cells are complex (Baird *et al.* 1988; Fernandez *et al.* 1990; Goldberg, 1991), it will therefore be relevant to investigate in detail how $\text{Ca}_v3.2$ channels modulate the ontogenesis of primary vestibular afferents and the related synaptogenesis in sensory hair cells. The role of the mechanical sensitivity of $\text{Ca}_v3.2$, which could be involved in the development of the vestibular system, should be explored further since dendritic spines are able to generate momentary contractions in relation to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients evoked by action potentials (Korkotian & Segal, 2001). Further investigations could now include the exploration of the vestibular development in $\text{Ca}_v3.2$ knockout mice (Chen *et al.* 2003).

References

- Anniko M (1983). Early development and maturation of the spiral ganglion. *Acta Otolaryngol* **95**, 263–276.
- Baird RA, Desmadryl G, Fernandez C & Goldberg JM (1988). The vestibular nerve of the chinchilla. II. Relation between afferent response properties and peripheral innervation patterns in the semicircular canals. *J Neurophysiol* **60**, 182–203.
- Ben-Tabou S, Keller E & Nussinovitch I (1994). Mechanosensitivity of voltage-gated calcium currents in rat anterior pituitary cells. *J Physiol* **476**, 29–39.
- Berthier C, Monteil A, Lory P & Strube C (2002). α_{1H} mRNA in single skeletal muscle fibres accounts for T-type calcium current transient expression during fetal development in mice. *J Physiol* **539**, 681–691.
- Bijlenga P, Liu JH, Espinos E, Haeggeli CA, Fischer-Lougheed J, Bader CR & Bernheim L (2000). T-type α_{1H} Ca^{2+} channels are involved in Ca^{2+} signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7627–7632.
- Bossu JL & Feltz A (1986). Inactivation of the low-threshold transient calcium current in rat sensory neurones: evidence for a dual process. *J Physiol* **376**, 341–357.
- Bourque CW & Oliet SH (1997). Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* **59**, 601–619.
- Bouskila Y & Bostock H (1998). Modulation of voltage-activated calcium currents by mechanical stimulation in rat sensory neurones. *J Neurophysiol* **80**, 1647–1652.
- Calabrese B, Tabarean IV, Juranka P & Morris CE (2002). Mechanosensitivity of N-type calcium channel currents. *Biophys J* **83**, 2560–2574.
- Chabbert C, Chambard JM, Sans A & Desmadryl G (2001). Three types of depolarization-activated potassium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *J Neurophysiol* **85**, 1017–1026.
- Chabbert C, Chambard JM, Valmier J, Sans A & Desmadryl G (1997). Voltage-activated sodium currents in acutely isolated mouse vestibular ganglion neurones. *Neuroreport* **8**, 1253–1256.
- Chambard JM, Chabbert C, Sans A & Desmadryl G (1999). Developmental changes in low and high voltage-activated calcium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *J Physiol* **518**, 141–149.
- Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Bourinet E, Nargeot J & Lory P (2002*a*). Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms (α_{1G} , α_{1H} and α_{1I}) to neuronal excitability. *J Physiol* **540**, 3–14.
- Chemin J, Nargeot J & Lory P (2002*b*). Neuronal T-type α_{1H} calcium channels induce neuritogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *J Neurosci* **22**, 6856–6862.
- Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA & Campbell KP (2003). Abnormal coronary function in mice deficient in α_{1H} T-type Ca^{2+} channels. *Science* **302**, 1416–1418.

- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M & Perez-Reyes E (1998). Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ Res* **83**, 103–109.
- Desarmenien MG, Clendening B & Spitzer NC (1993). In vivo development of voltage-dependent ionic currents in embryonic *Xenopus* spinal neurons. *J Neurosci* **13**, 2575–2581.
- Desarmenien MG & Spitzer NC (1991). Role of calcium and protein kinase C in development of the delayed rectifier potassium current in *Xenopus* spinal neurons. *Neuron* **7**, 797–805.
- Desmadryl G, Chambard JM, Valmier J & Sans A (1997). Multiple voltage-dependent calcium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *Neuroscience* **78**, 511–522.
- Desmadryl G & Sans A (1990). Afferent innervation patterns in crista ampullaris of the mouse during ontogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* **52**, 183–189.
- Dubreuil AS, Boukhaddaoui H, Desmadryl G, Martinez-Salgado C, Moshourab R, Lewin GR, Carroll P, Valmier J & Scamps F (2004). Role of T-type calcium current in identified d-hair mechanoreceptor neurons studied in vitro. *J Neurosci* **24**, 8480–8484.
- Fernandez C, Goldberg JM & Baird RA (1990). The vestibular nerve of the chinchilla. III. Peripheral innervation patterns in the utricular macula. *J Neurophysiol* **63**, 767–780.
- Goldberg JM (1991). The vestibular end organs: morphological and physiological diversity of afferents. *Curr Opin Neurobiol* **1**, 229–235.
- Gomez TM & Spitzer NC (1999). In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* **397**, 350–355.
- Gu X & Spitzer NC (1993). Low-threshold Ca^{2+} current and its role in spontaneous elevations of intracellular Ca^{2+} in developing *Xenopus* neurons. *J Neurosci* **13**, 4936–4948.
- Gu X & Spitzer NC (1995). Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca^{2+} transients. *Nature* **375**, 784–787.
- Herrington J & Lingle CJ (1992). Kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated Ca^{2+} current in rat clonal (GH3) pituitary cells. *J Neurophysiol* **68**, 213–232.
- Klockner U, Lee JH, Cribbs LL, Daud A, Hescheler J, Pereverzev A, Perez-Reyes E & Schneider T (1999). Comparison of the Ca^{2+} currents induced by expression of three cloned alpha1 subunits, alpha1G, alpha1H and alpha1I, of low-voltage-activated T-type Ca^{2+} channels. *Eur J Neurosci* **11**, 4171–4178.
- Korkotian E & Segal M (2001). Spike-associated fast contraction of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **30**, 751–758.
- Kozlov AS, McKenna F, Lee JH, Cribbs LL, Perez-Reyes E, Feltz A & Lambert RC (1999). Distinct kinetics of cloned T-type Ca^{2+} channels lead to differential Ca^{2+} entry and frequency-dependence during mock action potentials. *Eur J Neurosci* **11**, 4149–4158.
- Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T & Perez-Reyes E (1999a). Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* **19**, 1912–1921.
- Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL & Perez-Reyes E (1999b). Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J* **77**, 3034–3042.
- Lorenzon NM & Foehring RC (1995). Characterization of pharmacologically identified voltage-gated calcium channel currents in acutely isolated rat neocortical neurons. II. Postnatal development. *J Neurophysiol* **73**, 1443–1451.
- Lovinger DM & White G (1989). Post-natal development of burst firing behavior and the low-threshold transient calcium current examined using freshly isolated neurons from rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* **102**, 50–57.
- McCobb DP, Best PM & Beam KG (1989). Development alters the expression of calcium currents in chick limb motoneurons. *Neuron* **2**, 1633–1643.
- McRory JE, Santi CM, Hamming KS, Mezeyova J, Sutton KG, Baillie DL, Stea A & Snutch TP (2001a). Molecular and functional characterization of a family of rat brain T-type calcium channels. *J Biol Chem* **276**, 3999–4011.
- McRory JE, Santi CM, Hamming KS, Mezeyova J, Sutton KG, Baillie DL, Stea A & Snutch TP (2001b). *J Biol Chem* **276**, 30571. (Erratum for *J Biol Chem* **276**, 3999–4011.)
- Mariot P, Vanoverberghe K, Lalevee N, Rossier MF & Prevarskaya N (2002). Overexpression of an alpha1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* **277**, 10824–10833.
- Martin-Carballo M & Greer JJ (2001). Voltage-sensitive calcium currents and their role in regulating phrenic motoneuron electrical excitability during the perinatal period. *J Neurobiol* **46**, 231–248.
- Mbiene JP, Favre D & Sans A (1988). Early innervation and differentiation of hair cells in the vestibular epithelia of mouse embryos: SEM and TEM study. *Anat Embryol (Berl)* **177**, 331–340.
- Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P & Nargeot J (2000a). Molecular and functional properties of the human alpha1G subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem* **275**, 6090–6100.
- Monteil A, Chemin J, Leuranguer V, Altier C, Mennessier G, Bourinet E, Lory P & Nargeot J (2000b). Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha1I subunit. *J Biol Chem* **275**, 16530–16535.
- Nordemar H (1983). Embryogenesis of the inner ear. II. The late differentiation of the mammalian crista ampullaris in vivo and in vitro. *Acta Otolaryngol* **96**, 1–8.
- Oliet SH & Bourque CW (1993). Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature* **364**, 341–343.
- Papadaki M & Eskin SG (1997). Effects of fluid shear stress on gene regulation of vascular cells. *Biotechnol Prog* **13**, 209–221.
- Perez-Reyes E (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* **83**, 117–161.

- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M & Lee JH (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**, 896–900.
- Spitzer NC, Lautermilch NJ, Smith RD & Gomez TM (2000a). Coding of neuronal differentiation by calcium transients. *Bioessays* **22**, 811–817.
- Spitzer NC, Vincent A & Lautermilch NJ (2000b). Differentiation of electrical excitability in motoneurons. *Brain Res Bull* **53**, 547–552.
- Su H, Sochivko D, Becker A, Chen J, Jiang Y, Yaari Y & Beck H (2002). Upregulation of a T-type Ca^{2+} channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J Neurosci* **22**, 3645–3655.
- Takahashi K, Ueno S & Akaike N (1991). Kinetic properties of T-type Ca^{2+} currents in isolated rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **65**, 148–155.
- Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E & Bayliss DA (1999). Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* **19**, 1895–1911.
- Tang F, Dent EW & Kalil K (2003). Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *J Neurosci* **23**, 927–936.
- Thompson SM & Wong RK (1991). Development of calcium current subtypes in isolated rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* **439**, 671–689.
- Yaari Y, Hamon B & Lux HD (1987). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* **235**, 680–682.

Acknowledgements

The authors thank G. Dayanithi for critically reviewing the manuscript. We acknowledge Professor A. Sans director of the INSERM U432 laboratory where our first investigations were realized. We thank M. Breisse and D. Greuet for their assistance in the technical preparations. The work was supported by CNES grants 8529/00 and 793/01.

BIBLIOGRAPHIE

A

- al-Mohanna F. A., Cave J. et Bolsover S. R. (1992) A narrow window of intracellular calcium concentration is optimal for neurite outgrowth in rat sensory neurones. *Brain Res Dev Brain Res* 70(2), 287-90.
- Altman J. et Bayer S. A. (1982) Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 74, 1-90.
- Amato A., Al-Mohanna F. A. et Bolsover S. (1996) Spatial organization of calcium dynamics in growth cones of sensory neurones. *Brain Res Dev Brain Res* 92(1), 101-10.
- Anniko M. et Nordemar H. (1980) Embryogenesis of the inner ear. IV. Post-natal maturation of the secretory epithelia of the inner ear in correlation with the elemental composition in the endolymphatic space. *Arch Otorhinolaryngol* 229(3-4), 281-8.
- Anniko M., Nordemar H. et Wersall J. (1979) Genesis and maturation of vestibular hair cells. *Adv Otorhinolaryngol* 25, 7-11.
- Anniko M. et Wikstrom S. (1984) Pattern formation of the otic placode and morphogenesis of the otocyst. *Am J Otolaryngol* 5(6), 373-81.
- Assad J. A., Hacohen N. et Corey D. P. (1989) Voltage dependence of adaptation and active bundle movement in bullfrog saccular hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8), 2918-22.
- Aubert A., Norris C. H. et Guth P. S. (1995) Indirect evidence for the presence and physiological role of endogenous extracellular ATP in the semicircular canal. *Neuroscience* 64(4), 1153-60.

B

Bader C. R., Bertrand D. et Kato A. C. (1983) Membrane currents in a developing parasympathetic ganglion. *Dev Biol* 98(2), 515-9.

Bading H., Ginty D. D. et Greenberg M. E. (1993) Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260(5105), 181-6.

Bagger-Sjoberg D. (1974) The sensory hairs and their attachments in the lizard basilar papilla. *Brain Behav Evol* 10(1-3), 88-94.

Baird R. A., Desmadryl G., Fernandez C. et Goldberg J. M. (1988) The vestibular nerve of the chinchilla. II. Relation between afferent response properties and peripheral innervation patterns in the semicircular canals. *J Neurophysiol* 60(1), 182-203.

Baird R. A. et Lewis E. R. (1986) Correspondences between afferent innervation patterns and response dynamics in the bullfrog utricle and lagena. *Brain Res* 369(1-2), 48-64.

Barish M. E. (1991) Voltage-gated calcium currents in cultured embryonic *Xenopus* spinal neurones. *J Physiol* 444, 523-43.

Beam K. G. et Knudson C. M. (1988) Calcium currents in embryonic and neonatal mammalian skeletal muscle. *J Gen Physiol* 91(6), 781-98.

Benquet P., Le Guen J., Pichon Y. et Tiaho F. (2002) Differential involvement of Ca(2+) channels in survival and neurite outgrowth of cultured embryonic cockroach brain neurons. *J Neurophysiol* 88(3), 1475-90.

- Ben-Tabou S., Keller E. et Nussinovitch I. (1994) Mechanosensitivity of voltage-gated calcium currents in rat anterior pituitary cells. *J Physiol* 476(1), 29-39.
- Berninger B., Marty S., Zafra F., da Penha Berzaghi M., Thoenen H. et Lindholm D. (1995) GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation in vitro. *Development* 121(8), 2327-35.
- Berridge M. J., Bootman M. D. et Lipp P. (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* 395(6703), 645-8.
- Berthier C., Monteil A., Lory P. et Strube C. (2002) Alpha(1H) mRNA in single skeletal muscle fibres accounts for T-type calcium current transient expression during fetal development in mice. *J Physiol* 539(Pt 3), 681-91.
- Bertolesi G. E., Jollimore C. A., Shi C., Elbaum L., Denovan-Wright E. M., Barnes S. et Kelly M. E. (2003) Regulation of alpha1G T-type calcium channel gene (CACNA1G) expression during neuronal differentiation. *Eur J Neurosci* 17(9), 1802-10.
- Bickmeyer U., Muller E. et Wiegand H. (1993) Development of calcium currents in cultures of mouse spinal cord and dorsal root ganglion neurones. *Neuroreport* 4(2), 131-4.
- Birnbaumer L., Campbell K. P., Catterall W. A., Harpold M. M., Hofmann F., Horne W. A., Mori Y., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T. et al. (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13(3), 505-6.
- Bossu J. L. et Feltz A. (1986) Inactivation of the low-threshold transient calcium current in rat sensory neurones: evidence for a dual process. *J Physiol* 376, 341-57.
- Bourinet E., Alloui A., Monteil A., Barrere C., Couette B., Poirot O., Pages A., McRory J., Snutch T. P., Eschalier A. et Nargeot J. (2005) Silencing of the Cav3.2 T-

type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *Embo J* 24(2), 315-24.

Bournaud R., Hidalgo J., Yu H., Jaimovich E. et Shimahara T. (2001) Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J Physiol* 537(Pt 1), 35-44.

Bouskila Y. et Bostock H. (1998) Modulation of voltage-activated calcium currents by mechanical stimulation in rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 80(4), 1647-52.

Brown D. A. et Adams P. R. (1980) Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283(5748), 673-6.

C

Calabrese B., Tabarean I. V., Juranka P. et Morris C. E. (2002) Mechanosensitivity of N-type calcium channel currents. *Biophys J* 83(5), 2560-74.

Carbone E. et Lux H. D. (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310(5977), 501-2.

Carbone E. et Lux H. D. (1987) Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J Physiol* 386, 547-70.

Catterall W. A. (1998) Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24(5-6), 307-23.

Chabbert C., Chambard J. M., Sans A. et Desmadryl G. (2001a) Three types of depolarization-activated potassium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *J Neurophysiol* 85(3), 1017-26.

- Chabbert C., Chambard J. M., Valmier J., Sans A. et Desmadryl G. (1997) Voltage-activated sodium currents in acutely isolated mouse vestibular ganglion neurones. *Neuroreport* 8(5), 1253-6.
- Chabbert C., Chambard J. M., Valmier J., Sans A. et Desmadryl G. (2001b) Hyperpolarization-activated (I_h) current in mouse vestibular primary neurons. *Neuroreport* 12(12), 2701-4.
- Chambard J. M., Chabbert C., Sans A. et Desmadryl G. (1999) Developmental changes in low and high voltage-activated calcium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *J Physiol* 518 (Pt 1), 141-9.
- Chemin J., Monteil A., Perez-Reyes E., Bourinet E., Nargeot J. et Lory P. (2002a) Specific contribution of human T-type calcium channel isotypes (alpha(1G), alpha(1H) and alpha(1I)) to neuronal excitability. *J Physiol* 540(Pt 1), 3-14.
- Chemin J., Nargeot J. et Lory P. (2002b) Neuronal T-type alpha 1H calcium channels induce neuritogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *J Neurosci* 22(16), 6856-62.
- Chemin J., Nargeot J. et Lory P. (2004) Ca(v)3.2 calcium channels control an autocrine mechanism that promotes neuroblastoma cell differentiation. *Neuroreport* 15(4), 671-5.
- Chen C. C., Lamping K. G., Nuno D. W., Barresi R., Prouty S. J., Lavoie J. L., Cribbs L. L., England S. K., Sigmund C. D., Weiss R. M., Williamson R. A., Hill J. A. et Campbell K. P. (2003) Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science* 302(5649), 1416-8.
- Chomczynski P. et Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1), 156-9.

Chuang R. S., Jaffe H., Cribbs L., Perez-Reyes E. et Swartz K. J. (1998) Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci* 1(8), 668-74.

Corey D. P. et Hudspeth A. J. (1979a) Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature* 281(5733), 675-7.

Corey D. P. et Hudspeth A. J. (1979b) Response latency of vertebrate hair cells. *Biophys J* 26(3), 499-506.

Cribbs L. L., Lee J. H., Yang J., Satin J., Zhang Y., Daud A., Barclay J., Williamson M. P., Fox M., Rees M. et Perez-Reyes E. (1998) Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83(1), 103-9.

Curthoys I. S. (1981) Scarpa's ganglion in the rat and guinea pig. *Acta Otolaryngol* 92(1-2), 107-13.

Curthoys I. S. (1982) Postnatal developmental changes in the response of rat primary horizontal semicircular canal neurons to sinusoidal angular accelerations. *Exp Brain Res* 47(2), 295-300.

D

D'Angelo E., De Filippi G., Rossi P. et Taglietti V. (1997) Synaptic activation of Ca²⁺ action potentials in immature rat cerebellar granule cells in situ. *J Neurophysiol* 78(3), 1631-42.

De Vries H. (1951) The mechanics of the labyrinth otoliths. *Acta Otolaryngol* 38(3), 262-73.

Dechesne C., Mbiene J. P. et Sans A. (1986) Postnatal development of vestibular receptor surfaces in the rat. *Acta Otolaryngol* 101(1-2), 11-8.

Dechesne C. J., Desmadryl G. et Dememes D. (1987) Myelination of the mouse vestibular ganglion. *Acta Otolaryngol* 103(1-2), 18-23.

Dechesne C. J., Rabejac D. et Desmadryl G. (1994) Development of calretinin immunoreactivity in the mouse inner ear. *J Comp Neurol* 346(4), 517-29.

Dememes D. et Broca C. (1998) Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the rat efferent vestibular system during development. *Brain Res Dev Brain Res* 108(1-2), 59-67.

Dememes D., Dechesne C. J., Venteo S., Gaven F. et Raymond J. (2001) Development of the rat efferent vestibular system on the ground and in microgravity. *Brain Res Dev Brain Res* 128(1), 35-44.

Dememes D., Raymond J., Atger P., Grill C., Winsky L. et Dechesne C. J. (1992) Identification of neuron subpopulations in the rat vestibular ganglion by calbindin-D 28K, calretinin and neurofilament proteins immunoreactivity. *Brain Res* 582(1), 168-72.

Desarmenien M. G., Clendening B. et Spitzer N. C. (1993) In vivo development of voltage-dependent ionic currents in embryonic *Xenopus* spinal neurons. *J Neurosci* 13(6), 2575-81.

Desmadryl G. (1991) Postnatal developmental changes in the responses of mouse primary vestibular neurons to externally applied galvanic currents. *Brain Res Dev Brain Res* 64(1-2), 137-43.

Desmadryl G., Chambard J. M., Valmier J. et Sans A. (1997) Multiple voltage-dependent calcium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *Neuroscience* 78(2), 511-22.

Desmadryl G. et Dechesne C. J. (1992) Calretinin immunoreactivity in chinchilla and guinea pig vestibular end organs characterizes the calyx unit subpopulation. *Exp Brain Res* 89(1), 105-8.

Desmadryl G., Hilaire C., Vignes S., Diochot S. et Valmier J. (1998) Developmental regulation of T-, N- and L-type calcium currents in mouse embryonic sensory neurones. *Eur J Neurosci* 10(2), 545-52.

Desmadryl G., Raymond J. et Sans A. (1986) In vitro electrophysiological study of spontaneous activity in neonatal mouse vestibular ganglion neurons during development. *Brain Res* 390(1), 133-6.

Desmadryl G. et Sans A. (1990) Afferent innervation patterns in crista ampullaris of the mouse during ontogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* 52(1-2), 183-9.

Diochot S., Schweitz H., Beress L. et Lazdunski M. (1998) Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *J Biol Chem* 273(12), 6744-9.

Dubreuil A. S., Boukhaddaoui H., Desmadryl G., Martinez-Salgado C., Moshourab R., Lewin G. R., Carroll P., Valmier J. et Scamps F. (2004) Role of T-type calcium current in identified D-hair mechanoreceptor neurons studied in vitro. *J Neurosci* 24(39), 8480-4.

E

Eatock R. A. et Hutzler M. J. (1992) Ionic currents of mammalian vestibular hair cells. *Ann N Y Acad Sci* 656, 58-74.

Ertel E. A., Campbell K. P., Harpold M. M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R. W. et Catterall

W. A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25(3), 533-5.

Estes M. S., Blanks R. H. et Markham C. H. (1975) Physiologic characteristics of vestibular first-order canal neurons in the cat. I. Response plane determination and resting discharge characteristics. *J Neurophysiol* 38(5), 1232-49.

Everill B., Rizzo M. A. et Kocsis J. D. (1998) Morphologically identified cutaneous afferent DRG neurons express three different potassium currents in varying proportions. *J Neurophysiol* 79(4), 1814-24.

F

Fatt P. et Katz B. (1953) The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol* 120(1-2), 171-204.

Fedulova S. A., Kostyuk P. G. et Veselovsky N. S. (1991) Ionic mechanisms of electrical excitability in rat sensory neurons during postnatal ontogenesis. *Neuroscience* 41(1), 303-9.

Fedulova S. A., Kostyuk P. G. et Veselovsky N. S. (1994) Comparative analysis of ionic currents in the somatic membrane of embryonic and newborn rat sensory neurons. *Neuroscience* 58(2), 341-6.

Fernandez C., Baird R. A. et Goldberg J. M. (1988) The vestibular nerve of the chinchilla. I. Peripheral innervation patterns in the horizontal and superior semicircular canals. *J Neurophysiol* 60(1), 167-81.

Fernandez C., Goldberg J. M. et Abend W. K. (1972) Response to static tilts of peripheral neurons innervating otolith organs of the squirrel monkey. *J Neurophysiol* 35(6), 978-87.

Fernandez C., Goldberg J. M. et Baird R. A. (1990) The vestibular nerve of the chinchilla. III. Peripheral innervation patterns in the utricular macula. *J Neurophysiol* 63(4), 767-80.

Ferrary E. et Sterkers O. (1998) Mechanisms of endolymph secretion. *Kidney Int Suppl.* 65, 98-103.

Finkbeiner S. et Greenberg M. E. (1998) Ca²⁺ channel-regulated neuronal gene expression. *J Neurobiol* 37(1), 171-89.

Foster J. D., Drescher M. J. et Drescher D. G. (1995) Immunohistochemical localization of GABAA receptors in the mammalian crista ampullaris. *Hear Res* 83(1-2), 203-8.

Frischknecht F. et Randall A. D. (1998) Voltage- and ligand-gated ion channels in floor plate neuroepithelia of the rat. *Neuroscience* 85(4), 1135-49.

G

Gacek R. R. et Lyon M. (1974) The localization of vestibular efferent neurons in the kitten with horseradish peroxidase. *Acta Otolaryngol* 77(1), 92-101.

Galligan J. J., Tatsumi H., Shen K. Z., Surprenant A. et North R. A. (1990) Cation current activated by hyperpolarization (IH) in guinea pig enteric neurons. *Am J Physiol* 259(6 Pt 1), G966-72.

Goldberg J. M., Desmadryl G., Baird R. A. et Fernandez C. (1990a) The vestibular nerve of the chinchilla. IV. Discharge properties of utricular afferents. *J Neurophysiol* 63(4), 781-90.

Goldberg J. M., Desmadryl G., Baird R. A. et Fernandez C. (1990b) The vestibular nerve of the chinchilla. V. Relation between afferent discharge properties and

- peripheral innervation patterns in the utricular macula. *J Neurophysiol* 63(4), 791-804.
- Goldberg J. M. et Fernandez C. (1977) Conduction times and background discharge of vestibular afferents. *Brain Res* 122(3), 545-50.
- Goldberg J. M. et Fernandez C. (1980) Efferent vestibular system in the squirrel monkey: anatomical location and influence on afferent activity. *J Neurophysiol* 43(4), 986-1025.
- Goldin A. L. (2002) Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *J Exp Biol* 205(Pt 5), 575-84.
- Goldin A. L., Barchi R. L., Caldwell J. H., Hofmann F., Howe J. R., Hunter J. C., Kallen R. G., Mandel G., Meisler M. H., Netter Y. B., Noda M., Tamkun M. M., Waxman S. G., Wood J. N. et Catterall W. A. (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28(2), 365-8.
- Gomez T. M. et Spitzer N. C. (1999) In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 397(6717), 350-5.
- Gu X. et Spitzer N. C. (1993) Low-threshold Ca²⁺ current and its role in spontaneous elevations of intracellular Ca²⁺ in developing *Xenopus* neurons. *J Neurosci* 13(11), 4936-48.
- Gu X. et Spitzer N. C. (1995) Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients. *Nature* 375(6534), 784-7.
- Gu X. et Spitzer N. C. (1997) Breaking the code: regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients. *Dev Neurosci* 19(1), 33-41.
- Gutman G. A., Chandy K. G., Adelman J. P., Aiyar J., Bayliss D. A., Clapham D. E., Covarrubias M., Desir G. V., Furuichi K., Ganetzky B., Garcia M. L., Grissmer S., Jan L. Y., Karschin A., Kim D., Kuperschmidt S., Kurachi Y., Lazdunski M., Lesage F., Lester H. A., McKinnon D., Nichols C. G., O'Kelly I., Robbins J.,

Robertson G. A., Rudy B., Sanguinetti M., Seino S., Stuehmer W., Tamkun M. M., Vandenberg C. A., Wei A., Wulff H. et Wymore R. S. (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Potassium Channels

10.1124/pr.55.4.9. *Pharmacol Rev* 55(4), 583-586.

H

Hagiwara S. et Byerly L. (1981) Calcium channel. *Annu Rev Neurosci* 4, 69-125.

Hatakeyama S., Wakamori M., Ino M., Miyamoto N., Takahashi E., Yoshinaga T., Sawada K., Imoto K., Tanaka I., Yoshizawa T., Nishizawa Y., Mori Y., Niidome T. et Shoji S. (2001) Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca(2+) channels. *Neuroreport* 12(11), 2423-7.

Heng J. E., Zurakowski D., Vorwerk C. K., Grosskreutz C. L. et Dreyer E. B. (1999) Cation channel control of neurite morphology. *Brain Res Dev Brain Res* 113(1-2), 67-73.

Herrington J. et Lingle C. J. (1992) Kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated Ca²⁺ current in rat clonal (GH3) pituitary cells. *J Neurophysiol* 68(1), 213-32.

Hess P. (1990) Calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Neurosci* 13, 337-56.

Highstein S. M. (1991) The central nervous system efferent control of the organs of balance and equilibrium. *Neurosci Res* 12(1), 13-30.

Hilaire C., Diochot S., Desmadryl G., Richard S. et Valmier J. (1997) Toxin-resistant calcium currents in embryonic mouse sensory neurons. *Neuroscience* 80(1), 267-76.

- Hille B. (1975) The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin. A structural hypothesis. *Biophys J* 15(6), 615-9.
- Hodgkin A. L. et Huxley A. F. (1952) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116(4), 497-506.
- Holliday J., Adams R. J., Sejnowski T. J. et Spitzer N. C. (1991) Calcium-induced release of calcium regulates differentiation of cultured spinal neurons. *Neuron* 7(5), 787-96.
- Holliday J. et Spitzer N. C. (1990) Spontaneous calcium influx and its roles in differentiation of spinal neurons in culture. *Dev Biol* 141(1), 13-23.
- Honrubia V., Hoffman L. F., Sitko S. et Schwartz I. R. (1989) Anatomic and physiological correlates in bullfrog vestibular nerve. *J Neurophysiol* 61(4), 688-701.
- Honrubia V., Sitko S., Kimm J., Betts W. et Schwartz I. (1981) Physiological and anatomical characteristics of primary vestibular afferent neurons in the bullfrog. *Int J Neurosci* 15(4), 197-206.
- Hudspeth A. J. (1986) The ionic channels of a vertebrate hair cell. *Hear Res* 22, 21-7.
- Hudspeth A. J. (1989) How the ear's works work. *Nature* 341(6241), 397-404.
- Huguenard J. R. (1996) Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 58, 329-48.

I

Ino M., Yoshinaga T., Wakamori M., Miyamoto N., Takahashi E., Sonoda J., Kagaya T., Oki T., Nagasu T., Nishizawa Y., Tanaka I., Imoto K., Aizawa S., Koch S., Schwartz A., Niidome T., Sawada K. et Mori Y. (2001) Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the alpha 1B subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9), 5323-8.

Ishiyama G., Lopez I. et Ishiyama A. (1999) Subcellular immunolocalization of NMDA receptor subunit NR-1 in the chinchilla vestibular periphery. *Brain Res* 851(1-2), 270-6.

Ishiyama G., Lopez I., Williamson R., Acuna D. et Ishiyama A. (2002) Subcellular immunolocalization of NMDA receptor subunit NR1, 2A, 2B in the rat vestibular periphery. *Brain Res* 935(1-2), 16-23.

J

Jacobs R. A. et Hudspeth A. J. (1990) Ultrastructural correlates of mechano-electrical transduction in hair cells of the bullfrog's internal ear. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55, 547-61.

Jun K., Piedras-Renteria E. S., Smith S. M., Wheeler D. B., Lee S. B., Lee T. G., Chin H., Adams M. E., Scheller R. H., Tsien R. W. et Shin H. S. (1999) Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26), 15245-50.

K

- Kater S. B., Mattson M. P., Cohan C. et Connor J. (1988) Calcium regulation of the neuronal growth cone. *Trends Neurosci* 11(7), 315-21.
- Khan K. M. et Marovitz W. F. (1982) Effects of fluorodeoxyuridine on the developing inner ear of the rat. *Anat Rec* 202(3), 359-70.
- Kim D., Song I., Keum S., Lee T., Jeong M. J., Kim S. S., McEnery M. W. et Shin H. S. (2001) Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* 31(1), 35-45.
- Kitahara T., Takeda N., Ohno K., Araki T., Kubo T. et Kiyama H. (1994) Expression of GABAA receptor gamma 1 and gamma 2 subunits in the peripheral vestibular system of the rat. *Brain Res* 650(1), 157-60.
- Klockner U., Lee J. H., Cribbs L. L., Daud A., Hescheler J., Pereverzev A., Perez-Reyes E. et Schneider T. (1999) Comparison of the Ca²⁺ currents induced by expression of three cloned alpha1 subunits, alpha1G, alpha1H and alpha1I, of low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels. *Eur J Neurosci* 11(12), 4171-8.
- Komatsu Y. et Iwakiri M. (1992) Low-threshold Ca²⁺ channels mediate induction of long-term potentiation in kitten visual cortex. *J Neurophysiol* 67(2), 401-10.
- Korkotian E. et Segal M. (2001) Spike-associated fast contraction of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 30(3), 751-8.
- Kostyuk P. G. (1990) Calcium channels in cellular membranes. *J Mol Neurosci* 2(3), 123-41.

Kozlov A. S., McKenna F., Lee J. H., Cribbs L. L., Perez-Reyes E., Feltz A. et Lambert R. C. (1999) Distinct kinetics of cloned T-type Ca²⁺ channels lead to differential Ca²⁺ entry and frequency-dependence during mock action potentials. *Eur J Neurosci* 11(12), 4149-58.

L

Larmet Y., Dolphin A. C. et Davies A. M. (1992) Intracellular calcium regulates the survival of early sensory neurons before they become dependent on neurotrophic factors. *Neuron* 9(3), 563-74.

Lee J. H., Daud A. N., Cribbs L. L., Lacerda A. E., Pereverzev A., Klockner U., Schneider T. et Perez-Reyes E. (1999a) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19(6), 1912-21.

Lee J. H., Gomora J. C., Cribbs L. L. et Perez-Reyes E. (1999b) Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J* 77(6), 3034-42.

Lerche C., Scherer C. R., Seeböhm G., Derst C., Wei A. D., Busch A. E. et Steinmeyer K. (2000) Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem* 275(29), 22395-400.

Llinas R. et Muhlethaler M. (1988) Electrophysiology of guinea-pig cerebellar nuclear cells in the in vitro brain stem-cerebellar preparation. *J Physiol* 404, 241-58.

Llinas R. R. (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242(4886), 1654-64.

Locke R. E. et Nerbonne J. M. (1997) Role of voltage-gated K⁺ currents in mediating the regular-spiking phenotype of callosal-projecting rat visual cortical neurons. *J Neurophysiol* 78(5), 2321-35.

Lovinger D. M. et White G. (1989) Post-natal development of burst firing behavior and the low-threshold transient calcium current examined using freshly isolated neurons from rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 102(1), 50-7.

Luebke J. I., Dunlap K. et Turner T. J. (1993) Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* 11(5), 895-902.

Lysakowski A. et Goldberg J. M. (1997) A regional ultrastructural analysis of the cellular and synaptic architecture in the chinchilla cristae ampullares. *J Comp Neurol* 389(3), 419-43.

Lysakowski A., Standage G. P. et Benevento L. A. (1988) An investigation of collateral projections of the dorsal lateral geniculate nucleus and other subcortical structures to cortical areas V1 and V4 in the macaque monkey: a double label retrograde tracer study. *Exp Brain Res* 69(3), 651-61.

M

Marovitz W. F., Khan K. M. et Schulte T. (1977) Ultrastructural development of the early rat otocyst. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 86(1 Pt 2 Suppl 35), 9-28.

Marovitz W. F., Shugar J. M. et Khan K. M. (1976) Spiral migration theory of organ of Corti development. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 85(5 suppl 32 pt.4), 1-19.

Martin-Caraballo M. et Greer J. J. (2001) Voltage-sensitive calcium currents and their role in regulating phrenic motoneuron electrical excitability during the perinatal period. *J Neurobiol* 46(4), 231-48.

- Matsubara A., Takumi Y., Nakagawa T., Usami S., Shinkawa H. et Ottersen O. P. (1999) Immunoelectron microscopy of AMPA receptor subunits reveals three types of putative glutamatergic synapse in the rat vestibular end organs. *Brain Res* 819(1-2), 58-64.
- Mattson M. P. et Barger S. W. (1993) Roles for calcium signaling in structural plasticity and pathology in the hippocampal system. *Hippocampus* 3 Spec No, 73-87.
- Mattson M. P. et Kater S. B. (1987) Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J Neurosci* 7(12), 4034-43.
- Mbiene J. P., Dechesne C. J., Schachner M. et Sans A. (1989) Immunocytological characterization of the expression of cell adhesion molecule L1 during early innervation of mouse otocysts. *Cell Tissue Res* 255(1), 81-8.
- Mbiene J. P., Favre D. et Sans A. (1984) The pattern of ciliary development in fetal mouse vestibular receptors. A qualitative and quantitative SEM study. *Anat Embryol (Berl)* 170(3), 229-38.
- Mbiene J. P., Favre D. et Sans A. (1988) Early innervation and differentiation of hair cells in the vestibular epithelia of mouse embryos: SEM and TEM study. *Anat Embryol (Berl)* 177(4), 331-40.
- Mbiene J. P. et Sans A. (1986) Differentiation and maturation of the sensory hair bundles in the fetal and postnatal vestibular receptors of the mouse: a scanning electron microscopy study. *J Comp Neurol* 254(2), 271-8.
- McCobb D. P. et Beam K. G. (1991) Action potential waveform voltage-clamp commands reveal striking differences in calcium entry via low and high voltage-activated calcium channels. *Neuron* 7(1), 119-27.
- McCobb D. P., Best P. M. et Beam K. G. (1989) Development alters the expression of calcium currents in chick limb motoneurons. *Neuron* 2(6), 1633-43.

- McCobb D. P. et Kater S. B. (1988) Membrane voltage and neurotransmitter regulation of neuronal growth cone motility. *Dev Biol* 130(2), 599-609.
- McCormick D. A. et Huguenard J. R. (1992) A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J Neurophysiol* 68(4), 1384-400.
- McCormick D. A. et Pape H. C. (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431, 291-318.
- McRory J. E., Santi C. M., Hamming K. S., Mezeyova J., Sutton K. G., Baillie D. L., Stea A. et Snutch T. P. (2001) Molecular and functional characterization of a family of rat brain T-type calcium channels. *J Biol Chem* 276(6), 3999-4011.
- Mennerick S. et Matthews G. (1998) Rapid calcium-current kinetics in synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *Vis Neurosci* 15(6), 1051-6.
- Mercurio A. M. (1990) Laminin: multiple forms, multiple receptors. *Curr Opin Cell Biol* 2(5), 845-9.
- Meza G., Wu J. Y. et Lopez I. (1992) GABA is an afferent vestibular neurotransmitter in the guinea pig. Immunocytochemical evidence in the utricular maculae. *Ann N Y Acad Sci* 656, 943-6.
- Monteil A., Chemin J., Leuranguer V., Altier C., Mennessier G., Bourinet E., Lory P. et Nargeot J. (2000) Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. *J Biol Chem* 275(22), 16530-5.
- Murphy T. H., Worley P. F., Nakabeppu Y., Christy B., Gastel J. et Baraban J. M. (1991) Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons. *J Neurochem* 57(6), 1862-72.
- Mynlieff M. et Beam K. G. (1992) Developmental expression of voltage-dependent calcium currents in identified mouse motoneurons. *Dev Biol* 152(2), 407-10.

N

- Narahashi T., Moore J. W. et Poston R. N. (1967) Tetrodotoxin derivatives: chemical structure and blockage of nerve membrane conductance. *Science* 156(3777), 976-9.
- Newcomb R., Szoke B., Palma A., Wang G., Chen X., Hopkins W., Cong R., Miller J., Urge L., Tarczy-Hornoch K., Loo J. A., Dooley D. J., Nadasdi L., Tsien R. W., Lemos J. et Miljanich G. (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37(44), 15353-62.
- Nicolas M., Dememes D., Martin A., Kupersmidt S. et Barhanin J. (2001) KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells. *Hear Res* 153(1-2), 132-45.
- Nooney J. M. et Lodge D. (1996) The use of invertebrate peptide toxins to establish Ca²⁺ channel identity of CA3-CA1 neurotransmission in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 306(1-3), 41-50.
- Nordemar H. (1983a) Embryogenesis of the inner ear. II. The late differentiation of the mammalian crista ampullaris in vivo and in vitro. *Acta Otolaryngol* 96(1-2), 1-8.
- Nordemar H. (1983b) Postnatal development of the vestibular sensory epithelium in the mouse. *Acta Otolaryngol* 96(5-6), 447-56.

O

Ohmori H. (1987) Gating properties of the mechano-electrical transducer channel in the dissociated vestibular hair cell of the chick. *J Physiol* 387, 589-609.

P

Perchenet L., Benardeau A. et Ertel E. A. (2000) Pharmacological properties of Ca(V)3.2, a low voltage-activated Ca²⁺ channel cloned from human heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361(6), 590-9.

Perez-Reyes E. (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83(1), 117-61.

Perez-Reyes E., Cribbs L. L., Daud A., Lacerda A. E., Barclay J., Williamson M. P., Fox M., Rees M. et Lee J. H. (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391(6670), 896-900.

Perrier J. F., Alaburda A. et Hounsgaard J. (2002) Spinal plasticity mediated by postsynaptic L-type Ca²⁺ channels. *Brain Res Brain Res Rev* 40(1-3), 223-9.

Platzer J., Engel J., Schrott-Fischer A., Stephan K., Bova S., Chen H., Zheng H. et Striessnig J. (2000) Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* 102(1), 89-97.

Prigioni I., Russo G., Valli P. et Masetto S. (1990) Pre- and postsynaptic excitatory action of glutamate agonists on frog vestibular receptors. *Hear Res* 46(3), 253-9.

R

- Randall A. et Tsien R. W. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15(4), 2995-3012.
- Rennie K. J. et Ashmore J. F. (1991) Ionic currents in isolated vestibular hair cells from the guinea-pig crista ampullaris. *Hear Res* 51(2), 279-91.
- Reuter H. (1979) Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annu Rev Physiol* 41, 413-24.
- Richard S., Diochot S., Nargeot J., Baldy-Moulinier M. et Valmier J. (1991) Inhibition of T-type calcium currents by dihydropyridines in mouse embryonic dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 132(2), 229-34.
- Roberts W. M., Jacobs R. A. et Hudspeth A. J. (1990) Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J Neurosci* 10(11), 3664-84.
- Rohwedel J., Maltsev V., Bober E., Arnold H. H., Hescheler J. et Wobus A. M. (1994) Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 164(1), 87-101.
- Romand R. et Dauzat M. (1982) Modification of spontaneous activity in primary vestibular neurons during development in the cat. *Exp Brain Res* 45(1-2), 265-8.
- Rosato Siri M. D. et Uchitel O. D. (1999) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol* 514 (Pt 2), 533-40.

Rosenbluth J. (1962) The fine structure of acoustic ganglia in the rat. *J Cell Biol* 12, 329-59.

Rossi M. L., Valli P. et Casella C. (1977) Post-synaptic potentials recorded from afferent nerve fibres of the posterior semicircular canal in the frog. *Brain Res* 135(1), 67-75.

Ruben R. J. (1969) The synthesis of DNA and RNA in the developing inner ear. *Laryngoscope* 79(9), 546-56.

S

Saegusa H., Kurihara T., Zong S., Minowa O., Kazuno A., Han W., Matsuda Y., Yamanaka H., Osanai M., Noda T. et Tanabe T. (2000) Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11), 6132-7.

Sans A. et Chat M. (1982) Analysis of temporal and spatial patterns of rat vestibular hair cell differentiation by tritiated thymidine radioautography. *J Comp Neurol* 206(1), 1-8.

Sans A. et Scarfone E. (1996) Afferent calyces and type I hair cells during development. A new morphofunctional hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 781, 1-12.

Scarfone E., Dememes D. et Sans A. (1991) Synapsin I and Synaptophysin expression during ontogenesis of the mouse peripheral vestibular system. *J Neurosci* 11(5), 1173-81.

Schessel D. A., Ginzberg R. et Highstein S. M. (1991) Morphophysiology of synaptic transmission between type I hair cells and vestibular primary afferents. *An*

- intracellular study employing horseradish peroxidase in the lizard, *Calotes versicolor*. *Brain Res* 544(1), 1-16.
- Schessel D. A. et Highstein S. M. (1981) Is transmission between the vestibular type I hair cell and its primary afferent chemical? *Ann N Y Acad Sci* 374, 210-4.
- Schneider L. W. et Anderson D. J. (1976) Transfer characteristics of first and second order lateral canal vestibular neurons in gerbil. *Brain Res* 112(1), 61-76.
- Schroeder B. C., Hechenberger M., Weinreich F., Kubisch C. et Jentsch T. J. (2000) KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* 275(31), 24089-95.
- Seisenberger C., Specht V., Welling A., Platzer J., Pfeifer A., Kuhbandner S., Striessnig J., Klugbauer N., Feil R. et Hofmann F. (2000) Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* 275(50), 39193-9.
- Sephel G. C., Burrous B. A. et Kleinman H. K. (1989) Laminin neural activity and binding proteins. *Dev Neurosci* 11(4-5), 313-31.
- Shin J. B., Martinez-Salgado C., Heppenstall P. A. et Lewin G. R. (2003) A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor. *Nat Neurosci* 6(7), 724-30.
- Sidach S. S. et Mintz I. M. (2002) Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels. *J Neurosci* 22(6), 2023-34.
- Spitzer N. C. (1994) Spontaneous Ca²⁺ spikes and waves in embryonic neurons: signaling systems for differentiation. *Trends Neurosci* 17(3), 115-8.
- Spitzer N. C., Gu X. et Olson E. (1994) Action potentials, calcium transients and the control of differentiation of excitable cells. *Curr Opin Neurobiol* 4(1), 70-7.

- Spitzer N. C. et Ribera A. B. (1998) Development of electrical excitability in embryonic neurons: mechanisms and roles. *J Neurobiol* 37(1), 190-7.
- Steinhausen W. (1931) Über den Nachweis der Bewegung der Cupula in der Intaken Bogengansampulle des labyrinthes bei der Natürlichen Rotatorischen und Calorischen Reizung. *Pluegers Arch.* 232, 322-28
- Strassmaier M. et Gillespie P. G. (2002) The hair cell's transduction channel. *Curr Opin Neurobiol* 12(4), 380-6.
- Stuhmer W., Ruppersberg J. P., Schroter K. H., Sakmann B., Stocker M., Giese K. P., Perschke A., Baumann A. et Pongs O. (1989) Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *Embo J* 8(11), 3235-44.
- Su H., Sochivko D., Becker A., Chen J., Jiang Y., Yaari Y. et Beck H. (2002) Upregulation of a T-type Ca²⁺ channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J Neurosci* 22(9), 3645-55.

T

- Takahashi K., Ueno S. et Akaike N. (1991) Kinetic properties of T-type Ca²⁺ currents in isolated rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 65(1), 148-55.
- Takahashi T. et Momiyama A. (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366(6451), 156-8.
- Talley E. M., Cribbs L. L., Lee J. H., Daud A., Perez-Reyes E. et Bayliss D. A. (1999) Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19(6), 1895-911.

- Tanabe T., Takeshima H., Mikami A., Flockerzi V., Takahashi H., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T. et Numa S. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328(6128), 313-8.
- Tanaka M., Takeda N., Senba E., Tohyama M., Kubo T. et Matsunaga T. (1989) Localization and origins of calcitonin gene-related peptide containing fibres in the vestibular end-organs of the rat. *Acta Otolaryngol Suppl* 468, 31-4.
- Todorovic S. M., Jevtovic-Todorovic V., Mennerick S., Perez-Reyes E. et Zorumski C. F. (2001) Ca(v)3.2 channel is a molecular substrate for inhibition of T-type calcium currents in rat sensory neurons by nitrous oxide. *Mol Pharmacol* 60(3), 603-10.
- Tolkovsky A. M., Walker A. E., Murrell R. D. et Suidan H. S. (1990) Ca²⁺ transients are not required as signals for long-term neurite outgrowth from cultured sympathetic neurons. *J Cell Biol* 110(4), 1295-306.
- Torres M. et Giraldez F. (1998) The development of the vertebrate inner ear. *Mech Dev* 71(1-2), 5-21.

V

- Umemiya M. et Berger A. J. (1994) Properties and function of low- and high-voltage-activated Ca²⁺ channels in hypoglossal motoneurons. *J Neurosci* 14(9), 5652-60.
- Umemiya M. et Berger A. J. (1995) Single-channel properties of four calcium channel types in rat motoneurons. *J Neurosci* 15(3 Pt 2), 2218-24.

V

Van de Water T. (1988) Tissue interactions and cell differentiation: neurone-sensory cell interaction during otic development. *Development* 103(Suppl), 185-93.

Viana F., Bayliss D. A. et Berger A. J. (1993) Calcium conductances and their role in the firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 69(6), 2137-49.

W

Wackym P. A., Popper P. et Micevych P. E. (1993) Distribution of calcitonin gene-related peptide mRNA and immunoreactivity in the rat central and peripheral vestibular system. *Acta Otolaryngol* 113(5), 601-8.

Walker D. et De Waard M. (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends in Neurosciences* 21(4), 148-154.

Wersall J. (1972) Morphology of the vestibular receptors in mammals. *Prog Brain Res* 37, 3-17.

Wolfe J. T., Wang H., Howard J., Garrison J. C. et Barrett P. Q. (2003) T-type calcium channel regulation by specific G-protein betagamma subunits. *Nature* 424(6945), 209-13.

Y

Yaari Y., Hamon B. et Lux H. D. (1987) Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235(4789), 680-2.

Yagi T., Simpson N. E. et Markham C. H. (1977) The relationship of conduction velocity to other physiological properties of the cat's horizontal canal neurons. *Exp Brain Res* 30(4), 587-600.

Yamashita M. et Ohmori H. (1990) Synaptic responses to mechanical stimulation in calyceal and bouton type vestibular afferents studied in an isolated preparation of semicircular canal ampullae of chicken. *Exp Brain Res* 80(3), 475-88.

Z

Zhang L., Valiante T. A. et Carlen P. L. (1993) Contribution of the low-threshold T-type calcium current in generating the post-spike depolarizing afterpotential in dentate granule neurons of immature rats. *J Neurophysiol* 70(1), 223-31.

RESUME en français

Le calcium est un élément indispensable à la formation du système nerveux. Il intervient dans de nombreuses fonctions qui permettent la mise en place et le fonctionnement d'un organe. Le but de ce travail a été de caractériser les canaux calciques de type T dépendants du potentiel présents transitoirement dans les neurones vestibulaires primaires et de comprendre le rôle des influx calciques qu'ils induisent au cours du développement périnatal chez la souris.

Grâce à des études électrophysiologiques et pharmacologiques nous avons caractérisé les propriétés des sous-unités du canal de type T, $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$, cette dernière générant un courant de forte amplitude à un stade précoce du développement. L'étude de l'activité électrique de ces neurones révèle la présence d'une dépolarisation post potentiel corrélée avec l'expression du canal $Ca_v3.2$.

L'analyse des propriétés de l'activité électrique aux stades précoces du développement révèle qu'elle présente un ralentissement de la phase de repolarisation du potentiel d'action bloqué par le cadmium. Cette activité devient plus rapide aux stades plus matures. Ces observations ont été faites à des stades de développement où se déroulent la neuritogenèse et la synaptogenèse.

Nous avons pu déterminer le rôle physiologique de $Ca_v3.2$ et de l'activité électrique qui découle de son activation par l'utilisation d'antisens sur un modèle de culture de neurones. En l'absence de ces dernières, un ralentissement de la pousse neuritique a été observé, démontrant l'implication cruciale des courants calciques de type T dans la formation de ce système sensoriel.

TITRE en anglais

Role of the Calcium-dependant activity during the mouse vestibular neuronal ganglia development and maturation.

RESUME en anglais

Calcium plays a key role in nervous system formation. Calcium is involved in many functions enabling the setting up of organs work. The aim of the present study was to characterize the T-type voltage-dependent calcium channels transiently expressed in primary vestibular neurons and to understand the role of calcium entries during perinatal mouse development. By means of electrophysiological and pharmacological studies, T-type subunits $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.2$ properties were characterized. $Ca_v3.2$ induced a large current during the earlier developmental stage. Neuronal electrical activity studies showed the presence of an after-depolarisation component, which was correlated with $Ca_v3.2$ expression.

Electrical activity properties analyses at an early development stage (E17) revealed an increase of the repolarisation decay time during the action potential. This enlargement was blocked by cadmium. Action potentials became faster at more mature stages. These early phenomena occurred during the periods of neuritogenesis and synaptogenesis of the peripheral vestibular system. The physiological role of the $Ca_v3.2$ subunit and its related electrical activity were determined by use of antisens on neuronal cultures. When $Ca_v3.2$ was blocked, a decrease in the neuritis growth was observed. These results show that the T-type calcium current, especially that linked to the activation of $Ca_v3.2$, has a crucial implication in vestibular system ontogenesis.

DISCIPLINE Neurosciences

MOTS-CLES

Neurones vestibulaires, Canaux calciques de type T, Développement, Activité électrique, Antisens, Pousse neuritique

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Institut des Neurosciences de Montpellier INSERM U583

Hôpital St Eloi

80, rue Augustin Fliche

BP 74103

34091 Montpellier Cedex 5