



**HAL**  
open science

# Rôle des sous-unités auxiliaires des canaux calciques Cav1 dans les lymphocytes Th2: implications thérapeutiques dans l'asthme allergique

Nicolas Rosa

► **To cite this version:**

Nicolas Rosa. Rôle des sous-unités auxiliaires des canaux calciques Cav1 dans les lymphocytes Th2: implications thérapeutiques dans l'asthme allergique. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT: 2016TOU30359 . tel-01989915

**HAL Id: tel-01989915**

**<https://theses.hal.science/tel-01989915>**

Submitted on 22 Jan 2019

**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.



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par :

Nicolas Rosa

le 12 octobre 2016

**Titre :**

Rôle des sous-unités auxiliaires des canaux calciques  $Ca_v1$   
dans les lymphocytes Th2 :  
Implications thérapeutiques dans l'asthme allergique

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Immunologie

**Unité de recherche :**

Centre de Pathologie de Toulouse Purpan – Inserm UMR1043

**Directrice de thèse :**

Lucette Pelletier

**Jury :**

Jacques Haiech  
Emmanuel Bourinet  
Cédric Louvet  
Joost van Meerwijk

## *Remerciements*

*Je voudrais remercier en premier lieu les membres de mon jury de thèse, Emmanuel Bourinet, Jacques Haïech, Cédric Louvet et Joost van Meerwijk, pour avoir pris le temps de lire mon manuscrit, évaluer mes travaux et assister à ma soutenance de thèse.*

*Parmi les membres de mon équipe, mes premiers remerciements vont à Lucette et Jean-Charles pour avoir accepté de me recruter au sein de l'équipe 3 du CPTP et sans qui tout ceci n'aurait pas été possible.*

*Je me dois de remercier plus particulièrement Lucette et Magali pour leur encadrement tout au long de ces trois années. Malgré les moments de doute, je pense que nous sommes parvenus à faire quelque chose ensemble et à faire correctement avancer ce projet. Du moins, bien plus que je ne l'aurais cru possible à certains moments.*

*Je souhaite également remercier les autres chercheurs de l'équipe, Sophie, José et Claire, pour leurs très nombreux conseils, leur patience, leur gentillesse et leurs encouragements.*

*Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour les "jeunes" de l'équipe, les autres thésards de l'équipe, Laure, Pascal, Mélanie, Arnaud et Eve, mais aussi Marion. Je pense que la similarité de nos situations entraîne forcément une certaine familiarité et je suis reconnaissant du temps passé à vos côtés.*

*J'espère que les liens créés pendant ces trois ans perdureront après mon départ de l'équipe.*

*Je souhaite aussi mentionner les membres de mon comité de thèse, Abdel, Marc, Matthieu et plus particulièrement mon parrain de thèse Renaud. Votre implication est allée bien au delà du cadre scientifique et je vous en remercie.*

*Pour finir, je tiens à remercier les nombreux membres des autres équipes du CPTP, chercheurs et étudiants, avec qui j'ai eu l'occasion d'interagir toutes ces années et qui, je l'espère, se reconnaîtront ici. J'ai une pensée toute particulière pour la M2R team qui m'a accueilli à mon arrivée, Laure, Emilie, Charline, Claire et Lilian et surtout pour la grande bande des filles, Delphine, Anne, Cécile, Maryse, Sophie, Lucie, Aurélie, Jennifer et Maude.*

# Table des matières

Table des figures.....	1
Liste des abréviations .....	2
Introduction .....	5
<b>I) Les acteurs de la signalisation calcique .....</b>	<b>5</b>
I.1) La compartimentation du calcium dans la cellule et sa régulation .....	5
I.1.1) Les stocks de calcium intracellulaires .....	6
I.1.2) Les protéines tampons .....	8
I.2) Le calcium et son rôle dans les fonctions cellulaires .....	10
I.2.1) Les canaux calciques .....	10
I.2.1.1) Les canaux calciques des organelles .....	10
I.2.1.2) Les canaux calciques de la membrane plasmique .....	12
I.2.2) Les protéines de liaison au calcium et leurs fonctions effectrices .....	15
I.3) Les canaux calciques voltage-dépendants.....	18
I.3.1) Diversité et structure des canaux $Ca_v$ dans les cellules excitables.....	18
I.3.1.1) La sous-unité principale $\alpha_1$ .....	18
I.3.1.2) La sous-unité $\beta$ .....	22
I.3.1.3) Les sous-unités auxiliaires $\alpha_2\delta$ et $\gamma$ .....	28
I.3.2) Fonction et régulation des $Ca_v$ dans les cellules excitables .....	30
I.3.2.1) Mécanismes d'activation des canaux $Ca_v$ .....	30
I.3.2.2) Régulation des canaux $Ca_v$ .....	31
<b>II) Sous-populations de lymphocytes T et signalisation calcique.....</b>	<b>40</b>
II.1) La biologie des lymphocytes T $CD4^+$ .....	40
II.1.1) Développement, activation et différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ .....	40
II.1.2) Les lymphocytes Th2 .....	42
II.2) La signalisation calcique dans les lymphocytes T $CD4^+$ .....	45
II.2.1) La voie du courant CRAC dans les lymphocytes T .....	45
II.2.1.1) Description du courant CRAC .....	45
II.2.1.2) La découverte des protéines STIM et ORAI.....	46
II.2.1.3) Structure et fonction des protéines STIM et ORAI.....	47
II.2.2) Les autres canaux ioniques exprimés dans les lymphocytes T $CD4^+$ .....	51
II.2.3) Signalisation calcique et expression sélective de canaux ioniques dans les différentes sous- populations lymphocytes T $CD4^+$ .....	55
II.3) Les canaux $Ca_v$ dans la biologie des lymphocytes T .....	56
II.3.1) Canaux $Ca_v1$ au cours du développement des lymphocytes T dans le thymus.....	57
II.3.2) Canaux $Ca_v1$ dans les lymphocytes T périphériques .....	58
II.3.3) Expression sélective des canaux $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ dans les lymphocytes Th2 murins et humains..	62
<b>III) L'asthme allergique, une pathologie Th2.....</b>	<b>65</b>
III.1) Physiopathologie de l'asthme .....	65
III.2) Les traitements actuels et futurs de l'asthme .....	69
Travaux réalisés.....	75
Discussion et perspectives .....	109
Références bibliographiques .....	120

# Table des figures

Figure 1 : Compartimentation du calcium et acteurs de la signalisation calcique dans la cellule.....	6
Table 1 : Liste des canaux TRP identifiés chez les mammifères et de leurs propriétés.....	13
Figure 2 : Régulation de la transcription par le calcium.....	17
Figure 3 : Classification des canaux calciques voltages dépendants.....	19
Figure 4 : Localisation et fonction des canaux Cav1 dans l'organisme.....	20
Figure 5 : Structure et organisation des canaux calciques voltage-dépendants.....	21
Table 2 : Sous-unités auxiliaires des canaux calciques voltage-dépendants et implications de ces sous-unités dans le fonctionnement des canaux Ca <sub>v</sub> .....	22
Table 3 : Répartition des différentes sous-unités β et de leurs isoformes d'épissage dans l'organisme.....	23
Figure 6 : Domaines protéiques et épissages alternatifs des différentes sous-unités β.....	24
Figure 7 : Modèle proposé pour expliquer le rôle de la sous-unité β dans l'adressage de la sous-unité α1 à la membrane plasmique.....	26
Figure 8 : Rôle des sous-unités auxiliaires β et α2δ et dans la stabilité et l'adressage des canaux Ca <sub>v</sub> à la membrane.....	29
Figure 9 : Modèle d'inactivation dépendante du voltage.....	32
Figure 10 : Implication de la calmoduline dans l'inactivation dépendante du calcium.....	33
Figure 11 : Modèle proposé pour expliquer l'association des canaux Ca <sub>v</sub> 1.2 en amas.....	35
Figure 12 : Régulation des canaux calciques voltage-dépendants.....	38
Figure 13 : Différenciation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et sous-populations de LT auxiliaires.....	42
Figure 14 : Induction de la polarisation Th2 par les cellules dendritiques.....	44
Figure 15 : Représentation d'un dimère de protéines STIM1 et de ses domaines fonctionnels au repos.....	48
Figure 16 : Modèle d'activation des canaux ORA1 par les protéines STIM1.....	49
Figure 17 : Les acteurs de la signalisation calcique dans les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	53
Figure 18 : Réponse calcique dans des lymphocytes Th1, Th2 et Th17.....	55
Table 4 : Tableau récapitulatif des différentes sous-unités des canaux Cav exprimés dans les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	61
Figure 19 : Physiopathologie de l'asthme allergique.....	69
Table 5 : Traitements recommandés pour chaque phénotype d'asthme selon la <i>Global Initiative for Asthma</i> .....	71
Table 6 : Avancée des essais cliniques expérimentés actuellement chez l'homme basés sur l'inhibition de cytokines pro-inflammatoires ou de leurs récepteurs.....	73
Table 7 : Avancée des essais cliniques expérimentés actuellement chez l'homme basés sur l'utilisation d' oligodeoxynucleotides anti-sens.....	74
Figure 20 : Alignement de la séquence de l'ODN antisens d'A. Dolphin et des séquences murines et humaines de Cavβ1 et β3.....	78

# Liste des abréviations

## A

ADN : acide désoxyribonucléique  
ADP : adénosine diphosphate  
AID : *α-interacting domain*  
AKAP : *A-kinase anchor protein*  
AMP : adénosine monophosphate  
AMPc : AMP cyclique  
AMPA : *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*  
ANT : *adenine nucleotide translocase*  
AP-1 : *activator protein 1*  
ARC : *arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup>-selective*  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messager  
ATP : adénosine triphosphate

## B

BARP : *β-anchoring and -regulatory protein*

## C

CAD : *CRAC activation domain*  
cADPR : ADP-ribose cyclique  
CaM : calmoduline  
CaMK : *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*  
CAPS : *Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion*  
Ca<sub>v</sub> : canal calcique voltage-dépendant  
CBD : domaine de liaison à la calmoduline  
CCR : récepteur aux chimiokines CC  
CD : cluster de différenciation  
CDF : facilitation dépendante du calcium  
CDI : inactivation dépendante du calcium  
cEF : domaine *EF-hand* canonique  
CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*  
CHCB2/HP1γ : chromo shadow domain of chromobox protein 2/heterochromatin protein 1γ

CICR : *calcium-induced calcium release*  
CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II  
CRAC : *Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup>*  
CREB : *cyclic AMP response element-binding*  
CRMP-2 : *collapsin response mediator protein 2*  
CysLTR1 : récepteurs aux cysteinyl leucotriènes 1

## D

DAG : diacylglycerol  
DC : cellule dendritique  
DHP : dihydropyridine

## E

EF : *(E)helix-loop-(F)helix*  
eIF3e : *eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E*  
ERAD : *endoplasmic reticulum-associated protein degradation*  
ERK : *extracellular signal-regulated kinases*

## F

FcεR : récepteur aux immunoglobulines E

## G

GABA : acide γ-aminobutyrique  
GK : *guanylate kinase*  
GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*  
GMP : guanosine monophosphate  
GMPc : GMP cyclique  
GPI : glycosyl-phosphatidylinositol  
GTP : guanosine triphosphate

## H

HVA : *high voltage activated*

**I**

IFN- $\gamma$  : interféron  $\gamma$   
 Ig : immunoglobuline  
 IKK2 : *I $\kappa$ B kinase*  
 IL : interleukine  
 IL-4R : récepteur à l'IL-4  
 IL-13R : récepteur à l'IL-13  
 ILC : *innate lymphoid cell*  
 IP<sub>3</sub> : inositol trisphosphate  
 IP<sub>3</sub>R : récepteur à l'IP<sub>3</sub>  
 IRS-2 : *insulin receptor substrate 2*

**K**

K<sub>Ca</sub> : canal potassique activé par le calcium  
 K<sub>v</sub> : canal potassique voltage-dépendant

**L**

LABA : agonistes des  $\beta$ 2-adrenocepteurs de longue durée  
 LT : lymphocyte T  
 LTh2 : lymphocyte Th2  
 LVA : *low voltage activated*

**M**

MAGT1 : *magnesium transporter 1*  
 MAGUK : *membrane-associated guanylate kinase*  
 MAPK : mitogen-activated protein kinase  
 MCU : *mitochondrial calcium uniporter*  
 MLCK : *myosin light chain kinase*

**N**

NAD : *nicotinamide adenine dinucleotide*  
 NAADP : *nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate*  
 NCX : échangeur sodium/calcium  
 Nedd4-1 : *neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1*  
 NFAT : *nuclear factor of activated T-cells*  
 NF $\kappa$ B : *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
 NKT : *natural killer T*  
 NMDAR : *N-methyl-D-aspartate receptor*  
 NSCaTE : *N-terminal Spatial Ca<sup>2+</sup> Transforming Element*

**O**

ODN : oligodeoxynucléotide

**P**

PDL2 : *programmed death ligand 2*  
 PDGF : *platelet derived growth factor*  
 PI3K : phosphoinositide 3-kinase  
 PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
 PKA : protéine kinase A  
 PKC : protéine kinase C  
 PLC : phospholipase C  
 PMCA : *plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase*  
 PTP : *permeability transition pore*  
 PYK2 : *proline-rich tyrosine kinase 2*

**R**

RE : réticulum endoplasmique  
 ROC : *receptor-operated channels*  
 RyR : récepteur à la ryanodine

**S**

SABA : agonistes des  $\beta$ 2-adrenocepteurs de courte durée  
 SAC : *stretch-activated channels*  
 SAM : *sterile  $\alpha$  motif*  
 SCID : *severe combined immune deficiency*  
 SERCA : *sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*  
 SH3 : *Src homology 3*  
 siRNA : petit ARN interférant  
 SMOC : *second messenger-operated channels*  
 SOAR : *STIM ORAI activating region*  
 SOC : *store-operated channels*  
 SOCE : *store operated calcium entry*  
 SOICR : *store overload-induced calcium release*  
 STAT : *signal transducer and activator of transcription*  
 STIM : *stromal interaction molecule*

**T**

TCR : récepteur du lymphocyte T  
 TGF- $\beta$  : *transforming growth factor  $\beta$*   
 Th : *T helper*  
 TLR : *toll like receptor*

T<sub>reg</sub> : lymphocyte T régulateur  
TRP : *transient receptor potential*  
TSLP : *thymic stromal lymphopoietin*

## **V**

VDAC : *voltage dependent anion channel*  
VDI : inactivation dépendante du voltage  
VGCC : *voltage-gated calcium channel*

VLA-4 : *very late antigen-4*  
VOC : *voltage-operated channel*

## **Z**

ZIP : *Zrt/IRT-like protein*  
ZnT-1: *zinc transporter 1*  
γc : chaîne commune γ

# Introduction

## I) Les acteurs de la signalisation calcique

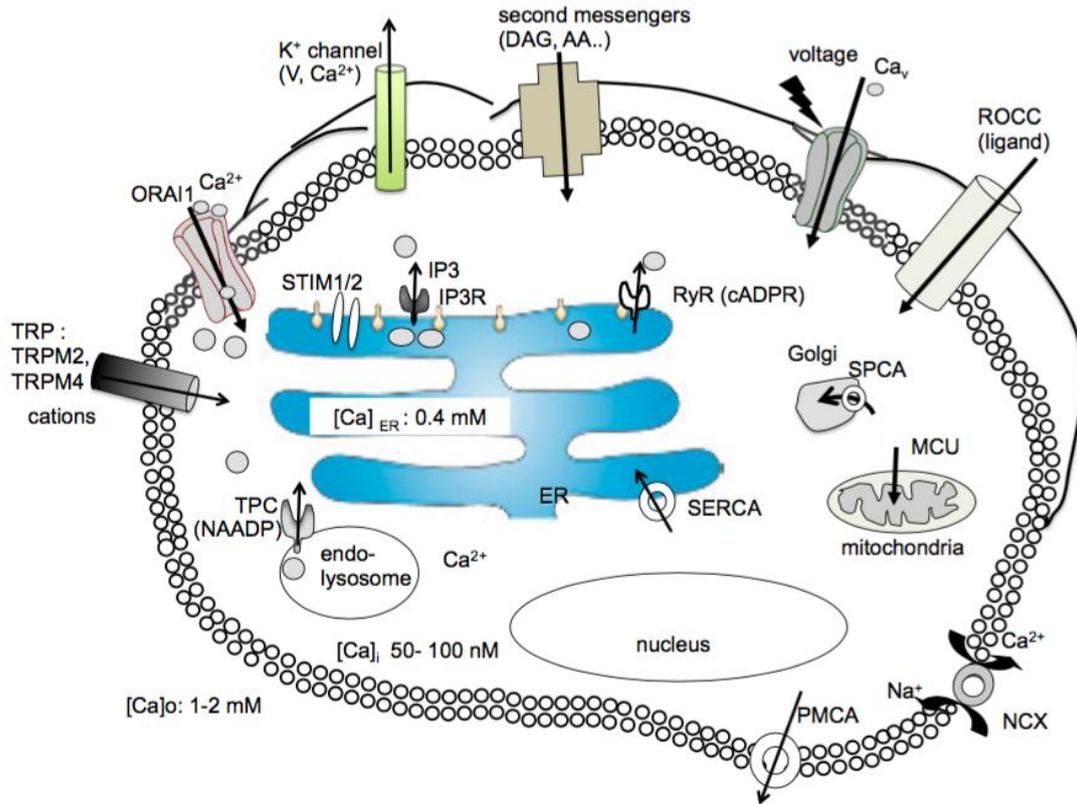
Le calcium est un second messager universel impliqué dans presque tous les aspects de la vie d'une cellule. Si l'on considère tous les types cellulaires confondus, la concentration de calcium libre (ionisé) intracellulaire moyenne est de l'ordre de 100 nM pour une concentration extracellulaire libre de 1 mM (2 mM total) (Oreskes et al., 1968) (Forsén and Kördel, 1994), soit un rapport de 10 000 entre les deux milieux. D'un point de vue évolutif, on considère aujourd'hui que le calcium est exclu du cytosol afin d'éviter la précipitation du phosphate en milieu aqueux (Clapham, 2007). Les échanges de phosphates sont considérés avec le calcium comme les deux principaux mécanismes d'altération de charges et de modification de conformation des biomolécules (Westheimer, 1987) (Clapham, 2007). La différence de concentration de calcium entre milieux intracellulaire et extracellulaire est, avec celle du zinc, le rapport le plus disproportionné parmi tous les ions de la biologie cellulaire (Lodish et al., 2000) (Sekler et al., 2007), ce qui fait du calcium l'ion le plus contrôlé et probablement le plus important pour les fonctions cellulaires (Clapham, 2007).

A partir d'une concentration cytosolique basale de 100 nM, le niveau de calcium peut être multiplié par 10, soit 1  $\mu$ M, en réponse à divers stimuli associés à des fonctions cellulaires précises (Berridge et al., 2000). Dès lors, une régulation du calcium est essentielle pour « protéger » la cellule : compartimenter le calcium, l'exclure de la cellule ou encore le tamponner. Un échec de cette régulation entraînera indubitablement la mort cellulaire (Haiech et al., 2011).

Dans ce premier chapitre, nous présenterons l'organisation et les mécanismes de gestion des stocks de calcium intracellulaires puis nous décrirons le rôle du calcium, des protéines de liaison au calcium et des canaux ioniques dans les fonctions cellulaires (contraction musculaire, transmission nerveuse, sécrétion...). Nous porterons un intérêt tout particulier aux canaux calciques voltage-dépendants.

### I.1) La compartimentation du calcium dans la cellule et sa régulation

La compartimentation du calcium dans la cellule est orientée dans deux directions : le stockage de calcium dans des organelles et l'extrusion de l'excès de calcium vers le milieu extracellulaire. Plusieurs protéines sont impliquées dans ce mécanisme, notamment les transporteurs ioniques (pompes, échangeurs) qui assurent les échanges entre les compartiments et les protéines tampons qui stockent le calcium dans ces compartiments (fig. 1).



**Figure 1 : Compartimentation du calcium et acteurs de la signalisation calcique dans la cellule.** Le calcium intracellulaire est contenu dans le cytoplasme et dans les organelles, surtout le réticulum endoplasmique (ER). Les canaux calciques, pompes et transports exprimés au niveau de ces organites incluent la *sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase* (SERCA), les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> (IP3R) et à la ryanodine (RYR), le *mitochondrial calcium uniporter* (MCU) et le *secretory pathway Ca<sup>2+</sup> ATPase* (SPCA). Les *receptor operated channels* (ROCC), les canaux calciques voltage-dépendants (Ca<sub>v</sub>), les canaux sensibles aux seconds messagers, les canaux potassique, les canaux ORAI1, les canaux *transient receptor potential* (TRP), la *plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase* (PMCA) et l'échangeur sodium/calcium (NCX) sont exprimés au niveau de la membrane plasmique. Les éléments entre parenthèses sont des voies d'activation et de régulation de ces derniers. cADPR : ADP-ribose cyclique, NAADP : nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, DAG : diacylglycerol, AA : acides aminés, IP3 : Inositol trisphosphate.

Pelletier, L. et al. 2015. Voltage Activated Cav1 Calcium Channels in T Cells. *Messenger*.

### I.1.1) Les stocks de calcium intracellulaires

Les deux organelles qui stockent le plus de calcium dans la cellule sont la mitochondrie (en moyenne 100  $\mu$ M de calcium libre) (Rizzuto et al., 2012), et surtout le réticulum endoplasmique (RE). La détermination de la concentration de calcium libre dans le RE a donné lieu à de nombreuses études et à des mesures des plus variées allant de 1  $\mu$ M à 5 mM (Meldolesi and Pozzan, 1998). Cette très grande variabilité peut s'expliquer par des différences tissulaires, le stockage du calcium dans le RE en deux états (libre et complexé)

ou encore par l'évolution des techniques de mesure. On estime généralement la concentration de calcium libre entre 300 et 800  $\mu\text{M}$  pour une concentration totale de 5 à 50 mM (Gilbert, 2012). Mais de nombreux autres compartiments sont impliqués dans ce stockage : appareil de Golgi, endosomes, lysosomes (Rizzuto et al., 2012).

Transporter le calcium dans ces organelles est contraire à la direction du gradient électrochimique.

Les pompes calciques sont des ATPases exprimées sur les membranes des organelles qui utilisent l'énergie libérée par la dégradation d'ATP pour transporter le calcium contre ce gradient. La pompe SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*) permet de maintenir les stocks calciques du RE de cette façon. Toutes les pompes calciques possèdent une structure assez similaire basée sur un domaine transmembranaire formant le pore calcique et de trois domaines cytosoliques : le domaine de liaison à l'ATP, le domaine ATPase et le domaine phosphorylable à l'origine d'un changement de conformation de la protéine et de l'ouverture du pore (MacLennan et al., 2002). Il existe plusieurs pompes SERCA codées par trois gènes différents avec plusieurs épissages alternatifs. Les SERCA1a et 1b sont exprimées dans le muscle squelettique, SERCA2a dans le cœur, SERCA2b est ubiquitaire, et les SERCA3 sont retrouvées dans certains tissus non musculaires. Chacune de ces pompes possède des spécificités de fonctionnement propre à chaque tissu. La pompe SPCA exprimée à la membrane de l'appareil de Golgi est un autre exemple de pompe calcique (Brini and Carafoli, 2009).

Les échangeurs sont une autre façon de contrer ce gradient. Egalement exprimés au niveau membranaire, ils permettent le passage d'un ion contre son gradient grâce au passage d'un autre ion, en sens inverse, qui lui se déplace dans le sens de son propre gradient. Le nombre d'ions échangés est inégal entre les deux directions. Par exemple, l'échangeur NCX ( *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger*) permet l'entrée de trois ions sodium (trois charges positives) dans le cytoplasme chargé assez négativement pour la sortie d'un ion calcium (deux charges positives) (MacLennan et al., 2002). On trouve plusieurs types d'échangeurs sur la membrane mitochondriale dont l'échangeur NCX (Szabadkai and Duchen, 2008). Le NCX est formé de neuf segments transmembranaires formant le pore ionique et d'une longue boucle cytosolique possédant des domaines de régulations sensibles à ces deux ions (MacLennan et al., 2002). La membrane mitochondriale possède également un transporteur uniport, le MCU (*mitochondrial calcium uniporter*), qui transporte du calcium dans la mitochondrie grâce à un gradient de protons entre mitochondrie et cytoplasme (Szabadkai and Duchen, 2008).

Il faut garder à l'esprit que l'ATP libéré par la mitochondrie permet le fonctionnement de la pompe SERCA du RE situé à proximité, ce qui régule localement le calcium. Or les gradients

de cations et de protons au voisinage de la membrane mitochondriale modulent l'activité de la mitochondrie (les enzymes du cycle de Krebs sont activées par des niveaux sous-micromolaires de calcium) (Szabadkai and Duchon, 2008). De plus, en cas de concentration de calcium trop élevée dans la mitochondrie, le NCX peut inverser son activité et libérer du calcium de la mitochondrie vers le RE (Berridge et al., 2000). Ainsi, le RE et la mitochondrie ne sont donc pas deux compartiments indépendants mais sont particulièrement interconnectés. Plusieurs études ont d'ailleurs montré le couplage physique entre RE et mitochondrie. Cela passe pas plusieurs protéines d'ancrage tel les protéines MFN, la chaperonne GRP75 (Rizzuto et al., 2012), ou encore les protéines Mmm et Mdm (Kornmann et al., 2009).

Transporter le calcium du cytosol vers le milieu extracellulaire s'oppose également au gradient électrochimique. La PMCA (*plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) est une pompe calcique de la membrane plasmique très similaire à la SERCA. Comme la SERCA, la pompe PMCA est un groupe de protéines codées par quatre gènes à plusieurs épissages alternatifs avec des spécificités fonctionnelles et tissulaires. PMCA1 et 4 sont ubiquitaires, PMCA2 est exprimée dans le système nerveux et dans la glande mammaire, et PMCA3 est retrouvée uniquement dans le système nerveux (Brini and Carafoli, 2009). Des échangeurs NCX sont également exprimés à la membrane plasmique. Les échangeurs Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> de la membrane plasmique des cellules musculaires sont les échangeurs qui ont le plus été étudiés. En plus du calcium, l'activité des échangeurs NCX de la membrane plasmique est particulièrement sensible aux équilibres ioniques du sodium mais aussi du potassium. Il a en effet été montré que les NCX sont fonctionnellement couplés aux pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPases (Moore et al., 1993). PMCA et NCX travaillent conjointement à l'exclusion du calcium vers le milieu extracellulaire. On considère que les échangeurs ont de plus grandes capacités de transport que les pompes mais que celles-ci compensent par leur plus forte affinité pour le calcium. Cette plus grande affinité permet aux pompes d'être activées pour de plus faibles augmentation de concentration de calcium intracellulaire et donc plus précocement que les échangeurs (MacLennan et al., 2002).

### **I.1.2) Les protéines tampons**

On distingue généralement deux types de protéines liant le calcium (*calcium binding proteins*) : les protéines senseurs, dont le rôle est de transduire un signal, et les protéines tampons, dont la fonction essentielle est de stocker le calcium à l'intérieur de compartiments et donc tamponner le calcium dans un milieu donné (Gilabert, 2012). Cependant, cette

distinction ancienne et quelque peu manichéenne se révèle en fait assez inadaptée au vu des fonctions extrêmement diverses des protéines tampons.

Les protéines tampons se définissent par une très haute capacité de liaison pour le calcium mais de faible affinité afin qu'il soit facilement relargable (Krause, 1991). On retrouve des protéines tampons dans la plupart des organelles stockant le calcium, notamment le réticulum endoplasmique, à l'exception du cas très particulier de la mitochondrie où le calcium est précipité sous forme de phosphate de calcium (Prins and Michalak, 2011).

Ces tampons ont deux fonctions essentielles : limiter la quantité de calcium libre dans les organelles afin de diminuer le gradient chimique défavorable à l'entrée de calcium et éviter la précipitation du calcium lorsqu'il est trop concentré en présence de phosphate (Krause, 1991). Néanmoins, on sait aujourd'hui que beaucoup de protéines décrites à l'origine comme des tampons possèdent en fait bien d'autres fonctions. C'est par exemple le cas de deux protéines tampons du RE très documentées, la calsequestrine et la calreticuline. La première est capable d'interagir avec les canaux à la ryanodine et ainsi réguler la vidange des stocks du RE. La seconde est la principale protéine tampon du RE (elle complexe plus de 50% du calcium du RE) mais c'est également une protéine chaperonne (Prins and Michalak, 2011). Certaines protéines, destinées par exemple à être exprimées à la membrane plasmique, du RE, du Golgi ou des vésicules (le système endomembranaire), sont traduites par des ribosomes liés à la membrane du RE vers l'intérieur de cet organelle. Là elles vont être repliées et subir des modifications post-traductionnelles (Cooper and Sunderland, 2000). Les protéines chaperonnes sont de larges molécules qui sont essentielles au repliement correct des protéines. On retrouve de telles protéines dans le cytosol mais également dans le RE. Dans le RE, ces protéines peuvent être exprimées dans la lumière ou au niveau de la membrane. Les chaperonnes du RE (calnexine, calreticuline...) ont la capacité, en présence de calcium, de lier les protéines mal conformées et de recruter les enzymes nécessaires à leur repliement correct (Michalak et al., 2002).

Un autre groupe de protéines est celui des protéines tampons cytoplasmiques : parvalbumine, calbindine, calretinine... (Gilibert, 2012) Comme dans le RE, ces protéines tampons possèdent des fonctions beaucoup plus complexes que le simple tamponnage du calcium. Par exemple, dans le muscle squelettique, la parvalbumine régule la contraction musculaire en contrôlant le calcium libéré par le RE de façon dépendante du pH ainsi que l'activité des ATPases (Pechere et al., 1977). Lors d'une entrée de calcium dans le cytoplasme (par un canal calcique voltage-dépendant par exemple), ces protéines vont tamponner ce calcium pour l'empêcher de diffuser au delà de 10 à 50 nm du point d'entrée (Gilibert, 2012). La combinaison de ces deux phénomènes entraîne une répartition hétérogène du calcium dans le cytoplasme et la formation de microdomaines, c'est à dire des zones très localisées dans lesquelles la concentration calcique est particulièrement

élevée. Le concept de calcisome a été introduit pour désigner des ensembles de protéines sensibles au calcium et de protéines effectrices localisées dans une très grande proximité au voisinage de canaux calciques et donc au cœur de microdomaines (Haiech, 1980) (Haiech et al., 2011). On sait aujourd'hui que la répartition du calcium en microdomaines est préférable à une diffusion dans tout le cytoplasme afin que les protéines dépendantes du calcium puissent assurer convenablement leurs fonctions (Rizzuto and Pozzan, 2006).

## **I.2) Le calcium et son rôle dans les fonctions cellulaires**

La mise en place de fonctions précises dépendantes du calcium dans les cellules nécessite plusieurs types de protéines : des canaux calciques qui permettent une libération de calcium dans le cytoplasme et des molécules adaptatrices capables de détecter ce calcium et activer différents processus biologiques.

### **I.2.1) Les canaux calciques**

Les canaux calciques sont des protéines transmembranaires exprimées à la membrane plasmique et au niveau des membranes des organelles.

#### **I.2.1.1) Les canaux calciques des organelles**

Deux types de canaux calciques permettent de libérer les stocks de calcium du RE dans le cytoplasme : les récepteurs à l' $IP_3$  ( $IP_3R$ ) et les récepteurs à la ryanodine (RyR).

Les récepteurs à l' $IP_3$  sont des canaux calciques activés par l'inositol trisphosphate. La voie de l' $IP_3$  a été découverte par M. Berridge dans les années 1980 et est aujourd'hui considérée comme une des principales voies de la signalisation calcique, tous types de cellules confondus. L' $IP_3$  est le résultat, avec le diacylglycerol (DAG), de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) par la phospholipase C (PLC). Le DAG est essentiel pour l'activation des protéines kinases C (PKC) classiques et nouvelles (Berridge, 2005). L'activation de la voie de l' $IP_3$  par l'entrée en action des PLC est dépendante de très nombreux ligands via différents types de récepteurs (récepteurs tyrosine kinase, récepteurs couplés à des protéines G) propres à chaque type cellulaire (Berridge et al., 2000). Il existe en fait trois récepteurs à l' $IP_3$  ( $IP_3R1$ ,  $IP_3R2$ ,  $IP_3R3$ ), codés par trois gènes différents. Le canal est formé d'un tétramère dont chacune des protéines est composé de six domaines transmembranaires contenant le pore calcique et d'une longue queue N-terminale cytosolique contenant le domaine de liaison à l' $IP_3$  (Patterson et al., 2004). Les  $IP_3R$  peuvent être activés par le calcium cytosolique pour des concentrations de 100 à 300 nM (au delà le calcium inhibe le canal). La libération de calcium des stocks intracellulaires en réponse au

calcium est un phénomène connu sous le nom de *calcium-induced calcium release* (CICR) (Berridge et al., 2000). Les IP<sub>3</sub>R sont aussi régulés par de nombreuses molécules, dont les acides nucléiques, ou encore par des phosphorylations. Ces mécanismes de régulation donnent à la réponse calcique des IP<sub>3</sub>R un profil oscillatoire (Patterson et al., 2004).

Les récepteurs à la ryanodine sont des canaux calciques décrits à l'origine pour être activés par un alcaloïde végétal, la ryanodine (Van Petegem, 2012). Il existe trois récepteurs à la ryanodine (RyR1, RyR2, RyR3). Ils sont structurellement très proches des récepteurs à l'IP<sub>3</sub>, un tétramère dont chacune des protéines est composé de six domaines transmembranaires contenant le pore calcique et d'une longue queue N-terminale cytosolique (Seidel et al., 2015). Le principal signal d'activation des récepteurs à la ryanodine est le calcium cytosolique. Ils sont activés par de plus fortes concentrations de calcium que les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) et possèdent une plus large conductance, ce qui en fait les principaux canaux impliqués dans le CICR (MacLennan et al., 2002). Les RyR peuvent aussi être activés par un excès de calcium dans le RE, le *store overload-induced calcium release* (SOICR). Les RyR sont également régulés par de très nombreuses molécules, dont les acides nucléiques, ou par des phosphorylations. Les récepteurs à la ryanodine ont été particulièrement étudiés dans les muscles striés dans lesquels l'ouverture de canaux calciques voltages dépendants (Ca<sub>v</sub>) entraîne l'activation des RyR et la déplétion des stocks du RE. C'est ce calcium libéré par le RE qui permet la contraction musculaire. On retrouve ce phénomène dans le muscle cardiaque et squelettique bien que le cas du muscle squelettique soit assez particulier. Alors que l'ouverture des récepteurs à la ryanodine dépend d'un mécanisme de CICR dans le muscle cardiaque, les RyR sont directement couplés aux canaux Ca<sub>v</sub> dans le muscle squelettique et c'est leur ouverture et non pas l'influx de calcium extracellulaire qui permet d'activer les RyR (Van Petegem, 2012).

Le PTP (*permeability transition pore*) n'est pas un canal calcique à proprement parler mais un pore non sélectif exprimé sur la membrane interne mitochondriale (Berridge et al., 2000). Si les propriétés et les modes de régulation du PTP sont bien connus, la nature moléculaire exacte de ce pore demeure inconnue. Il a cependant été clairement établi que les principaux canaux mitochondriaux, les VDAC (*voltage dependent anion channel*) et les ANT (*adenine nucleotide translocase*) ne rentrent pas dans la composition du PTP (Izzo et al., 2016). Les derniers travaux tendent à montrer que la F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATP synthase formerait le PTP (Giorgio et al., 2013) Dans des conditions physiologiques, l'ouverture de ce pore est très contrôlée, notamment de façon dépendante du voltage, et libère du calcium de façon régulée (Ichas et al., 1997). Dans des conditions pathologiques, une surcharge de calcium dans la mitochondrie associée à un stress oxydatif ou une déplétion en ATP entraîne une ouverture massive du PTP (Szabadkai and Duchen, 2008). Dès lors, le pore devient perméable à la

libération de protéines mitochondriales dans le cytoplasme, notamment du cytochrome C qui va déclencher l'apoptose (Berridge et al., 2000).

### **I.2.1.2) Les canaux calciques de la membrane plasmique**

Il existe de nombreux types de canaux calciques exprimés au niveau de la membrane plasmique. On les classe couramment selon leur structure ou leur mode d'activation. On peut citer les canaux activés par le voltage (VOC, pour *voltage-operated channels*), par des ligands (ROC, pour *receptor-operated channels*) ou des seconds messagers (SMOC, pour *second messenger-operated channels*), par la déplétion des stocks de calcium intracellulaires (SOC, pour *store-operated channels*), ou encore par les forces et tensions membranaires (SAC, pour *stretch-activated channels*).

De part l'importance des canaux calciques voltage-dépendants dans notre travail, nous traiterons ces canaux dans un chapitre à part entière.

Les ligand-gated ion channels, aussi connus sous le nom de receptor-operated channels, sont des canaux cationiques activés en réponse à la fixation d'un ligand sur un domaine extracellulaire. Ces canaux ont la particularité d'avoir une sélectivité pour le calcium plus faible que celle de véritables canaux calciques ( $P_{Ca}/P_{Na}$  : 3 à 10, contre  $P_{Ca}/P_{Na}$  supérieure à 1000 pour les canaux calciques voltages dépendants) et d'être très dépendants des gradients de cations, notamment de celui du magnésium (Tsien and Tsien, 1990). Ils sont généralement organisés en tétramères ou pentamères de deux à quatre domaines transmembranaires. Ces canaux ont beaucoup été étudiés pour leur rôle dans la transmission synaptique. Des exemples importants sont les récepteurs au glutamate et à l'aspartate (NMDAR), les récepteurs purinergiques à l'ATP (P2X), les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine et les récepteurs à la sérotonine 5-HT<sub>3</sub> (Galligan, 2002).

Les canaux TRP (*transient receptor potential*) appartiennent à une très large famille de canaux cationiques structurellement assez proches. Ils sont composés de six domaines transmembranaires avec des extrémités N- et C-terminale cytoplasmiques. Ces canaux se distinguent par leur très grande variabilité et l'originalité de leurs mécanismes d'activation, allant de ligands et seconds messagers classiques à des facteurs environnementaux. Cela en fait des canaux très impliqués dans la physiologie sensorielle (Venkatchalam and Montell, 2007). Les TRP regroupent nombre de canaux appartenant à la famille des *stretch activated channels* et sont parfois incorrectement considérés comme étant tous mécanosensibles (Sachs, 2009). Les canaux TRP sont classés en sept groupes, nommés le plus souvent selon le mode d'activation du premier canal découvert dans chaque groupe

(table 1). Les TRPC (canonical) sont activés par le diacylglycerol ou la déplétion des stocks du RE. Les TRPV (*vanilloid*) sont essentiellement activés par les signaux de l'environnement comme la chaleur, le pH ou l'osmolarité. Les TRPM (*melastatin*) sont activés par des acides nucléiques, des cations ou des dérivés lipidiques. D'autres TRP moins étudiés sont les TRPN (*no mechanoreceptor potential C*), les TRPA (*ankyrin*), les TRPP (*polycystic*) et les TRPML (*mucoipin*). Parmi tous ces groupes, les TRPV sont les plus sélectifs pour le calcium mais plusieurs TRPC et quelques TRPM le sont également (Venkatachalam and Montell, 2007).

Les canaux dépendants de la déplétion des stocks sont activés lors de la vidange du calcium du RE dans le cytoplasme. Cette déplétion est détectée au niveau du RE par les protéines sensibles au calcium STIM1 qui activent des canaux calciques membranaires. Certains canaux TRPC ont été décrits dans ce phénomène, mais ce sont les canaux ORAI1 qui sont aujourd'hui considérés comme prépondérants dans la mise en place d'un courant dépendants de la déplétion des stocks. La caractérisation des souris déficientes pour STIM1 et ORAI1 a mis en évidence des défaillances fonctionnelles dans de nombreux types cellulaires, et notamment un syndrome d'immunodéficience combinée (Hogan et al., 2010). C'est ainsi l'immunologie, et plus particulièrement l'étude des lymphocytes T, qui concentre la majorité des travaux concernant la voie STIM/ORAI. La déplétion des stocks du RE est la principale voie d'entrée de calcium extracellulaire dans les cellules du système immunitaire et on associe plus généralement ce phénomène aux cellules non excitables (par opposition aux canaux calciques voltage-dépendants dans les cellules excitables). Nous reviendrons plus en détail sur la voie STIM/ORAI dans le chapitre suivant consacré aux lymphocytes T.

**Table 1 : Liste des canaux TRP identifiés chez les mammifères et de leurs propriétés.**

A ces 28 canaux, se rajoute TRPN1 mis en évidence uniquement chez le poisson zèbre. *TRPC2* est un pseudo-gène chez l'homme mais est exprimé chez la souris. DAG : diacylglycerol,  $PIP_3$  : phosphatidylinositol trisphosphate,  $PIP_2$  : phosphoinositide bisphosphate, EGF : epidermal growth factor.

D'après Venkatachalam, K., and C. Montell. 2007. TRP channels. *Annu Rev Biochem.*

Nom du gène	Sélectivité P <sub>Ca</sub> /P <sub>Na</sub>	Modulation de l'activité	Expression tissulaire
TRPC1	pas de sélectivité	déplétion des stocks, couplage conformationnel, forces mécaniques	cœur, cerveau, testicules, ovaires, foie, rate
TRPC2	2.7	DAG	organe voméro-nasal, testicules
TRPC3	1.6	déplétion des stocks, couplage conformationnel, DAG, exocytose	cerveau
TRPC4	7	déplétion des stocks (?), exocytose	cerveau, endothélium, glandes surrénales, rétine, testicules
TRPC5	9.5	déplétion des stocks (?), sphingosine-1-phosphate, exocytose	cerveau
TRPC6	5	couplage conformationnel, DAG, PIP <sub>3</sub>	poumons, cerveau, placenta, ovaires
TRPC7	1.9 - 5	déplétion des stocks, DAG	œil, cœur, poumon
TRPV1	3.8 - 9.6	température, vanilloïdes, anandamide, camphre, pipérine, allicine, éthanol, nicotine, cytokines pro-inflammatoires, protons, PIP <sub>2</sub> , phosphorylation, exocytose	ganglions nerveux, neurones, vessie, testicules
TRPV2	3	température, osmolarité, exocytose	ganglions nerveux, moelle épinière, cerveau, rate, intestin
TRPV3	6	température, acides gras poly-insaturés, menthol	ganglions nerveux, moelle épinière, cerveau, kératinocytes, langue
TRPV4	6	température, osmolarité, exocytose	ganglions nerveux, reins, poumons, rate, testicules, cœur, kératinocytes, cœur, foie, endothélium
TRPV5	>100	Ca <sup>2+</sup> , hyperpolarisation, exocytose	rein, intestin, pancréas, placenta
TRPV6	>100	déplétion des stocks, exocytose	intestin grêle, le pancréas, le placenta
TRPM1	pas de sélectivité	translocation (?)	cerveau, mélanosomes
TRPM2	0.3	ADP-ribose, cADP-ribose, nucléotides pyrimidiques, acide arachidonique, NAD, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Ca <sup>2+</sup>	cerveau, moelle osseuse, rate
TRPM3	1.6	osmolarité, déplétion des stocks (?)	rein, cerveau, hypophyse
TRPM4	cations monovalents	Ca <sup>2+</sup> , voltage, PIP <sub>2</sub>	prostate, côlon, cœur, reins, testicules
TRPM5	cations monovalents	Ca <sup>2+</sup> , voltage, PIP <sub>2</sub> , température	intestin, foie, poumon, cellules gustatives
TRPM6	cations divalents	Mg <sup>2+</sup> , translocation	rein, intestin grêle
TRPM7	cations divalents	Mg <sup>2+</sup> , ATP, protons, phosphorylation, PIP <sub>2</sub>	rein, cœur, hypophyse, os, tissus adipeux
TRPM8	3.3	température, menthol, iciline, pH, PIP <sub>2</sub>	ganglions nerveux, prostate, foie
TRPA1	0.8	température, iciline, isothiocyanates, allicine, cinnamaldéhyde, acroléine, cannabinoïdes, bradykinine, DAG, acides gras poly-insaturés, forces mécaniques (?)	ganglions nerveux, cellules ciliées, ovaires, rate, testicules
TRPN1	?	forces mécaniques (?)	oreilles, œil
TRPP2	pas de sélectivité	Ca <sup>2+</sup> , translocation, TRPP1, EGF, PIP <sub>2</sub> , cytosquelette d'actine	largement exprimé
TRPP3	4.3	Ca <sup>2+</sup>	reins, cœur
TRPP5	?	?	testicules, cœur
TRPML1	cations monovalents ?	pH, Ca <sup>2+</sup> , clivage protéolytique	cerveau, cœur, muscles squelettiques
TRPML2	?	?	?
TRPML3	?	?	cellules ciliées cochléaires

## I.2.2) Les protéines de liaison au calcium et leurs fonctions effectrices

Pour assurer la régulation du calcium et assurer ses fonctions cellulaires des centaines de protéines sont capables d'interagir avec le calcium, et ce avec des rapports d'affinité disparates allant du nM au mM (Clapham, 2007). Il existe différents types de domaines protéiques de liaison au calcium. La plupart sont basés autour de résidus d'acides aminés particuliers, essentiellement l'acide aspartique et l'acide glutamique qui sont chargés négativement. Ces équilibres ioniques sont modifiés lorsque le calcium lie ces domaines de liaison, ce qui entraîne une modification de la structure tridimensionnelle au niveau de ces régions et un changement de conformation global des protéines (Bindreither and Lackner, 2009).

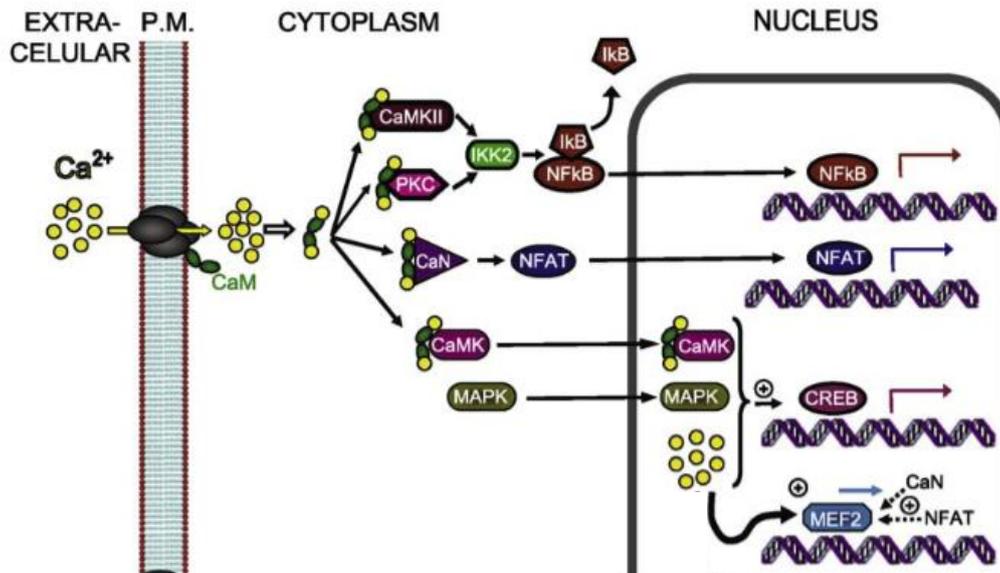
Le domaine *EF-hand* (pour *(E)helix-loop-(F)helix*) est probablement le domaine de liaison au calcium le plus représenté. Ce motif a été décrit par Kretsinger et Nockolds en 1973 à partir de l'étude cristallographique de la parvalbumine. Il est composé de deux hélices alpha reliées par une boucle contenant les résidus de liaison au calcium (Kretsinger and Nockolds, 1973). Chez l'homme, on retrouve ce domaine *EF-hand* dans environ 300 protéines, le EF-Handome, qui possèdent généralement deux à six domaines *EF-hand* fonctionnant de manière synergique, par exemple la parvalbumine et la calbindine citées précédemment mais aussi la calmoduline et la troponine C qui seront décrites plus bas (Haiech et al., 2011). La calmoduline (CaM) est sans conteste la protéine de liaison au calcium qui a été la plus étudiée. Il s'agit d'une protéine adaptatrice composée de quatre domaines *EF-hand* de liaison au calcium et joue le rôle d'interrupteur moléculaire pour des centaines de protéines (Clapham, 2007). La calmoduline a la capacité de réguler de nombreux canaux ioniques : les récepteurs à l' $IP_3$ , les récepteurs à la ryanodine, des canaux TRP, les récepteurs NMDA, des canaux calciques et potassiques voltage-dépendants (Saimi and Kung, 2002). De plus, la calmoduline a un rôle fondamental dans l'induction de l'expression génique (fig. 2). Elle active la phosphatase calcineurine en présence de calcium. La calcineurine permet notamment de déphosphoryler les facteurs de transcription de la famille NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), ce qui permet leur translocation dans le noyau où ils exercent leur activité. La calmoduline est aussi capable d'activer les protéines kinases de la famille CaMK (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*). La CaMK a la capacité de phosphoryler et d'activer le facteur de transcription CREB (*cyclic AMP response element-binding*) et la kinase I $\kappa$ B2 (*I $\kappa$ B kinase*) qui permet l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Alonso and Garcia-Sancho, 2011). On désigne généralement l'ensemble des gènes exprimés en réponse au calcium comme le signalosome calcique (Haiech et al., 2011). Les CaMK appartiennent à une très large famille

contenant une centaine de kinases caractérisées par la présence d'un domaine autorégulateur inactivé par la liaison au complexe calcium/calmoduline. Outre les CaMK, cette famille inclut les MLCK (*myosin light chain kinase*). Les différentes kinases MLCK possèdent une expression et une activité tissus-spécifique. Par exemple, la MLCK1 entraîne la phosphorylation de la myosine et la contraction du muscle lisse (Temmerman et al., 2013). La troponine C est une autre protéine adaptatrice sensible au calcium, possédant une grande similarité avec la calmoduline (Haiech et al., 2011). Elle possède deux domaines *EF-hand* pouvant lier le calcium. Elle assure le couplage excitation/contraction dans les muscles striés cardiaques et squelettiques. Dans ces muscles, les filaments d'actine sont recouverts par un filament de tropomyosine. En présence de calcium, la troponine C déplace la tropomyosine et permet à l'actine d'interagir avec la myosine, et donc la contraction (MacLennan et al., 2002).

Ces protéines à domaines *EF-hand* se distinguent par leurs différentes affinités pour le calcium. Celles de forte affinité pour le calcium (de l'ordre du nM) fixent aussi le magnésium et entraînent généralement la désactivation du signal calcique (comme la parvalbumine) alors que les protéines de faible affinité (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) sont le plus souvent impliquées dans la traduction du signal (comme la troponine C) (Kilhoffer et al., 1983).

Un autre exemple important de domaine de liaison au calcium est le domaine C2. Il est composé de feuillettes  $\beta$  antiparallèles organisés en sandwich  $\beta$ . On le retrouve par exemple sur des protéines kinases (certaines protéines kinases C sensibles au calcium, la phosphoinositide 3-kinase) ou encore sur la synaptotagmine, le senseur calcique qui régule l'exocytose (Clapham, 2007).

Dans les cellules sécrétrices, plusieurs PKC calcium-dépendantes (*PRKCA*, *PRKCB*, *PRKCG*) ainsi que deux protéines sensibles au calcium spécifiques au phénomène d'exocytose ont été mises en évidence. La PKC agit dans les phases précoces de l'exocytose en permettant le déplacement des vésicules au contact de la membrane plasmique. La synaptotagmine (*SYT1*) et la *Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion* (*CADPS*) sont actives dans les dernières étapes et modifient la conformation du complexe SNARE jusqu'à la libération des vésicules (Kits and Mansvelder, 2000).



**Figure 2 : Régulation de la transcription par le calcium.** La liaison du calcium à la calmoduline permet l'activation des Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases (CaMK), des protéines kinases C (PKC) et de la calcineurine (CaN), entraînant la translocation des facteurs de transcription NFkB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), NFAT (nuclear factor of activated T-cells) et l'activation de CREB (cyclic AMP response element-binding). Le facteur de transcription MEF2 est directement activable par le calcium nucléaire mais aussi par NFAT ou la calcineurine. MAPK : mitogen-activated protein kinase, IKK2 : IκB kinase, IκB (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor), MEF2 : myocyte enhancer factor-2.

Alonso, M.T. and J. Garcia-Sancho. 2011. Nuclear Ca(2+) signalling. *Cell Calcium*.

Enfin, nombre de fonctions cellulaires dépendantes du calcium impliquent des protéines capables de se lier directement au calcium afin de s'activer et exercer diverses fonctions. On peut citer par exemple la phosphoinositide 3-kinase qui est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, notamment par l'activation de la protéine kinase ubiquitaire Akt. Un autre exemple est la protéine kinase PYK2 (*proline-rich tyrosine kinase 2*) qui active l'indispensable voie des MAP (*mitogen-activated protein*) kinases après liaison au calcium (Berridge et al., 2000).

Tous ces éléments participent à faire du calcium un second messager indispensable dans tous les domaines de la biologie cellulaire.

### **I.3) Les canaux calciques voltage-dépendants**

Les canaux calciques voltage-dépendants ( $Ca_v$  ou VGCC, pour *voltage-gated calcium channels*) appartiennent au groupe des canaux ioniques voltage-dépendants. Il s'agit de canaux très sélectifs pour le calcium, exprimés à la membrane plasmique d'un grand nombre de types cellulaires. Ils ont particulièrement bien été décrits dans les cellules excitables chez lesquelles ils induisent un influx calcique après activation par dépolarisation de la membrane plasmique. Les canaux calciques voltage-dépendants représentent un groupe complexe de protéines qui présentent une très grande diversité d'assemblage, de fonctionnement et de mode de régulation. Cette diversité place les canaux  $Ca_v$  au centre de très nombreux processus cellulaires (contraction musculaire, neurotransmission, sécrétion...) et en fait des acteurs incontournables de la signalisation calcique.

#### **I.3.1) Diversité et structure des canaux $Ca_v$ dans les cellules excitables**

Les canaux calciques voltage-dépendants sont composés de quatre sous-unités codées par différents gènes : la sous-unité principale  $\alpha 1$  et les sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\alpha 2\delta$  et dans une moindre mesure  $\gamma$ .

##### **I.3.1.1) La sous-unité principale $\alpha 1$**

Il existe dix sous-unités  $\alpha 1$  des canaux calciques voltage-dépendants différentes; elles sont codées par dix gènes différents. On sait aujourd'hui que c'est la sous-unité  $\alpha 1$  qui définit les propriétés biophysiques et pharmacologiques qui ont permis de classer les canaux  $Ca_v$  en trois groupes :  $Ca_v 1$ ,  $Ca_v 2$  et  $Ca_v 3$  (fig. 3). Chaque groupe possède plusieurs membres caractérisés par une certaine spécificité tissulaire (Bidaud and Lory, 2011).

Les canaux  $Ca_v 1$  sont plus connus sous le nom de canaux de type L (pour long-lasting) en raison de leur longue durée d'action après activation. Ils ont été décrits à l'origine pour leur sensibilité aux dihydropyridines (DHP) mais ils sont également sensibles aux phenylalkylamines et aux benzothiazepines, des inhibiteurs pharmacologiques utilisés dans le traitement de l'hypertension (Zamponi et al., 2015). Les canaux  $Ca_v 1$  comptent quatre membres :  $Ca_v 1.1$ ,  $Ca_v 1.2$ ,  $Ca_v 1.3$  et  $Ca_v 1.4$ . Ces sous-unités  $\alpha 1$  étaient anciennement connues sous le nom de  $\alpha 1S$ ,  $\alpha 1C$ ,  $\alpha 1D$  et  $\alpha 1F$  ; et sont codées par les gènes *CACNA1S*, *CACNA1C*, *CACNA1D* et *CACNA1F* (Hofmann et al., 2014).  $Ca_v 1.1$  est exprimé exclusivement dans le muscle squelettique où il permet le couplage excitation-contraction.  $Ca_v 1.2$  est retrouvé dans les muscles cardiaque et lisse où il permet également le couplage

excitation-contraction ; ainsi que dans les neurones où il est important pour la transmission du signal nerveux.  $Ca_v1.3$  est exprimé des cellules endocrines et sa principale fonction est d'assurer la fonction sécrétoire de ces cellules. Néanmoins, il est aussi co-exprimé dans le muscle cardiaque et dans le cerveau avec  $Ca_v1.2$ . Enfin,  $Ca_v1.4$  est spécifique de la rétine et permet la transduction du signal visuel (fig. 4) (Catterall, 2011).

Familles de canaux			Noms des canaux		Gènes	Inhibiteur pharmacologiques
HVA	$Ca_v1$	L	$Ca_v1.1$	$\alpha 1S$	<i>CACNA1S</i>	dihydropyridine, phenylalkylamines, benzothiazepines
			$Ca_v1.2$	$\alpha 1C$	<i>CACNA1C</i>	
			$Ca_v1.3$	$\alpha 1D$	<i>CACNA1D</i>	
			$Ca_v1.4$	$\alpha 1F$	<i>CACNA1F</i>	
	$Ca_v2$	P/Q	$Ca_v2.1$	$\alpha 1A$	<i>CACNA1A</i>	$\omega$ -agatoxine
		N	$Ca_v2.2$	$\alpha 1B$	<i>CACNA1B</i>	$\omega$ -conotoxine, piperazines, piperidines
		R	$Ca_v2.3$	$\alpha 1E$	<i>CACNA1E</i>	SNX-482
LVA	$Ca_v3$	T	$Ca_v3.1$	$\alpha 1G$	<i>CACNA1G</i>	kurtoxine, ethosuximide, anandamide, amiloride
			$Ca_v3.2$	$\alpha 1H$	<i>CACNA1H</i>	
			$Ca_v3.3$	$\alpha 1I$	<i>CACNA1I</i>	

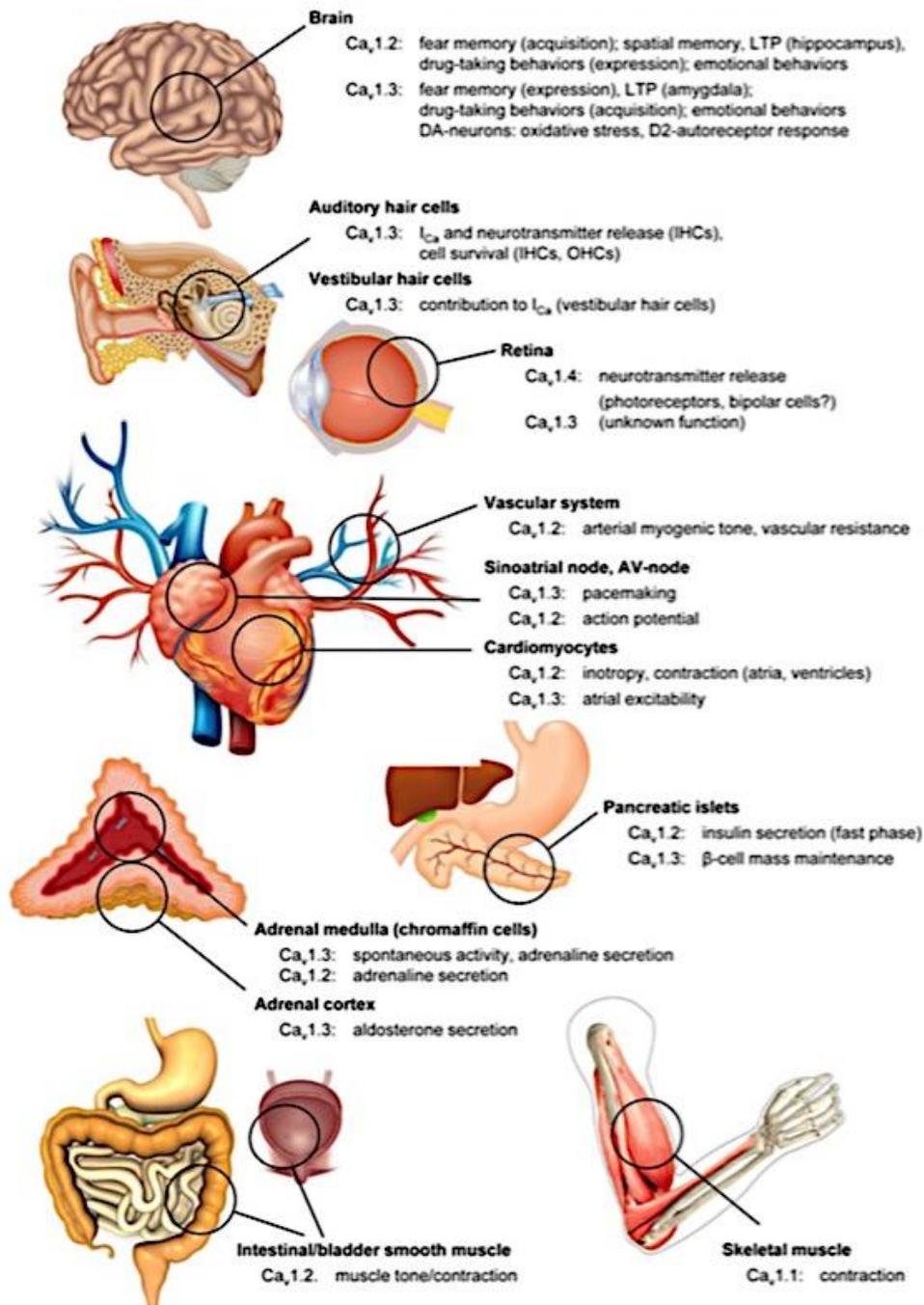
**Figure 3 : Classification des canaux calciques voltages dépendants.** Ce tableau utilise deux désignations pour le nom des canaux : la nouvelle nomenclature ( $Ca_v\dots$ ) et l'ancienne ( $\alpha 1\dots$ ).

HVA : high voltage activated, LVA : low voltage activated

Les canaux  $Ca_v2$  comptent trois membres :  $Ca_v2.1$  ( $\alpha 1A$ ),  $Ca_v2.2$  ( $\alpha 1B$ ) et  $Ca_v2.3$  ( $\alpha 1E$ ). Elles sont codées par les gènes *CACNA1A*, *CACNA1B* et *CACNA1E* (Hofmann et al., 2014). Ces trois protéines ont été divisées à l'origine selon leur sensibilité à diverses toxines utilisées comme inhibiteurs pharmacologiques, respectivement la  $\omega$ -agatoxine, la  $\omega$ -conotoxine et le SNX-482 ; et ont été nommés canaux de type P/Q, N et R (Dolphin, 2012). Les canaux  $Ca_v2$  sont exprimés uniquement dans le cerveau où ils assurent la transmission du signal nerveux (Catterall, 2011).

Les canaux  $Ca_v3$  sont plus connus comme les canaux de type T (pour *transient*) en raison de leur inactivation rapide (Zamponi et al., 2015). Ils comptent trois membres :  $Ca_v3.1$  ( $\alpha 1G$ ),  $Ca_v3.2$  ( $\alpha 1H$ ) et  $Ca_v3.3$  ( $\alpha 1I$ ), codés par les gènes *CACNA1G*, *CACNA1H* et *CACNA1I* (Hofmann et al., 2014). Les canaux  $Ca_v3$  sont exprimés dans les neurones, dans le cœur et les cellules sécrétoires (Catterall, 2011).

D'autre part, chacun de ces gènes possède des isoformes d'épissage alternatif. Ce qui renforce encore plus la diversité de ces canaux (Zamponi et al., 2015)).



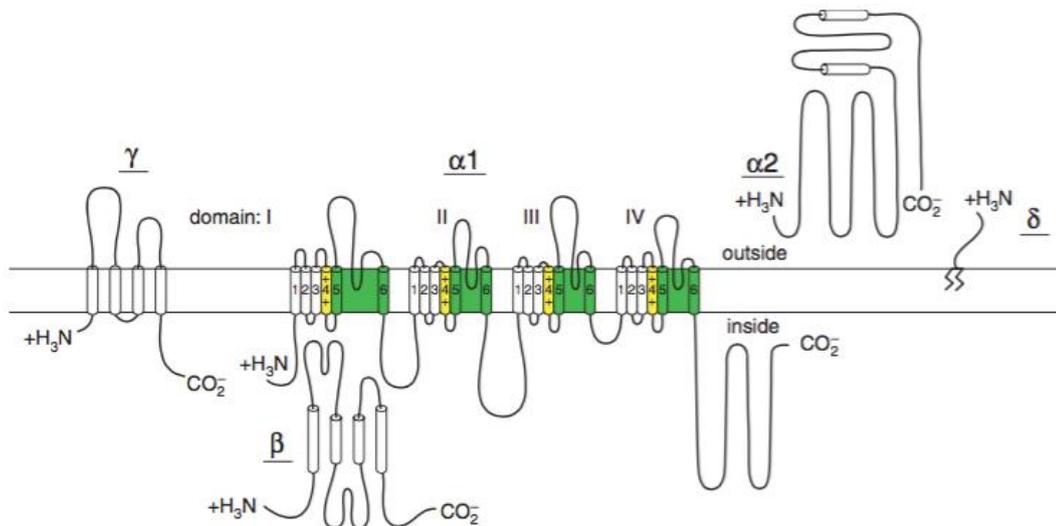
**Figure 4 : Localisation et fonction des canaux Ca<sub>v</sub>1 dans l'organisme (hors système immunitaire).**

Zamponi, G.W. et al. 2015. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacological reviews*.

Structurellement, la sous-unité α1 est formée de 4 domaines répétés (I à IV), chacun composé de six segments transmembranaires (S1 à S6) reliés entre eux par des boucles et avec des extrémités N- et C-terminales intracellulaires. Le segment transmembranaire S4 possède des acides aminés chargés positivement qui constituent le senseur au voltage (fig. 5 : en jaune). Les segments S5 et S6 forment le pore du canal (fig. 5 : en vert). Ces deux

segments possèdent des résidus glutamates et aspartates à l'origine de la sensibilité au calcium (Catterall, 2011). Avec une sélectivité pour le calcium plus de 1000 fois supérieure à celle pour le sodium ou le potassium, les  $Ca_v$  sont les canaux les plus sélectifs pour le calcium parmi tous les types de canaux calciques et les plus sélectifs pour leur ion parmi tous les types de canaux voltage-dépendants (Tsien and Tsien, 1990). Une différence structurale notable entre les canaux  $Ca_v3$  par rapport aux  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$  réside dans les acides aminés chargés du pore calcique au niveau des segments S5 et S6. Les  $Ca_v3$  possèdent davantage de résidus aspartates, ce qui se traduit par un pore plus étroit (5,1 Å contre 6,2 Å) et une sélectivité plus faible pour le calcium (Shuba, 2014) ; mais aussi une conductance plus faible (11-25 pS pour les canaux  $Ca_v1$ , 10-20 pS pour les  $Ca_v2$  et 5-11 pS pour les canaux  $Ca_v3$ ) (Berridge, 2014). Les segments S5 et S6 (fig. 5 : en vert) possèdent aussi des sites de fixation pour des molécules pharmacologiques comme les DHP pour les canaux  $Ca_v1$  (Zamponi et al., 2015).

Bien que toutes les sous-unités  $\alpha1$  possèdent ces domaines fonctionnels qui restent très conservés parmi les trois groupes, le reste de la structure possède une certaine variabilité. Les sous-unités  $\alpha1$  des  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$  possèdent entre elles environ 40% d'homologie de structure. Les sous-unités  $\alpha1$  des  $Ca_v3$ , plus divergentes, ne possèdent que 25% d'homologie avec ces dernières. A l'intérieur de chacun des trois groupes, les sous-unités  $\alpha1$  possèdent plus de 70% d'homologie de séquence (Catterall, 2011). Cette variabilité apporte une certaine spécificité fonctionnelle à chacune des dix sous-unités  $\alpha1$  et des mécanismes de régulation qui leur sont propres.



**Figure 5 : Structure et organisation des canaux calciques voltage-dépendants.** Les cylindres représentent des hélices  $\alpha$ . Les jaunes correspondent au senseur au voltage et les verts forment le pore du canal.

Catterall, W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*

Tous les canaux calciques voltage-dépendants sont composés d'une sous-unité  $\alpha 1$ . Les canaux  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$  comportent en plus des sous-unités auxiliaires communes :  $\beta$  et  $\alpha 2\delta$  (table 2). La sous-unité  $\gamma$  est un cas plus singulier. Les canaux  $Ca_v3$  au contraire ne possèdent pas de sous-unités auxiliaires et sont formés uniquement de la sous-unité  $\alpha 1$ . Comme les sous-unités  $\alpha 1$ , les sous-unités auxiliaires regroupent des groupes de protéines codées par des gènes différents et possédant de multiples épissages alternatifs (Campiglio and Flucher, 2015).

sous-unités auxiliaires		nom des gènes	fonction des sous-unités auxiliaires	sous-unités $\alpha 1$ associées
$\beta$	$\beta 1$	<i>CACNB1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• diminution des seuils d'activation et d'inactivation</li> <li>• adressage du canal</li> <li>• stabilité du canal</li> <li>• internalisation du canal</li> </ul>	$Ca_v1$ et $Ca_v2$
	$\beta 2$	<i>CACNB2</i>		
	$\beta 3$	<i>CACNB3</i>		
	$\beta 4$	<i>CACNB4</i>		
$\alpha 2\delta$	$\alpha 2\delta 1$	<i>CACNA2D1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• adressage du canal</li> <li>• recyclage du canal</li> </ul>	$Ca_v1$ et $Ca_v2$
	$\alpha 2\delta 2$	<i>CACNA2D2</i>		
	$\alpha 2\delta 3$	<i>CACNA2D3</i>		
	$\alpha 2\delta 4$	<i>CACNA2D4</i>		
$\gamma$	$\gamma 1$	<i>CACNG1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• inactivation du canal</li> </ul>	$Ca_v1.1$
	$\gamma 2$ à $8$	<i>CACNG2</i> à $8$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• indépendants des canaux <math>Ca_v</math></li> </ul>	aucunes

**Table 2 : Sous-unités auxiliaires des canaux calciques voltage-dépendants et implications de ces sous-unités dans le fonctionnement des canaux  $Ca_v$ .**

### I.3.1.2) La sous-unité $\beta$

Les sous-unités  $\beta$  comprennent quatre protéines différentes, de  $\beta 1$  à  $\beta 4$ , codées par quatre gènes, de *CACNB1* à *CACNB4* (Hofmann et al., 2014). Elles possèdent de nombreuses isoformes d'épissage qui sont différentiellement exprimées selon les tissus et les stades de développement (table 3) (Buraei and Yang, 2010). Les quatre sous-unités  $Ca_v1\alpha 1$  et les trois  $Ca_v2\alpha 1$  peuvent toutes s'associer aux quatre sous-unités  $\beta$ . Si dans un tissu donné  $\alpha 1$  peut être co-précipité avec plusieurs sous-unités  $\beta$  lorsqu'elles sont co-exprimées, il existe des associations préférentielles, liées à la structure des protéines  $\beta$  et des constantes de dissociation différentes avec  $\alpha 1$  (Cens et al., 2005). Dans le cerveau,  $Ca_v2.1\alpha 1$  s'associe aux quatre sous-unités  $\beta$  selon une affinité  $\beta 4 > \beta 2 > \beta 1 > \beta 3$  (De Waard et al., 1995) et  $Ca_v2.2\alpha 1$  selon une affinité  $\beta 3 > \beta 4 > \beta 1$  (Scott et al., 1996). De plus, ces affinités peuvent varier selon les étapes du développement (Vance et al., 1998) et les isoformes d'épissage. En effet, la forme cardiaque de  $Ca_v1.2\alpha 1$  ( $Ca_v1.2b$ ) s'associe préférentiellement à  $\beta 2$  par rapport à  $\beta 3$ , ce qui n'est pas le cas des formes musculaires et neuronales de  $Ca_v1.2$

(Murakami et al., 2006). Cela pourrait s'expliquer par l'épissage différent au niveau du site de liaison de  $\alpha 1$  à  $\beta$ . Enfin, la seule association exclusive connue concerne  $Ca_v1.1$  et  $\beta 1a$  qui sont les seules sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta$  exprimées dans le muscle squelettique (Buraei and Yang, 2010).

$Ca_v\beta$	Tissue Distribution
$\beta_1$	Expressed in brain (cerebral cortex, habenula, hippocampus, and olfactory bulb), heart, skeletal muscle, spleen, and T cells, but not in kidney, liver, or stomach.
$\beta_{1a}$	Expressed only in skeletal muscle (but see Ref. 89). Exclusive partner of $Ca_v1.1$ and irreplaceable for excitation-contraction coupling.
$\beta_{1b}$	Expressed in brain (cerebellum and cerebral cortex), nerve endings at the NMJ, and pancreas. Expression is detected at P0 in rat brains and increases from P7 to adulthood by ~3-fold.
$\beta_{1c}$	Expressed in brain and spleen, but not in kidney, liver, muscle, or stomach.
$\beta_{1d}$	Expressed in heart.
$\beta_2$	Expressed in brain (hippocampus—becoming the most abundant isoform there, cerebellum, pontine nucleus, substantia nigra, central grey, habenula, pineal gland, thalamic nuclei, cerebrum), heart, lung, nerve endings at the NMJ, T cells, and osteoblasts, but not in kidney, liver, pancreas, or spleen. Brain expression is constant during development, but see hippocampus data (391).
$\beta_{2a}$	Expressed in brain, heart, and aorta; its heart and brain levels seem lower than other $\beta$ subunits and isoforms.
$\beta_{2b}$	Expressed in brain, heart, and aorta. It is the most abundant $Ca_v\beta$ in human heart.
$\beta_{2c}$	Expressed in brain and heart, where it is the second most abundant $Ca_v\beta$ . Its expression declines in adults.
$\beta_{2de}$	Expressed in heart. $\beta_{2e}$ expression is robust only in young animals.
$\beta_3$	Expressed mostly in brain (cerebellum, cerebral cortex, habenula, hippocampus, olfactory bulb, and striatum), but also in heart, aorta, kidney, lung, skeletal muscle, smooth muscle, spleen, thalamus, T cells, and trachea, but not in liver, pancreas, or testis. Expression remains constant in the brain and heart during development. It is the most predominant partner of $Ca_v2.2$ (N-type) channels in the brain, and it pairs with ~40% of brain L-type channels.
$\beta_{3trunc}$	Expressed in brain, heart, and aorta.
$\beta_4$	Expressed in brain (cerebellum—the most abundant $Ca_v\beta$ there, brain stem, cerebral cortex, dentate gyrus, habenula, hippocampus, olfactory bulb, striatum, thalamus, and hypothalamus), kidney, nerve endings at the NMJ, ovary, skeletal muscle, spinal cord, T cells, and testis, but not detected in heart (except in young animals, Ref. 89), liver, lung, spleen, or thymus. The expression increases in rat brain by 10-fold from P0 to adult. It is the most prevalent partner of $Ca_v2.1$ (P/Q-type) channels in brain, and, like $\beta_3$ , it pairs with ~40% of brain L-type channels.
$\beta_{4a}$	Expressed in spinal cord and cerebellum.
$\beta_{4b}$	Expressed in spinal cord and forebrain.

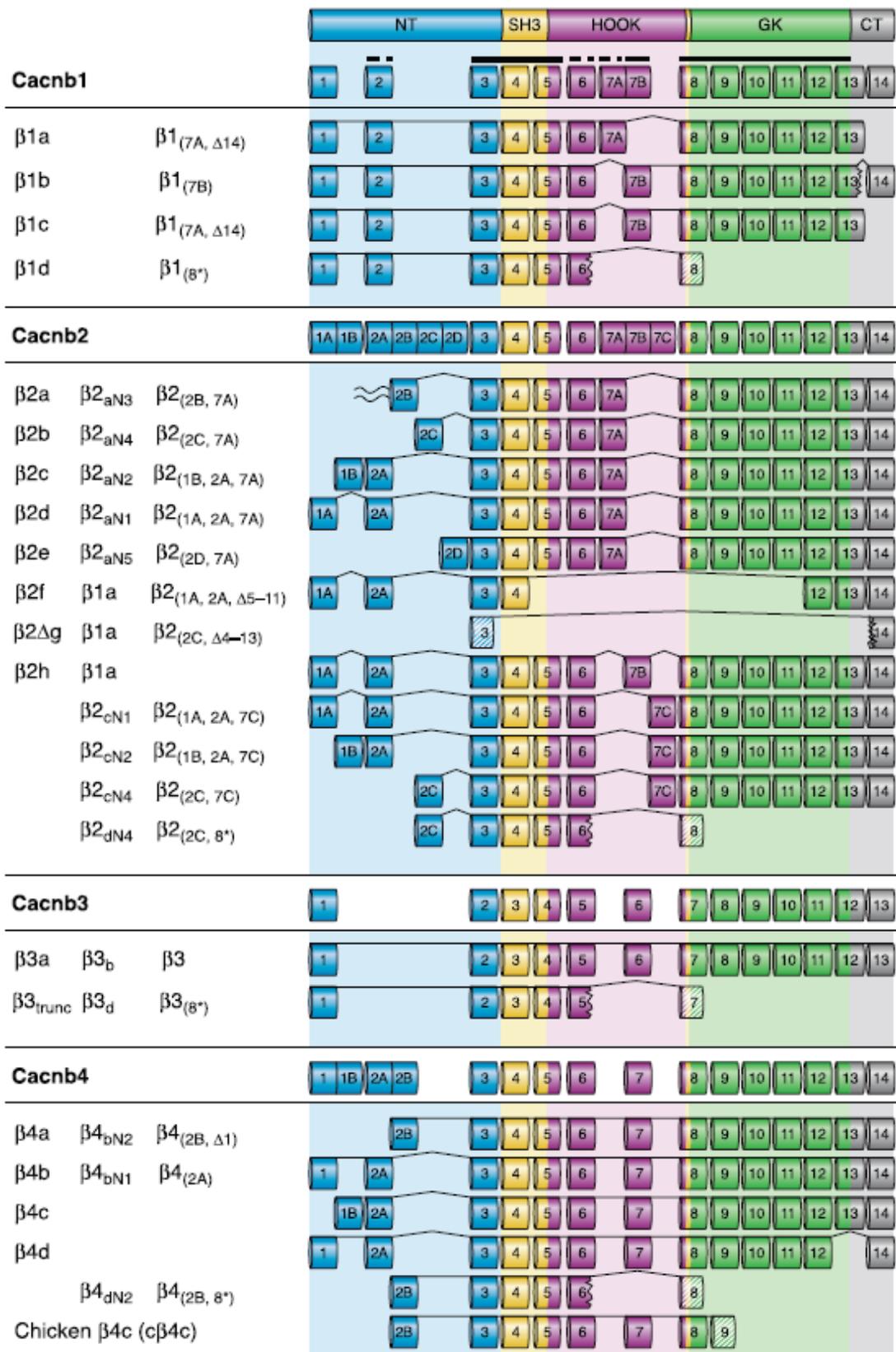
NMJ, neuromuscular junction.

### Table 3 : Répartition des différentes sous-unités $\beta$ et de leurs isoformes d'épissage dans l'organisme.

Buraei, Z. and J. Yang. 2010. The beta subunit of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels.

*Physiological reviews.*

Les sous-unités  $\beta$  sont des protéines cytosoliques structurellement très proches des protéines MAGUK (*membrane-associated guanylate kinases*) caractérisés par la présence de domaines SH3 (*Src homology 3*) et GK (*guanylate kinase*) reliés par un domaine HOOK (fig. 6). Le domaine guanylate kinase est inactif dans les sous-unités  $\beta$ . Ce domaine GK possède un motif hydrophobe dont le rôle est de permettre l'interaction des protéines  $\beta$  avec la sous-unité  $\alpha 1$  (Van Petegem et al., 2004).  $\beta$  est associée au niveau du motif AID ( *$\alpha$ -interacting domain*) de  $\alpha 1$ , situé sur la boucle I-II (la boucle entre les domaines I et II) (Pragnell et al., 1994).



**Figure 6 : Domaines protéiques et épissages alternatifs des différentes sous-unités β.**

Les cubes de couleur représentent les exons et les lignes les introns.

Buraei, Z. and J. Yang. 2010. The beta subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels.

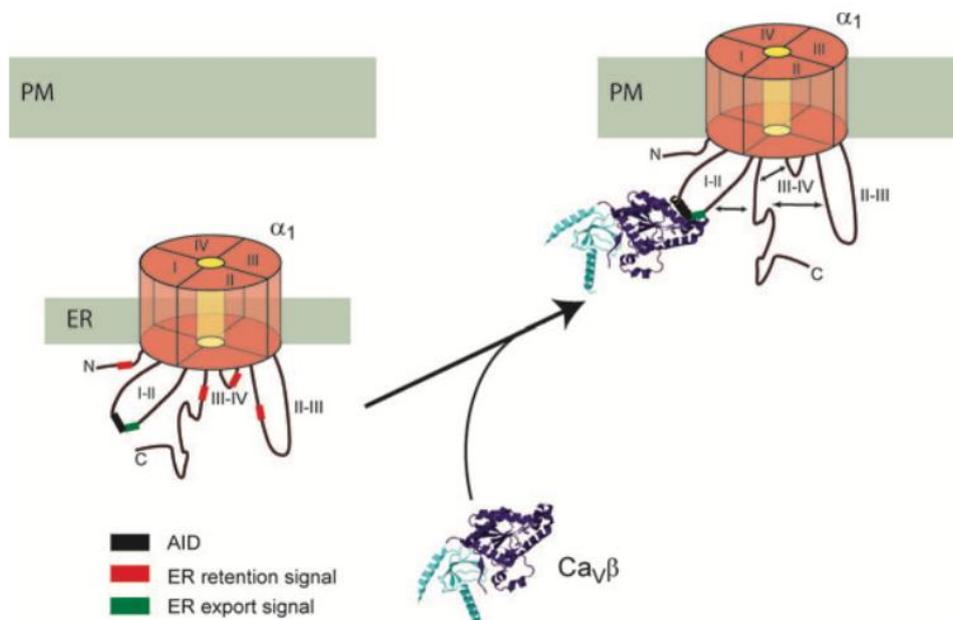
*Physiological reviews.*

Les sous-unités  $\beta$  partagent de très nombreux rôles afin d'assurer la fonction des canaux calciques voltage-dépendants.

D'une part, la sous-unité  $\beta$  assure l'adressage du canal à la membrane plasmique. Il a en effet été découvert très tôt que la surexpression de la sous-unité  $\alpha 1$  dans des cellules n'exprimant pas de  $\beta$  endogène permettait de générer un courant de faible intensité (Tareilus et al., 1997), indiquant que seule une faible proportion de canaux est capable de se localiser à la membrane en absence de  $\beta$  (Altier et al., 2011). Dès lors, la surexpression de  $\alpha 1$  est à présent systématiquement accompagnée de la surexpression de  $\beta$ . Il a été mis en évidence par l'équipe de De Waard que les domaines intracellulaires des canaux  $Ca_v$  possèdent des sites de rétentions au RE (dans les extrémités N- et C-terminales et dans la boucle I-II) (Bichet et al., 2000) (Cornet et al., 2002). L'équipe de Colecraft a par la suite identifié d'autres sites de rétentions au RE (dans les boucles intracellulaires II-II et III-IV) et surtout un site d'export du RE dans la boucle I-II (fig. 7). La liaison de  $\beta$  entrainerait un changement de conformation des parties intracellulaires du canal et permettrait de dévoiler ce site d'export, rendant les sites de rétentions inefficaces (Fang and Colecraft, 2011). De plus, Altier et ses collaborateurs ont récemment montré que la liaison de  $\beta$  prévient la prise en charge de  $\alpha 1$  par le système de dégradation du réticulum endoplasmique ERAD (*endoplasmic reticulum-associated protein degradation*) et évite sa dégradation (Altier et al., 2011). D'autre part, l'équipe de Condorelli a localisé deux séquences PEST dans les boucles I-II et II-III de  $\alpha 1$ . Ces séquences sont des signaux de dégradation rapides par des protéases, ce qui entraîne une réduction du nombre de canaux exprimés. La phosphorylation de  $\beta$  par la protéine kinase Akt inhibe cette dégradation et restaure l'expression des canaux (Catalucci et al., 2009a). Les auteurs suggèrent qu'une modification conformationnelle de la sous-unité  $\beta$  induite par la phosphorylation permettrait de masquer les séquences PEST. Une fois, les sous-unités  $\beta$  et  $\alpha 1$  associées, celles-ci vont trafiquer à travers le système endomembranaire (RE, Golgi, vésicules) jusqu'à la membrane plasmique (Dolphin, 2012). L'interaction de  $\beta$  avec l'actine (via le domaine SH3 de  $\beta$ ) semble indiquer un trafic des canaux à travers le cytosquelette et le réseau de filaments d'actine jusqu'à la membrane plasmique (Stolting et al., 2015).

D'autre part, les sous-unités  $\beta$  sont essentielles pour réguler les fonctions électrophysiologiques du canal. Plus précisément, elles multiplient de deux à quatre fois la vitesse d'activation du canal et diminuent le seuil d'activation de 5 à 25 mV. De plus, elles multiplient de deux à quatre fois la vitesse d'inactivation du canal et diminuent le seuil d'inactivation dépendante du voltage de 5 à 30 mV. Le degré de régulation de ces paramètres d'activation et d'inactivation est propre à chaque sous-unité  $\beta$  et aux isoformes de celles-ci (Buraei and Yang, 2010).

Enfin outre l'adressage et la stabilité, de plus en plus de travaux mettent en évidence le rôle de la sous-unité  $\beta$  dans le recyclage des canaux  $\text{Ca}_v$ . Plusieurs protéines ont été impliquées dans ce phénomène, la protéine d'assemblage des microtubules CRMP-2 (*collapsin response mediator protein 2*), le suppresseur de tumeur eIF3e (*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E*), l'ubiquitine-ligase Nedd4-1 (*neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1*), mais leur rôle dans ce mécanisme est inconnu (Simms and Zamponi, 2012). Le recyclage des canaux  $\text{Ca}_v$  est encore un phénomène mal compris mais la sous-unité  $\beta$  tient un rôle prépondérant.  $\beta$  interagit avec la dynamine, une GTPase impliquée dans la formation des vésicules d'endocytose, et favorise l'internalisation des canaux  $\text{Ca}_v1$  et  $\text{Ca}_v2$  (Gonzalez-Gutierrez et al., 2007). Il a été montré que cette fonction de  $\beta$  est distincte de son association à  $\alpha1$ . Lors de l'internalisation, les sous-unités  $\beta$  se détachent des canaux et forment des dimères associés entre eux par leur domaine SH3. Ces dimères s'associent alors à la dynamine par ce même domaine SH3, ce qui déclenche le phénomène d'endocytose (Miranda-Laferte et al., 2011).



**Figure 7 : Modèle proposé par K. Fang et H.M. Colecraft pour expliquer le rôle de la sous-unité  $\beta$  dans l'adressage de la sous-unité  $\alpha1$  à la membrane plasmique.** ER : membrane du réticulum endoplasmique, PM : membrane plasmique, AID :  $\alpha$ -interacting domain

Fang, K. and H.M. Colecraft. 2011. Mechanism of auxiliary beta-subunit-mediated membrane targeting of L-type ( $\text{Ca(V)1.2}$ ) channels. *The Journal of physiology*

Les sous-unités  $\beta$  servent également de plateforme de signalisation et interagissent avec de nombreuses protéines afin de réguler l'activité des canaux  $\text{Ca}_v$  et plus généralement les équilibres ioniques. Contrairement aux deux fonctions principales citées précédemment, les

mécanismes qui suivent ont été mis en évidence dans des tissus spécifiques et ne concernent que des sous-unités  $\beta$  particulières.

Dans le muscle strié squelettique, il a été montré que la sous-unité  $\beta 1a$  est essentielle au couplage des canaux  $Ca_v$  au réticulum sarcoplasmique (Buraei and Yang, 2010). D'autre part, les sous-unités  $\beta$  agissent aussi conjointement avec plusieurs canaux ioniques.  $\beta 1$  ralentit la cinétique d'activation et de dé-inactivation des canaux potassiques activés par le calcium  $BK_{Ca}$  (Zou et al., 2008).  $\beta 4$  s'associe au canal chlorure bestrophine (Yu et al., 2008) et  $\beta 2$  au transporteur de zinc ZnT-1 (Levy et al., 2009) pour limiter l'activité des canaux calciques HVA. De plus, les sous-unités  $\beta$  peuvent d'une certaine façon réguler le trafic vésiculaire. Une isoforme particulière de  $\beta 4$  peut interagir avec la synaptotagmine de façon calcium dépendante mais le rôle physiologique de cette interaction n'est pas connu (Vendel et al., 2006).  $\beta 2$  et  $\beta 4$  s'associent aussi avec RIM1, une protéine de la famille de la synaptotagmine, afin de réguler positivement l'activité des canaux  $Ca_v$  et l'exocytose (Kiyonaka et al., 2007).

Enfin, une spécificité très intéressante des sous-unités  $\beta$  réside dans son nombre très varié de fonctions indépendantes des canaux calciques voltage-dépendants. Dans les cellules  $\beta$  du pancréas,  $\beta 3$  a un effet négatif et limite l'aspect oscillatoire de la libération de calcium du RE dépendante de l' $IP_3$ . Ces oscillations sont nécessaires à la sécrétion d'insuline (Berggren et al., 2004). De plus en plus de travaux mettent en évidence la translocation des sous-unités  $\beta$  dans le noyau des cellules et leur implication dans des mécanismes de régulation de la transcription. Une isoforme tronquée de  $\beta 4$  a été mise en évidence pour être capable d'interagir avec la protéine de remodelage de la chromatine CHCB2/HP1 $\gamma$  (*chromo shadow domain of chromobox protein 2/heterochromatin protein 1 $\gamma$* ) (Hibino et al., 2003).  $\beta 3$ , de son côté, se fixe au facteur de transcription Pax6(S) (Zhang et al., 2010). Dans ces deux études, des expériences de *reporter assay* ont montré très clairement que la liaison de  $\beta 4$  et  $\beta 3$  réduit la liaison de CHCB2/HP1 $\gamma$  et Pax6(S) à l'ADN et diminue ainsi l'activité transcriptionnelle. Plus récemment, une étude de transcriptomique très poussée a permis de localiser  $\beta 1$  au niveau des sites (NC) E-box des promoteurs de très nombreux gènes. Parmi eux, les auteurs ont identifié que le gène de la myogenine (un facteur de transcription important pour la différenciation du muscle squelettique) et ont mis en évidence le rôle critique de  $\beta 1$  dans la myogenèse (Taylor et al., 2014).

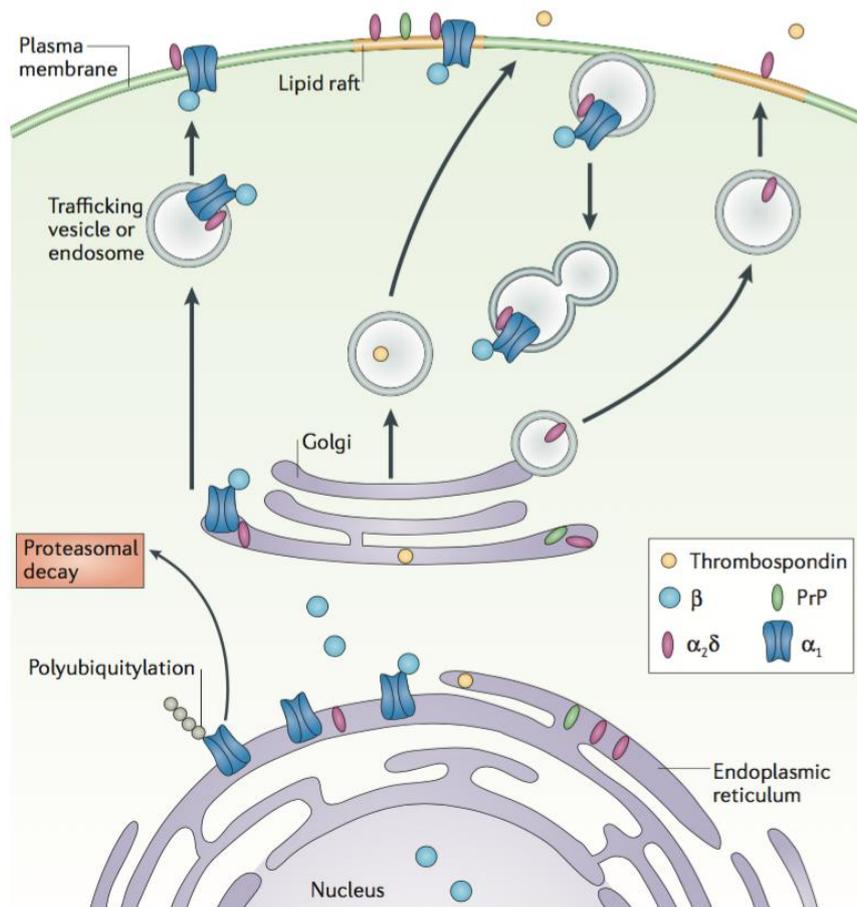
Enfin, il est connu que les sous-unités  $\beta$  possèdent de nombreux sites de phosphorylation pour plusieurs types de protéines kinases (PKC, PKA, PI3K, CaMKII). Les effets de ces différentes phosphorylations n'ont pas tous été étudiés dans le détail mais elles sont généralement associées à une amélioration de l'activité ou de l'expression des canaux  $Ca_v$  (Dolphin, 2012).

### I.3.1.3) Les sous-unités auxiliaires $\alpha 2\delta$ et $\gamma$

Les sous-unités  $\alpha 2\delta$  comprennent quatre protéines différentes, de  $\alpha 2\delta 1$  à  $\alpha 2\delta 4$ , codées par quatre gènes, de *CACNA2D1* à *CACNA2D4* (Hofmann et al., 2014). La sous-unité  $\alpha 2\delta$  était à l'origine considérée comme deux sous-unités indépendantes,  $\alpha 2$  et  $\delta$ . Ces deux éléments sont en fait issus du clivage post-traductionnel d'une seule protéine,  $\alpha 2\delta$ , et restent liés entre eux par des ponts dissulfures (Dolphin, 2012). Le fragment  $\delta$  a longtemps été considéré comme une protéine transmembranaire en hélice avec sa partie C-terminale cytosolique. On sait à présent que  $\alpha 2\delta$  est entièrement extracellulaire et fixée dans la membrane plasmique grâce à une ancre GPI (glycosyl-phosphatidylinositol) située à l'extrémité C-terminale de  $\delta$  (fig. 5). La position extracellulaire de  $\alpha 2\delta$  et son fort taux de glycosylation en fait une protéine très adaptée à l'interaction avec la matrice extracellulaire (Campiglio and Flucher, 2015). On retrouve d'ailleurs au niveau de  $\alpha 2$  un domaine VWA (von Willebrand factor A) que l'on retrouve habituellement dans les interactions protéine/protéine avec la matrice extracellulaire (Dolphin, 2012). De fait, la sous-unité  $\alpha 2\delta$  est capable d'interagir avec la thrombospondine, une protéine de la matrice extracellulaire et participe ainsi à la formation des synapses (Eroglu et al., 2009). Récemment, l'observation de la structure cristallographique du canal  $Ca_v1.1$  en haute résolution obtenue par cryo-microscopie électronique a permis de mieux comprendre l'architecture du canal et de ses sous-unités. Cette étude a montré que le domaine VWA et un domaine Cache de  $\alpha 2$  interagissent avec les boucles extracellulaires des domaines I, II et III de  $\alpha 1$  (Wu et al., 2015). Enfin, parmi les autres domaines notables de  $\alpha 2$ , on peut citer un motif RRR qui permet la liaison aux gabapentinoïdes, notamment la gabapentine qui est utilisée dans le cadre du traitement des douleurs neuropathiques et de l'épilepsie (Dolphin, 2012).

Les sous-unités  $\alpha 2\delta$  régulent les propriétés électrophysiologies du canal en diminuant son seuil d'activation. De façon similaire à la sous-unité  $\beta$ , le rôle prépondérant de  $\alpha 2\delta$  consiste à assurer l'adressage du canal à la membrane (fig. 8). Il est depuis longtemps admis que la sous-unité  $\alpha 1$  doit être associée aux sous-unités  $\beta$  et  $\alpha 2\delta$  dans des systèmes de surexpression pour être correctement exprimée à la membrane.  $\alpha 2\delta$  peut trafiquer à travers le système endomembranaire seule et se localiser à la membrane plasmique en absence de canal  $Ca_v$ . De ce fait, on pense que  $\alpha 2\delta$  peut s'associer à  $\alpha 1$  aussi bien dans le RE (en même temps que  $\beta$ ), que dans les autres compartiments, notamment l'appareil de Golgi. Le rôle exact de la sous-unité  $\alpha 2\delta$  dans l'adressage est moins clair que celui de  $\beta$  mais elle permettrait la localisation du canal à certains emplacements précis de la membrane comme les radeaux lipidiques (Dolphin, 2012). Enfin, si la sous-unité  $\beta$  a un rôle dans l'internalisation du canal,  $\alpha 2\delta$  agirait pour permettre le recyclage des vésicules d'endocytose, cela de façon

dépendante de la GTPase Rab11 (Tran-Van-Minh and Dolphin, 2010). Les canaux non recyclés sont eux dégradés par le lysosome (Tsuruta et al., 2009).



**Figure 8 : Rôle des sous-unités auxiliaires  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$  et dans la stabilité et l'adressage des canaux  $Ca_v$  à la membrane.** Les sous-unités  $\alpha_1$  exprimées dans le RE sont prises en charge par les sous-unités  $\beta$  afin d'éviter ubiquitination et dégradation par le protéasome. Elles migrent alors vers la membrane plasmique via le Golgi et des vésicules lipidiques. Les sous-unités  $\alpha_2\delta$  peuvent s'associer au canal aux différentes étapes de ce trafic ou migrer seules jusqu'à la membrane plasmique. La thrombospondine et les prions (PrP) sont deux exemples de protéines capables d'interagir avec  $\alpha_2\delta$ .

Dolphin, A.C. 2012. Calcium channel auxiliary  $\alpha_2\delta$  and  $\beta$  subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev NeuroScience*.

Les sous-unités  $\gamma$  comprennent huit protéines différentes, de  $\gamma_1$  à  $\gamma_8$ , codés par huit gènes, de *CACNG1* à *CACNG8* (Hofmann et al., 2014). La protéine  $\gamma$  est de très loin la sous-unité la plus méconnue, si tant est que l'on considère  $\gamma$  comme une véritable sous-unité auxiliaire des canaux calciques voltage-dépendants. Le premier canal  $Ca_v$  purifié dans les années 1980 a été  $Ca_v1.1$  qui a révélé posséder une sous-unité de 33 kDa, nommée  $\gamma_1$  (Takahashi et al., 1987). Il s'agit d'une protéine membranaire composée de quatre hélices transmembranaires (fig. 5) et capable d'interagir avec les hélices 5 et 6 du domaine IV de  $\alpha_1$

(Wu et al., 2015).  $\gamma 1$  est exprimée exclusivement dans le muscle squelettique où elle régule l'activité de  $Ca_v1.1$ , plus précisément l'intensité du courant calcique après activation et la libération des stocks calciques du RE en favorisant l'inactivation du canal (Campiglio and Flucher, 2015).

Par la suite, sept autres protéines structurellement très proches ont été mises à évidence, désignées  $\gamma 2$  à  $\gamma 8$ . Bien que dans des systèmes de surexpression elles soient toutes capables de s'associer à des canaux  $Ca_v$  (Yang et al., 2011), seule la protéine  $\gamma 1$  a jusqu'à présent été identifiée pour interagir avec  $Ca_v1.1$  de façon endogène. Les autres protéines  $\gamma$  sont exprimées uniquement dans le cerveau où elles sont connues comme les *transmembrane AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptor regulatory proteins*. Leur fonction est de permettre l'adressage des récepteurs ionotropiques AMPA à la membrane plasmique dans les neurones (Campiglio and Flucher, 2015).

### **I.3.2) Fonction et régulation des $Ca_v$ dans les cellules excitables**

#### **I.3.2.1) Mécanismes d'activation des canaux $Ca_v$**

La membrane plasmique possède une charge électrique négative mesurable par des techniques d'électrophysiologie, comme le patch-clamp, d'environ -70 à -60 mV selon le type cellulaire. La membrane des cellules excitables est sensible à des potentiels d'action induits par des canaux ioniques. Ils se déroulent en plusieurs étapes. Dans un premier temps, l'ouverture de canaux cationiques (calciques ou sodiques, de nature différente selon le type cellulaire) entraîne un influx de cations qui provoquent une dépolarisation de la membrane jusqu'à un pic de voltage supérieur à 0 mV. Cette dépolarisation est dans un second temps détectée par des canaux potassiques voltage-dépendants qui s'activent et provoquent un efflux de potassium. Cet efflux déclenche une repolarisation de la membrane pendant laquelle les canaux cationiques s'inactivent. Pour finir, l'efflux de potassium entraîne une hyperpolarisation de la membrane jusqu'à la fermeture des canaux potassiques et retour au repos (Barnett and Larkman, 2007). La nature de ces potentiels d'action peut être très différente selon le type cellulaire et à l'intérieur d'un même organe en raison des différences de type et de cinétique des canaux impliqués dans ce mécanisme (Schram et al., 2002). Dans le cerveau par exemple, la phase de dépolarisation est entièrement dépendante de canaux sodiques et atteint un pic de +40 mV (Barnett and Larkman, 2007). Les canaux calciques voltage-dépendants des neurones sont essentiellement exprimés au niveau présynaptique et associés à la libération de neuromédiateurs (Dolphin, 2012). Dans le cœur, le potentiel d'action est très dépendant de sa localisation. Dans le nœud sinusal par exemple, la phase de dépolarisation repose exclusivement sur des canaux  $Ca_v$  (des  $Ca_v3$  à

l'origine du courant pacemaker puis des  $Ca_v1$ ) Cette dépolarisation est assez brève car les canaux  $Ca_v1$  sont inactivés et les canaux potassiques activés lorsque le pic à 0 mV est atteint. Dans les ventricules, la dépolarisation est composée d'un influx sodique rapide suivi d'un plateau à +30 mV correspondant à une entrée de calcium par des canaux  $Ca_v1$  qui compense l'activation des canaux potassiques (Schram et al., 2002).

Les canaux  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$  appartiennent au groupe des canaux HVA (high-voltage activated) et sont donc activés par de hauts voltages. Plus précisément, cela signifie qu'ils sont activés par des dépolarisations membranaires supérieures à -30 mV environ. Les canaux  $Ca_v3$  sont aussi connus comme les canaux LVA (low-voltage activated). Ils sont de leur côté activés par de très faibles dépolarisations voire même au potentiel de repos, -70 à -60 mV (Berridge, 2014). Dans des conditions expérimentales, le pic d'intensité maximale de courant des canaux HVA est atteint pour une dépolarisation d'environ 0 à 20 mV et celui des LVA pour -20 à -30 mV (Nilius et al., 2006). Cependant, chacun des dix canaux  $Ca_v$  possède des propriétés qui lui sont propres et il n'est pas rare que la distinction entre HVA et LVA soit parfois plus complexe. Les canaux  $Ca_v1.3$  (Koschak et al., 2001) et  $Ca_v1.4$  (McRory et al., 2004) ont été décrits pour être activables pour de faibles dépolarisations. Les canaux  $Ca_v2.3$  sont également particuliers car ils possèdent des caractéristiques propres aux HVA et aux LVA : une activation pour de hauts voltages et une inactivation rapide (Budde et al., 2002).

Le modèle de fonctionnement classique des canaux  $Ca_v$ , et des canaux ioniques en général, se divise en trois états : fermé, ouvert et inactivé. Les canaux calciques HVA sont activés pendant la dépolarisation, s'inactivent pendant la repolarisation et repassent en état fermé pendant l'hyperpolarisation. Les canaux LVA sont plus particuliers. Leur potentiel de membrane au repos et leur potentiel d'ouverture sont très proches, de même que leur potentiel d'activation et d'inactivation. Ils ont ainsi la capacité d'être activés lors de la phase d'hyperpolarisation du potentiel d'action. Cette caractéristique donne aux canaux  $Ca_v3$  la possibilité d'induire une dépolarisation suite à une hyperpolarisation, et donc de provoquer une répétition des potentiels d'action. Cela explique leur rôle dans la mise en place de courants rythmiques, comme le courant pacemaker cardiaque (Perez-Reyes, 2003).

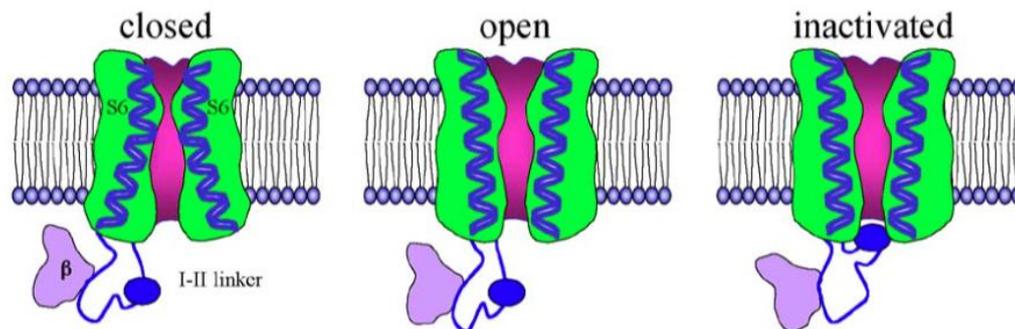
### **I.3.2.2) Régulation des canaux $Ca_v$**

L'activation des canaux calciques voltage-dépendants entraîne la libération de calcium dans la cellule qui est à l'origine de nombreuses réponses fonctionnelles. Dès lors, une régulation de l'activité de ces canaux est nécessaire.

## Inactivation et facilitation

Les canaux HVA et LVA se distinguent fortement par leur cinétique d'inactivation. Cette inactivation peut durer jusqu'à 2000 ms pour les HVA et est de l'ordre de 20 ms pour les LVA, ce qui explique leur désignation de transitoire (Nilius et al., 2006). Il existe plusieurs mécanismes d'inactivation très différents, dont le lien entre eux n'est pas toujours compris, qui sont classés en deux catégories : l'inactivation dépendante du voltage (VDI) et l'inactivation dépendante du calcium (CDI). La VDI concerne tous les types de canaux calciques, et en général la majorité des canaux ioniques. Au contraire, la CDI n'est connue que pour les canaux de type L ( $Ca_v1$ ), P/Q ( $Ca_v2.1$ ) et N ( $Ca_v2.2$ ) (Budde et al., 2002).

L'inactivation dépendante du voltage est encore assez mal comprise aujourd'hui. Des mutations dirigées contre des résidus dans des domaines particuliers ont permis de mettre en évidence des motifs particulièrement impliqués dans cette inactivation. Cela comprend notamment la boucle I-II et les segments transmembranaires S6 de la sous-unité  $\alpha_1$ . De plus, les sous-unités auxiliaires  $\alpha_2\delta$  et surtout  $\beta$  semble renforcer très fortement cette inactivation. De façon à rassembler ces éléments, Zamponi a proposé un modèle dans lequel les segments S6 changent de conformation suite à une dépolarisation membranaire et entraînent une modification de la configuration de la boucle I-II et un blocage du pore par cette boucle (fig. 9). Ce changement de conformation serait régulé par la sous-unité  $\beta$  qui est associée au canal au niveau de cette même boucle I-II (An and Zamponi, 2005).

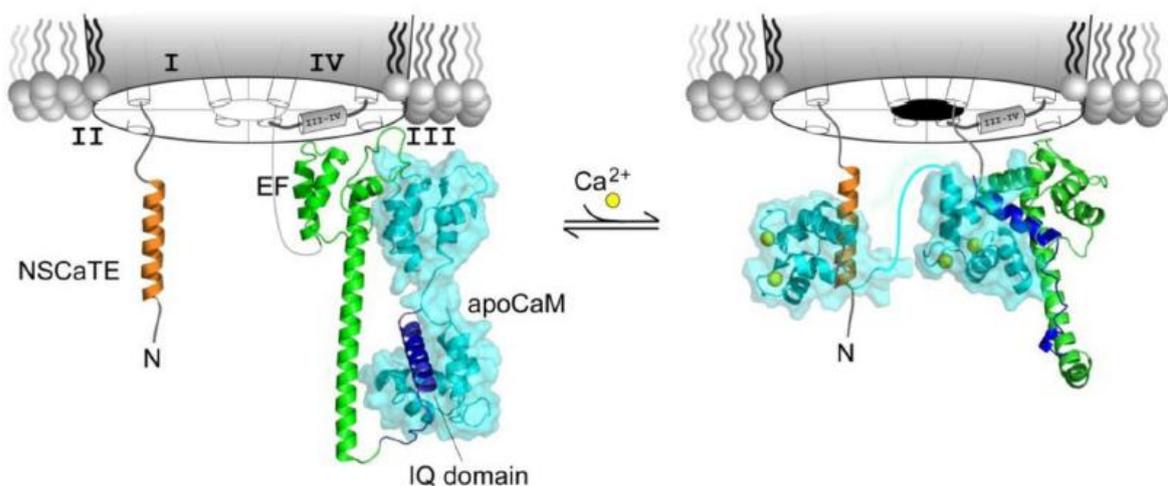


**Figure 9 : Modèle d'inactivation dépendante du voltage proposé par M.T. An et G.W. Zamponi.** Ce modèle réconcilie l'implication de la boucle I-II et des segments S6 de la sous-unité  $\alpha_1$  et de la sous-unité  $\beta$ .

An, M.T. and G.W. Zamponi. 2005. Voltage-Dependent Inactivation of Voltage Gated Calcium Channels. *Voltage-Gated Calcium Channels*.

L'inactivation dépendante du calcium a été mise en évidence dans des expériences d'électrophysiologie dans lesquelles cette inactivation disparaît lorsque d'autres cations sont utilisés pour générer des courants à la place du calcium. Elle comprend un ensemble de phénomènes variés entraînant un blocage physique du pore du canal ou une modification de sa conformation (Budde et al., 2002). Tous ces phénomènes reposent sur l'action de la

calmoduline au niveau de différents sites des extrémités N- et C-terminales de  $\alpha 1$ . La partie C-terminale possède un domaine *EF-hand* distal et un domaine IQ (isoleucine-glutamine) proximal, typique d'un site de liaison à la calmoduline. La présence du domaine *EF-hand* a laissé imaginer une possible régulation directe du canal par le calcium mais on sait aujourd'hui que ce domaine n'est pas capable de lier le calcium et est en fait impliqué dans l'interaction avec la calmoduline. Les données les plus récentes de mutagenèse dirigée et de cristallographie suggèrent le modèle suivant (fig. 10). Au repos, la molécule de calmoduline serait fixée par son lobe C au domaine IQ et par son lobe N au domaine *EF-hand*. En présence de calcium, la CaM change de conformation. Son lobe N se fixerait à un domaine NSCaTE (*N-terminal Spatial Ca<sup>2+</sup> Transforming Element*) sur l'extrémité N-terminale de  $\alpha 1$  alors que le lobe C s'associerait à la fois avec le domaine IQ et le domaine *EF-hand* (Ben-Johny et al., 2015). De plus, outre cette modification structurale qui pourrait d'une certaine façon bloquer le pore du canal, la calmoduline permet également d'activer la calcineurine. Cette phosphatase participe également à la CDI des canaux  $Ca_v1$  par la déphosphorylation de la serine 1928 sur la queue C-terminale de  $\alpha 1$  (Budde et al., 2002).



**Figure 10 : Implication de la calmoduline dans l'inactivation dépendante du calcium.** Au repos (à gauche), la calmoduline (en bleu clair) est fixée par son lobe C au domaine IQ (bleu foncé) et par son lobe N au domaine *EF-hand* (EF). En présence de calcium (à droite), le lobe N se fixe au domaine NSCaTE sur l'extrémité N-terminale de  $\alpha 1$  alors que le lobe C s'associe à la fois avec le domaine IQ et le domaine *EF-hand*. NSCaTE : *N-terminal Spatial Ca<sup>2+</sup> Transforming Element*

Ben-Johny, M. et al. 2015. Towards a Unified Theory of Calmodulin Regulation (Calmodulation) of Voltage-Gated Calcium and Sodium Channels. *Curr Mol Pharmacol*.

La facilitation dépendante du calcium (CDF) est le pendant inverse de l'inactivation dépendante du calcium. Elle repose également sur la calmoduline si bien que CDI et CDF sont souvent désigné par le terme de calmodulation. D'un point de vue cinétique, la facilitation dépendante du calcium se met en place très rapidement alors que l'inactivation

intervient plus tard (Ben-Johny et al., 2015). Le complexe calcium/calmoduline lié au canal est capable d'activer la CaMKII (Catterall, 2000). Les sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta$  possèdent des sites de phosphorylation pour cette kinase. L'action de la CaMKII entraîne un accroissement de l'activité des canaux calciques voltage-dépendants (Hofmann et al., 2014). L'observation en western-blot du poids moléculaire de la CaMKII co-précipitée avec  $Ca_v1.2$  tend à indiquer que c'est l'isoforme  $\delta$ -CaMKII qui est impliquée dans ce phénomène (Hudmon et al., 2005). Il est intéressant de noter que dans une étude récente, l'activation de la CaMKII par le calcium libéré par les canaux calciques HVA a été localisée dans un microdomaine au voisinage direct des canaux. Il a également été montré que la CaMKII peut phosphoryler et activer à proximité des canaux le facteur de transcription CREB, montrant ainsi le rôle prépondérant des canaux calciques voltage-dépendants dans le couplage excitation-transcription (Wheeler et al., 2012).

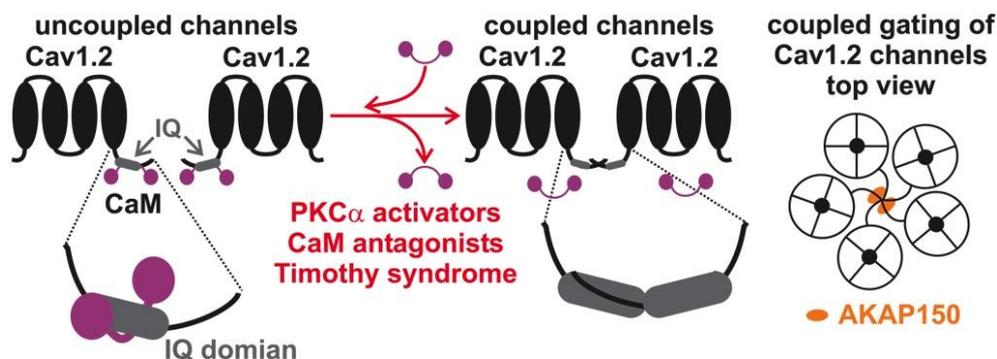
Les mécanismes d'inactivation et de facilitations cités précédemment représentent un premier aspect de la régulation des canaux  $Ca_v$ . Ce sont des phénomènes communs à la plupart des canaux ioniques et intrinsèques à ces canaux dans le sens où ils sont directement déclenchés par l'activité de ces canaux. Mais des éléments "extérieurs" jouent un grand rôle dans la modulation des canaux calciques voltage-dépendants. Ces phénomènes diffèrent sensiblement selon le type de canal considéré ou le tissu dans lequel ce canal est exprimé. Certains sont assez classiques et reposent sur des changements de conformation dus à des phosphorylations, d'autres passent par l'intermédiaire de la sous-unité  $\beta$ , et d'autres encore impliquent de véritables modifications structurales du canal (fig. 12).

### **La protéine kinase C**

La protéine kinase C est également impliquée dans la régulation de certains canaux calciques voltage-dépendants. C'est le cas de la forme cardiaque de  $Ca_v1.2$  ( $Ca_v1.2a$ ) qui est inhibée par une phosphorylation de deux résidus au niveau de l'extrémité N-terminale (McHugh et al., 2000). Au contraire, la forme neuronale de  $Ca_v1.2$  ( $Ca_v1.2b$ ) échappe à cette modification du fait d'un épissage alternatif différent.  $Ca_v1.2a$ ,  $Ca_v1.2b$ , et  $Ca_v1.2c$  désignent les trois variants de canaux  $Ca_v1.2$  initialement décrits dans la littérature et se distinguent par un épissage alternatif différent du premier exon. On sait à présent que plusieurs autres exons de ce gène sont soumis à épissage et les trois dénominations citées précédemment regroupent désormais plus d'une dizaine de protéines différentes (Hofmann et al., 2014). La PKC phosphoryle aussi la boucle I-II des canaux  $Ca_v2$  et prévient l'inhibition des canaux par les protéines  $G\beta\gamma$  (fig. 12) (Catterall, 2000). De façon générale, on peut donc considérer que la PKC favorise les courants calciques dans le cerveau. La sous-unité  $\beta$  quant à elle

possède également des sites de phosphorylation pour la PKC mais leur rôle demeure encore inconnu (Buraei and Yang, 2010).

La protéine kinase C a fait l'objet de travaux de la part de l'équipe de Santana. Celle-ci cherchait à expliquer l'activation indépendante du voltage des canaux  $Ca_v1.2$  dans le muscle lisse des vaisseaux sanguins. Ces auteurs ont montré que la PKC $\alpha$  est impliquée dans l'association de canaux  $Ca_v$  en amas associés entre eux par la liaison de leur extrémité C-terminale à un complexe de protéines échafaudages AKAP (*A kinase anchoring protein*), AKAP150 (fig. 11). Ce regroupement des canaux en amas permettrait d'augmenter singulièrement leur probabilité d'ouverture à des voltages proches du potentiel de repos. Le rôle de la PKC $\alpha$  dans ce phénomène n'est pas bien compris mais il est a été montré que les protéines AKAP79/150 permettent de localiser la PKC $\alpha$  près du canal. L'activité de la PKC $\alpha$  favorise le couplage des canaux mais on ignore si la PKC $\alpha$  phosphoryle directement le canal. Ce couplage entraîne aussi un repositionnement de la calmoduline, également liée à l'extrémité C-terminale du canal (Navedo et al., 2010). Le mouvement de la calmoduline pourrait permettre le détachement de la PKC $\alpha$  de AKAP79/150 une fois la PKC $\alpha$  adressée au canal (Faux and Scott, 1997).



**Figure 11 : Modèle proposé par M.F. Navedo et L.F. Santana pour expliquer l'association des canaux  $Ca_v1.2$  en amas.** En absence de calmoduline ou lors de l'activation de la PKC $\alpha$ , plusieurs canaux peuvent s'associer au niveau de l'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\alpha_1$  via des protéines AKAP150. CaM : camoduline, PKC $\alpha$  : protéine kinase C $\alpha$ , AKAP150 : A kinase anchoring protein 150.

Navedo, M.F. et al. 2010. Increased coupled gating of L-type  $Ca^{2+}$  channels during hypertension and Timothy syndrome. *Circ Res*.

Par ailleurs, il a été montré plus récemment que les canaux  $Ca_v1.2$  (Dixon et al., 2015) et  $Ca_v1.3$  (Moreno et al., 2016) peuvent aussi s'associer dans les cellules excitables. Le mécanisme est différent dans ces cellules et ne semble pas impliquer la PKC. Les extrémités C-terminale des canaux se lient entre elles au niveau d'un complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline formé après un influx calcique. Ces travaux tendent à généraliser le phénomène d'association des

canaux, aussi bien dans des types cellulaires dont la membrane plasmique ne se dépolarise pas ou peu après activation que dans des cellules facilement excitables.

### **La protéine kinase A**

Les canaux  $Ca_v1$  sont particulièrement sensibles à la régulation par la protéine kinase A (PKA). Ce mécanisme a surtout été mis en évidence dans les muscles striés cardiaques ( $Ca_v1.2$ ) et squelettiques ( $Ca_v1.1$ ). Dans ces tissus, les canaux  $Ca_v1$  subissent naturellement un clivage protéolytique au niveau de l'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\alpha1$  (fig. 12). Ce fragment C-terminal reste le plus souvent lié de façon non covalente à la nouvelle extrémité C-terminale (Hulme et al., 2005) et place le canal dans un état d'auto-inhibition (Hulme et al., 2006). La stimulation de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques induit la synthèse d'AMP cyclique et l'activation de la PKA. La PKA agit par l'intermédiaire des protéines échafaudages AKAP15 et AKAP18, qui se fixent à cette queue C-terminale à proximité du site de liaison du canal et du fragment C-terminal clivé. Le complexe AKAP permet de localiser la protéine kinase A afin qu'elle phosphoryle un résidu au voisinage du site de liaison du fragment C-terminal (Hulme et al., 2003). Cette PKA lève l'état d'inhibition des canaux  $Ca_v1$ , ce qui se traduit par une augmentation du rythme cardiaque et de la force de contraction du muscle squelettique (Catterall, 2011). Bien que décrites à l'origine pour leur implication dans l'action de la PKA, on sait aujourd'hui que les protéines AKAP interagissent avec de très nombreux partenaires et possèdent de nombreuses fonctions complètement indépendantes de la PKA. AKAP79/150 par exemple permet par une interaction avec la boucle cytosolique II-III l'assemblage correct du canal à la membrane plasmique (Altier et al., 2002).

### **Les protéines G**

Les canaux  $Ca_v2$  constituent la principale source de calcium à l'origine de la libération de neuromédiateurs dans les neurones. Dès lors, plusieurs éléments impliqués dans la communication neurale régulent les canaux  $Ca_v2$ . Les récepteurs couplés à des protéines G sont activés par différents ligands, dont de nombreux neuromédiateurs, et activent une protéine G hétérotrimérique intracellulaire. Celle-ci se divise en deux sous-unités :  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ . Les protéines  $G\alpha$  activent des voies de signalisation très spécifiques aux ligands des récepteurs alors que les protéines  $G\beta\gamma$  ont des fonctions régulatrices plus globales (Catterall, 2011). L'inhibition des canaux  $Ca_v$  par les protéines G a été mise en évidence dans les années 1980 (Holz et al., 1986). Cette inhibition se caractérise par une diminution de l'amplitude du courant, un déplacement du seuil d'activation pour de plus hauts voltages et un ralentissement des cinétiques d'activation et d'inactivations. On ignore la manière exacte dont les protéines  $G\beta\gamma$  régulent les canaux calciques. Il a cependant été très clairement montré que l'effet inhibiteur de ces protéines est perdu lors d'une dépolarisation

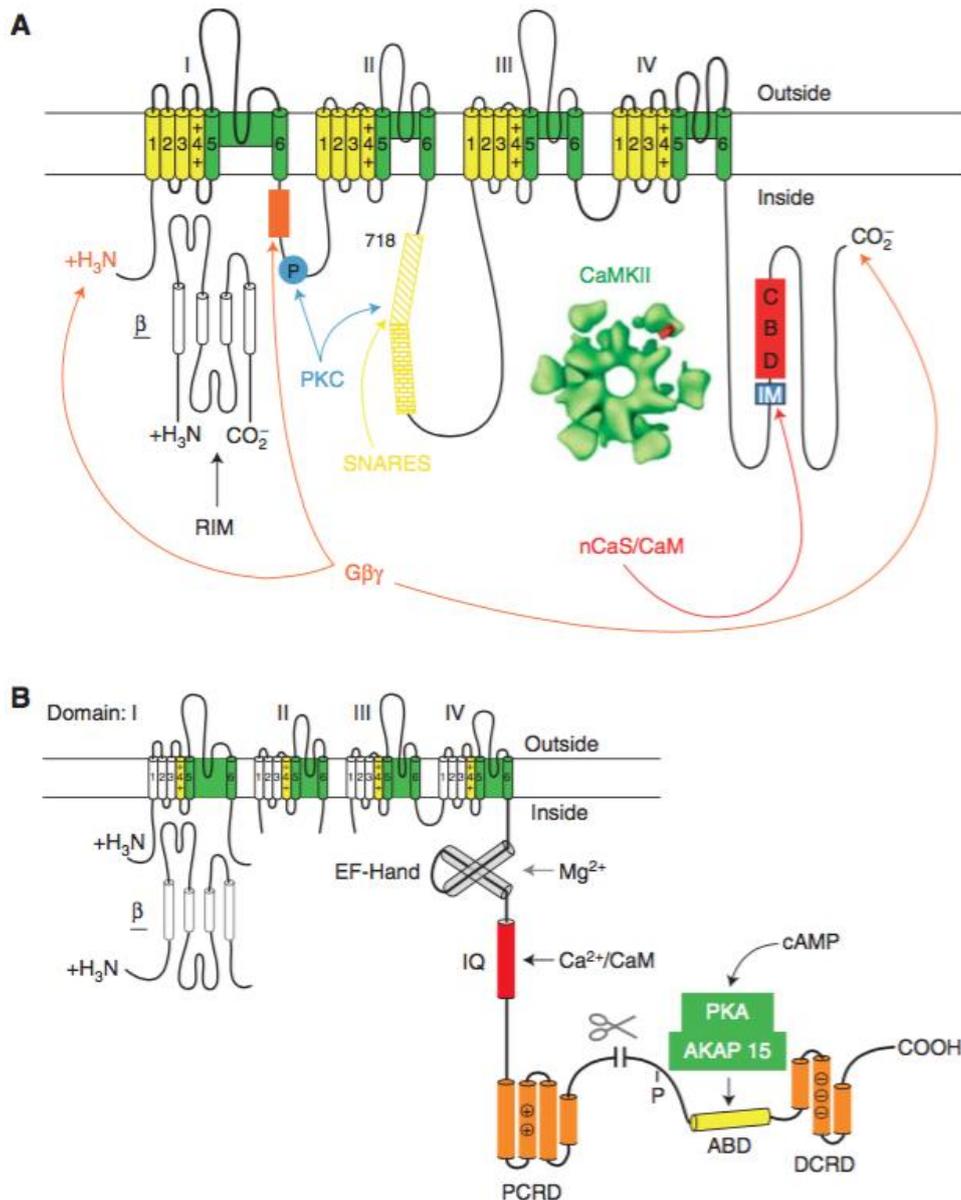
membranaire (Proft et al., 2015). De plus, cet effet est favorisé par l'absence de sous-unité  $\beta$  des canaux  $Ca_v$  (Campbell et al., 1995) (Bourinet et al., 1996), ce qui suggère une compétition entre  $Ca_v\beta$  et  $G\beta\gamma$ , d'autant plus que les protéines G se lient directement aux canaux au niveau de la boucle I-II (De Waard et al., 1997). Des expériences de mutagenèses dirigées ont montré également une certaine interaction avec les extrémités N- et C-terminale (Proft et al., 2015). Au vu des derniers travaux publiés, les modèles récents suggèrent que, au repos, la liaison de la sous-unité  $\beta$  au canal positionne la boucle I-II et le segment transmembranaire S6 dans une conformation favorisant la liaison de la protéine  $G\beta\gamma$ . La dépolarisation membranaire modifierait la configuration du segment S6 et de la boucle I-II, détachant ainsi la protéine G (Buraei and Yang, 2010). Enfin, la régulation des canaux  $Ca_v3$  par des protéines  $G\beta\gamma$  a plus récemment été mise en évidence. Dans ce cas, la protéine  $G\beta\gamma$  se lie à la sous-unité  $\alpha1$  au niveau de la boucle II-III (DePuy et al., 2006). Il n'est pas surprenant que le phénomène de régulation des  $Ca_v3$  soit différent de celui des canaux  $Ca_v2$  puisque les  $Ca_v3$  ne possèdent pas de sous-unité  $\beta$ .

### **Les protéines RGK**

La famille des protéines RGK constitue un groupe de quatre petites protéines G (Rad, Rem, Rem2, Gem/Kir) apparentées à la GTPase Ras. Les protéines RGK se distinguent par leur activité GTPase réduite voire perdue et par leur absence d'implication dans la signalisation cellulaire. Ces protéines ont deux rôles distincts : contrôler la dynamique du cytosquelette et réguler négativement les canaux calciques HVA. L'action des protéines RGK sur les canaux  $Ca_v$  passe par la liaison des RGK au niveau du domaine GK des sous-unités  $\beta$ . Les protéines RGK agissent en inhibant le courant calcique des canaux  $Ca_v$  présents à la membrane mais aussi en diminuant l'adressage de nouveaux canaux. La mécanistique d'action de ces protéines est mal comprise mais il a clairement été établi qu'elles ne perturbent pas la liaison de  $\beta$  à la sous-unité  $\alpha1$  (Buraei and Yang, 2010).

### **Les protéines BARP**

Les protéines BARP ( *$\beta$ -anchoring and -regulatory protein*) sont des protéines exprimées à la membrane plasmique des neurones et des cellules neuroendocrines. Ces protéines interagissent par des boucles intracellulaires avec les quatre sous-unités  $\beta$  au niveau du domaine de liaison à la sous-unité  $\alpha1$  des canaux  $Ca_v$ . Cette interaction prévient la liaison de  $\beta$  à  $\alpha1$  et inhibe la capacité de  $\beta$  à adresser le canal à la membrane plasmique (Beguin et al., 2014).



**Figure 12 : Régulation des canaux calciques voltage-dépendants.** La figure A présente les principales protéines de régulation des canaux Ca<sub>v</sub> et leur site d'interaction. La figure B représente la régulation des canaux Ca<sub>v1</sub> par le clivage du canal et la PKA. Le site de clivage est représenté par les ciseaux. Le fragment C-terminal reste lié au canal par une interaction de type *leucine zipper* entre les domaines DCRD et PCRD. PKC : protéine kinase C, CamKII : Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, P : sites de phosphorylation, nCaS : calcium sensing protein, CaM : calmoduline, CBD/IQ : domaines de liaison à la calmoduline, IM : IQ-like motif, AKAP : A-kinase anchor protein, ABD : AKAP15 binding domain, DCRD : distal carboxy-terminal regulatory domain, PCRD : proximal carboxy-terminal regulatory domain.

Catterall, W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.

### Le clivage du canal

Des travaux récents ont rajouté de la complexité dans les phénomènes de régulation des canaux Ca<sub>v</sub> en montrant que le clivage de l'extrémité C-terminale n'est pas la seule scission

du canal possible. En effet, le canal  $Ca_v1.2$  est clivé aussi au niveau de la boucle II-III. Cette protéolyse n'est pas un phénomène aléatoire car il est corrélé à l'activité du canal. L'inhibition du canal prévient le clivage et son activation ou les hautes concentrations de calcium intracellulaire le favorisent. Cette protéolyse apparaît donc comme un nouveau mode de régulation assez original de l'homéostasie calcique (Michailidis et al., 2014).

Le clivage de l'extrémité C-terminale a été particulièrement étudié par l'équipe de Dolmetsch qui a localisé un fragment du canal  $Ca_v1.2$  dans le noyau. Ce fragment, dénommé CCAT, a été identifié comme un facteur de transcription (Gomez-Ospina et al., 2006). Par la suite, il s'est avéré que le CCAT n'est pas un fragment issu du clivage post-traductionnel du canal mais une protéine à part entière, codée par un gène dont le promoteur est situé dans la partie codante du gène de  $Ca_v1.2$  (Gomez-Ospina et al., 2013). Un fragment C-terminal du canal  $Ca_v1.3$  avec un rôle de régulateur transcriptionnel a pareillement été localisé dans le noyau (Lu et al., 2015). On ignore encore si ce fragment est issu du clivage protéolytique du canal ou d'un promoteur cryptique mais sa découverte tend à généraliser le concept du fragment C-terminal comme modulateur de l'expression génique.

## **II) Sous-populations de lymphocytes T et signalisation calcique**

### **II.1) La biologie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Les lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup>, aussi appelés lymphocytes T auxiliaires (Th pour *T helper*), sont une population de lymphocytes T caractérisés par l'expression du marqueur membranaire CD4. Ces cellules sont au centre de toute la réponse immunitaire adaptative.

#### **II.1.1) Développement, activation et différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Les lymphocytes T se développent suite à la migration de progéniteurs lymphoïdes communs de la moelle osseuse vers le thymus où ils vont se différencier en thymocytes. Les thymocytes sont les précurseurs des lymphocytes T. Dans le thymus, ils subissent plusieurs étapes de sélection à partir d'un stade dit double négatif car n'exprimant pas les marqueurs CD4 et CD8, puis double positif. Au stade double positif, les thymocytes expriment le récepteur des lymphocytes T (TCR) et les marqueurs CD4 et CD8. Ces cellules vont ensuite entreprendre deux étapes de sélection qui va éliminer une certaine proportion de thymocytes par apoptose. La sélection positive permet de conserver uniquement les thymocytes possédant un TCR correctement assemblé et capable d'interagir avec des antigènes du soi présentés par des cellules épithéliales thymiques. La sélection négative permet d'éliminer les thymocytes possédant un TCR de trop forte affinité pour les antigènes du soi, propices à une auto-immunité. Il va en résulter le développement de thymocytes CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> simples positifs. A leur sortie du thymus, ils deviennent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Les LT CD4<sup>+</sup> ont la fonction d'activer et de réguler toute la réponse immunitaire adaptative. Les LT CD8<sup>+</sup> ont une fonction cytotoxique et permettent de détruire les cellules tumorales ou les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires comme des virus (Germain, 2002).

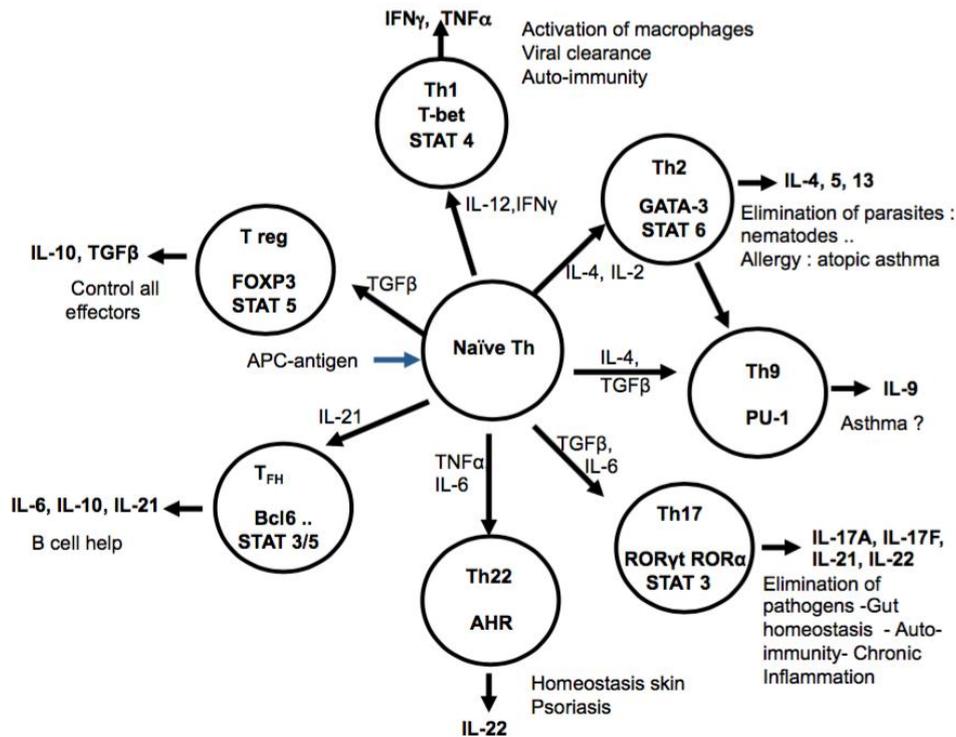
En périphérie, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont activés par la présentation d'un antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) d'une cellule présentatrice d'antigène, le plus souvent une cellule dendritique, au TCR d'un LT CD4<sup>+</sup>. Lors d'un événement inflammatoire, des cellules dendritiques résidentes captent des antigènes d'origine exogène au niveau d'un site inflammatoire. Elles dégradent ensuite ces antigènes en peptides associés à des molécules de CMH-II et migrent vers le ganglion drainant le site inflammatoire. C'est dans les ganglions que se déroule l'activation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs par les cellules dendritiques. Les DC activées expriment les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 avec lesquelles interagissent les LT CD4<sup>+</sup>, un événement essentiel pour l'activation. La stimulation du TCR entraîne une cascade de phosphorylation et d'activation de protéines

tyrosines kinases (LCK, ZAP70) et de protéines adaptatrices (LAT, SPL76) conduisant à l'activation de nombreuses voies de signalisation et des facteurs de transcriptions NF- $\kappa$ B, AP-1 et NFAT. Ces facteurs de transcription permettent d'activer l'expression des gènes essentiels aux fonctions effectrices des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, notamment les gènes codant des cytokines. Les T CD4<sup>+</sup> vont alors entrer en prolifération et migrer vers le site inflammatoire où elles exercent leurs fonctions (Chen and Flies, 2013).

L'activation d'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf engendre un processus de différenciation. Ces LT possèdent de nombreux récepteurs aux cytokines. En fonction du contexte inflammatoire, les cytokines libérées dans le milieu induisent la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> vers différents lignages de lymphocytes T auxiliaires adaptés au pathogène concerné. Plus précisément, la liaison d'une cytokine sur son récepteur induit dans les LT CD4<sup>+</sup> l'activation de différentes protéines de signalisation de la voie JAK/STAT, conduisant à l'expression de facteurs de transcriptions spécifiques à chaque lignage. Par exemple, la liaison des cytokines IL-12 et IL-4 à leur récepteur induisent respectivement l'activation des voies STAT4 et STAT6, des facteurs de transcriptions T-bet et GATA3, et ainsi les lignages Th1 et Th2. Il faut noter que d'autres paramètres peuvent influencer la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs. C'est le cas du type de cellule dendritique qui active le TCR ou encore de la force d'engagement du TCR (les peptides antigéniques à faible concentration ou de faible affinité pour le TCR favorisent la réponse Th2) (Jiang and Dong, 2013).

Les lymphocytes T de chaque lignage possèdent des profils transcriptomiques et épigénétiques complètement différents, notamment au niveau des gènes codant les cytokines produites. Les lymphocytes Th1 produisent de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et ont un rôle antiviral et antimicrobien. Les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-10 et de l'IL-13 et ont un rôle antiparasitaire. Les autres sous-populations de lymphocytes T auxiliaires les plus étudiées sont les Th17, à l'activité antivirale et antifongique, les T<sub>FH</sub>, qui permettent la maturation des lymphocytes B, et les T régulateurs (T<sub>reg</sub>), qui régulent les fonctions des autres lymphocytes T auxiliaires (Jiang and Dong, 2013).

C'est la spécificité de chacun des lignages de lymphocyte T CD4<sup>+</sup> qui permet la polyvalence de la réponse adaptative, mais qui est également à l'origine de la multiplicité de formes que peuvent prendre les maladies auto-immunes et allergiques.



**Figure 13 : Différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et sous-populations de LT auxiliaires.** Les cytokines indiquées autour des flèches intérieures sont celles nécessaires à la différenciation du LT CD4<sup>+</sup> naïf. Au dessous du nom de chaque sous-population de lymphocytes T auxiliaire est noté les facteurs de transcriptions spécifiques de chaque lignage. Les flèches extérieures indiquent les cytokines produites par ces sous-populations et leurs rôles dans l'immunité.

Pelletier, L. et al. 2015. Voltage Activated Cav1 Calcium Channels in T Cells. *Messenger*.

## II.1.2) Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 (LTh2) sont une population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> caractérisés par l'expression du facteur de transcription GATA3 et la production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. Physiologiquement, leur mission est de lutter contre les infections parasitaires. Médicalement, ils sont plus connus pour leur position centrale délétère dans de nombreuses allergies comme l'asthme.

Les lymphocytes Th2 se différencient à partir de LT CD4<sup>+</sup> naïfs en réponse à l'IL-4. Cette cytokine induit l'activation de la voie STAT6 puis de GATA3. La surexpression de GATA3 dans des Th1 suffit à les réorienter vers un lignage Th2, ce qui fait de GATA3 le *master gene* de la différenciation Th2. En plus d'être un facteur de transcription, GATA3 possède également la fonction de remodelleur de la chromatine. Il est capable de se fixer sur l'ADN au niveau d'un locus appelé *Th2 cytokine gene loci*, qui contient les gènes *IL4*, *IL5* et *IL13*. GATA3 va induire un remodelage de la chromatine (hyper-acétylation de l'histone H3-K9/14 et hyper-méthylation de H3-K4) permettant l'activation de ces gènes. Une fois les Th2

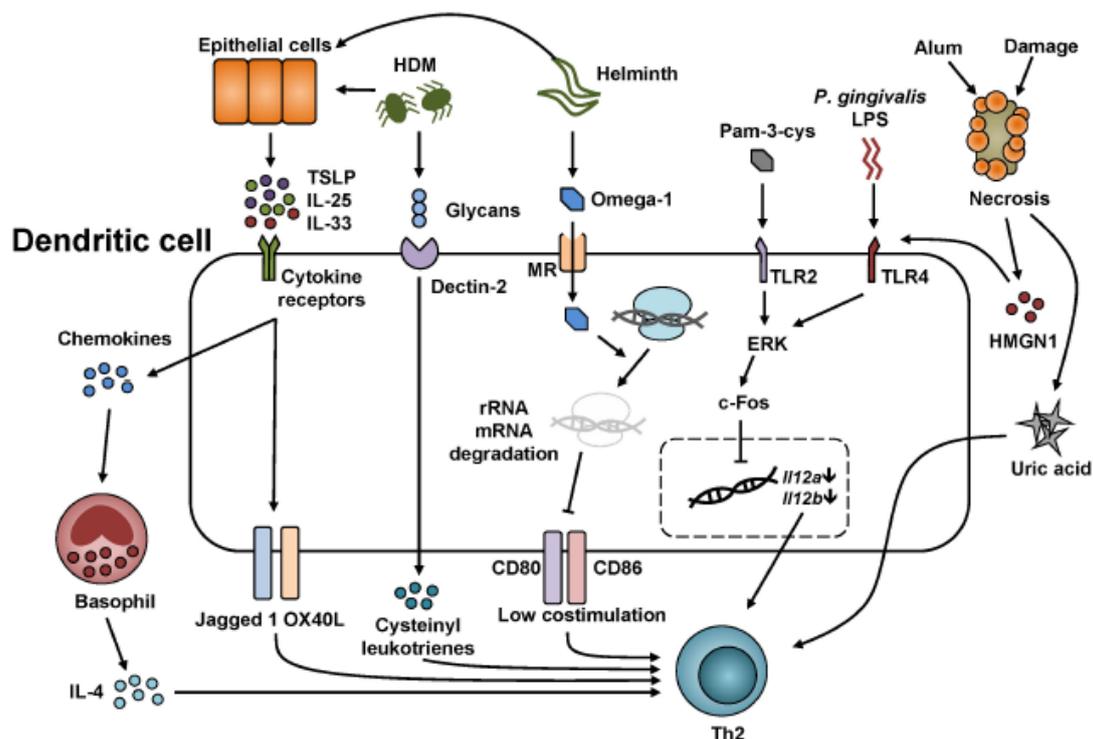
différenciés, une histone méthyltransferase, MLL, a pour charge de maintenir ce locus dans un état activé dans le temps. GATA3 devient alors inutile en terme de régulation de la chromatine mais reste essentiel comme facteur de transcription à proprement parler pour induire la production de ces cytokines à chaque restimulation du TCR (Nakayama and Yamashita, 2008).

Les modèles classiques de différenciation Th2 donnent aux cellules dendritiques un rôle prépondérant dans la différenciation des Th2 (fig. 14). Lambrecht a en effet montré dans des modèles d'asthmes chez la souris que la déplétion des DC CD11c<sup>+</sup> prévient le développement de l'inflammation, concluant que les DC sont nécessaires et suffisantes pour induire la différenciation Th2 (van Rijt et al., 2005). A la vue des travaux concernant le rôle des cellules dendritiques dans la différenciation Th2, on peut conclure que deux facteurs favorisent cette polarisation : la sous-population de DC et la nature des stimuli activant les DC. D'une part, il a été montré que certaines populations de DC favorisent la réponse Th2. Elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD11b (DC inflammatoires, dérivées des monocytes), CD301b, ou encore PDL2. D'autre part, les ligands des *toll like receptors* (TLR) 2 et 4 activent la voie ERK, ce qui va réduire l'expression d'IL-12 (favorisant les réponses Th1) par la phosphorylation du facteur de transcription c-Fos. Les glycanes produit par les acariens peuvent induire l'expression de leucotriènes cysteinyl pro-Th2 après fixation au récepteur Dectin-2. L'enzyme omega-1 libérée par certains parasites va diminuer l'expression des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 qui deviennent pro-Th2 à faible niveau d'expression. Enfin et surtout, les cytokines IL-25, IL-33 et TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) sont essentielles pour polariser les DC vers une réponse Th2. La liaison de ces cytokines à leur récepteur permet l'expression des ligands de Notch : Jagged 1 et OX40L, favorisant la réponse Th2, et la production de chimiokines, qui vont notamment permettre le recrutement de basophiles (Na et al., 2016). D'autre part, certains adjuvants sont utilisés pour faciliter les réponses Th2 dans des modèles expérimentaux. Le premier d'entre eux est l'alum qui est utilisé depuis des décennies mais dont le mécanisme n'a été que récemment découvert. Cet adjuvant provoque une nécrose tissulaire qui a pour conséquence la libération d'acide urique et l'activation de DC inflammatoires (Kool et al., 2008).

Les sous-populations de DC et la nature des stimuli activant les DC sont souvent présentées comme des éléments indépendants mais certains auteurs suggèrent que les DC ne sont pas préprogrammées vers une polarisation particulière mais que ce sont les stimuli précédemment cités qui vont activer les DC et les orienter vers des sous-populations capables d'induire une polarisation particulière des LT CD4<sup>+</sup> (Kalinski and Moser, 2005).

Cependant les DC ne peuvent pas produire l'IL-4 qui est essentielle à la différenciation Th2. La question de la source initiale d'IL-4 a toujours été l'objet de nombreux débats. Les

modèles classiques font intervenir d'autres populations cellulaires, capables de produire cette cytokine : basophiles, éosinophiles, cellules NKT, mastocytes (Hammad et al., 2010). Les basophiles ont été tout particulièrement étudiés en ce sens. Des travaux ont même proposé que des basophiles producteurs d'IL-4 soient eux même des cellules présentatrices d'antigène pour les LT CD4<sup>+</sup> dans les ganglions, exprimant à la fois CMH-II et protéines co-stimulatrices CD80 et CD86 (Sokol et al., 2009). Néanmoins, ces travaux sont de plus en plus contestés. En effet, ces cellules ne seraient pas des basophiles mais une sous-population de DC exprimant le FcεRI. L'équipe de Lambrecht a plus récemment analysé l'implication des DC, basophiles et éosinophiles dans un modèle d'inflammation pulmonaire. Elle a montré que seules les cellules dendritiques inflammatoires sont nécessaires et suffisantes pour la mise en place d'une réponse Th2. Ce sont ces DC qui seraient à l'origine du recrutement de basophiles (Hammad et al., 2010). Quoi qu'il en soit d'autres travaux seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes de la polarisation Th2.



**Figure 14 : Induction de la polarisation Th2 par les cellules dendritiques.** Au dessus de la cellule sont présentés les différents ligands capables d'induire cette polarisation. Les voies de signalisation correspondantes sont indiquées dans la cellule. En bas, sont représentés les différents signaux transmis par la cellule dendritique au lymphocyte T CD4<sup>+</sup> pour se différencier en lymphocytes Th2. TSLP : *thymic stromal lymphopoietin*, HDM : *house dust mite*, MR : récepteur au mannose, TLR : *toll like receptor*, ERK : *extracellular signal-regulated kinases*, HMGN1 : *high mobility group nucleosome binding domain 1*. Na, H. et al. 2016. Regulation of Th2 Cell Immunity by Dendritic Cells. *Immune network*.

## **II.2) La signalisation calcique dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, la stimulation du TCR induit une augmentation de la concentration calcique qui est nécessaire à la pleine activation de ces cellules. Plusieurs types de canaux calciques sont impliqués dans ce phénomène (TRP, P2X...) mais c'est la voie du courant CRAC qui est communément considérée comme prédominante (fig. 17).

### **II.2.1) La voie du courant CRAC dans les lymphocytes T**

La voie du courant CRAC (pour *Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup>*), aussi appelée SOCE (pour *store operated calcium entry*), ou encore voie du courant capacitif est la principale voie d'entrée du calcium dans les lymphocytes T activés. Bien qu'il soit avéré que puiseurs canaux TRP sont activés en réponse à une déplétion des stocks du RE (table 1) (Venkatachalam and Montell, 2007), le courant CRAC repose essentiellement sur les protéines STIM et ORAI, et plus particulièrement STIM1 et ORAI1. Ainsi, une déficience de STIM1 ou ORAI1 entraîne un défaut d'activation des lymphocytes T qui se traduit chez l'homme par un syndrome d'immunodéficience combinée.

#### **II.2.1.1) Description du courant CRAC**

La voie du courant CRAC est présente dans plusieurs types de cellules excitables (cellules musculaires cardiaques et squelettiques, neurones cellules  $\beta$  du pancréas...) mais également dans de nombreuses cellules non excitables, lymphocytes, mastocytes, ostéoclastes (Soboloff et al., 2012), ou encore dans les cellules souches de la pulpe dentaire (Sohn et al., 2005).

Dans les lymphocytes T, la reconnaissance d'un peptide antigénique associé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité par le TCR entraîne une cascade d'activation de protéines tyrosines kinases, dont Src, Syk/ZAP70 et Tec/Btk, qui vont conduire à la phosphorylation et à l'activation de la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). Cette enzyme va cliver le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et en inositol trisphosphate (fig. 17). L'IP<sub>3</sub> est le ligand de récepteurs canaux situés à la membrane du réticulum endoplasmique. La liaison de l'IP<sub>3</sub> à ses récepteurs va induire le passage d'ions calcium du RE vers le cytoplasme, entraînant la vidange du calcium du RE. C'est cette vidange des stocks qui est à l'origine du courant CRAC. La déplétion du calcium du RE est détectée par les protéines STIM1 localisées dans la membrane du RE. Ces protéines vont s'oligomériser et migrer le long de la membrane du RE jusqu'à ce que leurs domaines cytosoliques entrent en interaction avec le domaine cytosolique des canaux ORAI1, des canaux calciques exprimés à la membrane plasmique. L'activation des canaux ORAI1 par

les protéines STIM1 est à l'origine d'une entrée de calcium extracellulaire, le courant CRAC. Dans les cellules du système immunitaire, l'augmentation de la concentration calcique mène à l'activation de la phosphatase calcineurine qui va déphosphoryler le facteur de transcription NFAT et permettre sa translocation dans le noyau. NFAT est essentiel pour l'activation des gènes impliqués dans les réponses immunitaires (fig. 17), par exemple les gènes de cytokines (Hogan et al., 2010).

### **II.2.1.2) La découverte des protéines STIM et ORAI**

L'existence du courant CRAC est connue depuis les années 1980. Cependant, l'identification des protéines STIM et ORAI n'a eu lieu que 20 ans plus tard. Plusieurs outils se sont révélés essentiels dans la découverte de ces protéines. La thapsigargine, d'une part, est un inhibiteur de la SERCA, la pompe qui a pour fonction de remplir les stocks de calcium du RE depuis le cytoplasme. L'inhibition de cette pompe induit *in fine* une déplétion du calcium du RE. L'utilisation de cette drogue permet d'activer et de visualiser le courant CRAC lors d'expériences de patch-clamp. D'autre part, le perfectionnement des RNA interférants a également contribué à l'identification des acteurs de la voie du courant CRAC. Aussi bien STIM que ORAI ont été identifiés lors de larges criblages réalisés chez la drosophile à l'aide de siRNA. Cette espèce est en effet très propice à ce genre d'étude car elle possède un génome plus simple que celui des mammifères et ces cellules sont particulièrement sensibles aux siRNA (Hogan et al., 2010).

En 2005, deux articles publiés à un mois d'intervalle mettent en évidence l'implication de STIM dans le courant CRAC. Dans un premier article, l'équipe de Stauderman a criblé 170 gènes impliqués dans la signalisation calcique avec des dsRNA et il a mis en évidence l'implication de STIM1. Les auteurs ont montré dans des cellules de drosophiles et dans plusieurs lignées de cellules humaines que le courant CRAC induit par la thapsigargine est quasiment aboli après *knock-down* de STIM1. De plus, la surexpression de STIM1 entraîne une augmentation de ce courant (Roos et al., 2005). Dans un second article, l'équipe de Meyer a criblé 2304 gènes humains avec des siRNA dans des cellules HeLa et identifié le rôle de STIM1 et STIM2. Ils ont montré que le *knock-down* de STIM2 ou surtout de STIM1 inhibe le courant CRAC et que cette inhibition est amplifiée par le knock-down des deux protéines STIM. Enfin, ils ont démontré que STIM1 est exprimé au niveau du RE et qu'il se relocalise pour former des puncta lors de l'induction du courant CRAC, et ce de façon dépendante du domaine N-terminal de liaison au calcium (Liou et al., 2005).

Les protéines ORAI forment les canaux à l'origine du courant CRAC. L'identification du rôle de ces canaux dans ce courant a eu lieu en 2006, un an après celle de STIM. A l'origine, c'étaient d'autres canaux qui étaient suspectés d'être à l'origine du courant CRAC : les canaux TRP. Cette hypothèse était notamment confortée par le fait que STIM1 peut interagir directement avec la plupart des TRPC (Yuan et al., 2007). Cependant ces canaux possèdent des propriétés électrophysiologiques incompatibles avec le courant CRAC et il a été déterminé que leur expression est normale dans des cellules déficientes pour ce courant, provenant de certains patients SCID (pour *severe combined immune deficiency*) (Feske et al., 2005). Ces patients présentent un défaut de réponse immunitaire du fait d'une absence de courant CRAC dans les cellules du système immunitaire et donc d'activation. En 2006, Feske a montré que cette immunodéficiência est due à une mutation faux sens du gène *FLJ14466* dont la protéine a été nommée ORAI1. Cette mutation est une transition C=>T, à l'origine du remplacement d'un résidu arginine en tryptophane. Le *knock-down* d'ORAI1 a pour conséquence une absence de réponse de NFAT et la surexpression de la forme sauvage d'ORAI1 dans des lymphocytes T issus de patients SCID restaure leur fonction. Ils ont également montré que la protéine ORAI possède la structure d'un canal, en faisant un candidat crédible pour le canal à l'origine du courant CRAC (Feske et al., 2006). La même année, deux équipes ont également montré par des criblages à l'aide de siRNA dans des cellules de drosophiles que ORAI1 est bien un canal exprimé à la membrane plasmique et que c'est ce canal qui permet de former le courant CRAC (Vig et al., 2006) (Zhang et al., 2006).

### II.2.1.3) Structure et fonction des protéines STIM et ORAI

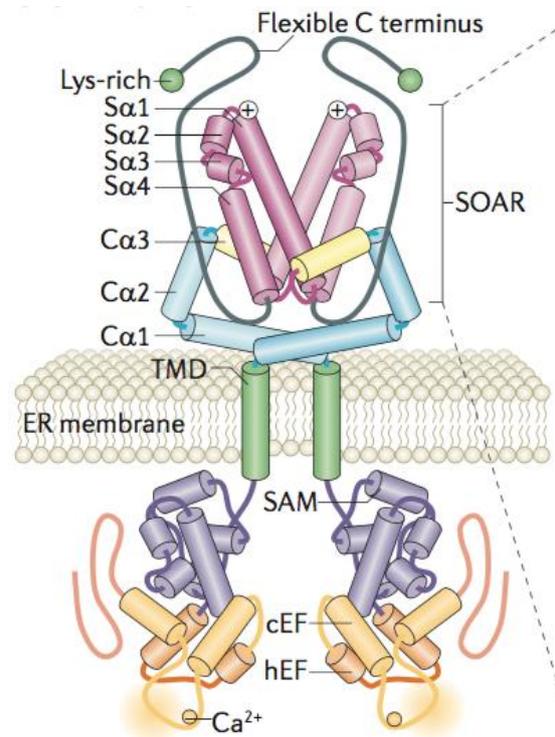
Suite à la découverte des protéines STIM et ORAI, des modèles de souris déficientes pour ces protéines ont été mis au point pour étudier plus précisément la mécanistique de cette voie. Il est apparu rapidement que la plupart des souris déficientes pour les gènes *Stim1* ou *Orai1* meurent au stade périnatal. Les souris survivantes présentent un phénotype rachitique, des myopathies, et un défaut d'activation plaquettaire. De plus, les souris déficientes pour *Orai1* arborent également une perte du pelage. Il est admis que c'est le défaut fonctionnel au niveau du muscle strié, reflétant les myopathies de certains patients SCID, qui est responsable de la forte mortalité. Sur le plan immunologique, les souris déficientes pour *Stim1* ou *Orai1* présentent un défaut de la réponse calcique dans les mastocytes et les lymphocytes T et B, et par conséquent un défaut fonctionnel de ces cellules. Ces modèles murins ont permis de mettre en évidence l'implication de la voie STIM/ORAI dans une grande variabilité de types cellulaires. Par la suite, des modèles de KO conditionnels (notamment via le système de recombinaison Cre-Lox) ont été mis au point

afin de cibler ces gènes dans des types cellulaires particuliers, notamment dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, et s'affranchir du problème de mortalité des souris déficientes totales (Feske, 2009).

Suite à la mise en évidence du rôle des protéines STIM et ORAI, des expériences de cristallographie et de mutagenèse dirigée ont permis de déterminer les domaines fonctionnels de ces protéines et de concevoir un modèle d'activation des canaux ORAI par les protéines STIM.

Les protéines STIM1 sont exprimées au niveau de la membrane du RE et organisées au repos en dimères (fig. 15). La partie N-terminale est située dans la lumière du RE et contient plusieurs domaines : un domaine SAM (*sterile α motif*) qui contient une hélice alpha et deux domaines *EF-hand* dont le plus distal (cEF) a la capacité de lier le calcium. En présence de calcium dans la lumière du RE, le domaine EF-hand distal est replié au contact du domaine SAM. La partie C-terminale de STIM1 quant à elle est située dans le cytoplasme. Elle contient trois domaines *coiled-coil* successifs formés d'hélice  $\alpha$ . Le premier domaine (CC1) possède trois hélices (Ca1 à 3) et les deux suivants (CC2 et CC3) en possèdent quatre (S $\alpha$ 1 à 4). Ces quatre hélices forment le SOAR (pour *STIM ORAI activating region*), ou CAD (pour *CRAC activation domain*). Au repos, les domaines CC1 et SOAR assurent par des liaisons hydrophobes l'interaction et la stabilité du dimère de protéines STIM. De plus, l'hélice Ca3 qui possède des résidus acides est en contact avec le domaine SOAR qui lui possède des résidus basiques, ce qui maintient le canal dans un état d'auto-inhibition. Enfin, les derniers acides-aminés de l'extrémité C-terminale forment un domaine riche en résidus lysines (Soboloff et al., 2012).

Lors de la déplétion des stocks, le calcium se détache du domaine *EF-hand* qui se sépare du domaine SAM et entraîne un changement de conformation de la protéine et une exposition

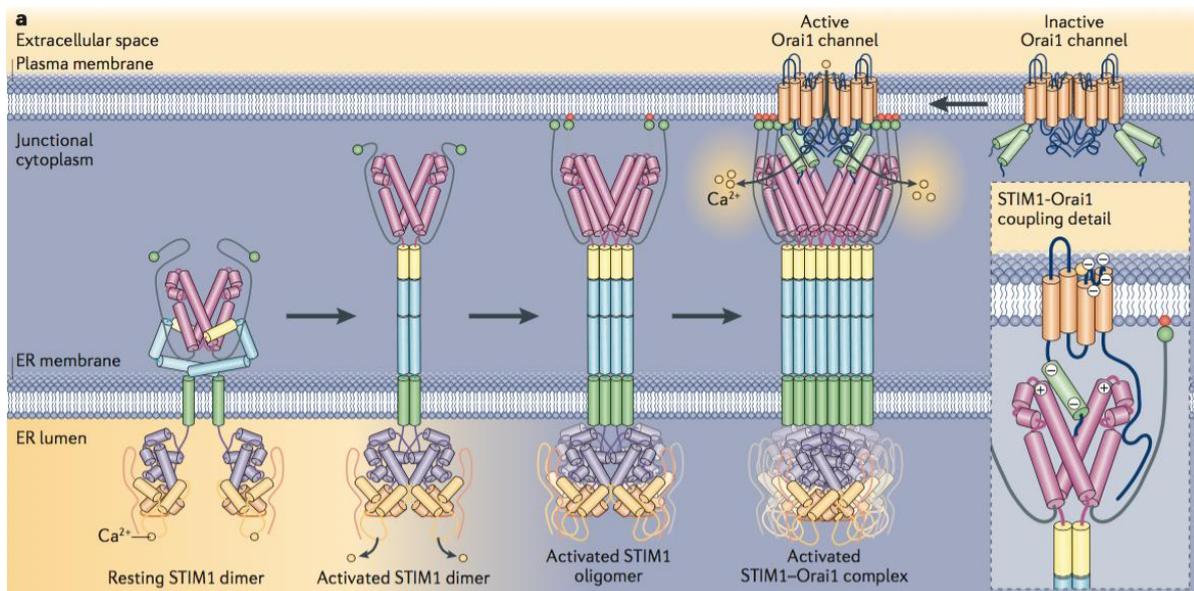


**Figure 15 : Représentation d'un dimère de protéines STIM1 et de ses domaines fonctionnels au repos.**

cEF : domaine *EF-hand* canonique, hEF : domaine *EF-hand* non fonctionnel, SAM : *sterile α motif*, TMD : domaine transmembranaire, Ca : domaines *coiled-coil*, S $\alpha$  : hélices  $\alpha$  du domaine SOAR, SOAR : *STIM ORAI activating region*.

Soboloff, J. et al. 2012. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers.

de résidus hydrophobes au niveau de ces deux domaines. Les domaines *EF-hand* et SAM deviennent ainsi capables d'entrer en interaction avec ces mêmes domaines d'autres protéines STIM qui vont s'oligomériser. Le changement de conformation engendré depuis la partie N-terminale entraîne une élongation de la molécule dans sa partie cytosolique et la dissociation de l'hélice inhibitrice  $\text{Ca}3$  du domaine SOAR. Les résidus libérés des trois domaines *coiled-coil* entraînent l'oligomérisation de plusieurs protéines STIM. Ces oligomères vont également migrer par diffusion dans la membrane du RE de façon à se rapprocher de la membrane plasmique (fig. 16) (Soboloff et al., 2012). Le rapprochement de STIM et ORAI est rendu possible par la protéine TMEM110. Cette protéine est exprimée à la membrane du RE et permet la réorganisation des jonctions membrane plasmique/membrane du RE qui sont critiques à l'établissement de complexes STIM/ORAI (Quintana et al., 2015). Cette interaction est aussi facilitée par un recrutement des résidus lysines distaux de l'extrémité C-terminale de STIM par des phospholipides chargés de la membrane plasmique. Le domaine SOAR est capital pour l'oligomérisation des protéines STIM mais est en plus responsable par ses résidus basiques de l'interaction avec les résidus acides des régions cytosoliques des canaux ORAI (Soboloff et al., 2012).



**Figure 16 : Modèle d'activation des canaux ORAI1 par les protéines STIM1.** Le code couleur des différents domaines de STIM1 correspond à celui de la figure 15. Au repos l'hélice  $\text{Ca}3$  de STIM (cylindres jaunes) maintient le domaine SOAR (cylindres roses) replié sur lui-même. En absence de calcium, les protéines STIM se déplient et s'oligomérisent au niveau des hélices  $\alpha$  des domaines CC (cylindres bleus, jaunes et roses). Les régions riches en lysines (boules vertes) interagissent avec les lipides membranaires (boules rouges). L'encadré à droite montre les résidus basiques du domaine SOAR (+) entrent en interaction avec les acides (-) des canaux ORAI.

Soboloff, J. et al. 2012. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature reviews. Molecular cell biology*.

STIM1 et STIM2 sont deux protéines structurellement très identiques, toutes deux impliquées dans la mise en place du courant CRAC. STIM1 est activé et relocalisé à la membrane uniquement lors de la déplétion des stocks (Zhang et al., 2005). STIM2, au contraire, a la capacité de se relocaliser pour de faibles déplétions de calcium et est de base partiellement activé (Brandman et al., 2007). Cela peut s'expliquer par le fait que les protéines STIM1 et STIM2 diffèrent essentiellement au niveau de leur domaine de liaison au calcium (Zheng et al., 2008). De plus, le *knock-down* de STIM2 n'est pas aussi efficace que celui de STIM1 pour réprimer le courant CRAC et la surexpression de STIM2 ne restaure pas complètement ce courant en absence de STIM1 (Oh-Hora et al., 2008). Ces éléments indiquent très clairement que c'est la protéine STIM1 qui est critique dans l'établissement du courant CRAC. Le rôle exact de STIM2 donc reste à déterminer, d'autant plus depuis qu'il a été révélé que cette protéine peut aussi bien agir comme activateur que comme inhibiteur des canaux ORAI selon son épissage (Rana et al., 2015).

ORAI1 est une protéine qui possède quatre segments transmembranaires, deux boucles extracellulaires, une boucle intracellulaire et deux extrémités N et C-terminale intracellulaires. Des résidus négativement chargés dans les hélices transmembranaires 1 et 3 sont à l'origine de la sélectivité du canal pour le calcium (Hogan et al., 2010). La sélectivité des canaux ORAI pour le calcium est très importante ( $P_{Ca}/P_{Na} > 1000$ ) mais leur conductance est relativement faible (30-200 fS, soit 100 fois moins que les canaux  $Ca_v1$  : 2-20 pS) (Robert et al., 2011). Les protéines STIM interagissent avec la partie C-terminale d'ORAI mais la partie N-terminale est également essentielle pour l'activation du canal (Hogan et al., 2010). Il faut une association de quatre protéines ORAI1 pour former un canal fonctionnel, parfois appelé canal CRAC. On ignore la stœchiométrie exacte de l'interaction entre protéines STIM et ORAI. Il semblerait que chacune des quatre protéines ORAI1 d'un canal puisse lier un dimère de protéines STIM, huit au maximum par canal donc, mais que ces quatre dimères ne soient pas forcément nécessaires à l'activation d'ORAI. L'activation des canaux CRAC serait en fait proportionnelle au nombre de dimères de STIM liés aux canaux (Muik et al., 2012).

Comme STIM1, ORAI1 possède plusieurs protéines homologues dont l'implication exacte dans le courant CRAC n'est pas très bien établie. ORAI2 et ORAI3 sont structurellement très similaires à ORAI1. *In vitro*, aussi bien ORAI2 que ORAI3 surexprimés avec STIM1 induisent la génération de courants calciques. ORAI2 est exprimé dans les lymphocytes T et pourrait expliquer le courant CRAC résiduel dans les cellules déficientes pour ORAI1. Cependant la surexpression de cette protéine ne compense pas du tout ORAI1, remettant en doute le rôle d'ORAI2 dans le courant CRAC (Gwack et al., 2008). Enfin le rôle de ORAI3 dans le courant CRAC n'est pas encore très bien compris. Cette protéine serait avant tout une sous-unité

des canaux ARC (*arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup>-selective*), des canaux calciques activés par l'acide arachidonique (Mignen et al., 2008).

En plus de se pencher sur la description des protéines STIM1 et ORAI1 ainsi que sur leur mécanisme d'activation, d'autres études commencent à se pencher sur l'interactome de ces protéines. Il a été montré que diverses protéines comme ARAF, junctate, Surf4 ou l'adenylate cyclase AC8 peuvent interagir ou réguler STIM-ORAI. De plus, l'activité d'ORAI peut être modulée par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ou la glutathionylation (Muik et al., 2012). Enfin, il a été démontré que les protéines STIM peuvent inhiber l'activité des canaux calciques voltage-dépendants. La déplétion des stocks du RE permet de relocaliser les protéines STIM au niveau d'ORAI et de la membrane plasmique, et donc des canaux Ca<sub>v</sub> (Park et al., 2010) (Wang et al., 2010).

Au vu du grand nombre de protéines et de canaux (TRP, Ca<sub>v</sub>, ARC) interagissant avec les protéines STIM ou ORAI, on peut s'interroger sur le fait que STIM et ORAI puissent être localisés au centre d'un vaste complexe de régulation multidirectionnel de l'influx calcique. Quoi qu'il en soit, on peut considérer que la voie du courant CRAC est centrale dans les mécanismes d'entrée de calcium et de régulation des flux calciques.

## **II.2.2) Les autres canaux ioniques exprimés dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Outre la voie du courant CRAC, de nombreux acteurs participent à l'augmentation du niveau de calcium intracellulaire et régulent ce phénomène dans ces cellules (fig. 17).

Les canaux P2X1, P2X4 et P2X7 exprimés par les lymphocytes T sont des canaux calciques purinergiques de la famille P2X activés par l'ATP extracellulaire. Lors de la stimulation, ces cellules vont d'une part libérer de l'ATP dans le milieu extracellulaire. Cet ATP pourra être capté par les cellules avoisinantes et participer ainsi à leur activation en déclenchant un courant calcique de façon paracrine.

La stimulation du TCR va aussi induire la formation de NAADP (*nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate*) et de cADPR (*ADP-ribose cyclique*), des produits du métabolisme du NAD (*nicotinamide adenine dinucleotide*), capables de se fixer aux récepteurs à la ryanodine du RE et d'entraîner la déplétion des stocks de cet organite.

De plus, certains canaux de la famille TRP sont impliqués dans l'entrée de calcium extracellulaire dans la cellule suite à la stimulation du TCR. Bertin et Raz ont parcouru la bibliographie et ont publié récemment un tableau récapitulatif de l'expression des canaux TRP dans les lymphocytes T (Bertin and Raz, 2016). Parmi eux, TRPA1, TRPC2, TRPC3, TRPC5, TRPC6, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, TRPV6 et TRPM6 présentent

une spécificité pour le calcium (Gees et al., 2010). Mais tous ces canaux n'ont pas fait l'objet d'une étude poussée dans les lymphocytes

Parmi eux, TRPM2 est un canal calcique connu pour être régulé par le stress oxydatif (Perraud et al., 2003). Il a été montré par des études d'électrophysiologie qu'un courant correspondant à TRPM2 est présent dans les Jurkat, une lignée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains, et qu'il peut être activé par les produits du métabolisme du NAD (Beck et al., 2006). L'expression de ce canal est tout à fait détectable au niveau protéique dans les LT CD4<sup>+</sup> de souris. Cependant, le niveau d'expression en ARNm est très modeste et est positivement régulé par la stimulation du TCR. Les auteurs ont montré que cibler TRPM2 réduit fortement la fonction des lymphocytes T, et plus particulièrement des Th1 et Th17. De plus, les souris déficientes pour *TRPM2* présentent une diminution de l'inflammation du système nerveux central dans des modèles murins de sclérose en plaque. Bien que toutes les cellules immunitaires de ces souris soient déficientes pour TRPM2, les auteurs suggèrent que cibler ce canal dans les lymphocytes T permettrait de lutter contre la maladie (Melzer et al., 2012).

TRPC3 est exprimé dans les LT CD4<sup>+</sup> humains et cette expression augmente avec la stimulation du TCR. Il a été montré à l'aide de siRNA que cibler l'expression de cette protéine diminue la concentration calcique et la prolifération des LT CD4<sup>+</sup>, mais ce de façon très modeste (Wenning et al., 2011).

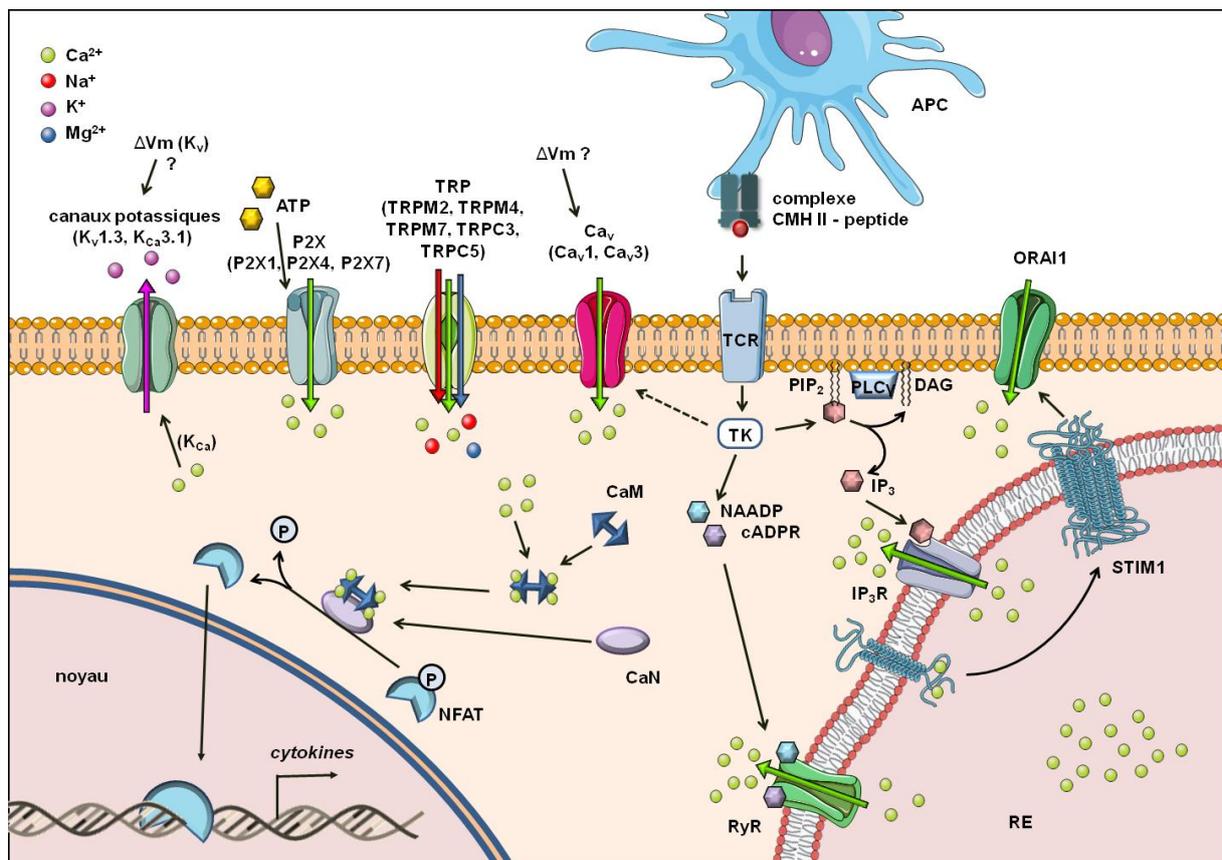
Enfin, TRPV5 et TRPV6 ont été étudiés par l'équipe de S. Semenova dans les lymphocytes T humains. Elle a montré que ces canaux sont co-exprimés au niveau des endosomes et que leur activité est régulée par le pH (Tomilin et al., 2016). Cependant leur rôle exact reste inconnu, d'autant plus que la déficience de *Trpv6* chez la souris ne présente aucun phénotype immunitaire (Feske et al., 2015).

En plus des canaux calciques, de nombreux autres types de canaux ioniques, bien que non spécifiques pour le calcium, participent néanmoins à la signalisation calcique, notamment en assurant un potentiel de membrane favorable à un influx calcique.

C'est particulièrement le cas des canaux potassiques  $K_{Ca}3.1$  et  $K_v1.3$ . La stimulation du TCR induit un influx de calcium nécessaire à l'activation de  $K_{Ca}3.1$ . Ce calcium provoque également une dépolarisation membranaire capable d'activer  $K_v1.3$ . L'ouverture de ces deux canaux se traduit par un efflux de potassium et une repolarisation membranaire, favorisant ainsi une entrée de calcium. De plus, cibler  $K_{Ca}3.1$  chez la souris diminue la réponse calcique dans les T et permet de réduire l'inflammation *in vivo* chez la souris (Di et al., 2010). Les canaux TRPM4 et TRPM7 sont également exprimés dans les lymphocytes T. Ils sont activés lors de la stimulation du TCR et induisent respectivement l'entrée de sodium et de magnésium. Contrairement aux courants potassiques, ces courants vont dépolariser la

membrane plasmique et limiter l'entrée de calcium en diminuant la force électromotrice du calcium. Enfin, les lymphocytes T expriment encore de nombreux types de canaux ioniques dont la fonction et le mode d'activation n'ont pas été extensivement étudiés. C'est par exemple le cas du transporteur de magnésium MAGT1, des transporteurs de zinc ZIP3, ZIP6 et ZIP8 ou encore des canaux chlorures CFTR, GABA<sub>A</sub> et LRRC8A.

Ainsi, d'un point de vue plus global, différents canaux ioniques exprimés à la membrane plasmique des lymphocytes T sont activés par la stimulation du TCR et supportent des courants ioniques qui vont selon leur nature dépolariser ou hyper-polariser la membrane et moduler le passage de calcium. Chaque canal possède une cinétique d'activation qui lui est propre. Ainsi, une succession d'événements dépolarisant ou hyperpolarisant capables d'influer sur le passage d'ions calcium pourrait expliquer les oscillations observées au cours de la réponse calcique suite à la stimulation du TCR. C'est notamment l'hypothèse soutenue par J.P. Kinet qui attribue au canal sodique TRPM4 le premier rôle dans ce mécanisme (Launay et al., 2004). Des études d'électrophysiologie extrêmement précises seront nécessaires pour mieux comprendre la cinétique précise de ces événements et appréhender la part de chaque canal.



**Figure 17 : Les acteurs de la signalisation calcique dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

RE : réticulum endoplasmique, APC : cellule présentatrice d'antigène, CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, TCR : récepteur du lymphocyte T, TK : protéines

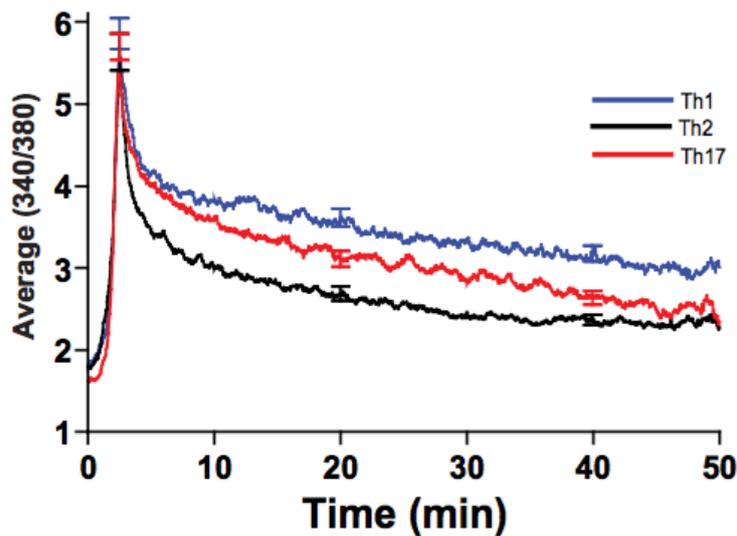
tyrosine kinases, PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol bisphosphate, PLC $\gamma$  : phospholipase C $\gamma$ , DAG : diacylglycerol, IP<sub>3</sub> : Inositol trisphosphate, IP<sub>3</sub>R : récepteur à l'IP<sub>3</sub>, NAADP : *nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate*, cADPR : ADP-ribose cyclique, RYR : récepteur à la ryanodine, STIM : *stromal interaction molecule*, CaM : calmoduline, CaN : calcineurine, NFAT : *nuclear factor of activated T-cells*, P : phosphorylation, Ca<sub>v</sub> : canal calcique voltage-dépendant,  $\Delta V_m$  : dépolarisation membranaire, TRP : *transient receptor potential*, P2X : récepteur purinergique à l'ATP, K<sub>Ca</sub> : canal potassique activé par le calcium, K<sub>v</sub> : canal potassique voltage-dépendant.

Il est connu que l'allure de l'influx calcique (pic, oscillations, plateau...) a de profondes conséquences sur la réponse cellulaire. C'est pourquoi on parle souvent de signal calcique. Dolmetsch a étudié précisément cet aspect à l'aide de systèmes permettant de générer artificiellement des influx calciques d'intensité, de durée et de fréquence contrôlées grâce à des ionophores et des chélateurs calciques. Il a montré que l'activation des facteurs de transcription NFAT et NF- $\kappa$ B dans les lymphocytes est contrôlée par la nature du signal calcique. NF- $\kappa$ B est activé pour une élévation très forte mais brève de calcium alors que NFAT est transloqué dans le noyau pour des influx calciques plus faibles mais maintenus dans le temps (Dolmetsch et al., 1997). De plus, la fréquence des oscillations et l'amplitude de la réponse calcique influencent cette activation. En l'occurrence, NFAT est activé pour des oscillations de fréquence plus élevée que NF- $\kappa$ B. Cette différence se retrouve au niveau fonctionnel dans l'expression de cytokines. Celles dont l'expression est dépendante de NFAT (comme l'IL-2) sont exprimées pour des oscillations plus rapides que celles dépendantes de NF- $\kappa$ B (comme l'IL-8). Par ailleurs, cette modulation de NFAT par les oscillations de calcium est totalement abolie pour de fortes concentrations calciques (Dolmetsch et al., 1998). Ces études démontrent de façon très claire que la nature de la réponse calcique influence complètement la réponse cellulaire.

Ce mode de régulation pourrait expliquer les résultats à première vue contradictoires concernant TRPC5. TRPC5 est exprimé dans les LT CD4<sup>+</sup> murines après la stimulation du TCR. Il a été mis en évidence que le crosslinking du lipide GM1 exprimé à la surface des LT effecteurs par le sucre galectin-1 libéré par les T régulateurs induit l'activation de TRPC5 dans les T effecteurs (Wang et al., 2009). Le crosslinking de GM1 se traduisant par une diminution de l'inflammation *in vivo*, il semblerait que le courant calcique dépendant de TRPC5 diminue la fonction effectrice des lymphocytes T. Cette étude tend à montrer qu'un courant calcique, possiblement par son intensité, la nature de ses oscillations ou encore par les protéines associées à ce canal, peut aussi avoir un effet inhibiteur sur la fonction des lymphocytes T.

### II.2.3) Signalisation calcique et expression sélective de canaux ioniques dans les différentes sous-populations lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, en plus de se caractériser par l'expression de cytokines spécifiques, se distinguent par des différences dans leur régulation calcique. Au repos, la concentration calcique est plus élevée dans les Th2 comparé aux Th1 mais l'augmentation du calcium après activation du TCR est beaucoup plus faible dans les Th2 que dans les Th1 après activation du TCR. Les cellules Th17 ont des valeurs intermédiaires (fig. 18). De plus les oscillations des Th17 et Th1 sont plus fréquentes que celles des Th2 (Weber et al., 2008).



**Figure 18 : Réponse calcique dans des lymphocytes Th1, Th2 et Th17.** Des LT ont été différenciés en Th1, Th2 et Th17, chargés avec la sonde fluorescente sensible au calcium Fura-2 AM, puis stimulées avec un antigène spécifique et des cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules sont excitées aux longueurs d'onde 340 et 380 nm, et l'émission est mesurée à la longueur d'onde 510 nm. Le rapport de fluorescence obtenu est un indicateur de la concentration de calcium intracellulaire.

Weber, K.S. et al. 2008. Th17 Cells Exhibit a Distinct Calcium Profile from Th1 and Th2 Cells and Have Th1-Like Motility and NF-AT Nuclear Localization. *J Immunol.*

Les raisons précises expliquant ces différences sont aujourd'hui inconnues mais au vu des observations précédentes il est aisé d'imaginer que chaque lignage possède des mécanismes de régulation du calcium qui lui sont propres et qui sont liés à sa fonction. Par exemple, l'expression de l'IL-4 spécifique aux Th2 est possible par la seule activation du facteur de transcription NFAT, facteur activé par une augmentation peu importante mais soutenue de calcium, ce qui est le cas dans les Th2.

Il est donc intéressant d'étudier les canaux ioniques, et voies de signalisations associées, exprimés par chaque sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> afin de déterminer comment leur expression et leur organisation distinctes peuvent se traduire par des fonctions complètement différentes. Dans ce sens, l'équipe de M. Cahalan a démontré que la réponse calcique des Th2, et plus particulièrement du courant CRAC, est plus faible que dans les Th1 à cause d'une activité moindre des canaux K<sub>Ca</sub>, d'où un potentiel de membrane moins favorable à l'entrée de calcium (Fanger et al., 2000). D'autre part, Orban et ses collaborateurs ont montré une expression nettement plus élevée de K<sub>v</sub>1.3 dans les lymphocytes Th17 humains par rapport aux Th1, Th2 et Tregs (Orban et al., 2014). Plus récemment encore, l'équipe de Louvet a mis en évidence l'expression de deux canaux cationiques fortement associés à l'appareil de Golgi, TMEM176A et TMEM176B, dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et plusieurs autres populations de cellules immunitaires. Ces canaux ont la particularité d'être particulièrement surexprimés dans les lymphocytes Th17 humains et murins par rapport aux autres sous-populations de lymphocytes T auxiliaires (Drujon et al., 2016). Cette étude, en plus de mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique dans le cadre des pathologies inflammatoires de la peau comme le psoriasis, va une fois encore dans le sens d'une expression différentielle des canaux ioniques selon la sous-population de lymphocyte T auxiliaire.

Tous ces éléments vont donc dans le sens de mécanismes de régulation des équilibres ioniques propres à chaque type cellulaire. C'est dans cette optique que notre équipe a porté un intérêt tout particulier aux canaux calciques voltages dépendants et comparé leur expression et fonction dans les différentes populations de lymphocytes T.

### **II.3) Les canaux Ca<sub>v</sub> dans la biologie des lymphocytes T**

Bien que la du courant CRAC ait été clairement définie comme la principale voie d'entrée du calcium en réponse à la stimulation du TCR dans les lymphocytes T, plusieurs observations montrent un rôle essentiel des canaux Ca<sub>v</sub> dans ces cellules. L'expression des canaux Ca<sub>v</sub> et plus particulièrement des canaux Ca<sub>v</sub>1 a été longtemps suspectée en raison de la présence d'ARNm spécifiques de la sous-unité  $\alpha$ 1 dans des lymphocytes T ou dans le thymus (Brereton et al., 1997). De plus, l'inhibition de fonctions des lymphocytes T par des inhibiteurs pharmacologiques des canaux Ca<sub>v</sub>1 tendait à indiquer un rôle fonctionnel de ces canaux (Birnbaumer et al., 1984). Les conclusions de ces études ne remportaient pas l'unanimité essentiellement car il était difficile de comprendre comment un canal activé par dépolarisation pouvait fonctionner dans les lymphocytes T dont la membrane ne se dépolarise pas après activation. Le potentiel de membrane d'un lymphocyte T est de l'ordre de -50 mV (Robert et al., 2011). La complexité est aussi augmentée du fait de la variété

d'expression des sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta$  selon le type de lymphocyte T et leur état d'activation. De plus, il semble que les mêmes lymphocytes puissent co-exprimer plusieurs sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta$  posant la question du rôle respectif de chacune de ces sous-unités. Un autre élément de complexité est dans la structure même de la sous-unité  $\alpha 1$ . La plupart des auteurs tendent à expliquer l'absence de sensibilité au voltage des canaux  $Ca_v1$  dans les lymphocytes T par des différences structurelles (nouveaux variants d'épissage alternatifs). Les données *in vivo* ont consolidé le rôle des canaux  $Ca_v$  dans l'immunité. Le syndrome de Timothy par exemple, une maladie génétique mortelle très rare due à une mutation du gène de  $Ca_v1.2$ , s'accompagne d'une immunodéficiência (Bidaud and Lory, 2011). Par la suite, les données génétiques de souris déficientes ont consolidé le rôle des canaux  $Ca_v1$  dans la biologie des lymphocytes T mais leur fonctionnement reste encore très mal compris.

### **II.3.1) Canaux $Ca_v1$ au cours du développement des lymphocytes T dans le thymus**

La ciclosporine A, un inhibiteur de la voie NFAT altère le développement des thymocytes (Gao et al., 1988). La déficiencia en NFATc3, un facteur de transcription sensible au calcium exprimé dans les thymocytes au stade double positif, réduit considérablement la génération et la survie des lymphocytes T (Oukka et al., 1998). Ces données suggèrent fortement que la signalisation calcique est nécessaire au développement des lymphocytes T. Pourtant, l'invalidation génétique d'ORAI1 (Gwack et al., 2008) ou de STIM1 et STIM2 (Oh-Hora et al., 2008) n'empêche pas le développement des lymphocytes T laissant supposer qu'une autre voie calcique est impliquée. Jha et ses collaborateurs ont analysé l'expression globale des sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta$  des canaux  $Ca_v$  dans le thymus. Ils ont détecté des transcrits codant les sous-unités  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v1.4$ ,  $Ca_v2.1$ ,  $Ca_v2.2$  et  $Ca_v2.3$  sans déterminer quel type cellulaire exprime ou co-exprime ces sous-unités ni mesurer les niveaux d'expression relatifs. L'administration de la nicardipine, une dihydropyridine antagoniste des canaux  $Ca_v1$ , *in vitro* diminue la prolifération des thymocytes, ce qui n'est pas le cas des inhibiteurs pharmacologiques des canaux  $Ca_v2$  (Jha et al., 2015). Ces résultats sont donc en faveur de l'implication de canaux  $Ca_v1$  dans l'ontogénie des lymphocytes T. Et en effet, les souris invalidées pour  $Ca_v1.4$  présentent un défaut du nombre de thymocytes avec une réduction de la proportion de thymocytes simples positifs  $CD4^+$  par rapport aux simples positifs  $CD8^+$  (Omilusik et al., 2011).

En ce qui concerne les sous-unités auxiliaires  $\beta$ , Jha et ses collaborateurs ont mis en évidence l'expression des quatre sous-unités  $\beta 1$  à  $\beta 4$  dans le thymus. La sous-unité  $Ca_v\beta 2$  est fortement exprimée dans les thymocytes double-négatifs  $CD4^-CD8^-$  par comparaison

avec les thymocytes double-positifs et simples positifs. L'invalidation conditionnelle (sous le contrôle du promoteur du gène *lck*, *lymphocyte protein tyrosine kinase*) du gène *Cacnb2*, codant  $\beta 2$ , tôt au cours du développement des thymocytes (entre les stades double-négatif DN2 et DN3) a un impact profond sur leur développement avec une diminution drastique du nombre de thymocytes. Cette réduction est observée dès le stade double-négatif et est amplifiée aux stades double-positifs et simples positifs  $CD4^+$  et  $CD8^+$ . Les auteurs observent une perte d'expression de NFATc3 dans les thymocytes déficients pour  $Ca_v\beta 2$ , suggérant que la signalisation calcique et la voie dépendant de NFATc3 sont défectueuses en conditions basales dans les thymocytes en développement. Une des conséquences pourrait être la perte d'expression de gènes anti-apoptotiques et une moindre survie des thymocytes déficients. De plus, la perte d'expression des sous-unités  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  dans les thymocytes déficients pour *Cacnb2* peut laisser penser que  $Ca_v\beta 2$  stabilise l'expression de ces sous-unités (Jha et al., 2015). Cependant, la même équipe a montré que les souris invalidées pour  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  ne présentent pas d'anomalie du développement des lymphocytes T dans le thymus (Jha et al., 2015), pas plus que les souris déficientes pour  $Ca_v\beta 3$  ou  $Ca_v\beta 4$  (Badou et al., 2006).

Ainsi, malgré l'expression de nombreuses sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta$  des canaux  $Ca_v$  dans les thymocytes, les travaux de ces deux équipes montrent essentiellement un rôle de  $Ca_v1.4$  et de  $Ca_v\beta 2$  dans le développement des lymphocytes T.

Il faut toutefois noter que le groupe d'Allen a montré qu'un canal sodique dépendant du voltage ( $Na_v1.5$ ) était nécessaire à la sélection positive des thymocytes (Lo et al., 2012). Il serait intéressant de comprendre le rôle de ce canal et d'une éventuelle dépolarisation dans l'activation d'un ou plusieurs canaux  $Ca_v1$  lors de l'engagement du pré-TCR et plus tard au cours de celui du TCR réarrangé.

### **II.3.2) Canaux $Ca_v1$ dans les lymphocytes T périphériques**

L'expression des quatre sous-unités  $\alpha 1$  des canaux  $Ca_v1$  et des quatre sous-unités  $\beta$  a été mis en évidence dans les lymphocytes T (table 4).

Parmi les premiers travaux publiés à ce sujet, Stokes et son équipe avaient mis en évidence l'expression de  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  dans les cellules Jurkat, une lignée de lymphocytes T  $CD4^+$  humains. Les sous-unités de  $\beta 1$  et  $\beta 3$  détectées en western-blot avait un poids moléculaire identique à celui des protéines du cerveau mais, au contraire, les sous-unités  $\alpha 1$  de  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  présentaient des profils uniques (Stokes et al., 2004). Les auteurs suggéraient alors que ces protéines possédaient des isoformes d'épissage propres aux lymphocytes.

Badou et ses collaborateurs ont détecté l'expression des sous-unités  $\alpha 1$  de  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.4$  et des sous-unités auxiliaires  $Ca_v\beta 3$  et  $Ca_v\beta 4$  dans les lymphocytes T  $CD4^+$  de souris. Ils ont montré que l'expression de  $Ca_v\beta 3$  et  $Ca_v\beta 4$  augmentait après stimulation du TCR (Badou et al., 2006). Des souris ayant une mutation spontanée dans le gène *Cacnb4*, codant la sous-unité auxiliaire  $Ca_v\beta 4$ , entraînant une perte de fonction de la protéine sont appelées léthargiques et développent une épilepsie avec absences (Burgess et al., 1997). Des souris déficientes pour le gène *Cacnb3* codant la sous-unité auxiliaire  $Ca_v\beta 3$  ont été développées. Ces souris présentent une résistance à la douleur (Murakami et al., 2002) et une sécrétion d'insuline améliorée (Berggren et al., 2004). Les souris déficientes pour  $Ca_v\beta 3$  ou  $Ca_v\beta 4$  ne montrent pas de défaut du nombre de LT en périphérie (Jha et al., 2009) mais leurs lymphocytes T  $CD4^+$  présentent une réduction du pic d'augmentation et du plateau de  $[Ca]_i$  après pontage du TCR. L'élévation de  $[Ca]_i$  induit par la thapsigargine (un inhibiteur irréversible de la pompe SERCA responsable d'une déplétion pharmacologique des stocks de  $Ca^{2+}$  du RE et un influx de  $Ca^{2+}$  à partir du milieu extracellulaire via les canaux ORAI) n'est pas altérée. Ceci suggère fortement que la voie calcique dépendant d'ORAI n'est pas impactée par l'absence de  $\beta 3$  et  $\beta 4$ . De plus, il a été montré que la déficience de  $Ca_v\beta 4$  entraîne une diminution de la production des cytokines suite à l'engagement du TCR. L'expression diminuée du canal  $Ca_v1.1$  et pas celle des autres sous-unités  $\alpha 1$  dans les lymphocytes T  $CD4^+$  dépourvus de  $Ca_v\beta 3$  ou  $Ca_v\beta 4$  suggère que  $Ca_v1.1$  est impliqué dans la régulation calcique dans les LT  $CD4^+$  (Badou et al., 2006). Un article récent du groupe de Flavell laisse penser qu'un variant particulier de la sous-unité  $\alpha 1$  de  $Ca_v1.1$  présentant cinq nouveaux exons dans la partie 5' et une délétion de l'exon 29 serait la seule forme de  $Ca_v1.1$   $\alpha 1$  présente dans les lymphocytes T  $CD4^+$ . De plus, son expression est plus importante dans les lymphocytes T différenciés en conditions Th1 ou Th2 pendant des courtes périodes (2 à 4 jours). Étonnamment, la surexpression du cDNA est létale dans des cellules Jurkat et seules les cellules HEK transfectées ont pu être étudiées. Les résultats leur font conclure que ce cDNA suffit à augmenter la concentration calcique intracellulaire de base d'environ 70-80 nM à 200-400 nM. Cette augmentation n'est plus retrouvée avec des cDNA contenant l'exon 29 ou si les cellules sont traitées par la nifédipine (Matza et al., 2016).

De façon surprenante, le rôle d'une autre sous-unité  $\alpha 1$ ,  $Ca_v1.4$ , a aussi été mis en avant par le même groupe, à la fois dans les lymphocytes T murins  $CD4^+$  (Badou et al., 2006) et surtout dans les LT  $CD8^+$  (Jha et al., 2009). Des études d'immuno-précipitation dans les lymphocytes T  $CD8^+$  révèlent que  $Ca_v1.4$  est localisé dans les rafts lipidiques et co-immunoprécipite en partie avec vav et la src kinase lck. De plus, cette étude montre l'association de  $Ca_v\beta 3$  avec les kinases lck et ZAP-70, les adaptateurs vav et nck. Les

auteurs proposent que  $Ca_v1.4$  est localisé à la membrane plasmique, même en absence d'activation du TCR (Jha et al., 2009).

Le rôle de  $Ca_v1.4$  a également été étudié par l'équipe de Jefferies. Ces auteurs ont mis en évidence par électrophysiologie des courants calciques entrants dans des lymphocytes T sauvages avec des caractéristiques compatibles avec des courants  $Ca_v1.4$  et leur absence dans les lymphocytes T déficients (Omilusik et al., 2011). Ils ont isolé plusieurs transcrits différents codés par le gène de  $Ca_v1.4$ , dont un similaire à la séquence du canal  $Ca_v1.4$  de la rétine et deux isoformes tronquées. Comme observé par le groupe de Flavell par rapport à  $Ca_v1.1$ , ces deux transcrits de  $Ca_v1.4$  codent pour des protéines tronquées au niveau du domaine IV et de l'extrémité C-terminale pouvant expliquer l'absence de sensibilité du canal au voltage (Kotturi and Jefferies, 2005). Le rôle de  $Ca_v1.4$  a été montré par l'étude des souris dont le gène *Cacna1f* (codant  $Ca_v1.4$ ) a été invalidé. Les résultats montrent que la délétion de  $Ca_v1.4$  engendre une diminution du nombre de lymphocytes T dans le thymus et en périphérie, une capacité réduite à proliférer en réponse à la vacuité du compartiment T (prolifération homéostatique) et une survie diminuée des lymphocytes T périphériques. En parallèle les lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  naïfs et mémoires présentent une diminution de l'augmentation de  $[Ca]_i$  suite à l'engagement du TCR mais aussi en réponse à la déplétion des stocks du RE (Omilusik et al., 2011).

Il est connu qu'une interaction entre lymphocyte T  $CD4^+$  et cellule dendritique en absence d'inflammation et d'antigène exogène est nécessaire à l'homéostasie des lymphocytes T  $CD4^+$  naïfs (Revy et al., 2001), ceci en induisant une entrée basale de calcium. Jefferies suggère que cet influx serait supporté par les canaux  $Ca_v1.4$  et que ceux-ci s'activeraient suite la présentation d'antigènes du soi au TCR des LT  $CD4^+$  naïfs (Omilusik et al., 2011). Ainsi, l'association de  $Ca_v1.4$  avec des molécules de signalisation contribuerait à une signalisation  $Ca^{2+}$  tonique du fait de l'interaction du TCR avec des antigènes du soi présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité, permettant la survie du lymphocyte. Certains points restent néanmoins à éclaircir. Le défaut d'activation de l'entrée de calcium dépendant de STIM/ORAI suggéré par la diminution d'augmentation de  $[Ca]_i$  induite par le traitement par la thapsigargine dans les lymphocytes déficients pour *Cacna1f* pourrait s'expliquer par un possible rôle de  $Ca_v1.4$  dans le remplissage des stocks de  $Ca^{2+}$  du RE. Il sera aussi important de déterminer quelle(s) forme(s) de la protéine  $Ca_v1.4$  exprimée dans les LT est fonctionnelle entre l'isoforme native et les deux tronquées.

En accord avec le rôle de  $Ca_v1.4$  dans la fonction des lymphocytes T, l'analyse des cellules mononuclées humaines du sang périphérique montre la prédominance des transcrits codant  $Ca_v1.4$ ,  $Ca_v\beta1$  et  $Ca_v\beta3$  dans les lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  T naïfs en comparaison avec les cellules mémoires. L'expression de  $Ca_v1.4$  reste toutefois détectable dans la plupart des

populations de lymphocytes T effecteurs différenciés *in vitro* en utilisant les cocktails appropriés de cytokines et anticorps anti-cytokines (Robert et al., 2014).

Canal Ca <sub>v</sub> considéré	Expression	Type cellulaire	Analyse fonctionnelle	Démonstration	Référence
Ca <sub>v</sub> 1	ARNm	lignée T humaine			Brereton, 1997
Ca <sub>v</sub> 1	ARNm	hybridome T murin	Implication dans la réponse calcique et la production de cytokines, régulation par la PKC $\alpha$	agonistes et inhibiteurs pharmacologique	Savignac, 2001
Ca <sub>v</sub> 1	ARNm	LT humains du sang périphérique			Grafton, 2003
Ca <sub>v</sub> 1	ARNm/protéine	LTh2 murins	Implication dans la réponse calcique et la production de cytokines	inhibiteur pharmacologique	Savignac, 2004
Ca <sub>v</sub> 1.1	protéine	LT CD4 <sup>+</sup> Th1 et Th2 murins	Implication dans la réponse calcique Epissage particulier constitutionnellement ouvert	inhibiteur pharmacologique et siRNA surexpression dans HEK	Matza, 2016
Ca <sub>v</sub> 1.1 et Ca <sub>v</sub> 1.2	protéine	LT CD4 <sup>+</sup> murins	Expression membranaire dépendante de AHNAK1	souris <i>knock-out</i>	Matza, 2008
Ca <sub>v</sub> 1.2 et Ca <sub>v</sub> 1.3	ARNm/protéine	LT humains du sang périphérique et lignée T humaine	Implication dans la réponse calcique Isoformes protéiques uniques	inhibiteur pharmacologique western-blot	Stokes, 2004
Ca <sub>v</sub> 1.2 et Ca <sub>v</sub> 1.3	ARNm/protéine	LTh2 murins	Implication dans la réponse calcique et la production de cytokines	ODN antisens séquençage	Djata Cabral, 2010
Ca <sub>v</sub> 1.4	ARNm	LT humains du sang périphérique et lignée T humaine	Implication dans la réponse calcique et la production de cytokines	agoniste et inhibiteur pharmacologique	Kotturi, 2003
Ca <sub>v</sub> 1.4	ARNm/protéine	LT humains du sang périphérique et lignée T humaine	Transcrits uniques (protéines insensibles au voltage ?)	séquençage	Kotturi, 2005
Ca <sub>v</sub> 1.4	protéine	LT CD4 <sup>+</sup> murins	Implication dans l'homéostasie et la réponse calcique des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> naïfs	souris <i>knock-out</i>	Omilusik, 2011
Ca <sub>v</sub> 1.1 et Ca <sub>v</sub> 1.2	ARNm/protéine	LT CD4 <sup>+</sup> murins	Réponse calcique et production de cytokines dépendantes de Ca <sub>v</sub> $\beta$ 3 et $\beta$ 4	souris <i>knock-out</i>	Badou, 2006
Ca <sub>v</sub> 1.4	ARNm				
Ca <sub>v</sub> 1.2	ARNm/protéine	LTh2 mémoires humains	Implication dans la réponse calcique et la production de cytokines	inhibiteur pharmacologique et ODN antisens	Robert, 2014
Ca <sub>v</sub> 1.3	ARNm				
Ca <sub>v</sub> 1.4	ARNm				
Ca <sub>v</sub> 3.1	protéine	LT CD4 <sup>+</sup> murins	Implication dans la réponse calcique et la production de cytokines	souris <i>knock-out</i>	Wang, 2016

**Table 4 : Tableau récapitulatif des différentes sous-unités des canaux Ca<sub>v</sub> exprimés dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

Enfin très récemment, une autre équipe a mis en évidence l'expression de canaux  $Ca_v3$  dans les lymphocytes T. Indétectables dans le thymus, les canaux  $Ca_v3.1$  sont exprimés dans les LT  $CD4^+$  en périphérie et engendrent un courant calcique caractéristique des canaux  $Ca_v3.1$  et indépendant de la voie du courant CRAC. Les lymphocytes T  $CD4^+$  invalidés pour *Cacna1g*, codant  $Ca_v3.1$ , et différenciés *in vitro* en Th17 présentent une réduction de la production de cytokines. Cela n'est pas retrouvé pour les Th2 et dans une moindre mesure pour les Th1 (la production de  $TNF-\alpha$  est diminuée mais pas celle d' $IFN-\gamma$ ). Pour finir, les souris déficientes sont en partie protégées du développement de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, le modèle murin de la sclérose en plaque qui est caractérisé par une inflammation de type Th1/Th17 dans le système nerveux central (Wang et al., 2016).

### **II.3.3) Expression sélective des canaux $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ dans les lymphocytes Th2 murins et humains**

A l'origine, notre équipe s'est attachée à expliquer les différences dans la réponse calcique et fonctionnelle entre lymphocytes Th1 et Th2 suite à la stimulation du TCR. La première étude a montré que deux lignées d'hybridomes T murins producteurs d'IL-4 apparentés à des LTh2 expriment des transcrits pour un canal calcique de type L. L'utilisation du (+) Bay K 8644, une dihydropyridine antagoniste des canaux  $Ca_v1$ , inhibe très fortement la réponse calcique dépendante du TCR et la production d'IL-4 dans ces hybridomes. De plus, une DHP agoniste suffit à induire une entrée de calcium (Savignac et al., 2001). Ce travail a donc démontré l'implication d'un canal calcique voltage dépendant dans l'établissement d'un influx calcique dans des cellules non excitables ; ainsi que la nécessité de ce courant dans la fonction de ces cellules. Cette étude a aussi mis en évidence l'implication d'une isoforme particulière des PKC, la  $PKC\alpha$ , dans ce phénomène et la translocation de cette dernière à la membrane lors de la stimulation du TCR (Savignac et al., 2001). La caractérisation de cette  $PKC\alpha$  est d'autant plus intéressante qu'elle ne fait pas partie, à l'exception des LTh17 (Meisel et al., 2013), des PKC communément décrites pour leur rôle dans la réponse des lymphocytes T.

Ces travaux ont été poursuivis ensuite dans des lymphocytes T primaires de souris. Des canaux calciques de type L sensibles aux dihydropyridines ont été mis en évidence dans les LTh2, cela de façon sélective puisqu'ils sont absents dans les LTh1. L'inhibition de ces canaux par des dihydropyridines diminue la réponse calcique et de la production de cytokines dans les Th2 uniquement. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de ces canaux dans plusieurs modèles d'inflammation de type Th2 chez le rat *in vivo* a permis de réduire nettement l'inflammation (Savignac et al., 2004). Cette étude a donc exposé le potentiel des canaux  $Ca_v1$  dans le cadre des pathologies de type Th2.

Les lymphocytes Th2 étant impliqués dans l'allergie, l'équipe a testé les dihydropyridines dans le cadre du traitement de l'asthme. La nifédipine s'est révélée efficace pour réduire les paramètres inflammatoires dans un modèle murin d'asthme actif (induit par une immunisation intra-péritonéale d'ovalbumine en alum et des resensibilisations par inhalation d'ovalbumine après deux semaines) (Gomes et al., 2007a).

Par la suite, ces canaux de type L ont été identifiés comme les canaux  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  (Djata Cabral et al., 2010). Bien que Stokes et son équipe avait suggéré que les sous-unités  $\alpha 1$  de  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  possédaient des isoformes uniques et propres aux lymphocytes (Stokes et al., 2004), l'analyse de  $Ca_v1.2$  issue des lymphocytes Th2 de souris par séquençage a révélé que cette protéine est structurellement identique à l'isoforme exprimée dans les neurones (Djata Cabral et al., 2010).

Une nouvelle approche, des oligonucléotides antisens ciblant  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$ , a ensuite permis de confirmer *in vitro* que ces canaux sont tous deux essentiels à la réponse calcique et à la production de cytokines en réponse à la stimulation du TCR dans les Th2 de souris. De plus, les lymphocytes Th2 spécifiques de l'ovalbumine transfectés avec des ODN antisens spécifiques des sous-unités  $\alpha 1$  de  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  se sont révélés incapables d'induire un asthme après transfert chez des souris inhalant de l'ovalbumine. Enfin, ces oligonucléotides antisens inhalés par des souris soumises à un protocole d'asthme actif préviennent le développement de l'asthme (Djata Cabral et al., 2010). Le modèle d'asthme actif consiste en une immunisation par voie intra-péritonéale d'ovalbumine et d'adjuvant alum (favorisant une réponse Th2) suivie de sensibilisations par plusieurs inhalations d'ovalbumine alors que l'asthme passif consiste en un transfert adoptif de LTh2 par voie intraveineuse également suivie de resensibilisations par des inhalations d'ovalbumine. Le premier modèle, plus physiologique, montre que cibler les canaux de façon globale dans le poumon par une technique utilisable chez l'homme a un effet préventif sur le développement de l'inflammation. Le second modèle permet de montrer que cibler les canaux uniquement dans les Th2 est suffisant à cet effet bénéfique.

Plus récemment, notre équipe a étendu ces résultats dans des lymphocytes Th2 humains. Pour cela, des lymphocytes Th2 mémoires humains ( $CRTH2^+$ ) ont été expandus à partir de lymphocytes T du sang périphérique. L'expression de  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  a été retrouvée de façon sélective dans les Th2 humains. De même que chez la souris, les dihydropyridines et les oligonucléotides antisens ciblant  $Ca_v1.2$  se sont révélés efficaces pour inhiber la réponse calcique et la production de cytokines après stimulation du TCR dans ces cellules. D'autre part, notre équipe a montré qu'un activateur des PKC classiques ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) et nouvelles ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), le phorbol myristate acetate, induit une réponse calcique dans les lymphocytes Th2 humains. De plus, un inhibiteur des PKC $\alpha/\beta$  réduit très fortement la réponse calcique et la production de cytokines de ces cellules en réponse à la stimulation du TCR (Robert et al.,

2014), tendant à confirmer le rôle de la PKC $\alpha$  observé dans les hybridomes murins (Savignac et al., 2001).

Ce travail a donc permis de confirmer la validité des canaux Ca<sub>v</sub>1.2 et Ca<sub>v</sub>1.3 comme cible thérapeutique sélective des lymphocytes Th2 dans le cadre des pathologies allergiques humaines.

### III) L'asthme allergique, une pathologie Th2

L'asthme est une maladie complexe et hétérogène du système respiratoire qui affecte 300 millions de personnes dans le monde. C'est une maladie aux phénotypes très variés dont les différents stades vont de l'asthme intermittent à l'asthme sévère avec obstruction bronchique permanente. Elle se caractérise par une hyperréactivité bronchique, conséquence d'une inflammation chronique des voies aériennes et d'un remodelage bronchique. Elle entraîne une réduction du diamètre interne des voies aériennes à l'origine d'une respiration sifflante et d'un essoufflement, les principaux symptômes de la maladie.

#### III.1) Physiopathologie de l'asthme

Le remodelage bronchique dans l'asthme désigne un ensemble de modifications structurales de la paroi bronchique. On observe ainsi dans les bronches de patients asthmatiques une altération de l'épithélium, une hyperplasie des cellules à mucus, un épaississement du tissu conjonctif avec une fibrose sous épithéliale liée à un dépôt de protéines de la matrice extracellulaire, une hypertrophie des glandes séromuqueuses, une néoangiogenèse et une hyperplasie du muscle lisse bronchique (Bara et al., 2010). De très nombreux facteurs participent à ce remodelage, notamment des facteurs de croissance et des cytokines. Quelques uns des plus importants sont le *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), le *platelet derived growth factor* (PDGF) et l'interleukine 6 (IL-6). Ces molécules sont produites par une grande variété de cellules : essentiellement des cellules du système immunitaire (lymphocytes, macrophages et surtout éosinophiles...) mais également des cellules du tissu bronchique (cellules épithéliales et cellules musculaires lisses) en réponse à des signaux inflammatoires (Hamid and Tulic, 2009). De plus, dans des conditions inflammatoires, l'épithélium et le muscle lisse en plus de produire des molécules propices au remodelage vont également libérer des molécules pro-inflammatoires comme des cytokines et chimiokines (Berger et al., 2002). Ainsi, le remodelage est une conséquence de l'inflammation mais la bronche remodelée par l'inflammation participe à renforcer cette inflammation. Ces phénomènes sont donc responsables d'un cercle vicieux renforçant la chronicité de l'inflammation.

L'inflammation des voies respiratoires dans l'asthme allergique est quasi exclusivement de type Th2. Les Th2 différenciés vont produire des cytokines capables de maintenir les DC vers une orientation pro-Th2 (Na et al., 2016), activer des mastocytes et des granulocytes producteurs de médiateurs inflammatoires, ou encore induire la commutation isotypique vers les IgE et IgG1 dans les lymphocytes B. On peut également retrouver des inflammations de

type Th1/Th17 mais celles-ci sont limitées à certains cas d'asthmes sévères (Hamid and Tulic, 2009).

La mise en place de l'inflammation dans l'asthme débute par une première étape de sensibilisation. Les antigènes de l'environnement qui sont régulièrement au contact de l'épithélium bronchique sont capables d'induire la production de cytokines par les cellules épithéliales. De plus, certains antigènes, par leur activité protéasique, sont plus particulièrement allergéniques. Ces allergènes vont instruire les cellules dendritiques présentes dans les bronches pour promouvoir une réponse Th2. Le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) et le TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) produits par les cellules épithéliales au contact d'allergènes jouent un rôle important dans cette instruction. Une autre population de cellules activées précocement sont les ILC-2. Récemment mises en évidence, les innate lymphoid cells de type 2 sont des cellules de l'immunité innée très proches fonctionnellement des lymphocytes Th2. Dans le poumon, les ILC-2 sont activés par les cytokines TSLP, IL25 et l'IL-33 produites par l'épithélium lésé. Comme les Th2, elles expriment le facteur de transcription GATA3 et sont capables de produire de l'IL-5, de l'IL-9 et de l'IL13 (Huang and Paul, 2015). La production d'IL-4 a été observée seulement *in vitro* et pour des stimulations non physiologiques (phorbol myristate acetate et ionomycine) (Moro et al., 2010). L'IL-13 produite par les ILC-2 est cruciale dans le recrutement des DC et leur instruction pro-Th2 (Halim et al., 2014). Les cellules dendritiques ainsi activées et polarisées peuvent ainsi migrer vers les ganglions drainants des voies respiratoires. C'est dans ces ganglions que va avoir lieu l'activation et la différenciation des lymphocytes CD4 naïfs en lymphocytes Th2 différenciés. Les lymphocytes T activés et spécifiques pour l'antigène deviennent des LT mémoires, capables de migrer vers les voies respiratoires (Medoff et al., 2008).

Lors d'un nouveau contact avec l'antigène (exacerbation), l'activation des DC aura lieu à nouveau mais cette fois, les DC activeront directement des LT mémoires, localement et dans les ganglions. Les LTh2 mémoires des ganglions proliféreront au sein de ces organes et migreront vers les voies respiratoires pour soutenir les LT mémoires activés localement. Ce sont ces lymphocytes Th2 mémoires activés qui sont à l'origine des exacerbations, ou crises d'asthmes, et de l'inflammation chronique (Medoff et al., 2008). Bien que plus de 30 cytokines soient impliquées dans l'asthme, les cytokines produites par les Th2 (l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 mais également l'IL-9) ont un rôle prépondérant (Hamid and Tulic, 2009).

L'IL-4 favorise la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en LTh2. En plus des LTh2, l'IL-4 est produite par d'autres populations cellulaires du système immunitaire (basophiles, éosinophiles...). D'autre part, l'IL-4 augmente l'expression de la protéine d'adhérence VCAM-1 sur les cellules endothéliales, permettant le recrutement des cellules exprimant les

intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$  : en particulier les lymphocytes et les éosinophiles (Iademarco et al., 1995). L'IL-4 agit également sur les lymphocytes B. Cette cytokine était décrite à l'origine comme le B-cell stimulatory factor 1, favorisant la prolifération (Rabin et al., 1985), la survie (Illera et al., 1993) et l'activation (Noelle et al., 1984) des lymphocytes B. De plus, l'IL-4 est la principale cytokine permettant d'induire la commutation isotypique dans les lymphocytes B vers la production d'immunoglobulines E (Lundgren et al., 1989). La présence d'IgE est l'une des principales caractéristiques de l'asthme et de l'allergie en général. Quasiment indétectables dans le sérum de personnes saines, les IgE voient leur concentration multipliée par 100 dans le sérum de patients allergiques (Dreskin et al., 1987). Ces IgE complexés à un antigène se lient à des récepteurs spécifiques (Fc $\epsilon$ R) exprimés par les éosinophiles, les basophiles et surtout les mastocytes. Les mastocytes et les granulocytes (éosinophiles, basophiles et neutrophiles) sont des cellules de la lignée hématopoïétique appartenant à l'immunité innée (Hamid and Tulic, 2009). Ils possèdent des granules contenant différents types de médiateurs chimiques. Après liaison des IgE à leur récepteur, les mastocytes libèrent de l'histamine et des molécules inflammatoires (leukotriènes, prostaglandines et cytokines). C'est la dégranulation très rapide des mastocytes (de l'ordre de quelques minutes) en réponse à un antigène opsonisé par des IgE qui est à l'origine des crises d'asthme, l'histamine étant un très puissant agent contractile du muscle lisse bronchique (Holgate and Polosa, 2008). Enfin, l'IL-4 agit aussi en améliorant l'activation des ILC-2 (Motomura et al., 2014). On sait qu'en fait les ILC-2 et les Th2 se soutiennent mutuellement. OX40L est une molécule de co-stimulation exprimée par les ILC-2 qui interagit avec le récepteur membranaire OX40 exprimé par les LTh2. Les ILC-2 favoriseraient l'activation et la différenciation des LTh2 par un mécanisme mettant en jeu le couple OX40L-OX40 (Drake et al., 2014) ; ainsi que par la présentation d'antigène via des molécules de CMH-II (Mirchandani et al., 2014). En retour, les Th2 produisent de l'IL-2 qui améliore la prolifération des ILC-2 et leur production d'IL-13 (Mirchandani et al., 2014). Les ILC-2 produiraient aussi de l'IL-4 quand elles sont cultivées avec des LT CD4<sup>+</sup> activés, favorisant la différenciation en Th2 (Drake et al., 2014), mais la production d'IL-4 par les ILC-2 *in vivo* reste à être déterminée.

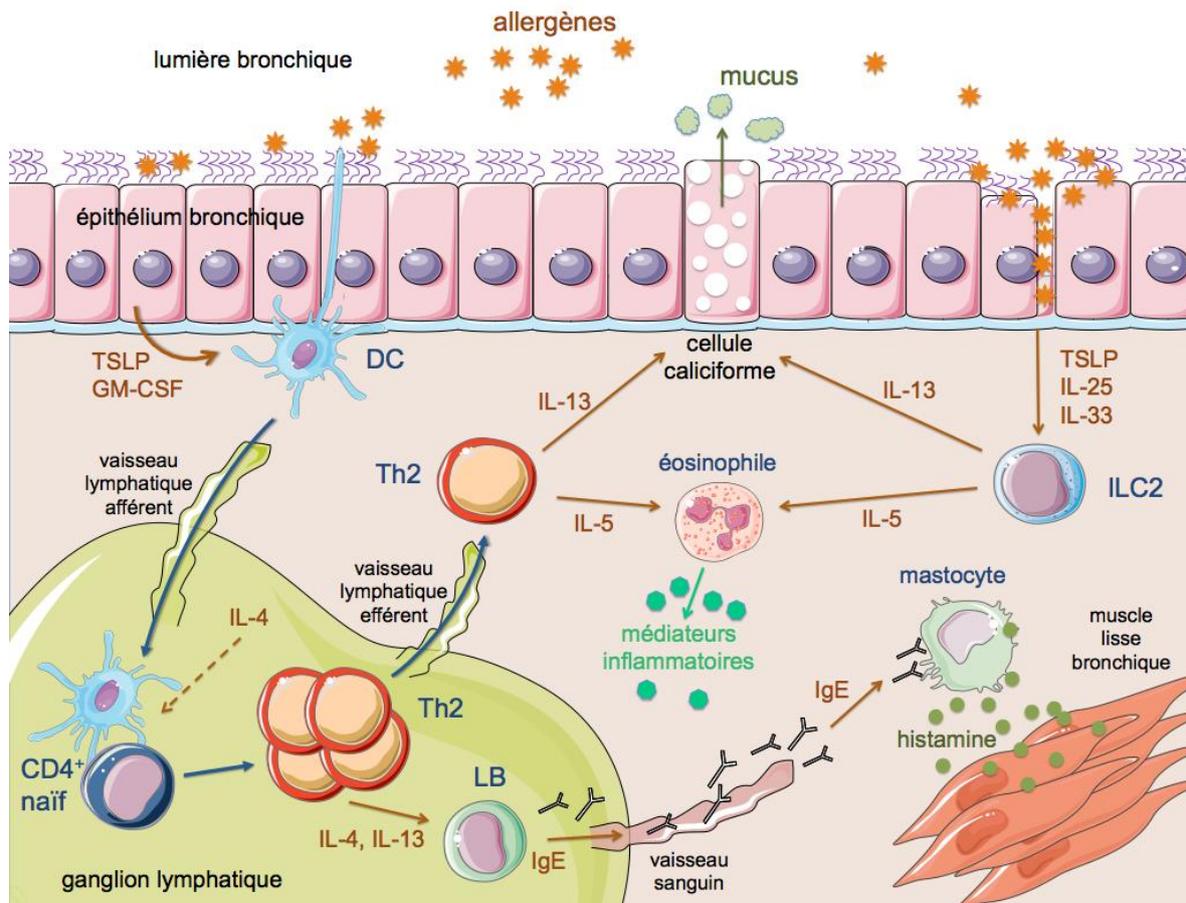
L'IL-5 est essentiel à la mise en place des éosinophiles, une des populations cellulaires les plus représentées dans les poumons asthmatiques. L'IL-5 est essentielle pour ces cellules car elle contrôle à la fois leur différenciation à partir des précurseurs dans la moelle osseuse, leur croissance et leur prolifération (Yamaguchi et al., 1988), leur survie (Yamaguchi et al., 1991), leur migration (Collins et al., 1995) et leur activation (Takafuji et al., 1996). Les éosinophiles possèdent des granules contenant différents types de molécules : des protéines cytotoxiques, des médiateurs lipidiques, des cytokines (dont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et le GM-

CSF) et des chimiokines. La libération de tous ces facteurs contribue à la chronicité de l'inflammation des voies respiratoires (Hamid and Tulic, 2009).

L'IL-13 et l'IL-4 sont deux protéines possédant environ 25% d'homologie mais structurellement très proches. Elles sont codées par deux gènes ayant probablement évolué à partir d'un gène commun (Wills-Karp, 2004). Leurs récepteurs sont également très proches. Ils sont composés de dimères et partagent tous deux une chaîne IL-4R $\alpha$ . Le récepteur à l'IL-4 (IL-4R) possède en plus une chaîne commune  $\gamma$  ( $\gamma$ c) et le récepteur à l'IL-13 (IL-13R) une chaîne IL-13R $\alpha$ . De par leur chaîne identique, ces deux récepteurs activent des voies de signalisation communes (dépendantes du facteur de transcription STAT6) et l'IL-4 et l'IL-13 ont parfois un effet redondant. Cependant, les chaînes uniques peuvent aussi induire des voies de signalisation différentes, comme la voie IRS-2 (*insulin receptor substrate 2*) / PI3-kinase pour l'IL-4R. Les lymphocytes T n'expriment pas la chaîne IL-13R $\alpha$  et les lymphocytes B l'expriment faiblement. Cela explique que ces cellules ne soient pas ou peu sensibles à l'IL-13 et dépendent de l'IL-4 pour engendrer la différenciation Th2 et la commutation isotypique des lymphocytes B vers les IgE (Gour and Wills-Karp, 2015).

Un des rôles essentiels de l'IL-13 dans l'asthme est d'induire l'hypersécrétion de mucus par l'épithélium. Ce mucus est libéré par des cellules caliciformes et est responsable de l'encombrement des bronches et de la toux (Kuperman et al., 2002). De plus, il a été montré que l'IL-13 à elle seule est capable d'induire une hyperréactivité bronchique indépendamment de la mise en place des marqueurs inflammatoires classiques de l'asthme, IgE et éosinophiles. Cette hyperréactivité est probablement causée par un effet de remodelage du muscle lisse (Wills-Karp et al., 1998). Dans ce sens, il a été montré que l'IL-13 est capable d'induire une fibrose pulmonaire chez la souris en déclenchant la libération du facteur de croissance TGF- $\beta$  (Lee et al., 2001).

L'IL-9 est une cytokine plus singulière. Elle a été longtemps considérée comme une cytokine spécifique des lymphocytes Th2 (Soussi-Gounni et al., 2001). En fait, elle est produite par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> différenciés en présence d'IL-4 et de TGF- $\beta$  (Schmitt et al., 1994). Ces signaux activent dans ces cellules des voies de signalisation communes aux Th2 mais également des voies distinctes. Cela a conduit à considérer les lymphocytes CD4<sup>+</sup> producteurs d'IL-9 comme une population de lymphocytes T auxiliaires à part entière, les lymphocytes Th9 (Kaplan et al., 2015). L'IL-9 a un effet très délétère dans l'asthme en agissant sur de nombreux acteurs. Cette cytokine favorise la libération de mucus et de chimiokines par l'épithélium, l'expression d'IL-8 par les neutrophiles, la production d'IgE dépendante de l'IL-4 par les lymphocytes B, l'expression du récepteur à l'IL-5 par les éosinophiles et donc leur survie et leur différenciation, la prolifération et la production d'IL-6 par les mastocytes ou encore la survie et la prolifération des lymphocytes T (Soussi-Gounni et al., 2001).



**Figure 19 : Physiopathologie de l'asthme allergique.** La flèche en pointillés représente la source précoce d'IL-4 nécessaire à la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en LTh2. DC : cellule dendritique, ILC2 : *innate lymphoid cell 2*, LB : lymphocyte B, IL : interleukine, IgE : immunoglobuline de type E, GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, TSLP : *thymic stromal lymphopoietin*.

Ainsi les cytokines produites par les lymphocytes Th2, par leurs actions pléiotropes sont essentielles à l'inflammation dans l'asthme. De façon très simplifiée, elles agissent et permettent de mettre en place d'autres types de cellules inflammatoires, notamment des mastocytes à l'origine des crises d'asthmes et les éosinophiles à l'origine de l'inflammation chronique et du remodelage. Elles représentent donc des cibles de traitements privilégiées.

### III.2) Les traitements actuels et futurs de l'asthme

Les traitements classiques utilisés par les patients asthmatiques sont de différentes natures et le plus couramment symptomatiques. Les  $\beta_2$ -agonistes et corticostéroïdes sont les plus communément utilisés mais bien d'autres molécules sont utilisées pour réduire l'inflammation ou prévenir la bronchoconstriction. Les traitements approuvés et utilisés par les malades sont spécialement adaptés à chaque phénotype d'asthme (table 5). De nombreux autres types de thérapies sont actuellement en cours de développement et cherchent à cibler spécifiquement la réponse Th2 et à traiter l'inflammation de façon durable.

Les agonistes des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques, comme le salbutamol, se lient à des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques exprimés par le muscle lisse. Ils sont appliqués par inhalation et fonctionnent en activant la voie de la protéine kinase A (PKA) qui a un effet relaxant sur le muscle lisse. On les classe en deux catégories : les SABA (*short-acting  $\beta$ 2-adrenoceptor agonists*) et LABA (*long-acting  $\beta$ 2-adrenoceptor agonists*). Les SABA permettent d'entraîner immédiatement la broncho-dilatation en cas de crise d'asthme. Les LABA agissent de la même façon mais restent efficaces sur plusieurs heures. De plus, certains travaux montrent que les LABA potentialisent l'effet des corticostéroïdes (Holgate and Polosa, 2008).

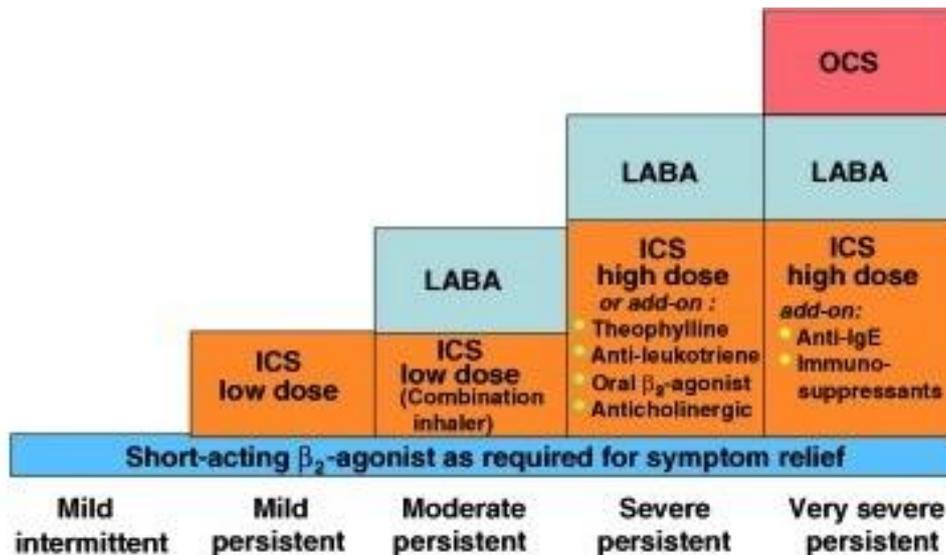
Les corticostéroïdes sont des anti-inflammatoires utilisés par inhalation mais également par voie orale par les asthmatiques sévères. Ils diffusent à travers la membrane plasmique pour se fixer à des récepteurs cytoplasmiques capables de transloquer dans le noyau pour réguler l'expression génique. L'expression des facteurs de transcription NF $\kappa$ B et AP1, qui sont particulièrement importants pour l'activation des cellules du système immunitaire, est particulièrement régulée par ce traitement (Holgate and Polosa, 2008).

Les antihistaminiques  $H_1$  sont des antagonistes des récepteurs à l'histamine  $H_1$ . Ils permettent de contrer l'effet bronchoconstricteur de l'histamine libéré par les mastocytes. Une seconde génération d'antihistaminiques est actuellement utilisée. Ceux-ci ont l'avantage de ne pas traverser la barrière hémato-encéphalique et ont moins d'effets secondaires au niveau du cerveau, l'histamine étant aussi un neuromédiateur (Holgate and Polosa, 2008).

Les leucotriènes sont une famille de lipides très délétères dans l'asthme. Ils ont un rôle chimioattractant pour les cellules inflammatoires mais possèdent aussi un effet constricteur sur le muscle lisse bronchique. Les leucotriènes étant insensibles aux corticostéroïdes, des inhibiteurs du récepteur aux cysteinyl leucotriènes 1 (CysLTR1) sont utilisés en complément des corticostéroïdes inhalés (Holgate and Polosa, 2008).

Un inhibiteur des phosphodiesterases, la théophylline, est utilisé dans les cas d'asthmes sévères. Les phosphodiesterases convertissent les seconds messagers AMPc et GMPc en AMP et GMP inactifs. La théophylline permet donc de réguler positivement l'AMPc, un activateur de la PKA, et donc de favoriser la broncho-dilatation du muscle lisse (Holgate and Polosa, 2008).

Plusieurs traitements ciblant les IgE ou leurs récepteurs sont actuellement en phase d'essai clinique (Holgate, 2008). L'Omalizumab est un anticorps bloquant dirigé contre la partie constante des IgE. Il s'agit du premier anticorps bloquant approuvé dans le cadre du traitement de l'asthme. Cette molécule est déjà sur le marché et utilisée en thérapeutique humaine. Son application est néanmoins limitée en raison du faible bénéfice par rapport aux traitements traditionnels. Il est aujourd'hui utilisé en complément à ces traitements dans les asthmes sévères à fortes concentrations d'IgE (Pelaia et al., 2012).



**Table 5 : Traitements recommandés pour chaque phénotype d'asthme selon la Global Initiative for Asthma.** ICS : corticostéroïdes inhalés, LABA : agonistes des  $\beta_2$ -adrenocepteurs de longue durée, OCS : corticostéroïdes par voie orale.

Barnes, P.J. 2010. New therapies for asthma: is there any progress? *Trends Pharmacol Sci*.

La désensibilisation est une approche complètement différente qui vise à reprogrammer la réponse immunitaire en induisant une tolérance vis à vis de l'allergène par une stratégie assez similaire à une vaccination. Elle consiste à mettre les patients en contact avec des doses faibles puis croissantes d'allergène purifié. La désensibilisation est une idée relativement ancienne qui commence seulement à être généralisée dans de nombreuses allergies, notamment l'asthme. Pour être envisageable, elle nécessite la présence d'IgE spécifiques d'antigènes précisément identifiés dans le sang. La désensibilisation induit un basculement de la réponse immunitaire Th2 vers des réponses de type Th1 mais permet surtout la mise en place de lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Treg produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  qui ont un effet anti-inflammatoire en agissant au niveau des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de nombreuses autres populations cellulaires (Moote and Kim, 2011). Les mécanismes cellulaires précis à l'origine de cette désensibilisation ne sont pas complètement connus mais il apparait clairement que l'exposition répétée à des allergènes induit l'activation et la maturation de DC tolérogènes dans les voies respiratoires. Ces DC produisent de l'IL-10 en permettant la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Tregs (Akbari et al., 2001). La désensibilisation entraîne également une diminution de la proportion d'IgE au profit d'IgG et l'apparition d'IgG bloquantes qui ciblent les médiateurs inflammatoires libérés par les mastocytes et les éosinophiles. La désensibilisation est la seule approche visant véritablement à soigner l'asthme. Ce traitement est plus efficace lorsqu'il est débuté rapidement après le diagnostic de l'asthme et a donné des résultats très efficaces chez l'enfant (Moote and Kim, 2011).

Une part importante des travaux en cours pour mettre au point de nouveaux traitements vise l'inflammation et les cytokines, plus particulièrement dans le but de bloquer l'activité des cytokines Th2. Cibler des molécules inflammatoires très précises a déjà donné des résultats très prometteurs chez l'animal et de nombreuses molécules sont déjà en phase d'essais cliniques chez l'homme (table 6). Ces molécules sont de plusieurs types : des anticorps bloquants ciblant les cytokines ou leurs récepteurs, des protéines recombinantes solubles composées de la partie extracellulaire de leurs récepteurs, ou encore des protéines recombinantes conçues pour déclencher une réponse vaccinale. Le pascolizumab, par exemple, est un anticorps bloquant contre le récepteur à l'IL-4. L'altrakincept est une protéine recombinante basée sur la partie extracellulaire du récepteur à l'IL-4. Ils ont été jugés efficaces en phase II mais ces résultats n'ont pas été confirmés en phase III. Le mepolizumab est un anticorps bloquant contre l'IL-5. Il est considéré comme très efficace pour éliminer les éosinophiles mais est sans effet sur l'inflammation globale et l'hyperréactivité bronchique. Le MEDI-528, un anticorps contre l'IL-9, et l'IMA-638, un anticorps ciblant l'IL-13, sont également en phase II (Holgate and Polosa, 2008). Le dupilumab, un anticorps ciblant la chaîne commune des récepteurs à l'IL-4 et l'IL-13 est l'anticorps bloquant aux résultats les plus encourageants. Il a passé avec succès les essais cliniques et est considéré aujourd'hui comme un futur traitement très prometteur dans le cadre des allergies et de l'asthme (Wenzel et al., 2013). L'efficacité du dupilumab par rapport aux anticorps cités précédemment, qui malgré leur effet sur la cytokine visée n'ont pas forcément apporté d'améliorations cliniques notables, tend à confirmer l'idée que cibler plusieurs cytokines sera un prérequis à tout traitement efficace dans le futur.

Drogue	Fabriquant	Cible	Effet <i>in vivo</i> chez l'homme	Développement
Omalizumab	Genentech,	IgE	Réduit les exacerbations, améliore les symptômes et la qualité de vie	Approuvé le 20/06/2003
Mepolizumab	GlaxoSmithKline	IL-5	Diminue le nombre d'éosinophiles et la fréquence des exacerbations	Approuvé le 4/11/2015
Reslizumab	Teva Respiratory	IL-5	Diminue le nombre d'éosinophiles dans les expectorations et améliore le VEMS	Approuvé le 23/03/2016
Benralizumab	MedImmune	IL-5R	Abolit le nombre d'éosinophiles du sang périphérique	Phase II/III en cours
Pascolizumab	GlaxoSmithKline	IL-4	Aucune efficacité clinique significative	Phase II en cours
Altrakinecept	Immunex	IL-4	Aucune efficacité clinique significative	Phase III achevée
Dupilumab	Regeneron Pharmaceuticals	IL-4R $\alpha$	Diminue le nombre d'exacerbations quel que soit le taux d'éosinophiles	Phase III en cours
Pitrakinra	Aerovance	IL-4R	Peut prévenir une diminution du VEMS après provocation allergénique	Phase II achevée
Tralokinumab	MedImmune	IL-13	Réduit le nombre d'éosinophilie des voies aériennes	Phase II/III en cours
Anrukinzumab	Wyeth	IL-13	Empêche la phase tardive des réponses asthmatiques induites par les allergènes	Phase II achevée
Lebrikizumab	Tanox	IL-13	Améliore le VEMS chez les patients ayant des taux sériques élevés de périostine	Phase II/III en cours
MEDI-528	MedImmune	IL-9	Réduit l'inflammation des voies aériennes et l'hyperréactivité chez la souris	Phase II achevée
MT203	Takeda	GM-CSF	Diminue la survie et l'activation des éosinophiles	Phase II en cours
Secukinumab	Novartis	IL-17	Données peu concluantes	Phase II en cours (approuvé dans le cadre du psoriasis)
Golimumab	Janssen Biotech	TNF $\alpha$	Peut augmenter le risque d'infections et les tumeurs malignes	Phase II en cours (approuvé dans le cadre du psoriasis et de la polyarthrite rhumatoïde)
Infliximab	Janssen Biotech	TNF $\alpha$	Réduit les oscillations de PEF et les exacerbations	Phase II en cours (approuvé dans le cadre du psoriasis, de la polyarthrite rhumatoïde et de la maladie de Crohn)
Etanercept	Immunex	TNF $\alpha$	Données contradictoires	Phase II en cours (approuvé dans le cadre du psoriasis et de la polyarthrite rhumatoïde)
Daclizumab	PDL BioPharma	IL-2R	Empêche la génération de cytokines pro-inflammatoires par l'IL-2R blocus sur les cellules T. Aucun effet négatif n'a été observé sur génération de cellules Treg <i>in vivo</i>	Phase II achevée

**Table 6 : Avancée des essais cliniques expérimentés actuellement chez l'homme basés sur l'inhibition de cytokines pro-inflammatoires ou de leurs récepteurs.** Ce tableau liste des anticorps approuvés par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux, la FDA (<http://www.fda.gov/>), ou testés sous l'égide de l'Institut national de la santé américain, le NIH (<https://clinicaltrials.gov/>). VEMS : volume expiratoire maximal par seconde, PEF : débit de pointe (débit expiratoire maximal après une inspiration maximale). D'après Pelaia, G. et al. 2012. The potential of biologics for the treatment of asthma. *Nat Rev Drug Discov.*

Enfin, une approche testée avec succès chez l'animal est celle des oligonucléotides anti-sens. Cette stratégie vise cette fois non pas à bloquer l'activité de protéines mais à inhiber leur expression. Les oligonucléotides ont l'énorme avantage de pouvoir être appliqués localement au niveau du poumon par inhalation. Chez l'homme, des oligonucléotides

antisens ciblant CCR3, les récepteurs à l'IL-3, à l'IL-5, au GM-CSF et à l'adénosine A1 sont actuellement en phase d'essai clinique de niveau II. Des AS contre le récepteur à l'IL-4 et VLA-4 sont également en essai préclinique et clinique de phase I dans le cadre du traitement de l'asthme (table 7) (Seguin and Ferrari, 2009).

Drogue	Fabriquant	Cible	Effet <i>in vivo</i>	Développement
TPI ASM8	Topigen	CCR3 et chaîne commune $\beta$ des récepteurs à IL-3, l'IL-5 et au GM-CSF	Réduit le taux d'éosinophiles et les réponses asthmatiques précoces et tardives chez l'homme	Phase II achevée
EPI-2010	Epigenesis	Adénosine A1R	Réduit la bronchoconstriction chez l'animal	Phase II achevée, programme stoppé
AIR645	Altair Therapeutics/ISIS Pharmaceuticals	IL-4R $\alpha$	Données non disponibles	Phase II achevée
ATL 1102	Antisense Therapeutics/Teva	VLA-4	Réduit les symptômes des patients souffrants de sclérose en plaque	Preclinique

**Table 7 : Avancée des essais cliniques expérimentés actuellement chez l'homme basés sur l'utilisation d' oligodeoxynucleotides anti-sens.**

D'après Seguin, R.M. and N. Ferrari. 2009. Emerging oligonucleotide therapies for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Investig Drugs*.

Les autres traitements en cours de développement incluent de nouveaux types de bronchodilatateurs et d'anti-inflammatoires, des inhibiteurs des chimiokines, des inhibiteurs d'agents lipidiques (leucotriènes prostaglandines...), des inhibiteurs de voies de signalisation (NF-kB, MAPK...), des oligodeoxynucleotides CpG ciblant le toll-like receptor (TLR)-9 de façon à induire une réponse Th1, ou encore des cytokines pro-Th1 et pro-Treg (Barnes, 2010).

L'asthme est donc une maladie complexe mettant en jeu de très nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. Cibler les symptômes permet d'améliorer la qualité de vie des patients mais sans soigner la maladie. De nouvelles approches sont donc nécessaires pour espérer pouvoir traiter les patients. L'utilisation de modèles animaux a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de comprendre le rôle précis de chacun des acteurs impliqués dans la pathologie. Cependant, les modèles animaux d'inflammation pulmonaire induite expérimentalement diffèrent singulièrement de l'asthme qui reste avant tout une maladie chronique. Par conséquent, les approches visant à cibler un seul de ces acteurs ne seront probablement pas aussi efficaces chez l'homme. C'est la combinaison de plusieurs méthodes visant un panel de plusieurs molécules délétères qui sera vraisemblablement la plus efficace pour un jour envisager de traiter cette maladie.

# Travaux réalisés

## Résumé des travaux

Les canaux calciques incluent notamment les canaux dépendants des stocks (ORAI) et dépendants du voltage ( $Ca_v$ ) qui sont considérés de première importance pour l'entrée du calcium dans les cellules non-excitables et excitables, respectivement. Les canaux calciques voltage-dépendants tels que  $Ca_v1$  sont essentiels pour le fonctionnement des cellules excitables, notamment la transmission neuronale, la contraction musculaire ou la sécrétion hormonale. Cependant, de nombreuses études montrent désormais que les canaux  $Ca_v1$  sont aussi exprimés dans des cellules non excitables, et sont importants pour les fonctions effectrices des lymphocytes T. Les canaux  $Ca_v1$  sont constitués de la sous-unité  $\alpha1$  formant le pore ionique et des sous-unités auxiliaires  $\beta$  et  $\alpha2\delta$ . Ces sous-unités sont importantes pour l'activité électrique du canal, mais aussi pour sa régulation, sa stabilité et son expression à la membrane plasmique dans les cellules excitables. Les travaux de notre groupe ont clairement identifié les sous-unités  $\alpha1$  de  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  comme essentielles pour la fonction des lymphocytes Th2, une sous-population de cellules T responsable des maladies allergiques. L'inhibition pharmacologique et génétique de ces canaux réduit de manière significative l'expression des cytokines dans les lymphocytes Th2 chez la souris, mais pas dans les Th1.

Le but de mon travail a été de comprendre si les sous-unités auxiliaires des canaux  $Ca_v$ , et plus particulièrement la sous-unité  $\beta$ , sont nécessaires au fonctionnement des canaux  $Ca_v1$  dans les lymphocytes Th2 qui ne sont pas des cellules excitables.

Nous avons utilisé des oligonucléotides antisens ciblant toutes les sous-unités  $\beta$  afin de réduire l'expression de  $\beta1$  et  $\beta3$ , les deux sous-unités exprimées dans des lymphocytes Th2. La transfection de Th2 murines et humaines avec ces oligonucléotides diminue l'influx de calcium dépendant du TCR et l'expression des cytokines. En outre, l'effet des oligonucléotides antisens semble résulter de la perte d'expression de la sous-unité  $\alpha1$  selon un mécanisme similaire à celui décrit dans les neurones. De plus, L'utilisation de shRNA spécifiques de  $\beta1$  et  $\beta3$  dans les Th2 de souris montre un rôle essentiel la sous-unité  $\beta1$  dans la réponse fonctionnelle des lymphocytes Th2. Enfin, les antisens  $Ca_v\beta$  diminuent l'inflammation dans un modèle d'asthme allergique chez la souris, de même qu'un inhibiteur pharmacologique des sous-unités  $\alpha2\delta$ .

Ce travail a donc permis d'identifier les sous-unités auxiliaires des canaux  $Ca_v$  comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le cadre des maladies allergiques telles que l'asthme.

## Oligonucléotides anti-sens spécifiques des sous-unités Cav $\beta$

Le rôle de sous-unités  $\beta$  en tant que sous-unités régulatrices des canaux Ca $_v$  dans les lymphocytes T est d'une grande importance, d'autant plus que ce sont des protéines régulatrices aux fonctionnalités multiples et pouvant avoir des activités indépendamment de leur association avec les sous-unités  $\alpha_1$  des canaux Ca $_v$ . Notre but est donc l'étude de l'expression et du rôle fonctionnel des sous-unités  $\beta$  avec pour optique de savoir si le *knock-down* de l'une ou l'autre des sous-unités  $\beta$  a un effet sur la signalisation calcique des lymphocytes Th2 et leurs fonctions *in vitro et in vivo*.

Les stratégies d'inhibition d'expression basées sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens a été validée dans le cadre de l'étude des canaux calciques voltages dépendants, et plus spécialement la sous-unités  $\beta$ .

Des oligonucléotides antisens modifiés par l'incorporation d'un peptide transportant 10 (qui favorise l'entrée des oligonucléotides dans la cellule) ont été utilisés pour cibler chacun des différents canaux Ca $_v1$  exprimés dans le cerveau. Ce travail a permis de montrer que c'est Ca $_v1.2$  qui est surexprimé dans les modèles animaux de neuropathie et qui joue un rôle majeur dans le processus de douleur chronique (Fossat et al., 2010).

Des ODN antisens ciblant différents canaux Ca $_v3$  sont également générés pour comprendre le fonctionnement de ces canaux. L'utilisation d'une molécule capable d'inhiber l'expression des trois gènes de la famille Ca $_v3$  a permis de démontrer que ces canaux sont à l'origine des courants LVA dans les neurones de rat. (Lambert et al., 1998). Par la suite, des ODN antisens contre Ca $_v3.2$  ont révélé l'importance de ce canal dans les neurones par rapport à Ca $_v3.1$  et Ca $_v3.3$ , en ce qui concerne la neurogenèse par exemple (Chemin et al., 2002) ou encore la perception de la douleur (Bourinet et al., 2005).

L'équipe d'Annette Dolphin de son côté travaille sur la fonction des canaux calciques voltages dépendants dans les neurones, et plus particulièrement sur le rôle des sous-unités auxiliaires. Dans le cadre de l'étude de la sous-unité  $\beta$ , Berrow a utilisé un oligonucléotide phosphorothioate pour cibler l'expression des différentes sous-unités  $\beta$ . Pour cela, il a mis au point une séquence de 27 bases, complémentaires à 96% de l'ARNm de  $\beta_1$  et à 92% de  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  et  $\beta_4$ . La microinjection de cet antisens dans des neurones de rat a permis de réduire de plus de 90% l'expression de  $\beta$  entre quatre et cinq jours après injection. Cet oligonucléotide a permis de caractériser les propriétés électrophysiologiques du canal en absence de sous-unité  $\beta$ . Les canaux calciques des cellules traitées présentent une diminution d'amplitude de courant et un retard de réponse après dépolarisation ainsi qu'une forte diminution de la réponse à un agoniste de la famille des dihydropyridines (Berrow et al., 1995). A l'aide de ces mêmes oligonucléotides antisens, ils ont également montré que l'inhibition du courant

calcique par une protéine G0 (activée par un agoniste du récepteur GABAB qui est couplé à une protéine G) suite à une dépolarisation membranaire est fortement augmentée en absence de sous-unité  $\beta$ . Cela semble indiquer que la sous-unité  $\beta$  et les protéines G0 sont en compétition pour la liaison aux canaux  $Ca_v$  et que la sous-unité  $\beta$  diminue l'effet inhibiteur des protéines G0 (Campbell et al., 1995). Les ODN antisens d'A. Dolphin ont été également utilisés par d'autres équipes pour cibler les sous-unités  $\beta$ . Dans une lignée de neuroblastome, l'inhibition des sous-unités  $\beta$  n'a pas eu de conséquence sur des courants calciques générés par des canaux  $Ca_v3$ , confirmant ainsi le fonctionnement de ces canaux de façon indépendante des sous-unités  $\beta$  (Leuranguer et al., 1998). Dans les myocytes de rat, l'application de ces mêmes ODN élève le seuil d'activation des canaux  $Ca_v$  et diminue le niveau d'expression membranaire des canaux, ce qui se traduit par une réduction de l'amplitude des courants générés par ces canaux (Leach et al., 2007a).

Enfin, plus récemment, des oligonucléotides antisens spécifiques ont été utilisés pour cibler chaque sous-unité  $\beta$  dans les cellules  $\beta$  du pancréas afin de comprendre comment celles-ci régulent les oscillations calciques et la libération d'insuline. Cette étude a permis de montrer que  $\beta2$  et  $\beta3$  inhibent l'activation de la PKC $\alpha$  au niveau de la membrane plasmique, possiblement en empêchant sa translocation à la membrane ou son interaction avec les canaux  $Ca_v$  (Rajagopal et al., 2014).

Ces travaux montrent ainsi que l'utilisation d'oligonucléotides antisens est une stratégie valable pour étudier la fonctions des canaux  $Ca_v$  et des sous-unités auxiliaires in vitro.

Nous avons donc décidé d'utiliser les ODN antisens mis au point par l'équipe d'A. Dolphin (Berrow et al., 1995) qui, malgré des mésappariements, permettent de cibler exclusivement les quatre sous-unités  $\beta$  murines et les quatre sous-unités  $\beta$  humaines à l'aide d'une seule molécule (fig. 20). Pour les expériences nécessitant d'inhiber spécifiquement une sous-unité particulière, nous avons utilisé des shRNA spécifiques de  $Ca_v\beta1$  et  $\beta3$ , les principales sous-unités  $\beta$  exprimées dans les lymphocytes Th2.

```

...AATGACTGGTGGATTGGGCGGCTGGT...  $\beta$ 1 souris
AATGACTGGTGGATCGGAAGGCTGGT ODN antisens

...AATGACTGGTGGATCGGGAGGCTAGT...  $\beta$ 3 souris
AATGACTGGTGGATCGGAAGGCTGGT ODN antisens

...AATGACTGGTGGATCGGGCGGCTGGT...  $\beta$ 1 homme
AATGACTGGTGGATCGGAAGGCTGGT ODN antisens

...AATGACTGGTGGATCGGGCGGCTAGT...  $\beta$ 3 homme
AATGACTGGTGGATCGGAAGGCTGGT ODN antisens

```

**Figure 20 : Alignement de la séquence de l'ODN antisens d'A. Dolphin et des séquences murines et humaines de  $Ca_v\beta$ 1 et  $\beta$ 3.**  $Ca_v\beta$ 1 et  $\beta$ 3 sont les principales sous-unités  $\beta$  exprimées dans les lymphocytes Th2. Les bases en rouge indiquent les mésappariements.

Ca<sub>v</sub>β and α2-δ auxiliary subunits are required for proper calcium signaling in mouse and human Th2-cells and their targeting is beneficial in experimental asthma.

Nicolas Rosa\*, Emily Triffaux\*, Virginie Robert\*, Jean-Charles Guéry, Lucette Pelletier\*\*, Magali Savignac\*\*.

\* and \*\* These authors contributed equally to this work.

From INSERM U1043, CNRS U5282, University Paul Sabatier, Center of Physiopathology Toulouse Purpan, Toulouse, France.

Corresponding authors: Lucette Pelletier, MD, PhD, INSERM UMR1043, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Place du Dr Baylac, 31024 Toulouse Cedex 3, France. E-mail: lucette.pelletier@inserm.fr. or: Magali Savignac, PhD, INSERM UMR1043, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Place du Dr Baylac, 31024 Toulouse Cedex 3, France. E-mail: magali.savignac@inserm.fr.

Acknowledgements. The work was supported by the French National Institute for Health and Medical research (INSERM) and by grants from the French Society of Allergology, the Région Midi-Pyrénées and Gentcel biotechnology Labs. N.R. was supported by the Région Midi-Pyrénées and by INSERM. We thank the cytometry and imaging platforms (INSERM U1043, CPTP). We also thank the animal facility and the histology platforms (Anexplo Toulouse). We thank Joris Hien-Turpin for its technical assistance.

## Abstract

Calcium is a versatile second messenger but its shape, partly conditioned by the equipment in calcium channels influences cell program activation. T-cells express not only the cell membrane calcium ORAI1 but also voltage-gated ( $Ca_v1$ ) channels formed by an ion forming pore- $\alpha1$  and auxiliary ( $\beta$  and  $\alpha2\text{-}\delta$ ) subunits. Four genes encode each subunit generating channel diversity.  $Ca_v1.2$  and  $Ca_v1.3$   $\alpha1$  are needed for Th2- but not Th1-cell functions and can be targeted to suppress asthma. How  $Ca_v1$  channels contribute to calcium signal in T-cells is puzzling. Herein, we show that both mouse and human Th2-cells express  $Ca_v\beta1$ ,  $\beta3$  and  $\alpha2\text{-}\delta2$  subunits. Knocking-down all  $Ca_v\beta$  with  $Ca_v\beta$  antisense oligonucleotides ( $Ca_v\beta$ AS) reduce mouse and human Th2 cytokine production with no effect on Th1-cells. Transduction of Th2-cells with shRNAs targeting  $Ca_v\beta1$  diminishes Th2 cytokine production with no effect of  $Ca_v\beta3$  specific shRNA indicating that  $Ca_v\beta$  isoforms have no redundant roles.  $Ca_v\beta$ AS strongly impacts TCR-driven calcium response and  $\alpha1$  expression at the protein but not mRNA levels. This points the role of  $Ca_v\beta$  in protecting  $\alpha1$  from degradation in Th2-cells allowing  $Ca_v1$ -dependent  $Ca^{2+}$  response in mouse and human Th2-cells. The  $\alpha2\text{-}\delta$  inhibitor Gabapentin® also alters Th2-functions. Moreover, treatment with  $Ca_v\beta$ AS or gabapentin prevents experimental asthma. These results show that auxiliary subunits are required for proper functions of  $Ca_v1$  channels in Th2-cells *in vitro* and *in vivo*.

## Introduction

Calcium signaling is essential for most T-lymphocyte functions. The role of store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is essential, implicating the sensing of TCR-driven endoplasmic reticulum (ER)  $\text{Ca}^{2+}$  depletion by STIM-1, its oligomerization and its localization in the vicinity of ORAI-1 calcium channels at the cell membrane permitting sustained  $\text{Ca}^{2+}$  entry through ORAI channels (Hogan et al., 2010). Besides these channels, the role of  $\text{Ca}_v$  channels (defined as voltage activated in excitable cells) subunits in T-lymphocytes emerges (Badou et al., 2013; Omilusik et al., 2013; Pelletier and Savignac, 2013).  $\text{Ca}_v$  channels are composed of  $\alpha 1$  subunits (from  $\text{Ca}_v1.1$  to  $\text{Ca}_v1.4$ ) that form the ion pore and mainly support the biophysical properties of the channel (Catterall, 2000), and auxiliary  $\beta$  and  $\alpha 2\text{-}\delta$  subunits. Four genes encode  $\text{Ca}_v\beta$  ( $\text{Ca}_v\beta 1$  to  $\beta 4$ ) with multiple splice variants and  $\alpha 2\text{-}\delta$  (from  $\text{Ca}_v\alpha 2\text{-}\delta 1$  to  $\alpha 2\text{-}\delta 4$ ).  $\text{Ca}_v\beta$  association with  $\alpha 1$  subunits is required to get proper function of  $\text{Ca}_v1$  channels (reviewed in (Dolphin, 2012)). In excitable cells,  $\text{Ca}_v\beta 1a$  is the only form in the skeletal muscles and associates with  $\text{Ca}_v1.1$   $\alpha 1$  while  $\text{Ca}_v\beta 1b$  is found in neurons and genetic deletion of this subunit is lethal in embryos.  $\text{Ca}_v\beta 2$  is the only form found early in cardiomyocyte development and its absence is lethal. Conversely  $\text{Ca}_v\beta 3$  and  $\text{Ca}_v\beta 4$  null mice are viable. Regarding their role in the immune system,  $\text{Ca}_v\beta 3$  and  $\text{Ca}_v\beta 4$  null bone marrow chimeras display reduced calcium response, NFAT nuclear translocation and cytokine production in  $\text{CD4}^+$  T cells upon TCR engagement (Badou et al., 2006).  $\text{Ca}_v\beta 3$  was also shown to be important for  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in  $\text{CD8}^+$  T cells (Jha et al., 2009). These data raise the question of the implication of  $\text{Ca}_v\beta$  as interacting with and which  $\alpha 1$  subunit because  $\beta$  subunits can act independently of  $\alpha 1$  subunits (Hofmann et al., 2014). In this line,  $\text{Ca}_v\beta$  including  $\beta 3$  and  $\beta 4$  variants (Beguin et al., 2006; Tadmouri et al., 2012) may localize into the nucleus and even interfere with the transcriptional machinery. The selective deletion of  $\beta 2$  in T-cells using the *lck* promoter has a profound impact on thymocyte development, which is not the case for the other  $\beta$  subunits (Jha et al., 2015), indicating that the pattern of

expression and function of  $Ca_v$  subunits in highly plastic. We previously found that  $Ca_v1.2$  is selectively expressed and functional in human and mouse Th2 cells (Djata Cabral et al., 2010; Gomes et al., 2007b; Robert et al., 2014). We then addressed whether  $Ca_v$  auxiliary subunits may be required for channel functions in non-excitabile Th2-lymphocytes. Herein, we found that human and mouse Th2-cells express  $Ca_v\beta3$  and  $\beta1$ . Their inhibition affects cytokine production without any effect on Th1-cells. The effect on Th2 cells is associated with a strong reduction in the TCR-driven calcium response, and to the loss of  $Ca_v1.2$   $\alpha1$  protein expression. This shows that  $Ca_v\beta$  is important for the stability of the  $\alpha1$  protein probably by preventing its degradation through the proteasome.  $Ca_v\beta1$  and  $Ca_v\beta3$  have no redundant roles as knocking down  $Ca_v\beta1$  but not  $Ca_v\beta3$  impairs Th2 cell functions. Finally, we show that gabapentin, an inhibitor of  $\alpha2-\delta$  subunits decreases Th2 cell functions suggesting that the  $Ca_v1$  channel is composed of both the  $\alpha1$  and auxiliary subunits that are all required for the functions of the channel. As a consequence, targeting either  $Ca_v\beta$  or  $\alpha2-\delta$  is beneficial in experimental asthma.

## Results

### **Knocking down Ca<sub>v</sub>β subunits diminishes cytokine production by mouse Th2-cells**

Murine Th2 cells expressed Ca<sub>v</sub>β1 and Ca<sub>v</sub>β3 with low if any detection of Ca<sub>v</sub>β2 and Ca<sub>v</sub>β4 encoding transcripts (Fig. 1A) as human Th2 cells did (Robert et al., 2014). The proteins Ca<sub>v</sub>β1 and Cavβ3 were detected by Western blotting with the same apparent molecular weights as the control neuronal forms (Fig. 1B) and by immunofluorescence (Fig. 1C, 1D). The specificity of anti-Ca<sub>v</sub>β1 and Ca<sub>v</sub>β3 antibodies was verified on HEKs transfected with plasmids encoding Ca<sub>v</sub>β1 or Ca<sub>v</sub>β3 (not shown). The expression of Ca<sub>v</sub>β1 discriminates Th2 and Th1 cells at the transcriptional (Fig. 1A), and protein level (Fig. 1C, 1D). We previously showed that Th2-cells expressed α1 Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>1.3 subunits. Antisense (AS) oligodeoxynucleotides (ONs) targeting Cav1.2 and Cav1.3 α1 subunits were effective in inhibiting Th2 cytokine production. In order to know whether β subunits are important for calcium signaling in Th2 cells, we used antisense ONs described as targeting the four Ca<sub>v</sub>β subunits in mice (Berrow et al., 1995). Transfection of mouse Th2-cells with Ca<sub>v</sub>β AS ODNs decreased the expression of both Ca<sub>v</sub>β1 and Ca<sub>v</sub>β3 subunits (Fig. 2A, 2B). Ca<sub>v</sub>β AS ONs decreased IL-4, IL-5 and IL-13 production by 50 to 70% in mouse Th2-cells transfected with Ca<sub>v</sub>β AS ONs (Fig. 2C to E).

### **Knocking down Ca<sub>v</sub>β subunits diminishes cytokine production by human Th2-cells**

Human memory Th2-cells were selected on the basis of the expression of the cell membrane marker CRTH2 and expanded with anti-CD3/anti-CD28-coated beads in the presence of IL-4 and IL-2 in order to get enough cells for analysis. We previously showed that expansion did not modify the profile of expression of Ca<sub>v</sub>1 α1 or auxiliary β and α2-δ subunits (Robert et al., 2014). We transfected these Th2-cells with Ca<sub>v</sub>βAS. CavβAS ONs decreased Ca<sub>v</sub>β1 expression by around 50% with no significant effect on Ca<sub>v</sub>β3 expression in human Th2-cells (Supplementary Fig. 1). Although transfection with Ca<sub>v</sub>β AS ODNs did not affect the viability and the ability of human Th2 cells to proliferate upon TCR stimulation

(not shown), it significantly reduced the production of Th2 cytokines with no effect on IFN $\gamma$  production by human Th1-cells (Fig. 3).

### **Knocking down Ca $_v$ $\beta$ subunits diminishes TCR-driven calcium response in mouse Th2-cells, which was associated with decreased Ca $_v$ 1 $\alpha$ 1 expression**

The variations in [Ca $^{2+}$ ] $_i$  was tested in mouse Th2-cells transfected with control or Ca $_v$  $\beta$ AS before and after stimulation with beads coated with anti-CD3/CD28 mAbs at the single cell level. Less cells transfected with Ca $_v$  $\beta$ AS displayed an increase in [Ca $^{2+}$ ] $_i$  ( $79 \pm 3\%$  versus  $98 \pm 2\%$  for control cells,  $p < 0.005$ ) and a decreased calcium response upon TCR engagement was observed in Ca $_v$  $\beta$ AS-transfected responsive Th2-cells compared to control cells (Fig. 4A-C). Ca $_v$  $\beta$ AS ODNs delayed the calcium response of mouse Th2 cells upon TCR stimulation (Fig. 4C). However, ionomycin application at the end of the experiment induced similar [Ca $^{2+}$ ] $_i$  increase in Th2-cells whether they were transfected with control or antisense ON (Fig. 4A), indicating that antisense ON affected neither the loading with the Fura-2 probe nor the filling of the intracellular Ca $^{2+}$  stores (Fig. 4A). In excitable cells, Ca $_v$  $\beta$  subunits are known to associate with the  $\alpha$ 1 subunits of Ca $_v$ 1 channels, for the expression of the channel at the cell membrane (Dolphin, 2012). We then assessed if Ca $_v$  $\beta$  subunits has the same role in Th2-cells. Ca $_v$  $\beta$  AS markedly reduced the expression of Ca $_v$ 1.2  $\alpha$ 1 protein in mouse (Fig. 4E-F) although Ca $_v$  $\beta$  AS did not affect the amounts of the transcripts (Fig. 4D).

### **Knocking down Ca $_v$ $\beta$ subunits reduced TCR-driven calcium responses in human Th2 but not Th1-cells, associated with loss of expression of Ca $_v$ 1.2 $\alpha$ 1 in Th2-cells.**

Transfection of human Th2-cells with Ca $_v$  $\beta$  AS ODNs had the same effect in human compared to mouse Th2-cells on TCR-driven calcium response. It delayed and reduced by 45% the [Ca $^{2+}$ ] $_i$  rise (Fig. 4G, Supplementary Fig.2) following TCR stimulation. Conversely, transfection of human Th1-cells with control or Ca $_v$  $\beta$  AS ODNs had no impact on the shape and the amplitude of TCR-driven calcium response induced by TCR stimulation (Fig. 4H), which is in accordance with the absence of effect of Ca $_v$  $\beta$  AS on IFN- $\gamma$  synthesis by Th1 cells

(Fig. 3D). As for mouse Th2-cells, Ca<sub>v</sub>β AS strongly reduced Ca<sub>v</sub>1.2 α1 expression in human Th2-cells suggesting that Ca<sub>v</sub>β is important for the stability of α1 proteins in T-cells, as in neurons (Altier et al., 2011).

### **Intranasal delivery of Ca<sub>v</sub>β AS ODNs protects against experimental asthma.**

We have previously shown that airway administration of Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>1.3 AS ODNs protected against asthma (Djata Cabral et al., 2010), we then checked if Ca<sub>v</sub>β AS modified the course of experimental asthma. Ca<sub>v</sub>βAS administration strongly decreased the content of inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid with a major effect on eosinophils and lymphocytes compared to mice immunized and challenged with ovalbumin (OVA) whether they received or not control oligonucleotides (Fig. 5A). Consistent with these data, Ca<sub>v</sub>βAS nearly abolished airway inflammation (Fig. 5D) compared to control mice (Fig. 5B-C). This protection was associated with defective Th2 responses as shown by the decrease in serum IgE concentration (Fig. 6A) and reduced IL-4 (Fig. 6B), IL-5 (Fig. 6C) and IL-13 (Fig. 6D) synthesis upon stimulation of lung draining lymph node cells from Ca<sub>v</sub>βAS-treated mice with OVA compared to the response of controls. CD4<sup>+</sup> T-cells infiltrating the lungs of Ca<sub>v</sub>βAS-treated mice, immunized and challenged with OVA expressed reduced amounts of Ca<sub>v</sub>1.2 α1 proteins compared to CD4<sup>+</sup> T-cells from mice treated with control ODNs (Fig. 7), suggesting that Ca<sub>v</sub>β impacts the expression of the α1 protein as shown *in vitro*.

### **Ca<sub>v</sub>β1 but not Ca<sub>v</sub>β3 is involved in cytokine synthesis by Th2-cells.**

In order to establish if one and which Ca<sub>v</sub>β subunit has a selective effect on Th2 functions, we targeted specifically Ca<sub>v</sub>β1 and Ca<sub>v</sub>β3 that predominate in Th2-cells. We transduced CD4<sup>+</sup> T-cells under Th2-differentiation conditions with control or specific shβ1 or shβ3, and sorted Th2-cells on the basis of GFP expression. Knocking-down Ca<sub>v</sub>β1 but not Ca<sub>v</sub>β3 diminished Th2 cytokine production (Fig. 8), while each shRNA inhibited more than 50% of the expression of the corresponding subunit. These results show that Ca<sub>v</sub>β forms do not have a redundant role in Th2 functions.

## **Gabapentin an inhibitor of Ca<sub>v</sub>α2-δ alters Th2 functions and improves the course of experimental asthma**

Since mouse Th2 cells expressed Ca<sub>v</sub>α2-δ2 (not shown) as human Th2-cells did, we wondered if gabapentin, a pharmacological inhibitor of Ca<sub>v</sub>α2-δ subunits had an effect on Th2 cytokine production. *In vitro*, gabapentin reduced the frequency of Th2-cells producing IL-4 and 13 (Fig. 9A-B). The production of IL-4, the cytokine signature of Th2-cells stimulated through the TCR was also diminished by gabapentin in a dose-dependent manner. Gabapentin is currently used in the treatment of epilepsy and chronic pain, and we tested a potential beneficial effect during the course of experimental asthma. *In vivo* administration of gabapentin effectively prevented airway inflammation (Fig. 9 D-E) with a strong reduction in the number of inflammatory cells in the BAL fluid (Fig. 9D) and in the lungs (Fig. 9E). Especially, the number of eosinophils, a major feature of allergic asthma is markedly decreased in gabapentin-treated animals (Fig. 9D).

## Materials and Methods

### Mice and experimental asthma

BALB/c mice originated from Janvier (Le Genest St.Isle, France) while TCR OVA transgenic DO11.10 mice were maintained in our pathogen-free animal facility. Eight- to 12-wk-old female mice were used in all experiments. The INSERM U1043 Institutional Review Board for animal experimentation approved protocols. BALB/c mice were immunized with OVA (100 µg) in aluminum hydroxyde (alum, 2 mg) and 15 days later, they were given intranasal OVA (50 µg/day) with or without scrambled ( $Ca_v\beta S$ ) or  $Ca_v\beta$  antisense specific ( $Ca_v\beta AS$ ) oligonucleotides oligonucleotides in PBS for 5 days as previously described (Djata Cabral et al., 2010). The sequences  $Ca_v\beta S$ : 5'-GAAGTAGGTCTTGGTGGTGG-3' and  $Ca_v\beta AS$ : 5'-ACCAGCCTTCCGATCCACCAGTCATT-3' (Eurogentec, Angers France) were chosen from (Berrow et al., 1995).  $Ca_v\beta AS$  have 92% complementarity to mouse or human  $\beta 1$  and  $\beta 3$  mRNA.

BALB/c mice were immunized with OVA in alum. Fifteen days later, they were challenged with intranasal and received or not Gabapentin (400 mg/l in drinking water that was renewed every other day according to (Warnier et al., 2015)). The bronchoalveolar lavage fluid was collected and the content in inflammatory cells was determined as previously (Djata Cabral et al., 2010). Lung draining lymph nodes were harvested and cell suspensions were stimulated with OVA for 3 days. Cytokine concentration was measured in the supernatants by ELISA. In some experiments,  $CD4^+$  T cells were purified from the lungs, stained with anti- $\alpha 1C$  antibodies and analyzed by confocal microscopy.

### Cell culture

Mouse Th1 and Th2-cells were generated by weekly stimulation of DO11.10  $CD4^+$  T-cells with irradiated BALB/c spleen cells as antigen presenting cells and the 323-339 OVA peptide plus appropriated differentiation cocktails: IL-12 (5 ng/ml) and anti-IL-4 antibody (11B11, 10 µg/ml) for Th1 and IL-4 (5 ng/ml) and anti-IFN $\gamma$  antibody (XMG1.2, 10 µg/ml) for Th2. Human

memory CRTH2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T- and human Th1-cells were obtained and expanded as previously reported (Robert et al., 2014).

CD4<sup>+</sup> T cells were transfected three days after stimulation with 8  $\mu$ M oligodeoxynucleotides (Eurogentec) using TurboFect transfection reagent (Fermentas). The Ca<sub>v</sub> $\beta$  antisense and control oligodeoxynucleotide sequences were previously described by Berrow et al. (Berrow et al., 1995). Cells were collected three days after transfection.

### **Single cell calcium imaging**

Th2 cells were loaded with Fura-2AM as previously described (Djata Cabral et al., 2010) in culture medium containing 5% heat-inactivated FBS for 30 min at 37°C. Cells were then washed, plated and excited in 10 second intervals using 340 and 380 nm excitation filters. Emission was recorded using 510/ 540 nm band pass filters by a CCD camera before and after stimulation with anti-CD3/CD28 coated beads (1 bead per cell). Fluorescence ratio images were then calculated using the Metafluor software. 40-60 cells were analyzed by well. Each experiment was repeated four times.

### **Real-time quantitative PCR**

CD4<sup>+</sup> T cells were lysed and mRNA transcripts extracted using the RNeasy Micro Kit (Qiagen). The absorbance ratios at 260 and 280 nm were measured to verify RNA quality. Reverse transcription PCR was performed with the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Ca<sub>v</sub> $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 and HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) transcripts were measured by real-time quantitative PCR using a LightCycler 480 Instrument (Roche). qPCR was performed with the LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche). We used the following primers to quantify mRNA.

Ca<sub>v</sub> $\beta$ 1: 5'-gcagagcgccaggcctta-3' and 5'-tgatggcactccctgtaca-3'

Ca<sub>v</sub> $\beta$ 2: 5'-cgaacagagagccaagcaa-3' and 5'-gggcactatgtcacccaaa-3'

Ca<sub>v</sub> $\beta$ 3: 5'-tgtggcattgctgtgagga-3' and 5'-ccgatccaccagtcattgc-3'

Ca<sub>v</sub> $\beta$ 4: 5'-gagcgagaacagcaagcag-3' and 5'-tcaaaggagatggctgtgc-3'

HPRT: 5'-ctggtgaaaaggacctctcg-3' and 5'-tgaagtactcattatagtcaggca-3'

Quantification of target gene expression was calculated by normalizing the values relative to the expression of the housekeeping gene HPRT. The amounts of mRNA were expressed as arbitrary units relative to HPRT ( $2^{-(Ct \text{ interest gene} - Ct \text{ HPRT})} \times 10^{-3}$ ).

### **Immunoblotting**

T lymphocytes or brain cells were lysed in RIPA buffer containing protease inhibitors (Roche). The lysates (30 µg/ lane for T-cell extracts and 10 µg/ lane for brain lysate) were submitted to 10% SDS electrophoresis, transferred to Hybond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham) and then blotted with anti-Ca<sub>v</sub>β1 (Alomone Labs) or anti-Ca<sub>v</sub>β3 (Santa Cruz Biotechnology) primary antibodies. We then stained blots with horseradish peroxidase coupled secondary antibodies (Cell Signaling Technology), before detection and visualization with the ECL Prime (Amersham) using a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

### **Lentiviral transduction**

CD4<sup>+</sup> T cells were purified using the Dynabeads® Untouched™ Mouse CD4 Cells Kit (Invitrogen). Cells were seeded into plates coated with retronectine (Takara Bio) (40 µg/mL) and anti-CD3 antibodies (3 µg/mL) and stimulated with soluble anti-CD28 antibodies (2 µg/mL), IL-2 (5 ng/mL) and Th2 differentiation cocktail, IL-4 (5 ng/mL) and anti-IFNγ antibodies (10 µg/mL). HEK 293T cells were cultured in DMEM medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, 1mM sodium/pyruvate and 100 µg/mL G418. Lentiviral particles were produced by transfection of plasmids into HEK 293T cells using GeneJuice transfection reagent (Merck Millipore). Plasmids comprised VSV-G envelope coding plasmid pMD2.G (Addgene), second generation packaging vector coding plasmid psPAX2 (Addgene) and MISSION shRNA plasmids PLKO.1-CMV-tGFP (Sigma-Aldrich). HEK 293T medium was replaced by optiMEM (Gibco) 24 hours after transfection and supernatant containing lentiviral particles was recovered 24 hours later. Supernatant was 0,45 µm filtered and supplemented with anti-CD28 antibodies (2 µg/mL), IL-2 (5 ng/mL), IL-4

(5 ng/mL) and anti-IFN $\gamma$  antibodies (10  $\mu$ g/mL). CD4<sup>+</sup> T cells culture medium was removed 18 hours after stimulation and replaced by supplemented lentiviral supernatant. CD4<sup>+</sup> T cells were spinoculated at 3000 rpm for one hour at 32°C. Supernatant was removed 24 hours later and cells were transduced with fresh lentiviral supernatant a second time as described. Supernatant was removed 24 hours later and cells were cultured in R10 medium supplemented with IL-2 (5 ng/mL). GFP positive cells were sorted with FACSAria II (BD Biosciences) six days after the first transduction.

## **ELISA**

For *in vitro* cytokine assays, CD4<sup>+</sup> T cells were seeded into plates coated with anti-CD3 antibodies (3  $\mu$ g/mL) and stimulated with soluble anti-CD28 antibodies (2  $\mu$ g/mL). Supernatants were collected 24 hours later. For *in vivo* IgE assays, serum was isolated from blood collected into the mouse retro-orbital sinus. Cytokines and immunoglobulins were quantified using the sandwich ELISA method. Supernatants or serums were incubated into 96 wells plates coated with anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-13 (eBioscience), anti-IFN $\gamma$  or anti-IgE (Interchim). Bound cytokines and IgE were then labeled with biotinylated anti-IL-4 (eBioscience), anti-IL-5 (eBioscience), anti-IL-13 (eBioscience), anti-IFN $\gamma$  (eBioscience), or anti-IgE (BD Pharmingen). Biotinylated antibodies were revealed by incubation with alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch) and subsequent adding of the alkaline phosphatase substrate pNPP disodium salt hexahydrate (Sigma-Aldrich). Absorbance was measured at 405-650 nm using an EMax Microplate Reader (Molecular Devices). Cytokines and immunoglobulins concentrations were calculated from standard curves generated by titration of recombinant mouse cytokines and purified immunoglobulins.

## **Confocal microscopy**

CD4<sup>+</sup> T cells in R10 were seeded onto glass slides coated with poly-L-lysine (0,01 % in water) (Sigma-Aldrich) during 10 minutes at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes. CD2 staining was performed using an anti-CD2 rat IgG

antibody (Abcam) for 30 minutes and an anti-rat IgG Alexa Fluor 488 antibody (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Molecular Probes) for 30 minutes. Cells were then permeabilized with 0,1% saponine 0,5% bovine serum albumin in PBS.  $\text{Ca}_v$  channel subunit staining's were performed using anti- $\text{Ca}_v1.2$  mouse IgG2b (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (NeuroMab), anti- $\text{Ca}_v\beta1$  rabbit IgG (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Alomone Labs) and anti- $\text{Ca}_v\beta3$  rabbit IgG (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Alomone Labs) antibodies overnight and anti-mouse IgG2b Alexa Fluor 555 and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647 antibodies (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Molecular Probes) for one hour. DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma-Aldrich) staining was then performed for 10 minutes. Slides were mounted in Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako) and analyzed using a LSM 710 confocal microscope (Zeiss).

### **Statistical analysis**

Groups were compared using the paired or unpaired t test as needed thanks to the Graphpad Prism software.

## Discussion

We have previously shown that knocking down the  $Ca_v1.2$  and  $Ca_v1.3$   $\alpha 1$  subunits in Th2-cells impaired their functions and protected against asthma (Djata Cabral et al., 2010). These subunits are voltage-gated calcium ion forming pores in excitable cells. However us and other groups showed that they are not voltage gated in lymphocytes. We then asked if auxiliary subunits as  $Ca_v\beta$  and  $Ca_v\alpha 2-\delta$  are required for Th2 cell functions and can be beneficially targeted in asthma.

Our results show that i) knocking down  $Ca_v\beta$  expression reduced TCR-driven  $[Ca^{2+}]_i$  increase and Th2 cytokine production by mouse and human Th2-cells with no effect on Th1-cells. ii)  $Ca_v\beta$  AS ONs designed to inhibit the four beta subunits was remarkably effective in protecting mice against the development of experimental asthma. The main roles of  $Ca_v\beta$  subunits in Th2-cells appeared to ensure the stability of  $\alpha 1$  proteins *in vitro* and *in vivo* iii)  $Ca_v\beta 1$  and  $Ca_v\beta 3$  have distinct roles as inhibiting  $Ca_v\beta 1$  but not  $Ca_v\beta 3$  decreased Th2 cytokine production. iv) a pharmacological inhibitor of  $Ca_v\alpha 2-\delta$  used for the treatment of chronic neuropathic pain reduces asthmatic airway inflammation.

It was previously shown that knockdown of  $Ca_v\beta$  can interfere with T-cell functions but the isoforms implicated seems to depend upon the type of T-cells.  $Ca_v\beta 2$  deletion (Jha et al., 2015) affects thymocyte development while  $Ca_v\beta 3$  and  $Ca_v\beta 4$  would be important for peripheral  $CD4^+$  T lymphocytes (Badou et al., 2006). Thus mice with  $Ca_v\beta 3$  or  $Ca_v\beta 4$  mutant  $CD4^+$  T-cells both exhibited defective  $Ca^{2+}$  influx and NFAT nuclear translocation and  $Ca_v\beta 4$  mutant cells showed decreased  $Ca_v1.1$   $\alpha 1$  expression but the expression of  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$  was spared (Badou et al., 2006). These data do not allow to determine the respective role of one or the other  $Ca_v\beta$  nor to definitely be sure that  $Ca_v\beta$  acts through its interaction with  $\alpha 1$  since  $Ca_v\beta 3$  and  $Ca_v\beta 4$  variants can have other functions, independent of their association with the  $\alpha 1$  subunit (Beguin et al., 2006; Dolphin, 2009; Ebert et al., 2008; Tadmouri et al., 2012; Zhang et al., 2010). For example,  $Ca_v\beta 3$  can inhibit  $Ca^{2+}$  oscillations in pancreatic  $\beta$  cells as  $Ca^{2+}$  oscillations increased in  $Ca_v\beta$  mutated cells although  $Ca_v$  currents are not altered in

mutant cells (Berggren et al., 2004). The authors showed that  $Ca_v\beta 3$  would act by limiting IP3 generation (Berggren et al., 2004).

Our data strongly show that  $Ca_v\beta$  subunits are required for proper calcium signaling and cytokine production in Th2-cells. Knocking down  $Ca_v\beta$  has the same impact on TCR-driven calcium response and cytokine production in Th2-cells, as  $Ca_v1.2 \alpha 1$  knocking down did, and both antisense are effective during the course of experimental asthma.

$Ca_v\beta$  subunits in association with the  $\alpha 1$  subunits have several functions, preventing ER retention, preventing protein degradation and once at the cell membrane increasing  $Ca_v$ -dependent calcium currents (Dolphin, 2009). The loss of expression of  $Ca_v1.2 \alpha 1$  in human and mouse Th2 cells transfected with  $Ca_v\beta$  AS without an impact on the level of transcripts pleads for a role of  $Ca_v\beta$  in stabilizing the  $\alpha 1$  protein. Surprisingly, transfection of ventricular myocytes with the same  $Ca_v\beta$ AS we used resulted in  $Ca_v1\alpha 1$  sequestration without increased cardiac  $Ca_v1.2 \alpha 1$  degradation (Leach et al., 2007b). This apparent discrepancy in T-lymphocytes and cardiac myocytes could be related to differences in  $Ca_v\beta$  subunit equipment and/or regulation in these cell types.  $Ca_v\beta$  can protect  $Ca_v1.2$  from degradation through several mechanisms. For example, the AKT pathway promotes  $Ca_v\beta 2$  phosphorylation in the heart, and the association of phosphorylated  $Ca_v\beta 2$  with  $Ca_v1.2 \alpha 1$  that contains highly conserved PEST sequences (signals for rapid protein degradation) would slow the recognition of these sequences and  $\alpha 1$  degradation in lysosomes (Catalucci et al., 2009b). In neurons,  $Ca_v\beta 1b$  protects the  $\alpha 1$  subunit to be degraded through the proteasome and allows routing to the plasma membrane (Altier et al., 2011). Surprisingly, MG132 allows the expression of  $Ca_v1.2 \alpha 1$  at the cell membrane even in the absence of  $Ca_v\beta$  while it was assumed that the absence of  $Ca_v\beta$  leads an ER export signal present on the  $Ca_v1.2 \alpha 1$  subunit I-II loop to be functionally overcome by multiple ER retention signals, resulting in channel ER retention (Fang and Colecraft, 2011). Upon  $\beta$ -binding to the  $Ca_v1.2 \alpha 1$  I-II loop, a C-terminus-dependent conformational rearrangement of the intracellular domains would occur that diminishes the strength of ER retention signals relative to I-II loop export signals, allowing channel transport to the cell surface.

Therefore the precise role and mechanisms by which  $\text{Ca}_v\beta$  regulates ER export and the stability of  $\text{Ca}_v1 \alpha1$  in Th2-cells remains to be determined.

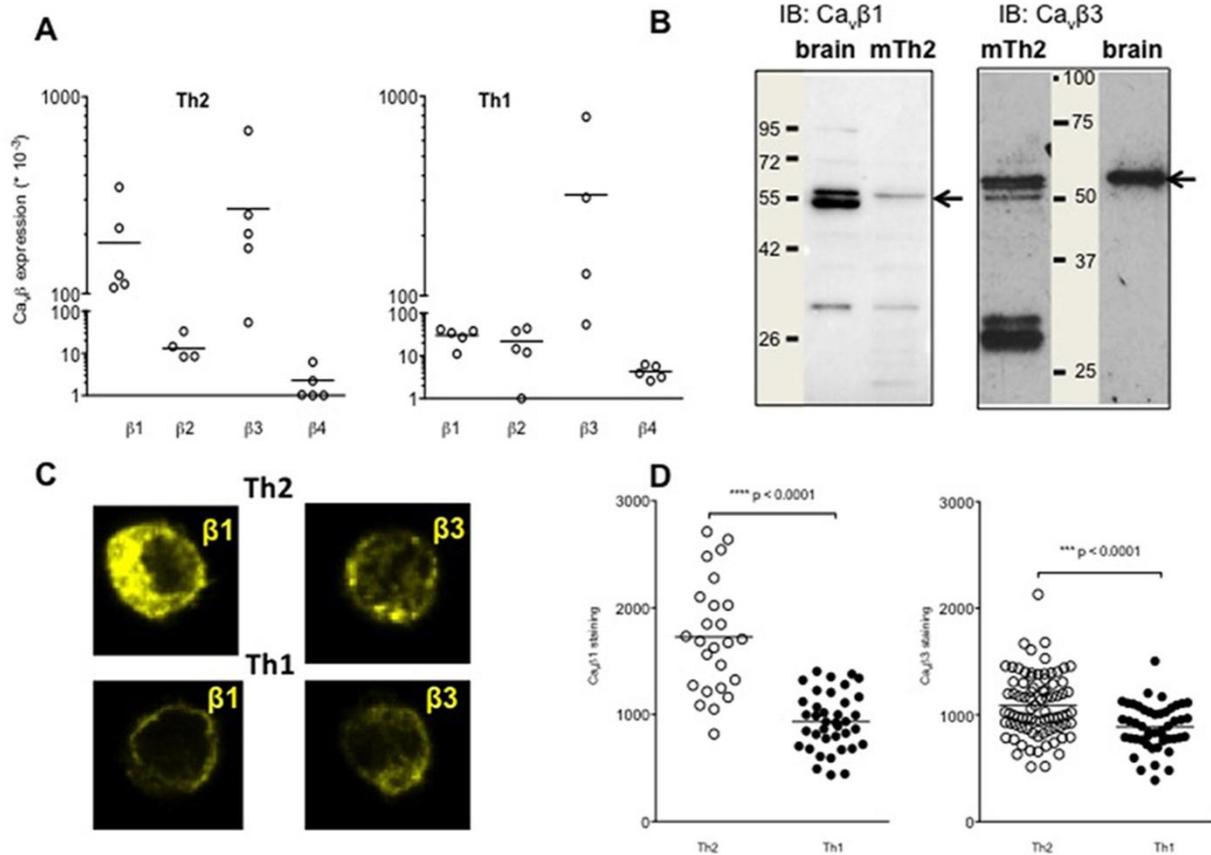
Mouse Th2-cells express predominantly both  $\beta1$  and  $\beta3$  subunits as human Th2 cells did (Robert et al., 2014). However targeting the expression of  $\text{Ca}_v\beta1$  but not  $\beta3$  appears to have an effect on Th2 cytokine production, showing that  $\beta1$  and  $\beta3$  subunits do not have redundant roles. Preferential association of  $\text{Ca}_v\beta$  with  $\alpha1$  subunits was not previously reported except for  $\beta1$  variant which was shown to preferentially interact with  $\text{Ca}_v1.1 \alpha1$  allowing the interaction of  $\text{Ca}_v1$  with type 1 ryanodine receptors (RyR) (Schredelseker et al., 2005) that are ER calcium channels. This allows the physical coupling of  $\text{Ca}_v1$  channels with RyR channels and ER calcium depletion. It will be helpful to determine if the  $\beta1$  subunit interacts with RyR channels in Th2-cells.

The  $\alpha2\text{-}\delta$  subunits are largely extracellular and are part of  $\text{Ca}_v1$  and  $\text{Ca}_v2$  channels in excitable cells. They contribute to the trafficking of  $\text{Ca}_v$  channels from the ER to the cell membrane, are involved in rab11-dependent endosomal  $\text{Ca}_v1$  recycling to the cell membrane, thereby increasing the  $\text{Ca}_v$  currents; they can also interact with extracellular matrix (reviewed in (Patel and Dickenson, 2016)). Chronic neuropathy was shown to be associated with  $\alpha2\text{-}\delta1$  overexpression (Li, 2004) and gabapentinoids, the  $\alpha2\text{-}\delta$  inhibitors that block all the  $\alpha2\text{-}\delta$  properties are therapeutically used in these pathological conditions.  $\alpha2\text{-}\delta2$  is detected in mouse and human Th2-cells and we showed for the first time that gabapentin affects Th2-functions and is markedly effective in preventing asthmatic airway inflammation. Altogether, these data stress the role of auxiliary subunits in  $\text{Ca}_v1$  channel functions in Th2-cells and show that the auxiliary subunits are potential therapeutic targets in allergy as the  $\alpha1$  subunits.

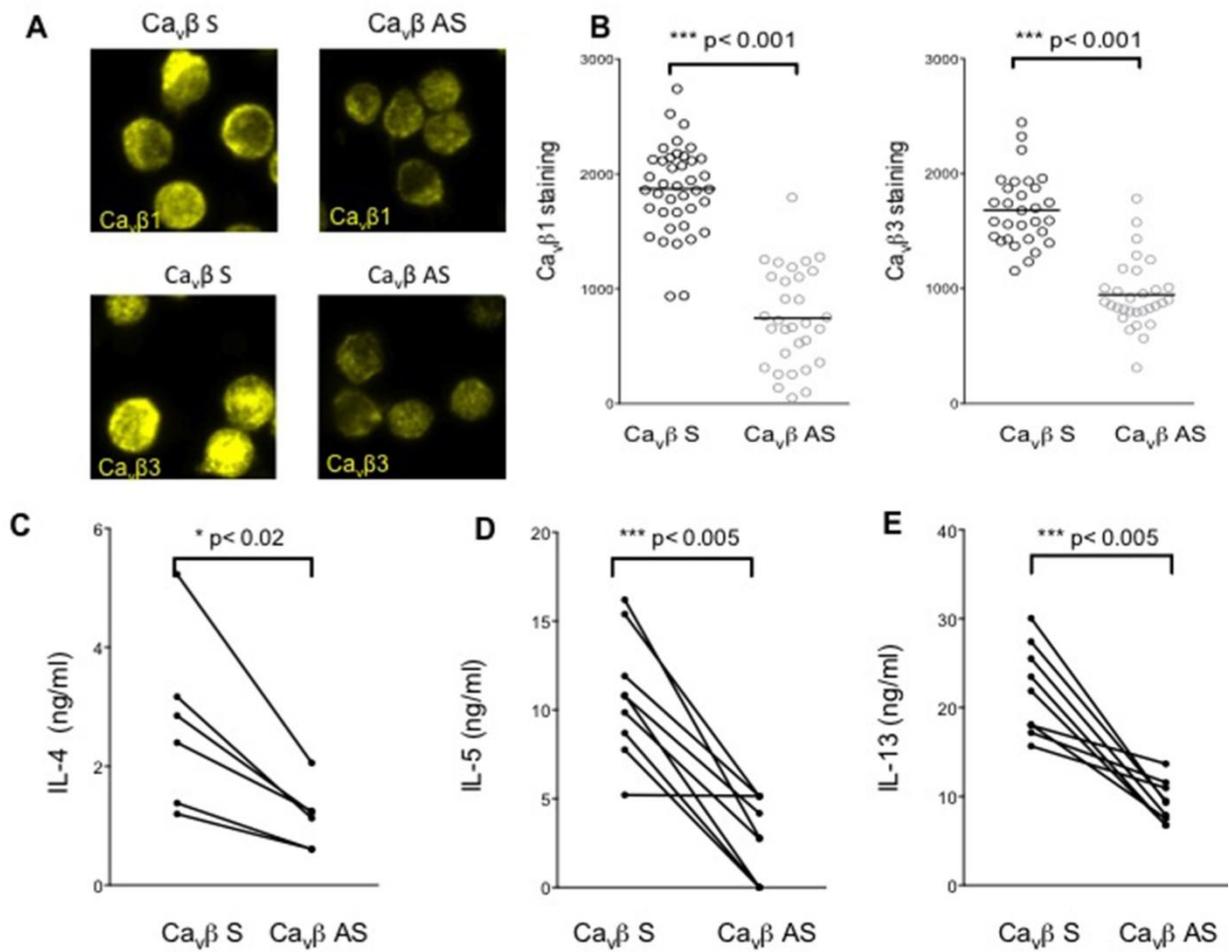
## References

1. Hogan, P.G., Lewis, R.S. & Rao, A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* **28**, 491-533 (2010).
2. Pelletier, L. & Savignac, M. Ca(2+) signaling in T-cell subsets with a focus on the role of cav1 channels: possible implications in therapeutics. *Front Immunol* **4**, 150 (2013).
3. Badou, A., Jha, M.K., Matza, D. & Flavell, R.A. Emerging roles of L-type voltage-gated and other calcium channels in T lymphocytes. *Front Immunol* **4**, 243 (2013).
4. Omilusik, K.D., Nohara, L.L., Stanwood, S. & Jefferies, W.A. Weft, warp, and weave: the intricate tapestry of calcium channels regulating T lymphocyte function. *Front Immunol* **4**, 164 (2013).
5. Catterall, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 521-555 (2000).
6. Dolphin, A.C. Calcium channel auxiliary  $\alpha 2\delta$  and  $\beta$  subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev NeuroScience* **13**, 542-555 (2012).
7. Badou, A., *et al.* Critical role for the beta regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15529-15534 (2006).
8. Jha, M.K., *et al.* Defective survival of naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the absence of the beta3 regulatory subunit of voltage-gated calcium channels. *Nat Immunol* **10**, 1275-1282 (2009).
9. Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S. & Wegener, J.W. L-Type Cav1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev* **94**, 303-326 (2014).
10. Beguin, P., *et al.* Nuclear sequestration of beta-subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca<sup>2+</sup> channel regulation. *J Mol Biol* **355**, 34-46 (2006).
11. Tadmouri, A., *et al.* Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *Embo J* **31**, 3730-3744 (2012).
12. Jha, A., *et al.* Essential roles for Cavb2 and Cav1 channels in thymocyte development and T cell homeostasis. *Sci Signal* **8**, 1-12 (2015).
13. Gomes, B., *et al.* Calcium channel blocker prevents T helper type 2 cell-mediated airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **175**, 1117-1124 (2007).
14. Djata Cabral, M., *et al.* Knocking-down Cav1 Calcium Channels Implicated in Th2-cell Activation Prevents Experimental Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **181**, 1310-1317 (2010).

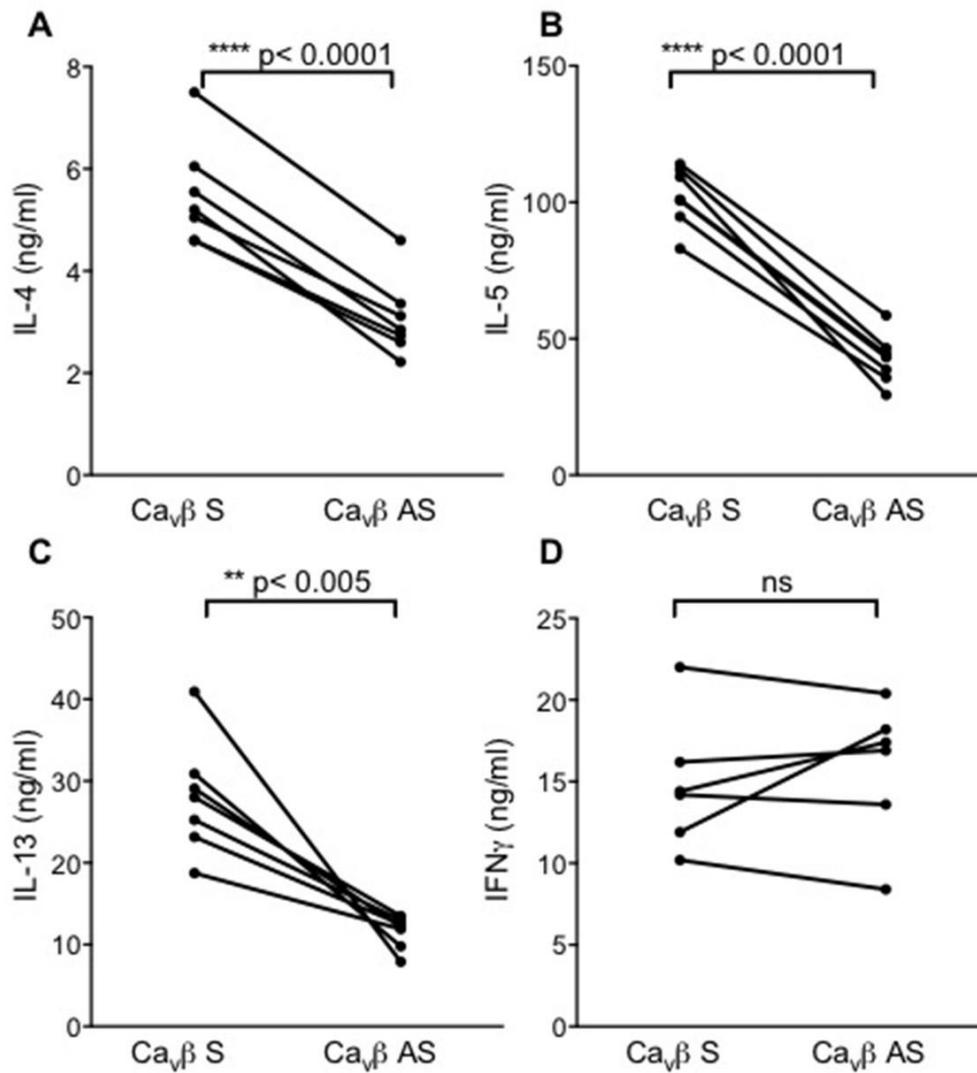
15. Robert, V., *et al.* Protein kinase C-dependent activation of CaV1.2 channels selectively controls human TH2-lymphocyte functions. *J Allergy Clin Immunol* **133**, 1175-1183 (2014).
16. Berrow, N.S., Campbell, V., Fitzgerald, E.M., Brickley, K. & Dolphin, A.C. Antisense depletion of beta-subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. *J Physiol* **482 ( Pt 3)**, 481-491 (1995).
17. Altier, C., *et al.* The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci* **14**, 173-180 (2011).
18. Warnier, M., *et al.* CACNA2D2 promotes tumorigenesis by stimulating cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* **34**, 5383-5394 (2015).
19. Ebert, A.M., *et al.* Ca<sup>2+</sup> channel-independent requirement for MAGUK family CACNB4 genes in initiation of zebrafish epiboly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 198-203 (2008).
20. Dolphin, A.C. Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol* **19**, 237-244 (2009).
21. Zhang, Y., *et al.* The beta subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *J Biol Chem* **285**, 2527-2536 (2010).
22. Berggren, P.O., *et al.* Removal of Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit enhances Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell* **119**, 273-284 (2004).
23. Leach, R.N., Brette, F. & Orchard, C.H. Antisense oligonucleotide against the Ca channel beta subunit decreases L-type Ca current in rat ventricular myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **352**, 794-798 (2007).
24. Catalucci, D., *et al.* Akt regulates L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity by modulating Cavalpha1 protein stability. *J Cell Biol* **184**, 923-933 (2009).
25. Fang, K. & Colecraft, H.M. Mechanism of auxiliary beta-subunit-mediated membrane targeting of L-type (Ca(V)1.2) channels. *J Physiol* **589**, 4437-4455 (2011).
26. Schredelseker, J., *et al.* The beta 1a subunit is essential for the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17219-17224 (2005).
27. Patel, R. & Dickenson, A.H. Mechanisms of the gabapentinoids and alpha 2 delta-1 calcium channel subunit in neuropathic pain. *Pharmacol Res Perspect* **4**, e00205 (2016).
28. Li, C.Y. Spinal Dorsal Horn Calcium Channel 2 -1 Subunit Upregulation Contributes to Peripheral Nerve Injury-Induced Tactile Allodynia. *Journal of Neuroscience* **24**, 8494-8499 (2004).



**Fig. 1. Ca<sub>v</sub>β1 expression characterizes Th2-cells.** OVA-specific Th2 and Th1-cells were generated in polarizing conditions from DO11.10 mice and tested for the expression of Ca<sub>v</sub>β transcripts (A). Quantification of Ca<sub>v</sub>β gene expression was calculated by normalizing the values relative to the expression of the housekeeping gene HPRT. The amounts of mRNA were expressed as arbitrary units relative to HPRT ( $2^{-(Ct \text{ interest gene} - Ct \text{ HPRT})} \times 10^{-3}$ ). Ca<sub>v</sub>β1 and Ca<sub>v</sub>β3 proteins were also detected at the expected sizes by blotting Th2-cell lysates with the appropriate antibodies. Brain was used as a control. C) Immunofluorescence confirms the expression of Ca<sub>v</sub>β1 and Ca<sub>v</sub>β3 in Th2 compared to Th1-cells and D) quantifies the total expression of β subunits. One experiment out of 3 is shown. At least 40 cells/field were analyzed. The bars represent the mean.

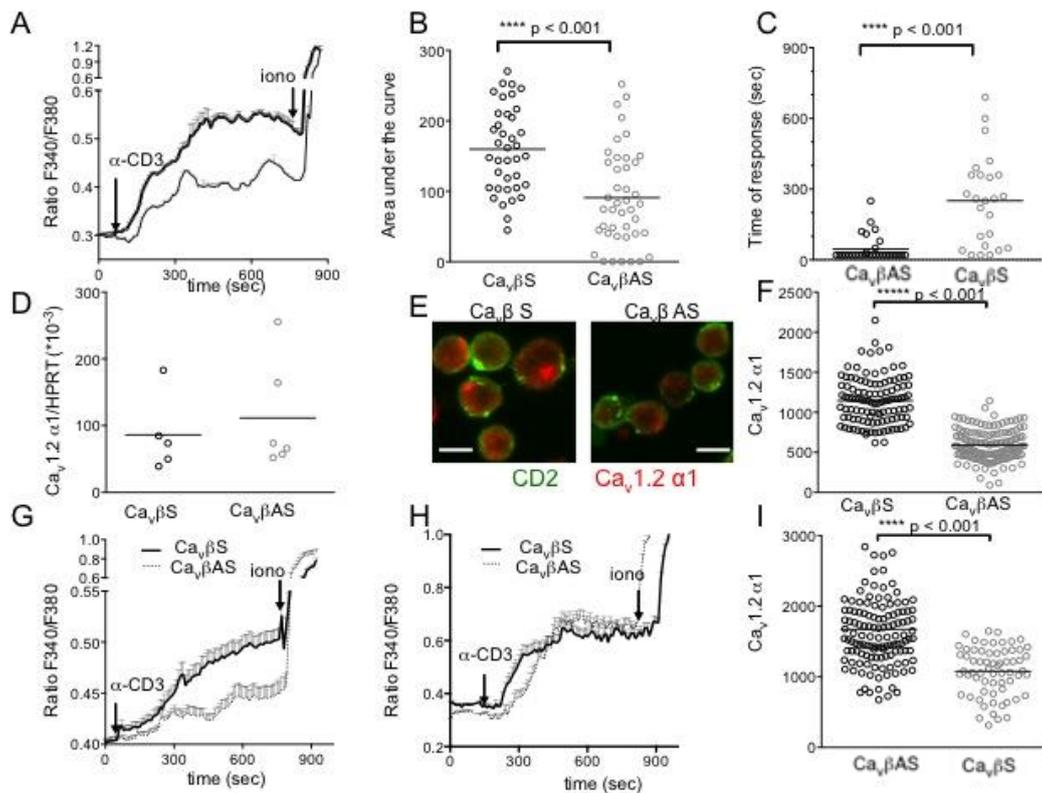


**Fig. 2 Ca<sub>v</sub>β AS diminish mouse Th2 cytokine production.** **A)** Th2-cells were transfected with Ca<sub>v</sub>β S and Ca<sub>v</sub>β AS ONs for 72h before staining with specific anti-Ca<sub>v</sub>β1 and Ca<sub>v</sub>β3 antibodies (A) and the quantification is shown in B). One representative experiment out of 3 is shown. C-E) Th2 cells transfected with (Ca<sub>v</sub>β AS) or control (Ca<sub>v</sub>β S) ONs were stimulated for 24 hours with anti-CD3/C28 antibodies and cytokine production was measured. Results were compared using paired t test (6 to 9 independent experiments).



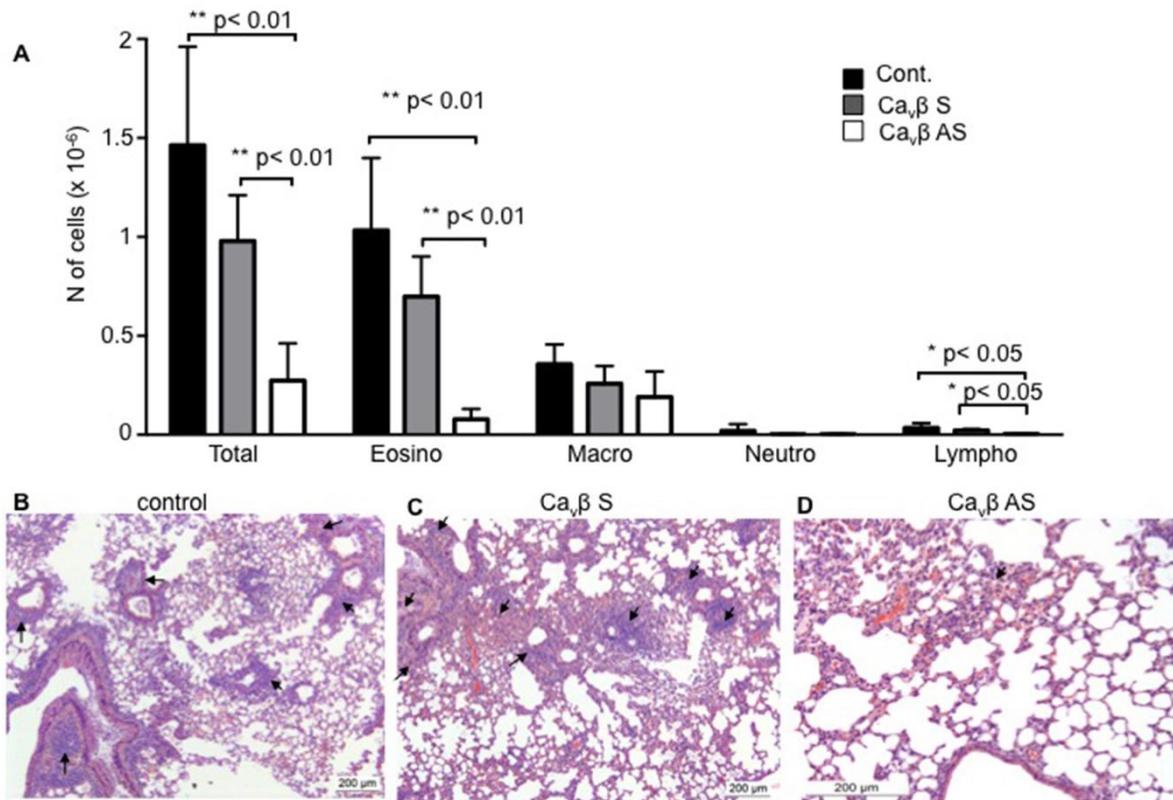
**Fig. 3. Knocking down Ca<sub>v</sub>β subunits inhibits human Th2 but not Th1 cytokine production.** Human CRTH2<sup>+</sup> (A-C) or Th1 (D) cells generated *in vitro* in polarizing conditions were transfected with control (Ca<sub>v</sub>β S) or Ca<sub>v</sub>β antisense ONs (Ca<sub>v</sub>β AS), washed and stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies for 24 h before analysis of the cytokine content. Results were compared using a paired t test (5 to 6 independent experiments).

Fig. 4 Knocking down  $Ca_v\beta$  subunits reduces TCR-driven  $[Ca]_i$  increase in Th2 cells and decreases  $Ca_v1\ \alpha1$  expression in mouse and human Th2-cells

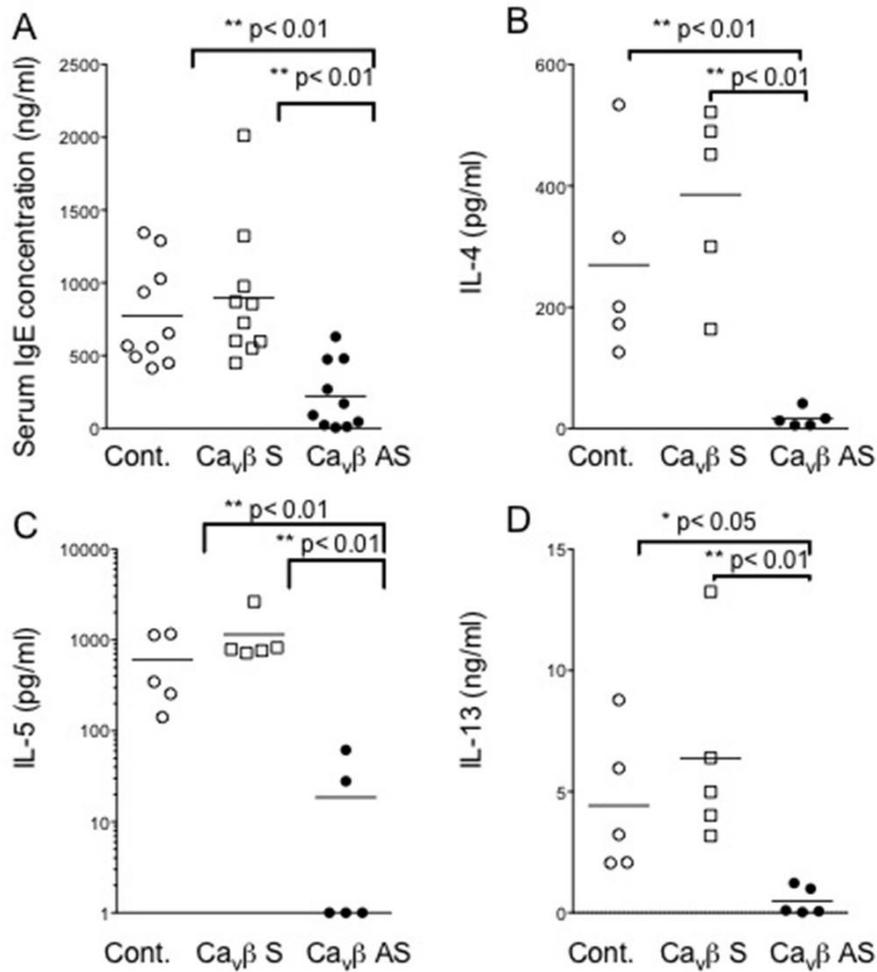


**Fig. 4. Knocking down  $Ca_v\beta$  subunits reduces TCR-driven  $[Ca]_i$  increase in Th2-cells and decreases  $Ca_v1\ \alpha1$  expression in mouse and human Th2-cells.**

Mouse Th2-cells were transfected with  $Ca_v\beta$ AS or control ( $Ca_v\beta$ S) and loaded with Fura2-AM. The fluorescence ratio at 340 and 380 nm excitation wavelengths was recorded at the single cell level (A) before and after stimulation with anti-CD3/CD28 coated beads (TCR); ionomycin (iono) was added at the end of the experiment. The time of response (defined as the delay between stimulation and the time showing an increase of the ratio over the mean ratio plus 1 SD recorded before stimulation) and the area under the curve are depicted in B and C. D). The amount of  $Ca_v1.2\ \alpha1$  transcripts was measured by qPCR 72 hours after transfection with control of  $Ca_v\beta$ AS. E) Mouse Th2-cells were transfected with control ( $Ca_v\beta$ S) or  $Ca_v\beta$ AS, for 72 hours. Mouse Th2 cells were then stimulated with beads coated with anti-CD3/CD28 for 24 hours before to be stained with anti-CD2 (green) and anti- $Ca_v1.2\ \alpha1$  (red) antibodies. The bar: 10  $\mu$ m. The  $Ca_v1.2$  cell amount over all the Z stack sections was shown in F. One representative experiment out of three is shown. Human Th2 (G) and Th1 (H) cells were loaded with the calcium probe Fura2-AM. The fluorescence ratio at 340 and 380 nm excitation wavelengths was recorded at the single cell level before and after stimulation with beads coated with anti-CD3/CD28 abs (TCR). Results show the mean plus 1SD of 25-50 cells. One representative experiment out of 6 (G) and 4 (H) is shown. Human Th2 cells transfected with  $Ca_v\beta$ S or  $Ca_v\beta$ AS were processed as in E and the amount of  $Ca_v1.2\ \alpha1$  was quantified (I) as in F. One experiment representative out of three is shown.

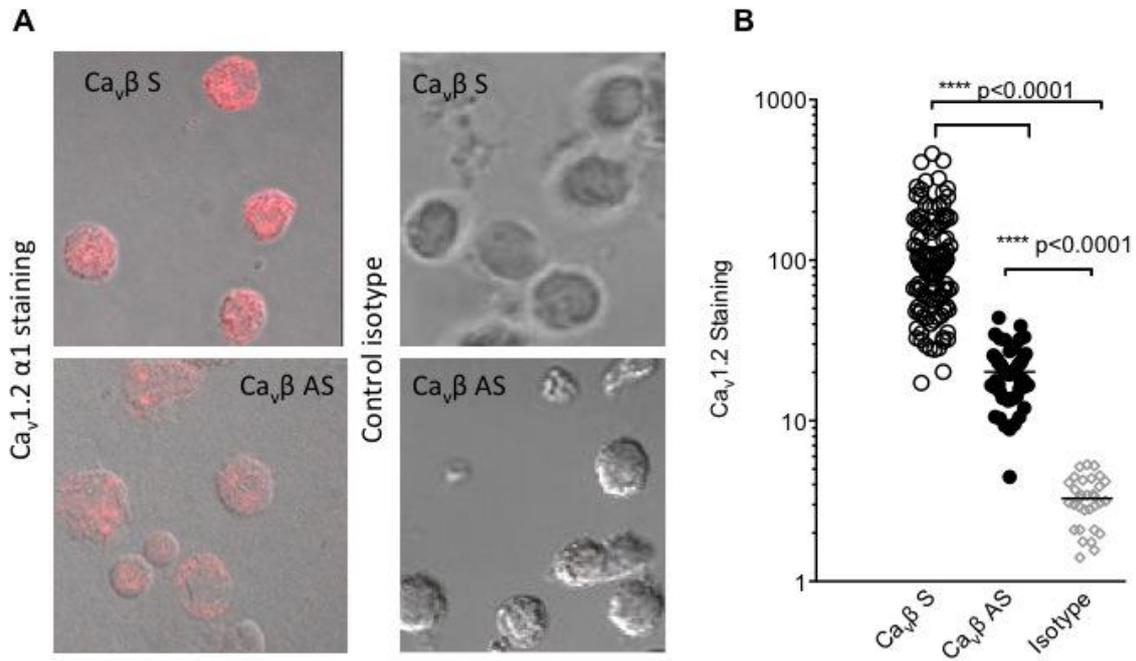


**Fig. 5. Ca<sub>v</sub>β AS ONs administration prevents airway inflammation in an asthma model**  
 BALB/c mice were immunized with OVA in alum and were challenged 15 days later with intranasal OVA only or OVA plus control (Ca<sub>v</sub>β S) or OVA plus Ca<sub>v</sub>β antisense (Ca<sub>v</sub>β AS) ONs every day for 5 days. A) Number of cells into the broncho-alveolar lavage fluid (BAL). B-D) H&E sections from the mice. The arrows indicate the cellular infiltrates. Results are the mean of 6 mice and are representative of 2 independent experiments.

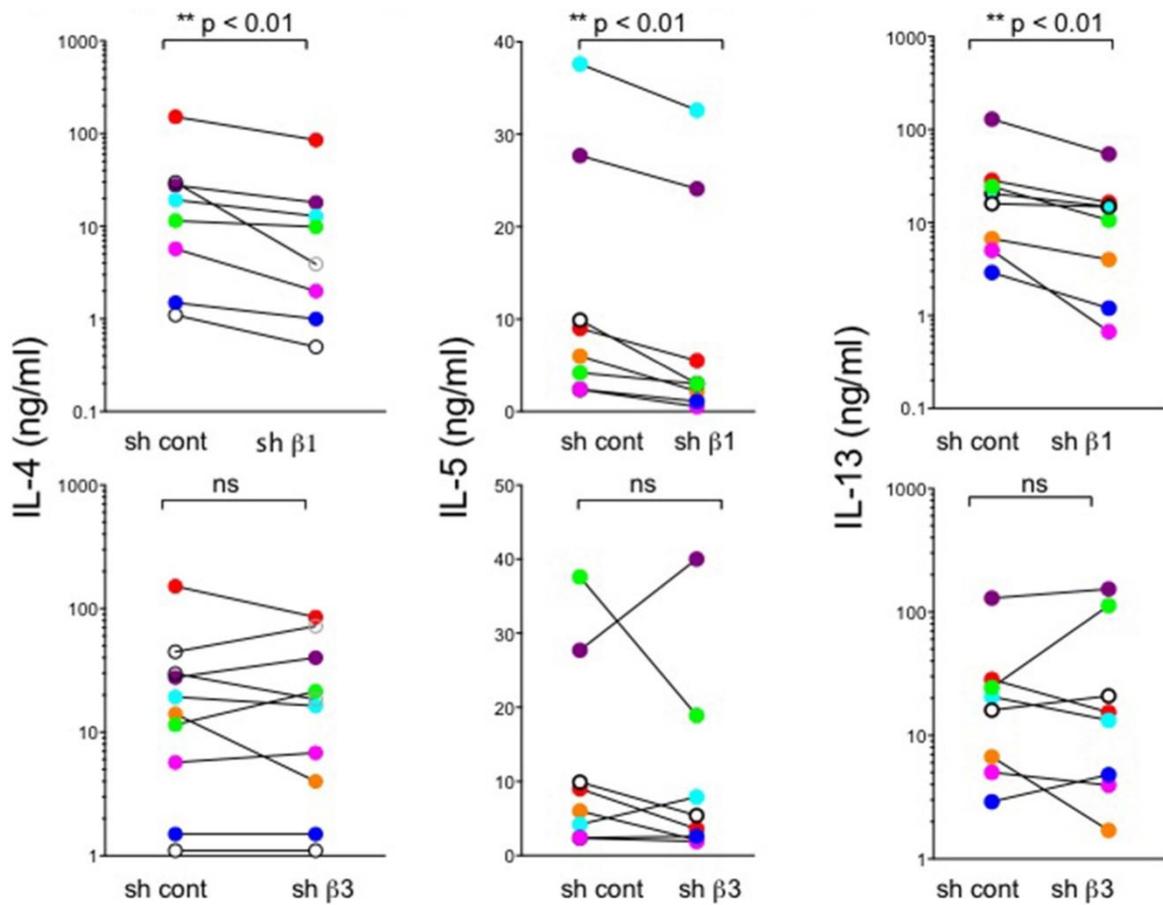


**Fig.6.  $Ca_v\beta$  AS ON administration strongly diminishes Th2 responses *in vivo*.** BALB/c mice were immunized with OVA in alum and challenged 15 days later with OVA minus (Cont.) or plus control ( $Ca_v\beta$  S) or  $Ca_v\beta$  antisense ( $Ca_v\beta$  AS) ONs for 5 days. Mice were then sacrificed. Serum IgE concentration was measured (A) and mediastinal lymph nodes were collected. Lymph node cells were stimulated for 3 days with OVA (100  $\mu$ g/ml), and Th2 cytokine production was measured by ELISA (B-D).

Fig. 7 Lung infiltrating CD4<sup>+</sup> cells from mice treated with Ca<sub>v</sub>β AS ONs express reduced amounts of α1 Ca<sub>v</sub>1.2 channels

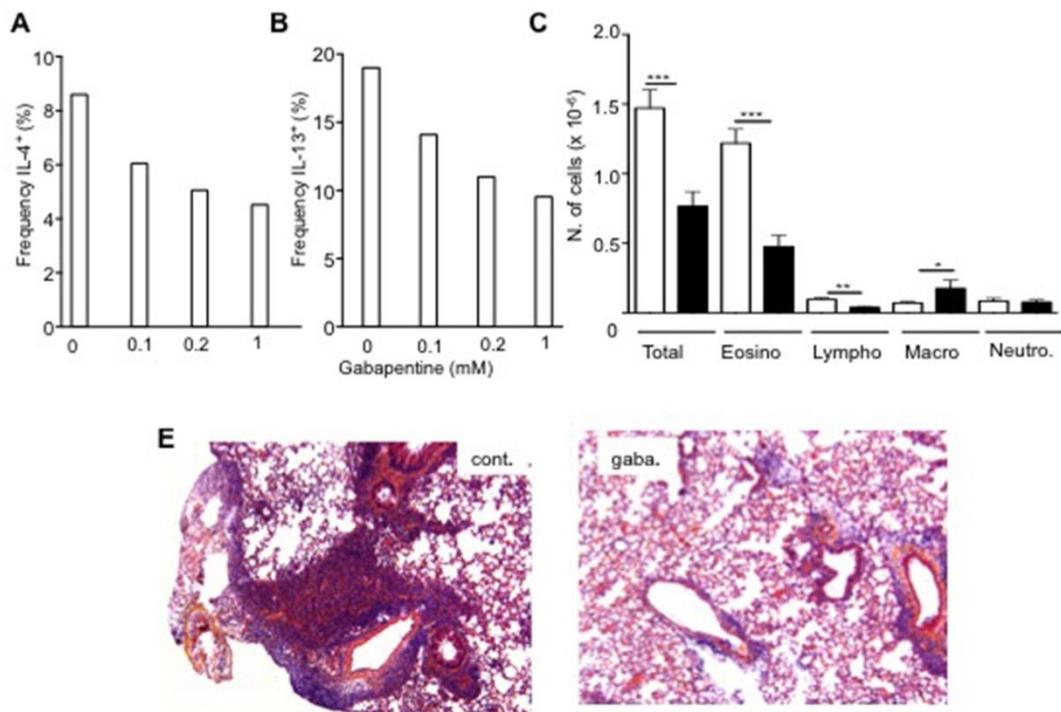


**Fig. 7. Lung infiltrating CD4<sup>+</sup> cells from mice treated with Ca<sub>v</sub>β AS ONs express reduced amounts of α1 Ca<sub>v</sub>1.2 channels.** BALB/c mice were immunized with OVA in alum and were challenged 15 days later with OVA plus control (Ca<sub>v</sub>β S), or OVA plus Ca<sub>v</sub>β antisense (Ca<sub>v</sub>β AS) ONs every day for 5 days. Lung cells were collected and CD4<sup>+</sup> T-cells were purified and stained with anti-Ca<sub>v</sub>1.2 α1 mAb or with control isotype. Optical sections were shown in A. Quantification was done by collecting data from all the Z stack sections. Each point represents one cell. Results are representative from 4 mice per group.

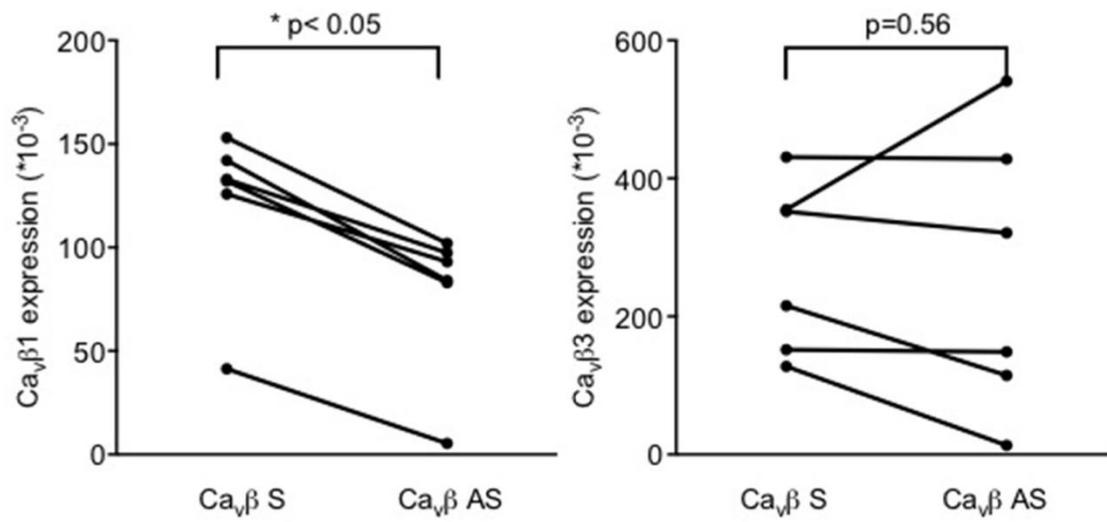


**Fig. 8. Knocking down  $Ca_v\beta 1$  but not  $Ca_v\beta 3$  reduces Th2 cytokine production.**

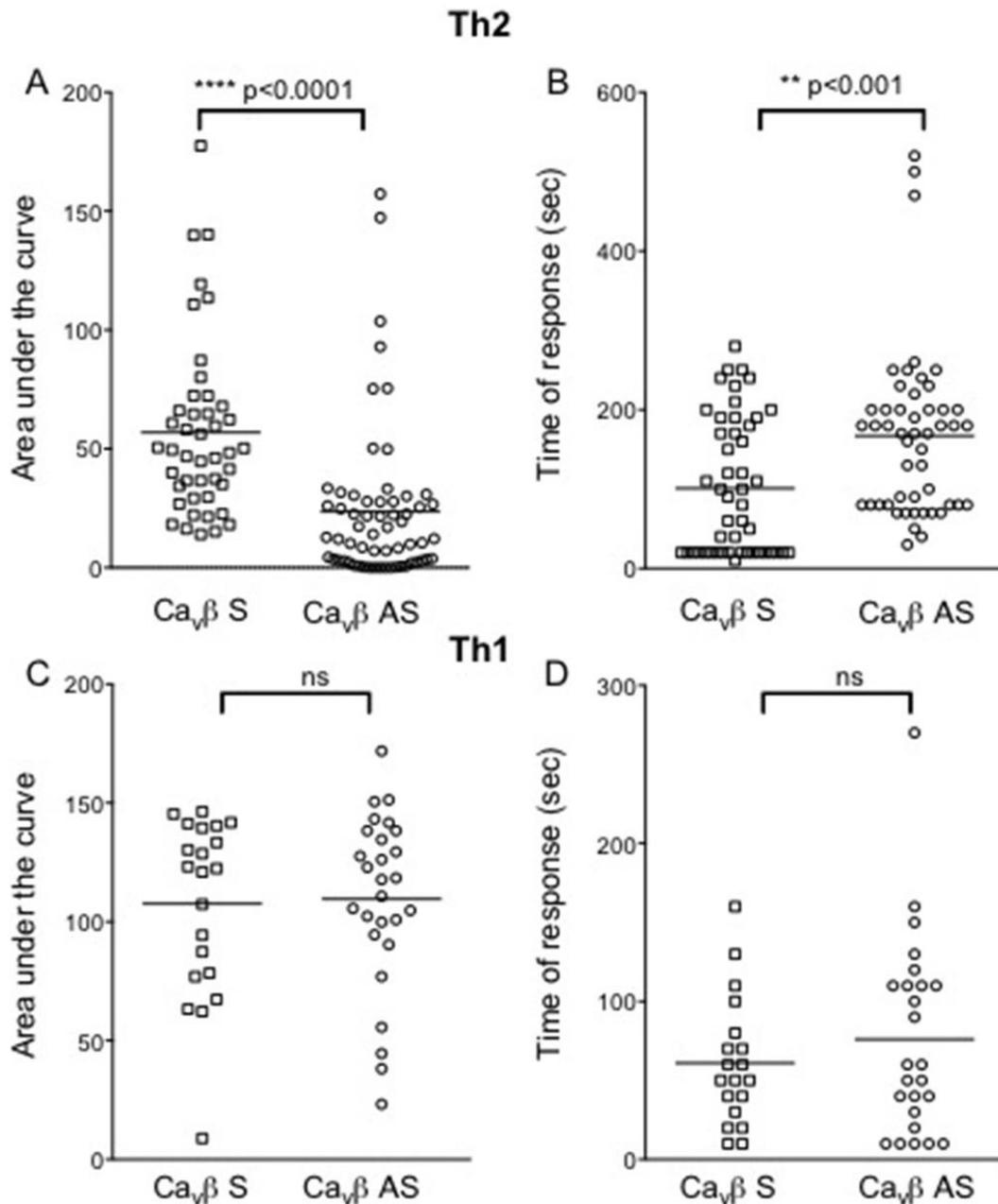
Mouse Th2-cells were transduced with shRNAs specific for  $Ca_v\beta 1$  (sh $\beta 1$ )  $Ca_v\beta 3$  (sh $\beta 3$ ) or an irrelevant target (sh cont). Four days later, T-cells were recovered and stimulated for 24 hours with anti-CD3/CD28 antibodies before cytokine content determination. Data between control and sh $\beta$  transduced cells were compared by using paired t test (n=8).



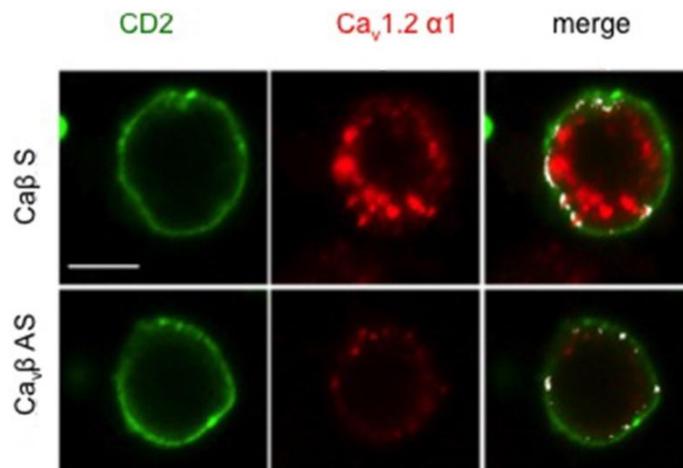
**Fig. 9. Gabapentin, an inhibitor of  $\alpha 2\delta$  subunits prevents asthma.** A-B OVA-specific DO11.10 Th2-cells were pre-incubated with increasing concentrations of gabapentin for 18 hours before to be stimulated with anti-CD3/CD28 mAbs for 6 hours and analyzed for the intracellular expression of IL-4 (A) and IL-13 (B). C) DO11.10 Th2-cells were stimulated with APC and the OVA peptide for 24 hours before determination of IL-4 production in culture supernatants. D-E) BALB/c mice were immunized with OVA in alum and then challenged with intranasal OVA for 6 days. Gabapentin was or not given in drinking water for the last 6 days. The next day mice were killed and the broncho-alveolar lavage fluid was collected and analyzed for the inflammatory cell content (D). H&E histological sections were shown in E. 6-7 mice per group.



**Supplementary Fig.1. Ca<sub>v</sub>β AS ONs target mainly the Ca<sub>v</sub>β1 subunit in human Th2 cells.** Human CRTH2<sup>+</sup> cells were transfected with control or Ca<sub>v</sub>β antisense (Ca<sub>v</sub>β AS) for 72 hours before analysis of Ca<sub>v</sub>β expression.



**Supplementary Fig.2.  $Ca_v\beta$ AS impact TCR driven calcium signal in Th2 but not Th1-cells.** Human CRTH2+ (A-B) cells or Th1 cells (C-D) generated in polarizing conditions were transfected with  $Ca_v\beta$  antisense ONs ( $Ca_v\beta$  AS) or control ( $Ca_v\beta$  S) and loaded with the calcium probe Fura2-AM. The fluorescence ratio at 340 and 380 nm excitation wavelengths was recorded at the single cell level before and after stimulation with beads coated with anti-CD3/CD28 abs (TCR). A and C show the area under the curve that integrates the increase in the  $[Ca^{2+}]_i$  between stimulation and ionomycin (iono) application for each cell analyzed during one experiment. B and D) The time of response (delay between stimulation and the time showing an increase of the ratio over the mean ratio plus 1 SD recorded before stimulation) is shown for each cell during one experiment.



**Supplementary Fig.3. Ca<sub>v</sub>β AS significantly decreases Ca<sub>v</sub>1.2 α1 expression in human Th2-cells.** Human Th2-cells were transfected with control (Ca<sub>v</sub>βS) or Ca<sub>v</sub>βAS. 72 hours later, they were stimulated for additional 24 hours before staining with anti-CD2 (green) and anti-Ca<sub>v</sub>1.2 α1 antibodies (red). Representative optical sections are shown. Bar: 10μm.

# Discussion et perspectives

## Mise en évidence *in vitro* du rôle des sous-unités auxiliaires des canaux $Ca_v$ dans la biologie des lymphocytes Th2

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence le rôle essentiel des sous-unités auxiliaires des canaux calciques voltage-dépendants  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$  dans la biologie des lymphocytes Th2.

Les sous-unités  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$  ont été décrites dans les cellules excitables pour assurer les fonctions biophysiques du canal et garantir sa stabilité, son adressage à la membrane plasmique et son recyclage. L'analyse des différentes sous-unités  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$  dans les lymphocytes Th2 murins et humains a mis en évidence l'expression préférentielle de  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  et  $\alpha_2\delta_2$ . Du point de vue fonctionnel, le *knock-down* post-transcriptionnel de  $\beta$  avec les oligodeoxynucléotides (ODN) antisens ciblant les quatre sous-unités  $\beta$  ou l'inhibition des sous-unités  $\alpha_2\delta$  par la gabapentine, un inhibiteur pharmacologique, engendrent une forte diminution de la production de cytokines en réponse à la stimulation du TCR dans les Th2. Ainsi, nos résultats tendent à confirmer que les canaux calciques voltage-dépendants exprimés dans les lymphocytes Th2 sont composés d'une sous-unité principale  $\alpha_1$  et des sous-unités auxiliaires  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$  de la même façon que dans les cellules excitables. Le travail de notre équipe est d'ailleurs le premier à montrer formellement l'implication de la sous-unité  $\alpha_2\delta$  dans la biologie des lymphocytes T.

Le *knock-down* de  $\beta$  avec les ODN antisens dans les Th2 murins et humains a les mêmes conséquences fonctionnelles que lors de l'application d'antisens ciblant la sous-unité  $\alpha_1$  de  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  (Djata Cabral et al., 2010) (Robert et al., 2014), les deux canaux  $Ca_v1$  exprimés dans les lymphocytes Th2. De plus, l'absence de  $\beta$  se traduit par une diminution de l'expression de  $Ca_v1.2$  et une réduction de la réponse calcique après stimulation du TCR. Cela démontre que la fonction de  $\beta$  dans les LTh2 humains et murins passe par son association avec la sous-unité  $\alpha_1$ . Ces résultats tendent à indiquer que la sous-unité  $\beta$  agit dans les lymphocytes Th2 de façon similaire aux cellules excitables pour assurer la stabilité des canaux  $Ca_v$ . Nous pensons que  $\beta$  agit de la même manière pour assurer la stabilité de  $Ca_v1.3$  dans les LTh2 et cela devra être confirmé.

Par la suite, des expériences similaires à celles réalisées avec  $\beta$  devront être réalisées pour montrer que les sous-unités  $\alpha_2\delta$  agissent, comme  $\beta$ , par leur association avec  $\alpha_1$ . La gabapentine est un inhibiteur des sous-unités  $\alpha_2\delta$  dérivé du neurotransmetteur GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique). Par sa liaison aux sous-unités  $\alpha_2\delta$ , la gabapentine réduit fortement la

localisation des canaux  $Ca_v$  à la membrane. Elle agit en inhibant le trafic du canal au niveau post-Golgi et le recyclage du canal. En liant le canal, elle interfère avec l'activité de la GTPase Rab11 au niveau des endosomes de recyclage et la prise en charge du canal dans ses endosomes (Tran-Van-Minh and Dolphin, 2010). Nous pensons donc que cette molécule agit *in vitro* et *in vivo* en inhibant le recyclage des canaux, réduisant ainsi leur nombre à la membrane.

Il est communément admis que l'étude des canaux calciques voltage-dépendants dans des systèmes de surexpression nécessite la co-expression des sous-unités  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$  avec  $\alpha_1$  pour avoir un adressage correct à la membrane. Celles-ci ont été décrites pour assurer la stabilité, l'adressage, ou encore le recyclage des canaux. Nos hypothèses de travail sont en grande partie orientées par les travaux des équipes de G. Zamponi et A. Dolphin. Elles ont réalisé des travaux très convaincants pour essayer de comprendre le rôle des sous-unités auxiliaires dans ces phénomènes, notamment dans les neurones. L'équipe de C.H. Orchard a pour sa part étudié le rôle de la sous-unité  $\beta$  dans les cardiomyocytes. Celle-ci a observé que l'inhibition de  $\beta$  réduit le nombre de canaux exprimés à la membrane plasmique mais n'a pas d'effet sur la quantité totale, montrant donc que  $\beta$  n'a aucun effet sur la stabilité du canal (Leach et al., 2007a). Cette conclusion va à l'encontre de beaucoup de travaux publiés mais elle est intéressante car ses auteurs utilisent la même stratégie d'ODN antisens que nous. Nous pensons que ces travaux ne sont pas forcément contradictoires et que les différences observées peuvent s'expliquer par une spécificité fonctionnelle propre à chacune des quatre sous-unités  $\beta$  et aux tissus considérés. En l'occurrence, l'effet de la sous-unité  $\beta$  sur la stabilité des canaux  $Ca_v$  dans les LTh2 se rapproche de travaux de Zamponi dans le cerveau. Nous aimerions également déterminer la part des différentes sous-unités auxiliaires dans la stabilité, l'adressage et le recyclage des canaux dans les LTh2. Dans sa publication, C. Altier montre qu'une faible proportion de canaux peut se localiser à la membrane plasmique en absence de sous-unités auxiliaires (Altier et al., 2011). G.W. Zamponi suggère que le site d'export du RE dans la boucle I-II de  $\alpha_1$  suffirait à certains canaux pour sortir du RE et aller à la membrane plasmique par eux-mêmes (Simms and Zamponi, 2012). Cela pourrait indiquer que la sous-unité  $\beta$  est surtout utile pour la stabilité ou le recyclage du canal. L'effet sur l'adressage n'en serait qu'une conséquence et cela ferait de  $\alpha_2\delta$  la principale sous-unité auxiliaire impliquée dans l'adressage du canal. Nous tenterons de répondre à cette question par le *knock-down* de  $\beta$  dans les LTh2 en présence du MG132, un inhibiteur du protéasome. Si  $\beta$  est véritablement impliquée dans la stabilité ou le recyclage du canal et non dans l'adressage, nous nous attendons à observer une restauration de l'expression du canal à la membrane plasmique, et ce malgré le *knock-down* de  $\beta$ . Des analyses plus précises de localisation des canaux  $Ca_v$  à la membrane plasmique et dans les endosomes par immunofluorescence ou des western-blot sur les protéines de surface

biotinylées seront nécessaires pour déterminer si la déplétion de la sous-unité  $\beta$  s'accompagne d'une diminution de l'adressage du canal à la membrane ou de son recyclage, en particulier dans les cellules traitées par le MG132. A plus long terme, nous aimerions mettre au point des expériences basées sur l'utilisation de protéines étiquetées avec différents marqueurs fluorescents, idéalement en créant des lymphocytes T *knock-in* pour ces marqueurs ce qui nous permettrait de conserver la stoechiométrie des protéines endogènes. Nous pourrions observer le trafic de ces sous-unités par microscopie à fluorescence en temps réel depuis leur synthèse jusqu'à leur arrivée à la membrane. De plus, des co-localisations avec les protéines spécifiques des organelles du système endomembranaire nous permettraient d'observer le trafic, l'assemblage et le recyclage de ces sous-unités à travers les différents compartiments. Nous pourrions ainsi déterminer comment l'absence d'une ou l'autre des sous-unités auxiliaires impacte ces phénomènes. Enfin, des expériences d'électrophysiologie (patch-clamp) ou de microscopie en onde évanescente seront nécessaires pour caractériser le courant calcique dépendant des  $Ca_v$  dans les LTh2 après stimulation du TCR et déterminer si les sous-unités auxiliaires régulent les propriétés de ce courant dans ces cellules.

### **Expression différentielle de $Ca_v\beta 1$ et $Ca_v\beta 3$ dans les LTh2 et LTh1 murins et humains**

Nos travaux ont mis en évidence l'expression préférentielle des sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 3$  dans les lymphocytes Th2 murins et humains et de  $\beta 3$  dans les LTh1.

Le *knock-down* spécifique des différentes sous-unités  $\beta$  par des shRNA fait ressortir  $\beta 1$  comme la seule sous-unité  $\beta$  indispensable à la fonction des LTh2. Nous devons par la suite analyser la réponse calcique et l'expression de  $Ca_v1.2$  lors de l'inhibition de  $\beta 1$  pour déterminer si  $\beta 1$  est bien comme nous le pensons responsable de la stabilité du canal. Ce travail met aussi en évidence l'expression de la sous-unité  $\beta 3$  dans les lymphocytes Th2. Cette co-expression n'est pas surprenante car il est connu que la plupart des cellules excitables, par exemple les neurones et les cardiomyocytes, co-expriment plusieurs sous-unités  $\beta$  (Buraei and Yang, 2010). Aucune étude à notre connaissance n'a jamais montré la part de chaque sous-unité  $\beta$  dans la fonction de ces cellules. De façon surprenante, le *knock-down* de  $\beta 3$  n'a pas d'effet sur la réponse fonctionnelle des Th2.  $\beta 3$  ne semble donc pas compenser la déficience de  $\beta 1$  et ce résultat montre la non redondance de ces sous-unités  $\beta$ . Cependant, notre travail n'a pas permis de montrer clairement l'implication de  $\beta 3$  dans la fonction des Th2. L'expression de  $\beta 3$  et l'augmentation de cette expression avec la stimulation du TCR tendent à indiquer un rôle de cette sous-unité dans les fonctions effectrices des lymphocytes Th2. On peut alors imaginer que contrairement à  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  pourrait être compensé par une autre sous-unité  $\beta$ , comme  $\beta 1$ . Ce genre de compensation n'a jamais

été mis en évidence à notre connaissance mais il est plausible au vu des fonctions similaires des différentes sous-unités  $\beta$ . Cependant nos données préliminaires à ce jour tendent plutôt à montrer que l'inhibition de  $\beta 1$  induit une surexpression de  $\beta 3$  et non l'inverse. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle de  $\beta 3$  dans les Th2.

Cette sous-unité  $\beta 3$  est également exprimée dans les lymphocytes Th1. Or ces Th1 n'expriment pas de canaux  $Ca_v1$ . On pourrait imaginer que cette sous-unité  $\beta 3$  s'associe à d'autres canaux  $Ca_v$  mais l'inhibition de toutes les sous-unités  $\beta$  dans les lymphocytes Th1 avec les ODN antisens n'a pas d'effet sur la réponse calcique. Cela indique clairement que la fonction de  $\beta 3$  dans les Th1 est indépendante de canaux calciques. Il est donc peu probable que  $\beta 3$  agisse par l'intermédiaire de canaux  $Ca_v$ . La sous-unité  $\beta 3$  est connue pour avoir de nombreuses fonctions indépendantes de ces canaux. Par exemple, elle régule la libération des stocks de calcium du RE dépendante de l' $IP_3$  (Berggren et al., 2004) et peut agir comme régulateur transcriptionnel (Zhang et al., 2010). On peut imaginer que  $Ca_v\beta 3$  agisse par des mécanismes similaires dans les Th1 mais l'absence d'effet sur la production de cytokines après traitement par les ODN antisens  $\beta$  tend à montrer le rôle limité de cette protéine dans ces cellules.

Un travail intéressant consistera à analyser l'interactome des sous-unités  $\beta 1$  dans les Th2. Cela permettrait de mieux comprendre par quelles voies ces sous-unités, et les canaux par extension, sont régulés dans les LTh2. Il sera nécessaire d'analyser plus précisément cet interactome des sous-unités  $\beta$ , que l'on considère  $\beta$  comme étant associée au canal ou agissant de façon indépendante. De manière générale, il sera important de déterminer si les fonctions des sous-unités  $\beta$  indépendantes des canaux  $Ca_v$  décrites dans la littérature sont des cas isolés ou si ces mécanismes existent de façon endogène et sont généralisés à tous les types cellulaires exprimant les sous-unités  $\beta$ , des cellules excitables aux lymphocytes T. Enfin, il sera intéressant d'analyser la séquence des transcrits de  $\beta 1$  et  $\beta 3$  afin de déterminer quelles isoformes d'épissage de chacun de ces gènes sont exprimés dans les LTh2. Cela permettrait de dégager des pistes de recherche quant aux régulations et à l'interactome de ces sous-unités.

Il est important de noter que l'équipe de R.A. Flavell a observé une diminution de la production de cytokines par des lymphocytes T  $CD4^+$  différenciés en LTh1 et LTh2 provenant de souris déficientes pour  $\beta 3$  (Badou et al., 2006). Néanmoins, dans cette étude, A. Badou a mesuré la production de cytokines seulement quelques jours après l'induction de la différenciation Th1 ou Th2. A ce stade, nous savons que les LTh2 n'expriment pas encore les canaux  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  et que les canaux  $Ca_v1.4$  (importants dans l'homéostasie des  $CD4^+$  naïfs) sont présents dans les LTh1 et LTh2 et en train d'être régulés négativement. On

pourrait penser que la présence de  $\beta 3$  dans les Th1 et Th2 pleinement différenciés n'est que le vestige d'une association avec  $Ca_v1.4$  dans les  $CD4^+$  naïfs.

### **Expression des canaux $Ca_v$ et des sous-unités auxiliaires au cours du temps**

Un autre élément de réflexion mis en évidence par notre équipe est l'effet de la stimulation du TCR sur l'expression des sous-unités des canaux  $Ca_v$ , et plus particulièrement des sous-unités  $\beta 3$  et  $\alpha 2\delta 2$ . En effet, l'expression de ces sous-unités auxiliaires augmente avec la stimulation des lymphocytes Th2 (Robert et al., 2014). Une observation similaire avait été faite auparavant pour les des sous-unités principales  $\alpha 1$  de  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  (Djata Cabral et al., 2010). Il semble donc qu'à l'exception notable de  $Ca_v\beta 1$ , l'activation du lymphocyte Th2 entraîne la mise en place de nouveaux canaux  $Ca_v$  par une forte augmentation de l'expression de toutes ses sous-unités. Il est donc probable que la signalisation du TCR entraîne un phénomène de régulation de l'expression des gènes de ces sous-unités, par des voies de signalisations différentes ou de façon conjointe. Ce genre de mécanisme n'est pas improbable. Par exemple, les LT  $CD4^+$  naïfs ne produisent ni IL-4, IL-5 et IL-13, ni IFN- $\gamma$  car leurs gènes sont inactifs. Il est connu que les gènes de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 (formant le locus Th2) sont corégulés positivement lors de la différenciation en LTh2. Dans les LT  $CD4^+$  naïfs, les gènes du locus Th2 et le gène de l'IFN- $\gamma$ , bien que situé sur un chromosome différent, sont co-régulés négativement par une séquence de régulation LCR localisée non loin du locus Th2. Ce phénomène est possible par le rapprochement physique des chromosomes et de ces gènes au contact de cette séquence de régulation (Spilianakis et al., 2005). On peut donc imaginer que ce genre de régulation puisse exister dans le sens inverse. Un autre mécanisme de co-régulation très intéressant et spécifique aux canaux  $Ca_v$  a été mis en évidence. L'équipe de M. Landry a en effet montré qu'un seul miRNA, le miR-103, peut réguler négativement l'expression de toutes les sous-unités d'un canal  $Ca_v$  dans le cerveau (Favereaux et al., 2011). Ainsi, cibler ce seul miRNA aurait des effets sur toutes les sous-unités. Ces deux exemples montrent que la co-régulation de plusieurs gènes peut être associée à l'état d'activation d'un lymphocyte T et peut concerner l'ensemble des sous-unités des canaux  $Ca_v$ . Notre hypothèse privilégiée est que les sous-unités des canaux  $Ca_v$  sont sous le contrôle du facteur de transcription GATA3. GATA3 est le *master gene* de la différenciation Th2. Lors de la différenciation Th2, il est exprimé très précocement (dans les premiers jours), de façon antérieure aux canaux  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$ . De plus, il n'est pas exprimé dans les autres populations de lymphocytes T  $CD4^+$ , ce qui pourrait expliquer l'expression des canaux uniquement dans les LTh2, et nous pourrions tester cette hypothèse par une co-immunoprécipitation de la chromatine au niveau des promoteurs des gènes des sous-unités afin d'analyser la liaison de GATA3 à ces séquences. D'autre part, il sera

nécessaire d'analyser les voies de signalisation classiques en aval du TCR pour déterminer comment elles pourraient impacter l'expression, la localisation ou l'activation de ces sous-unités.

Quoi qu'il en soit, nos observations renforcent l'idée que des canaux  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  parfaitement assemblés sont nécessaires à la fonctionnalité des LTh2.

D'autre part, des expériences préliminaires tendent à indiquer qu'un certain nombre de canaux calciques  $Ca_v$  sont exprimés dans les LTh2 à l'état basal et que la stimulation induit une relocalisation de ces canaux à la membrane plasmique. Les expériences d'imagerie citées précédemment, notamment à l'aide de protéines étiquetées avec des marqueurs fluorescents, nous permettraient d'observer ce phénomène. Il sera aussi intéressant d'observer comment les sous-unités auxiliaires et les protéines de signalisation associées au TCR régulent ce phénomène au cours du temps. Une de nos hypothèses est que les canaux se relocalisent à proximité de la synapse immunologique après stimulation du TCR.

### **Le fonctionnement des canaux $Ca_v$ dans les lymphocytes Th2**

Au delà des sous-unités auxiliaires, se pose la question du fonctionnement des canaux  $Ca_v$  dans les lymphocytes Th2 et de la place de ces canaux dans la signalisation calcique.

Les lymphocytes T sont des cellules dont la stimulation du TCR ne dépolarise que très légèrement la membrane. Cette dépolarisation même facilitée avec du KCl ne permet pas d'activer les canaux  $Ca_v$  dans les lymphocytes T (Badou et al., 2006). Plusieurs équipes ont montré l'existence de protéines tronquées (Stokes et al., 2004) avec l'absence probables des domaines senseurs au voltage (Kotturi and Jefferies, 2005) (Matza et al., 2016) pour expliquer ce phénomène. Cependant, cela ne semble pas être le cas dans les LTh2. La séquence du canal  $Ca_v1.2$  des Th2 montre qu'elle est identique à l'isoforme du cerveau. Nous n'excluons pas que ce canal puisse d'une certaine mesure être activée de façon dépendante du voltage, suite à des dépolarisations membranaires très localisées générées par d'autres types de canaux ioniques. Le travail de l'équipe a aussi montré le rôle de la  $PKC\alpha$  dans la réponse des lymphocytes Th2. Plusieurs isoformes des PKC sont exprimées dans les lymphocytes T mais c'est surtout la  $PKC\theta$  qui a été décrite jusqu'à présent comme la principale PKC impliquée dans la signalisation du TCR. L'inhibition des  $PKC\alpha/\beta$  avec le Gö 6976 engendre une forte réduction de la réponse calcique et de la production de cytokines après stimulation du TCR dans les lymphocytes Th2. Cet inhibiteur pharmacologique n'a, au contraire, aucun effet sur les LTh1 (Robert et al., 2014). L'effet et la sélectivité du Gö 6976 corréleront donc parfaitement avec l'inhibition pharmacologique et génétique des canaux  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$ . De plus, notre équipe a montré que la  $PKC\alpha$  est localisée à la membrane

plasmique après stimulation du TCR dans un hybridome assimilé à un LTh2 (Savignac et al., 2001). L'équipe de L.F. Santana a montré que la PKC $\alpha$  peut se fixer à la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux Ca $_v$ 1.2 et Ca $_v$ 1.3 et par son activité dissocier la calmoduline au niveau de l'extrémité C-terminale. La dissociation de la calmoduline permettrait le groupement de plusieurs canaux associés entre eux par la liaison de leur extrémité C-terminale à une protéine AKAP150. Ce regroupement des canaux augmenterait leur probabilité d'ouverture pour des voltages proches du potentiel de repos dans des cellules musculaires lisses artériolaires (Navedo et al., 2010). Une autre famille de protéines échafaudages, les protéines AHNAK, est exprimée dans les lymphocytes T. Ces protéines ont elles-aussi un rôle de plateforme d'adressage et de signalisation, y compris pour la PLC $\gamma$  (Sekiya et al., 1999) et la PKC $\alpha$  (Lee et al., 2008). L'équipe de R.A. Flavell a montré que la protéine AHNAK1 permet l'activité des canaux Ca $_v$ 1.1 dans les LT CD4 $^+$ , cela par son association aux canaux via la sous-unité  $\beta$  (Matza et al., 2008). Ainsi, il est tentant d'imaginer dans les LT CD4 $^+$  un schéma dans lequel une protéine échafaudage servirait d'intermédiaire pour des protéines de signalisation en aval du TCR, comme la PLC $\gamma$ , et adresserait la PKC $\alpha$  au niveau des canaux Ca $_v$ . Cette PKC $\alpha$  agirait en favorisant l'association de canaux et ainsi leur activation indépendante du voltage. Des travaux non publiés de notre équipe montrent très clairement la non-redondance des canaux Ca $_v$ 1.2 et Ca $_v$ 1.3 dans les LTh2. Ainsi, l'activité conjointe des canaux Ca $_v$ 1.2 et Ca $_v$ 1.3 renforcerait l'idée d'un fonctionnement des canaux Ca $_v$  en amas dans les LTh2.

La principale voie d'entrée du calcium en réponse à la stimulation du TCR dans les lymphocytes T est la voie dépendante de la vidange des stocks du RE. La voie du courant CRAC est bien présente dans les LTh2. Dès lors, se pose la question de la part des canaux Ca $_v$  et des canaux ORAI dans l'influx calcique dépendant de la stimulation du TCR. Dans les LT CD4 $^+$  naïfs, l'équipe de W.A. Jefferies a montré que la déficience en canaux Ca $_v$ 1.4 inhibe le courant calcique CRAC généré par la déplétion des stocks. Cela implique que les canaux Cav sont nécessaires à la mise en place du courant CRAC et les auteurs suggèrent que les canaux Ca $_v$ 1.4 servent à remplir les stocks du RE. Ce n'est pas le cas dans les LTh2. L'inhibition des canaux Ca $_v$ 1.2 et Ca $_v$ 1.3 n'a aucun effet sur la réponse dépendante de la déplétion des stocks générée artificiellement par la thapsigergine (Djata Cabral et al., 2010). Ainsi, le courant CRAC peut être généré indépendamment des canaux Ca $_v$  dans les Th2 différenciés contrairement aux CD4 $^+$  naïfs. De plus, dans les LTh2, l'inhibition des canaux Ca $_v$  ou des canaux ORAI se traduit dans les deux cas par une perte très importante de l'influx calcique. Il n'y a donc à priori pas de compensation d'un courant par un autre. Parmi les différents canaux calciques, chacun possède une cinétique d'activation qui lui est propre. Celle des canaux Ca $_v$  est la plus rapide (du moins pour un courant voltage-

dépendant) alors que celle des canaux ORAI est parmi les plus longues (Soboloff et al., 2012). On peut donc supposer qu'après stimulation du TCR dans les LTh2, le courant dépendant des Cav est généré dans un premier temps et le courant CRAC dans un second temps. De cette façon, l'activation des canaux Ca<sub>v</sub> pourrait entraîner l'activation des canaux à la ryanodine (par CICR ou couplage direct comme dans le muscle squelettique), une déplétion des stocks du RE puis l'activation du système STIM/ORAI. Cette interconnexion permettrait d'expliquer comment l'inhibition de l'un ou l'autre des canaux pourrait bloquer l'ensemble du signal calcique. Dans ce cas, le courant généré par les canaux Ca<sub>v</sub> ne permettrait pas d'augmenter la concentration calcique intracellulaire mais serait suffisant pour entraîner la déplétion des stocks et la génération d'un courant calcique plus important par les canaux ORAI. Un prérequis cependant nécessaire au vu de nos observations pour que cette hypothèse soit envisageable est l'impossibilité d'activer la voie du courant CRAC directement en aval du TCR dans les LTh2 comme décrit classiquement dans les lymphocytes T. Aucun élément allant dans ce sens n'a jamais été démontré mais peu d'acteurs de la signalisation calcique ont été étudiés en détail dans chaque sous-population de LT CD4<sup>+</sup>. Quelques pistes à étudier pour confirmer ou infirmer cette hypothèse incluent un défaut de génération d'IP<sub>3</sub> ou d'activation des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> dans les Th2, ou encore une inhibition des IP<sub>3</sub>R, des protéines STIM ou des canaux ORAI induite par les canaux Ca<sub>v</sub>. Une interaction entre canaux Ca<sub>v</sub> et protéines STIM a déjà été mise en évidence (Park et al., 2010) (Wang et al., 2010), via les protéines Homer (Dionisio et al., 2015), mais cette interaction a jusqu'à présent été décrite comme un mode de régulation des canaux Ca<sub>v</sub> par la voie STIM/ORAI et non l'inverse. Des protéines plus intéressantes pour renforcer notre hypothèse sont les protéines Golli. Ces protéines ont été décrites à l'origine dans le cerveau où elles régulent le processus de myélinisation. Dans les neurones, l'activité des protéines Golli est associée aux courants calciques générés par les canaux Ca<sub>v</sub> (Paez et al., 2009). Or, il a été montré que les protéines Golli sont également exprimées dans les LT CD4<sup>+</sup> où elles régulent négativement le courant CRAC. Ces protéines montrent ainsi qu'une inhibition de la voie STIM/ORAI par les canaux Ca<sub>v</sub> est envisageable. Quoi qu'il en soit, ce travail devra être poursuivi afin de comprendre le fonctionnement des canaux calciques voltage-dépendants dans ces cellules non excitables que sont les lymphocytes Th2.

### **Les sous-unités auxiliaires des canaux Ca<sub>v</sub> comme cibles thérapeutiques**

Un de nos plus intéressants résultats concerne notre travail *in vivo* chez la souris. Nous avons observé une diminution très notable de l'inflammation dans des modèles d'asthme allergique en réponse à un traitement par les ODN antisens contre les sous-unités β ou par la gabapentine, un inhibiteur pharmacologique des sous-unités α2δ. Ces traitements

s'accompagnent notamment d'une diminution du remodelage bronchique et du nombre de cellules inflammatoires dans le poumon. De plus, l'application des ODN antisens  $\beta$  engendre une diminution de l'expression de  $Ca_v1.2$  dans les LTh2 du poumon. Cela indique que ces molécules agissent *in vivo* de la même façon que sur les cellules *in vitro*. Nos résultats mettent ainsi en évidence le potentiel des sous-unités auxiliaires des canaux calciques voltage-dépendants comme cibles thérapeutiques dans la pathologie de l'asthme.

Le principal inconvénient à cibler les canaux  $Ca_v$  chez l'homme réside dans les effets indésirables possibles au niveau de tous les organes exprimant les canaux  $Ca_v$ , le premier d'entre eux étant une atteinte cardiaque. Une étude clinique menée récemment chez des patients asthmatiques a montré que l'administration quotidienne par voie orale d'un inhibiteur des canaux  $Ca_v1$ , le gallopamil (appartenant aux molécules de la famille des phenylalkylamines), s'est accompagnée d'une réduction de la masse du muscle lisse bronchique et d'une diminution du nombre d'exacerbation, mais sans effet apparent sur l'inflammation (Girodet et al., 2015). Ce traitement n'a pas révélé d'effet secondaire notable chez les patients asthmatiques incorporés dans l'étude mais on ignore comment auraient pu réagir des patients souffrants de pathologies cardiaques ou d'hypertension artérielle. Notre travail avec les ODN antisens  $Ca_v\beta$  aborde une approche complètement différente. Les oligonucléotides antisens sont des molécules utilisées dans le but de moduler l'expression génique. De par leur facilité de fabrication, leur prix relativement peu élevé et leur efficacité avérée, ces molécules sont toujours utilisées aujourd'hui *in vitro*, mais aussi *in vivo* chez l'homme (en particulier dans le cadre des thérapies géniques par *exon skipping*). Les ODN sont des molécules possédant une structure d'acide nucléique simple brin de petite taille (13 à 25 nucléotides) qui vont s'hybrider par complémentarité de base à l'ARNm et induire sa dégradation, ou du moins empêcher sa traduction (Dias and Stein, 2002). Une particularité très intéressante dans l'utilisation des ODN antisens par rapport à des outils moléculaires plus récents comme les siRNA réside dans la possibilité d'administration par inhalation. L'application de molécules par voie nasale est théoriquement plus efficace car appliquée localement, efficace à plus faible concentration et moins nocive que des stratégies plus classiques (Popescu, 2005). L'inhalation d'oligonucléotides marqués chez la souris et le lapin a montré que ces molécules se répartissent uniformément dans les poumons (Ali, 2000) et pénètrent les différentes populations cellulaires étudiées (Moschos et al., 2011). Ainsi, des dizaines de protéines (cytokines, récepteurs ou encore facteurs de transcription) ont ainsi été ciblées par des antisens inhalés chez l'animal et ont diminué de façon encourageante l'inflammation dans le poumon dans différents modèles d'asthme. Le mécanisme de pénétration exact est inconnu mais la liaison des oligonucléotides à des protéines faciliterait la captation des molécules à l'intérieur des cellules (Karras et al., 2006). Cette capacité des ODN antisens à cibler les cellules du poumon a un intérêt tout particulier dans le contexte de

l'asthme. En effet, cibler les cellules inflammatoires directement dans le poumon évite l'effet systémique de traitements anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes (Popescu, 2005). Des ODN antisens contre plusieurs cytokines ou leurs répéteurs (IL-4R, IL-5, IL-13...) sont en cours d'essai clinique chez l'homme (Seguin and Ferrari, 2009) et on pourrait envisager que les antisens ciblant les canaux  $Ca_v$  (Djata Cabral et al., 2010) ou leurs sous-unités  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$  le deviennent également. On peut penser que l'application locale par une technique comme celle des ODN inhalés devrait tout en améliorant l'efficacité réduire au maximum les risques. Cibler des sous-unités spécifiques au lieu du canal dans son ensemble permettrait de gagner en spécificité et de limiter les effets locaux néfastes. Par exemple, la sous-unité  $\beta_1$  dont nous avons montré la grande importance dans l'inflammation via les LTh2 est la seule sous-unité  $\beta$  dont l'expression n'a pas été détectée dans le poumon (Buraei and Yang, 2010). Cibler  $\beta_1$  diminue donc le risque d'effets indésirables sur d'autres populations cellulaires. Cependant, vu que de nombreuses populations inflammatoires expriment des canaux  $Ca_v$  dans l'asthme (Robert et al., 2014), il sera important de déterminer quelles sous-unités  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$  sont exprimées dans ces populations et comparer l'efficacité de stratégies d'inhibition ciblée d'une sous-unité contre une inhibition totale. Outre l'asthme, cibler spécifiquement  $\beta_1$  dans le poumon pourrait garantir d'inhiber uniquement la réponse Th2 et d'épargner la réponse Th1, impliquée notamment dans la lutte contre les infections virales. Enfin, en ce qui concerne  $\alpha_2\delta$ , la capacité de cette sous-unité à lier des ligands extracellulaires donne aux canaux  $Ca_v$  un rôle possible de récepteur. Parmi ces ligands, on peut citer la thrombospondine, une glycoprotéine extracellulaire impliquée dans l'agrégation plaquettaire, l'angiogenèse ou encore l'activation du TGF- $\beta$ . Cette protéine est essentiellement produite par les plaquettes activées, lors de l'inflammation, et est retrouvée augmentée dans le sérum des animaux asthmatiques (Huang et al., 1996). On ignore encore si la capacité de  $\alpha_2\delta$  à lier la thrombospondine est liée à son association avec le canal ou relève d'une fonction indépendante de  $\alpha_2\delta$  (Eroglu et al., 2009), ce que suggèrent les découvreurs de ce mécanisme. Toutefois, cette association laisse imaginer que l'activité des canaux  $Ca_v$  pourrait être influencée par un médiateur inflammatoire comme la thrombospondine. Il sera intéressant de déterminer si la liaison de la thrombospondine à  $\alpha_2\delta$  a une implication dans l'asthme et, si oui, si cela engage l'activité des canaux calciques. S'il existait un rôle de la thrombospondine dans l'inflammation pulmonaire via  $\alpha_2\delta$  mais indépendamment des canaux  $Ca_v$ , cibler  $\alpha_2\delta$  pourrait alors permettre de bloquer au moins deux voies de signalisation impliquées dans l'asthme.

Pour conclure, nos travaux ont montré l'expression des sous-unités auxiliaires  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$  des canaux calciques voltage-dépendants, leur implication dans la fonctionnalité des canaux  $Ca_v1$  et leur importance dans les fonctions effectrices des lymphocytes Th2 humains et

murins. Nous avons également montré que cibler ces sous-unités permet de réduire nettement l'inflammation dans des modèles murins d'asthme allergiques. Les similarités des données entre LTh2 humains et murins *in vitro* et l'amélioration du phénotype dans nos expériences *in vivo* font de ces sous-unités auxiliaires des cibles très pertinentes dans le cadre de futurs traitements contre l'asthme, voire même des allergies en général.

## Références bibliographiques

- Akbari, O., R.H. Dekruyff, and D.T. Umetsu. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2:725–731.
- Alonso, M.T., and J. Garcia-Sancho. 2011. Nuclear Ca(2+) signalling. *Cell Calcium.* 49:280-289.
- Altier, C., S.J. Dubel, C. Barrère, S.E. Jarvis, S.C. Stotz, R.L. Spaetgens, J.D. Scott, V. Cornet, M. De Waard, G.W. Zamponi, J. Nargeot, and E. Bourinet. 2002. Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. *J Biol Chem.* 277:33598–33603.
- Altier, C., A. Garcia-Caballero, B. Simms, H. You, L. Chen, J. Walcher, H.W. Tedford, T. Hermosilla, and G.W. Zamponi. 2011. The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nature neuroscience.* 14:173-180.
- An, M.T., and G.W. Zamponi. 2005. Voltage-Dependent Inactivation of Voltage Gated Calcium Channels. *In Voltage-Gated Calcium Channels.* Kluwer Academic/Plenum Publishers. 194-204.
- Badou, A., M.K. Jha, D. Matza, and R.A. Flavell. 2013. Emerging roles of L-type voltage-gated and other calcium channels in T lymphocytes. *Front Immunol.* 4:243.
- Badou, A., M.K. Jha, D. Matza, W.Z. Mehal, M. Freichel, V. Flockerzi, and R.A. Flavell. 2006. Critical role for the beta regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:15529-15534.
- Bara, I., A. Ozier, J.M. Tunon de Lara, R. Marthan, and P. Berger. 2010. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J.* 36:1174-1184.
- Barnes, P.J. 2010. New therapies for asthma: is there any progress? *Trends Pharmacol Sci.* 31:335-343.
- Barnett, M.W., and P.M. Larkman. 2007. The action potential. *Pract Neurol.* 7:192-197.
- Beck, A., M. Kolisek, L.A. Bagley, A. Fleig, and R. Penner. 2006. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose regulate TRPM2 channels in T lymphocytes. *Faseb J.* 20:962-964.
- Beguin, P., R.N. Mahalakshmi, K. Nagashima, D.H. Cher, H. Ikeda, Y. Yamada, Y. Seino, and W. Hunziker. 2006. Nuclear sequestration of beta-subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca<sup>2+</sup> channel regulation. *J Mol Biol.* 355:34-46.
- Beguin, P., K. Nagashima, R.N. Mahalakshmi, R. Vigot, A. Matsunaga, T. Miki, M.Y. Ng, Y.J. Ng, C.H. Lim, H.S. Tay, L.A. Hwang, D. Firsov, B.L. Tang, N. Inagaki, Y. Mori, S. Seino, T. Launey, and W. Hunziker. 2014. BARP suppresses voltage-gated calcium channel activity and Ca<sup>2+</sup>-evoked exocytosis. *The Journal of cell biology.* 205:233-249.
- Ben-Johny, M., I.E. Dick, L. Sang, W.B. Limpitikul, P.W. Kang, J. Niu, R. Banerjee, W. Yang, J.S. Babich, J.B. Issa, S.R. Lee, H. Namkung, J. Li, M. Zhang, P.S. Yang, H. Bazzazi, P.J. Adams, R. Joshi-Mukherjee, D.N. Yue, and D.T. Yue. 2015. Towards a Unified Theory of Calmodulin Regulation (Calmodulation) of Voltage-Gated Calcium and Sodium Channels. *Curr Mol Pharmacol.* 8:188–205.
- Berger, P., R. Marthan, and J.M. Tunon de Lara. 2002. [The pathophysiological role of smooth muscle cells in bronchial inflammation]. *Rev Mal Respir.* 19:778-794.
- Berggren, P.O., S.N. Yang, M. Murakami, A.M. Efanov, S. Uhles, M. Kohler, T. Moede, A. Fernstrom, I.B. Appelskog, C.A. Aspinwall, S.V. Zaitsev, O. Larsson, L.M. de Vargas, C. Fecher-Trost, P. Weissgerber, A. Ludwig, B. Leibiger, L. Juntti-Berggren, C.J. Barker, J. Gromada, M. Freichel, I.B. Leibiger, and V. Flockerzi. 2004. Removal of Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit enhances Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell.* 119:273-284.
- Berridge, M.J. 2005. Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol.* 67:1-21.

- Berridge, M.J. 2014. Ion Channels. *Cell Signalling Biology*.
- Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:11-21.
- Berrow, N.S., V. Campbell, E.M. Fitzgerald, K. Brickley, and A.C. Dolphin. 1995. Antisense depletion of beta-subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. *J Physiol.* 482 ( Pt 3):481-491.
- Bertin, S., and E. Raz. 2016. Transient Receptor Potential (TRP) channels in T cells. *Semin Immunopathol.* 38:309-319.
- Bidaud, I., and P. Lory. 2011. Hallmarks of the channelopathies associated with L-type calcium channels: a focus on the Timothy mutations in Ca(v)1.2 channels. *Biochimie.* 93:2080-2086.
- Bindreither, D., and P. Lackner. 2009. Structural diversity of calcium binding sites. *Gen Physiol Biophys.* 28 Spec No Focus:F82-88.
- Birx, D.L., M. Berger, and T.A. Fleisher. 1984. The interference of T cell activation by calcium channel blocking agents. *J Immunol.* 133:2904-2909.
- Bourinet, E., T.W. Soong, A. Stea, and T.P. Snutch. 1996. Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:1486–1491.
- Bourinet, E., A. Alloui, A. Monteil, C. Barrère, B. Couette, O. Poirot, A. Pages, J. McRory, T.P. Snutch, A. Eschalier, and J. Nargeot. 2005. Silencing of the Ca<sub>v</sub>3.2 T- type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J.* 24:315–324.
- Brandman, O., J. Liou, W.S. Park, and T. Meyer. 2007. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> levels. *Cell.* 131:1327-1339.
- Brereton, H.M., M.L. Harland, M. Froscio, T. Petronijevic, and G.J. Barritt. 1997. Novel variants of voltage-operated calcium channel alpha-1 subunit transcripts in a rat liver-derived cell line: deletion in the IVS4 voltage sensing region. *Cell Calcium.* 22:39-52.
- Brini, M., and E. Carafoli. 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.* 89:1341-1378.
- Budde, T., S. Meuth, and H.C. Pape. 2002. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci.* 3:873-883.
- Buraei, Z., and J. Yang. 2010. The beta subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Physiological reviews.* 90:1461-1506.
- Burgess, D.L., J.M. Jones, M.H. Meisler, and J.L. Noebels. 1997. Mutation of the Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell.* 88:385-392.
- Campbell, V., N.S. Berrow, E.M. Fitzgerald, K. Brickley, and A.C. Dolphin. 1995. Inhibition of the interaction of G protein G(o) with calcium channels by the calcium channel beta-subunit in rat neurones. *J Physiol.* 485 ( Pt 2):365-372.
- Campiglio, M., and B.E. Flucher. 2015. The role of auxiliary subunits for the functional diversity of voltage-gated calcium channels. *J Cell Physiol.* 230:2019-2031.
- Catalucci, D., D.H. Zhang, J. DeSantiago, F. Aimond, G. Barbara, J. Chemin, D. Bonci, E. Picht, F. Rusconi, N.D. Dalton, K.L. Peterson, S. Richard, D.M. Bers, J.H. Brown, and G. Condorelli. 2009a. Akt regulates L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity by modulating Cavalpha1 protein stability. *J Cell Biol.* 184:923-933.
- Catalucci, D., D.H. Zhang, J. DeSantiago, F. Aimond, G. Barbara, J. Chemin, D. Bonci, E. Picht, F. Rusconi, N.D. Dalton, K.L. Peterson, S. Richard, D.M. Bers, J.H. Brown, and G. Condorelli. 2009b. Akt regulates L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity by modulating Cavalpha1 protein stability. *J Cell Biol.* 184:923-933.
- Catterall, W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual review of cell and developmental biology.* 16:521-555.
- Catterall, W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a003947.

- Cens, T., S. Restituito, M. Rousset, and P. Charnet. 2005. Role of  $\beta$  Subunits in Voltage-Gated Calcium Channel Functions. *In Voltage-Gated Calcium Channels*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 95-112.
- Chemin, J., J. Nargeot, and P. Lory. 2002. Neuronal T-type  $\alpha_1H$  calcium channels induce neurogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *J Neurosci*. 22:6856–6862.
- Chen, L., and D.B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 13:227-242.
- Clapham, D.E. 2007. Calcium signaling. *Cell*. 131:1047-1058.
- Collins, P.D., S. Marleau, D.A. Griffiths-Johnson, P.J. Jose, and T.J. Williams. 1995. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med*. 182:1169-1174.
- Cooper, G.M., and M.A. Sunderland. 2000. The Endoplasmic Reticulum. *In The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- De Waard, M., D.R. Witcher, M. Pragnell, H. Liu, and K.P. Campbell. 1995. Properties of the alpha 1-beta anchoring site in voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels. *J Biol Chem*. 270:12056-12064.
- De Waard, M., H. Liu, D. Walker, V.E.S. Scott, C.A. Gurnett, and K.P. Campbell. 1997. Direct binding of G-protein  $\beta\gamma$  complex to voltage-dependent calcium channels. 385:446–450.
- DePuy, S.D., J. Yao, C. Hu, W. McIntire, I. Bidaud, P. Lory, F. Rastinejad, C. Gonzalez, J.C. Garrison, and P.Q. Barrett. 2006. The molecular basis for T-type  $Ca^{2+}$  channel inhibition by G protein  $\beta_2\gamma_2$  subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:14590–14595.
- Di, L., S. Srivastava, O. Zhdanova, Y. Ding, Z. Li, H. Wulff, M. Lafaille, and E.Y. Skolnik. 2010. Inhibition of the  $K^+$  channel  $KCa_{3.1}$  ameliorates T cell-mediated colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:1541-1546.
- Dias, N., and C.A. Stein. 2002. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther*. 1:347-355.
- Dionisio, N., T. Smani, G.E. Woodard, A. Castellano, G.M. Salido, and J.A. Rosado. 2015. Homer proteins mediate the interaction between STIM1 and Cav1.2 channels. *Biochim Biophys Acta*. 1853:1145-1153.
- Dixon, R.E., C.M. Moreno, C. Yuan, X. Opitz-Araya, M.D. Binder, M.F. Navedo, and L.F. Santana. 2015. Graded  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent coupling of voltage-gated Cav1.2 channels. *Elife*. 4.
- Djata Cabral, M., P.E. Paulet, V. Robert, B. Gomes, M.L. Renoud, M. Savignac, C. Leclerc, M. Moreau, D. Lair, M. Langelot, A. Magnan, H. Yssel, B. Mariame, J.C. Guery, and L. Pelletier. 2010. Knocking-down Cav1 Calcium Channels Implicated in Th2-cell Activation Prevents Experimental Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 181:1310-1317.
- Dolmetsch, R.E., R.S. Lewis, C.C. Goodnow, and J.I. Healy. 1997. Differential activation of transcription factors induced by  $Ca^{2+}$  response amplitude and duration. *Nature*. 386:855-858.
- Dolmetsch, R.E., K. Xu, and R.S. Lewis. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*. 392:933-936.
- Dolphin, A.C. 2009. Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol*. 19:237-244.
- Dolphin, A.C. 2012. Calcium channel auxiliary  $\alpha_2\delta$  and  $\beta$  subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev NeuroScience*. 13:542-555.
- Drake, L.Y., K. Iijima, and H. Kita. 2014. Group 2 innate lymphoid cells and CD4+ T cells cooperate to mediate type 2 immune response in mice. *Allergy*. 69:1300-1307.
- Dreskin, S.C., P.K. Goldsmith, W. Strober, L.A. Zech, and J.I. Gallin. 1987. Metabolism of immunoglobulin E in patients with markedly elevated serum immunoglobulin E levels. *J Clin Invest*. 79:1764-1772.

- Drujont, L., A. Lemoine, A. Moreau, G. Bienvenu, M. Lancien, T. Cens, F. Guillot, G. Beriou, L. Bouchet-Delbos, H.J. Fehling, E. Chiffolleau, A.B. Nicot, P. Charnet, J.C. Martin, R. Josien, M.C. Cuturi, and C. Louvet. 2016. RORgammat(+) cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus. *Sci Rep.* 6:23682.
- Ebert, A.M., C.A. McAnelly, A. Srinivasan, J.L. Linker, W.A. Horne, and D.M. Garrity. 2008. Ca<sup>2+</sup> channel-independent requirement for MAGUK family CACNB4 genes in initiation of zebrafish epiboly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:198-203.
- Eroglu, Ç., N.J. Allen, M.W. Susman, N.A. O'Rourke, C.Y. Park, E. Özkan, C. Chakraborty, S.B. Mulinyawe, D.S. Annis, A.D. Huberman, E.M. Green, J. Lawler, R. Dolmetsch, K.C. Garcia, S.J. Smith, Z.D. Luo, A. Rosenthal, D.F. Mosher, and B.A. Barres. 2009. Gabapentin Receptor  $\alpha 2\delta$ -1 Is a Neuronal Thrombospondin Receptor Responsible for Excitatory CNS Synaptogenesis. *Cell.* 139:380–392.
- Fang, K., and H.M. Colecraft. 2011. Mechanism of auxiliary beta-subunit-mediated membrane targeting of L-type (Ca(V)1.2) channels. *The Journal of physiology.* 589:4437-4455.
- Fanger, C.M., A.L. Neben, and M.D. Cahalan. 2000. Differential Ca<sup>2+</sup> influx, KCa channel activity, and Ca<sup>2+</sup> clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *J. Immunol.* 164:1153-1160.
- Faux, M.C., and J.D. Scott. 1997. Regulation of the AKAP79-protein kinase C interaction by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin. *J Biol Chem.* 272:17038-17044.
- Favereaux, A., O. Thoumine, R. Bouali-Benazzouz, V. Roques, M.A. Papon, S.A. Salam, G. Drutel, C. Leger, A. Calas, F. Nagy, and M. Landry. 2011. Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. *Embo J.* 30:3830-3841.
- Feske, S. 2009. ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in the immune system and beyond. *Immunol Rev.* . 231:189-209.
- Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, and A. Rao. 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.* 441:179-185.
- Feske, S., M. Prakriya, A. Rao, and R.S. Lewis. 2005. A severe defect in CRAC Ca<sup>2+</sup> channel activation and altered K<sup>+</sup> channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med.* 202:651-662.
- Feske, S., H. Wulff, and E.Y. Skolnik. 2015. Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 33:291-353.
- Forsén, S., and J. Kördel. 1994. Calcium in Biological Systems. *In* Bioinorganic chemistry. University Science Books, Mill Valley, CA. 107-135.
- Fossat, P., E. Dobremez, R. Bouali-Benazzouz, A. Favereaux, S.S. Bertrand, K. Kilk, C. Leger, J.R. Cazalets, U. Langel, M. Landry, and F. Nagy. 2010. Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 30:1073-1085.
- Galligan, J.J. 2002. Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 14:611-623.
- Gao, E.K., D. Lo, R. Cheney, O. Kanagawa, and J. Sprent. 1988. Abnormal differentiation of thymocytes in mice treated with cyclosporin A. *Nature.* 336:176-179.
- Gees, M., B. Colsoul, and B. Nilius. 2010. The role of transient receptor potential cation channels in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a003962.
- Germain, R.N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol.* 2:309-322.
- Gilibert, J.A. 2012. Cytoplasmic calcium buffering. *Adv Exp Med Biol.* 740:483-498.
- Giorgio, V., S. von Stockum, M. Antoniel, A. Fabbro, F. Fogolari, M. Forte, G.D. Glick, V. Petronilli, M. Zoratti, I. Szabo, G. Lippe, and P. Bernardi. 2013. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:5887-5892.

- Girodet, P.O., G. Dournes, M. Thumerel, H. Begueret, P. Dos Santos, A. Ozier, I. Dupin, T. Trian, M. Montaudon, F. Laurent, R. Marthan, and P. Berger. 2015. Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma. A proof-of-concept study. *Am J Respir Crit Care Med.* 191:876-883.
- Gomes, B., M.D. Cabral, A. Gallard, M. Savignac, P. Paulet, P. Druet, B. Mariame, M. Moreau, C. Leclerc, J.C. Guery, and L. Pelletier. 2007a. Calcium channel blocker prevents T helper type 2 cell-mediated airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 175:1117-1124.
- Gomes, B., M.D. Cabral, A. Gallard, M. Savignac, P. Paulet, P. Druet, B. Mariame, M. Moreau, C. Leclerc, J.C. Guery, and L. Pelletier. 2007b. Calcium channel blocker prevents T helper type 2 cell-mediated airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 175:1117-1124.
- Gomez-Ospina, N., G. Panagiotakos, T. Portmann, S.P. Pasca, D. Rabah, A. Budzillo, J.P. Kinet, and R.E. Dolmetsch. 2013. A promoter in the coding region of the calcium channel gene CACNA1C generates the transcription factor CCAT. *PLoS one.* 8:e60526.
- Gomez-Ospina, N., F. Tsuruta, O. Barreto-Chang, L. Hu, and R. Dolmetsch. 2006. The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell.* 127:591-606.
- Gonzalez-Gutierrez, G., E. Miranda-Laferte, A. Neely, and P. Hidalgo. 2007. The Src homology 3 domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *J Biol Chem.* 282:2156-2162.
- Gour, N., and M. Wills-Karp. 2015. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine.* 75:68-78.
- Gwack, Y., S. Srikanth, M. Oh-Hora, P.G. Hogan, E.D. Lamperti, M. Yamashita, C. Gelinas, D.S. Neems, Y. Sasaki, S. Feske, M. Prakriya, K. Rajewsky, and A. Rao. 2008. Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Mol. Cell. Biol.* 28:5209-5222.
- Haiech, J., E. Audran, M. Feve, R. Ranjeva, and M.C. Kilhoffer. 2011. Revisiting intracellular calcium signaling semantics. *Biochimie.* 93:2029-2037.
- Halim, T.Y., C.A. Steer, L. Matha, M.J. Gold, I. Martinez-Gonzalez, K.M. McNagny, A.N. McKenzie, and F. Takei. 2014. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity.* 40:425-435.
- Hamid, Q., and M. Tulic. 2009. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol.* 71:489-507.
- Hammad, H., M. Plantinga, K. Deswarte, P. Pouliot, M.A. Willart, M. Kool, F. Muskens, and B.N. Lambrecht. 2010. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med.* 207:2097-2111.
- Hibino, H., R. Pironkova, O. Onwumere, M. Rousset, P. Charnet, A.J. Hudspeth, and F. Lesage. 2003. Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca<sup>2+</sup>-channel beta 4 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:307-312.
- Hofmann, F., V. Flockerzi, S. Kahl, and J.W. Wegener. 2014. L-Type Cav1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev* 94:303-326.
- Hogan, P.G., R.S. Lewis, and A. Rao. 2010. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol.* 28:491-533.
- Holgate, S.T., and R. Polosa. 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 8:218-230.
- Holz, G.G., Rane S.G. and K. Dunlap. 1986. GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature.* 319:670-672.
- Huang, S.-W., K.-J. Kao, and W.M. Abraham. 1996. Plasma Thrombospondin Levels in Sheep With Allergic Asthma. *Chest.* 109:1614-1617.
- Huang, Y., and W.E. Paul. 2015. Inflammatory group 2 innate lymphoid cells. *Int Immunol.* 28:23-28.
- Hudmon, A., H. Schulman, J. Kim, J.M. Maltez, R.W. Tsien, and G.S. Pitt. 2005. CaMKII tethers to L-type Ca<sup>2+</sup> channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca<sup>2+</sup> signals for facilitation. *J Cell Biol.* 171:537-547.

- Hulme, J.T., K. Konoki, T.W. Lin, M.A. Gritsenko, D.G. Camp, 2nd, D.J. Bigelow, and W.A. Catterall. 2005. Sites of proteolytic processing and noncovalent association of the distal C-terminal domain of CaV1.1 channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:5274-5279.
- Hulme, J.T., T.W. Lin, R.E. Westenbroek, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 2003. Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13093-13098. Epub 12003 Oct 13020.
- Hulme, J.T., V. Yarov-Yarovoy, T.W. Lin, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 2006. Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J Physiol*. 576:87-102.
- Iademarco, M.F., J.L. Barks, and D.C. Dean. 1995. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF-alpha in cultured endothelial cells. *J Clin Invest*. 95:264-271.
- Ichas, F., L.S. Jouaville, and J.P. Mazat. 1997. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*. 89:1145-1153.
- Illera, V.A., C.E. Perandones, L.L. Stunz, D.A. Mower Jr, and R.F. Ashman. 1993. Apoptosis in splenic B lymphocytes Regulation by protein kinase C and IL-4. *J Immunol*. 151:2963-2973.
- Izzo, V., J.M. Bravo-San Pedro, V. Sica, G. Kroemer, and L. Galluzzi. 2016. Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol*.
- Jha, A., A.K. Singh, P. Weissgerber, M. Freichel, V. Flockerzi, R.A. Richard A. Flavell, and M.K. Jha. 2015. Essential roles for Cavb2 and Cav1 channels in thymocyte development and T cell homeostasis. *Science Signaling* 8:1-12.
- Jha, M.K., A. Badou, M. Meissner, J.E. McRory, M. Freichel, V. Flockerzi, and R.A. Flavell. 2009. Defective survival of naive CD8+ T lymphocytes in the absence of the beta3 regulatory subunit of voltage-gated calcium channels. *Nature immunology*. 10:1275-1282.
- Jiang, S., and C. Dong. 2013. A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev*. 252:5-11.
- Kalinski, P., and M. Moser. 2005. Consensual immunity: success-driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses. *Nat Rev Immunol*. 5:251-260.
- Kaplan, M.H., M.M. Hufford, and M.R. Olson. 2015. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol*. 15:295-307.
- Karras, J.G., R.S. Geary, and S.A. Gregory. 2006. Inhaled antisense oligonucleotide therapies: Inspiration and progress. *Drug Discovery Today Therapeutic Strategies*. 3:335-341.
- Kilhoffer, M.C., J. Haiech, and J.G. Demaille. 1983. Ion binding to calmodulin. A comparison with other intracellular calcium-binding proteins. *Mol Cell Biochem*. 51:33-54.
- Kits, K.S., and H.D. Mansvelder. 2000. Regulation of exocytosis in neuroendocrine cells: spatial organization of channels and vesicles, stimulus-secretion coupling, calcium buffers and modulation. *Brain Res Brain Res Rev*. 33:78-94.
- Kiyonaka, S., M. Wakamori, T. Miki, Y. Uriu, M. Nonaka, H. Bito, A.M. Beedle, E. Mori, Y. Hara, M. De Waard, M. Kanagawa, M. Itakura, M. Takahashi, K.P. Campbell, and Y. Mori. 2007. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca2+ channels. *Nature neuroscience*. 10:691-701.
- Kool, M., T. Soullie, M. van Nimwegen, M.A. Willart, F. Muskens, S. Jung, H.C. Hoogsteden, H. Hammad, and B.N. Lambrecht. 2008. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. 205:869-882.
- Kornmann, B., E. Currie, S.R. Collins, M. Schuldiner, J. Nunnari, J.S. Weissman, and P. Walter. 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*. 325:477-481.
- Kotturi, M.F., and W.A. Jefferies. 2005. Molecular characterization of L-type calcium channel splice variants expressed in human T lymphocytes. *Mol Immunol*. 42:1461-1474.
- Krause, K.H. 1991. Ca(2+)-storage organelles. *FEBS Lett*. 285:225-229.

- Kretsinger, R.H., and C.E. Nockolds. 1973. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem.* 248:3313-3326.
- Kuperman, D.A., X. Huang, L.L. Koth, G.H. Chang, G.M. Dolganov, Z. Zhu, J.A. Elias, D. Sheppard, and D.J. Erle. 2002. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med.* 8:885-889.
- Lambert, R.C., F. McKenna, Y. Maulet, E.M. Talley, D.A. Bayliss, L.L. Cribbs, J.H. Lee, E. Perez-Reyes, and A. Feltz. 1998. Low-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents are generated by members of the Ca<sub>v</sub>T subunit family ( $\alpha$ 1G/H) in rat primary sensory neurons. *J Neurosci.* 18:8605–8613.
- Launay, P., H. Cheng, S. Srivatsan, R. Penner, A. Fleig, and J.P. Kinet. 2004. TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science.* 306:1374-1377.
- Leach, R.N., F. Brette, and C.H. Orchard. 2007a. Antisense oligonucleotide against the Ca channel beta subunit decreases L-type Ca current in rat ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 352:794-798.
- Leach, R.N., F. Brette, and C.H. Orchard. 2007b. Antisense oligonucleotide against the Ca channel beta subunit decreases L-type Ca current in rat ventricular myocytes. *Biochemical and biophysical research communications.* 352:794-798.
- Lee, C.G., R.J. Homer, Z. Zhu, S. Lanone, X. Wang, V. Koteliansky, J.M. Shipley, P. Gotwals, P. Noble, Q. Chen, R.M. Senior, and J.A. Elias. 2001. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med.* 194:809-821.
- Lee, I.H., H.J. Lim, S. Yoon, J.K. Seong, D.S. Bae, S.G. Rhee, and Y.S. Bae. 2008. Ahnak protein activates protein kinase C (PKC) through dissociation of the PKC-protein phosphatase 2A complex. *The Journal of biological chemistry.* 283:6312-6320.
- Leuranguer, V., E. Bourinet, P. Lory, and J. Nargeot. 1998. Antisense depletion of  $\beta$ -subunits fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line. *Neuropharmacology.* 37:701–708.
- Levy, S., O. Beharier, Y. Etzion, M. Mor, L. Buzaglo, L. Shaltiel, L.A. Gheber, J. Kahn, A.J. Muslin, A. Katz, D. Gitler, and A. Moran. 2009. Molecular basis for zinc transporter 1 action as an endogenous inhibitor of L-type calcium channels. *J Biol Chem.* 284:32434-32443.
- Li, C.Y. 2004. Spinal Dorsal Horn Calcium Channel 2 -1 Subunit Upregulation Contributes to Peripheral Nerve Injury-Induced Tactile Allodynia. *Journal of Neuroscience.* 24:8494-8499.
- Liou, J., M.L. Kim, W.D. Heo, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E. Ferrell, Jr., and T. Meyer. 2005. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol.* 15:1235-1241.
- Lo, W.L., D.L. Donermeyer, and P.M. Allen. 2012. A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells. *Nat Immunol.* 13:880-887.
- Lodish, H., A. Berk, L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell. 2000. Intracellular Ion Environment and Membrane Electric Potential. In *Molecular Cell Biology*, 4th edition. W.H. Freeman, New York.
- Lu, L., P. Sirish, Z. Zhang, R.L. Woltz, N. Li, V. Timofeyev, A.A. Knowlton, X.D. Zhang, E.N. Yamoah, and N. Chiamvimonvat. 2015. Regulation of Gene Transcription by Voltage-Gated L-Type Calcium Channel, Cav1.3. *The Journal of biological chemistry.* 290:4663-4676.
- Lundgren, M., U. Persson, P. Larsson, C. Magnusson, C.I. Smith, L. Hammarstrom, and E. Severinson. 1989. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol.* 19:1311-1315.
- MacLennan, D.H., M. Abu-Abed, and C. Kang. 2002. Structure-function relationships in Ca(2+) cycling proteins. *J Mol Cell Cardiol.* 34:897-918.
- Matza, D., A. Badou, K.G. Klemic, J. Stein, U. Govindarajulu, M.J. Nadler, J.P. Kinet, A. Peled, O.M. Shapira, L.K. Kaczmarek, and R.A. Flavell. 2016. T Cell Receptor Mediated Calcium Entry Requires Alternatively Spliced Cav1.1 Channels. *PLoS one.* 11:e0147379.

- Matza, D., A. Badou, K.S. Kobayashi, K. Goldsmith-Pestana, Y. Masuda, A. Komuro, D. McMahon-Pratt, V.T. Marchesi, and R.A. Flavell. 2008. A Scaffold Protein, AHNAK1, Is Required for Calcium Signaling during T Cell Activation. *Immunity*. 28:64-74.
- Medoff, B.D., S.Y. Thomas, and A.D. Luster. 2008. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annu Rev Immunol*. 26:205-232.
- Meisel, M., N. Hermann-Kleiter, R. Hinterleitner, T. Gruber, K. Wachowicz, C. Pfeifhofer-Obermair, F. Fresser, M. Leitges, C. Soldani, A. Viola, S. Kaminski, and G. Baier. 2013. The Kinase PKC $\alpha$  selectively upregulates interleukin-17A during Th17 cell immune responses. *Immunity*. 38:41-52.
- Meldolesi, J., and T. Pozzan. 1998. The endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci*. 23:10-14.
- Melzer, N., G. Hicking, K. Gobel, and H. Wiendl. 2012. TRPM2 cation channels modulate T cell effector functions and contribute to autoimmune CNS inflammation. *PLoS One*. 7:e47617.
- Michailidis, I.E., K. Abele-Henckels, W.K. Zhang, B. Lin, Y. Yu, L.S. Geyman, M.D. Ehlers, E.A. Pnevmatikakis, and J. Yang. 2014. Age-related homeostatic midchannel proteolysis of neuronal L-type voltage-gated Ca(2)(+) channels. *Neuron*. 82:1045-1057.
- Michalak, M., J.M. Robert Parker, and M. Opas. 2002. Ca<sup>2+</sup> signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*. 32:269-278.
- Mignen, O., J.L. Thompson, and T.J. Shuttleworth. 2008. Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup>-selective (ARC) channels. *J Physiol*. 586:185-195.
- Miranda-Laferte, E., G. Gonzalez-Gutierrez, S. Schmidt, A. Zeug, E.G. Ponimaskin, A. Neely, and P. Hidalgo. 2011. Homodimerization of the Src homology 3 domain of the calcium channel beta-subunit drives dynamin-dependent endocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 286:22203-22210.
- Mirchandani, A.S., A.G. Besnard, E. Yip, C. Scott, C.C. Bain, V. Cerovic, R.J. Salmond, and F.Y. Liew. 2014. Type 2 innate lymphoid cells drive CD4<sup>+</sup> Th2 cell responses. *J Immunol*. 192:2442-2448.
- Moore, E.D., E.F. Etter, K.D. Philipson, W.A. Carrington, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, and F.S. Fay. 1993. Coupling of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature*. 365:657-660.
- Moote, W., and H. Kim. 2011. Allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 7 Suppl 1:S5.
- Moreno, C.M., R.E. Dixon, S. Tajada, C. Yuan, X. Opitz-Araya, M.D. Binder, and L.F. Santana. 2016. Ca(2+) entry into neurons is facilitated by cooperative gating of clustered CaV1.3 channels. *Elife*. 5.
- Moro, K., T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii, and S. Koyasu. 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 463:540-544.
- Moschos, S.A., M. Frick, B. Taylor, P. Turnpenny, H. Graves, K.G. Spink, K. Brady, D. Lamb, D. Collins, T.D. Rockel, M. Weber, O. Lazari, L. Perez-Tosar, S.A. Fancy, C. Laphorn, M.X. Green, S. Evans, M. Selby, G. Jones, L. Jones, S. Kearney, H. Mechiche, D. Gikunju, R. Subramanian, E. Uhlmann, M. Jurk, J. Vollmer, G. Ciaramella, and M. Yeadon. 2011. Uptake, efficacy, and systemic distribution of naked, inhaled short interfering RNA (siRNA) and locked nucleic acid (LNA) antisense. *Mol Ther*. 19:2163-2168.
- Motomura, Y., H. Morita, K. Moro, S. Nakae, D. Artis, T.A. Endo, Y. Kuroki, O. Ohara, S. Koyasu, and M. Kubo. 2014. Basophil-Derived Interleukin-4 Controls the Function of Natural Helper Cells, a Member of ILC2s, in Lung Inflammation. *Immunity*. 40:758-771.
- Muik, M., R. Schindl, M. Fahrner, and C. Romanin. 2012. Ca(2+) release-activated Ca(2+) (CRAC) current, structure, and function. *Cell Mol Life Sci*. 69:4163-4176.
- Murakami, M., B. Fleischmann, C. De Felipe, M. Freichel, C. Trost, A. Ludwig, U. Wissenbach, H. Schwegler, F. Hofmann, J. Hescheler, V. Flockerzi, and A. Cavalie. 2002. Pain perception in

- mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem.* 277:40342-40351.
- Murakami, M., T. Ohba, Y. Takahashi, H. Watanabe, I. Miyoshi, S. Nakayama, K. Ono, H. Ito, and T. Iijima. 2006. Identification of a cardiac isoform of the murine calcium channel alpha1C (Cav1.2-a) subunit and its preferential binding with the beta2 subunit. *J Mol Cell Cardiol.* 41:115-125.
- Na, H., M. Cho, and Y. Chung. 2016. Regulation of Th2 Cell Immunity by Dendritic Cells. *Immune network.* 16:1-12.
- Nakayama, T., and M. Yamashita. 2008. Initiation and maintenance of Th2 cell identity. *Curr Opin Immunol.* 20:265-271.
- Navedo, M.F., E.P. Cheng, C. Yuan, S. Votaw, J.D. Molkentin, J.D. Scott, and L.F. Santana. 2010. Increased coupled gating of L-type Ca<sup>2+</sup> channels during hypertension and Timothy syndrome. *Circ Res.* 106:748-756.
- Nilius, B., K. Talavera, and A. Verkhratsky. 2006. T-type calcium channels: the never ending story. *Cell Calcium.* 40:81-88.
- Noelle, R., P.H. Krammer, J. Ohara, J.W. Uhr, and E.S. Vitetta. 1984. Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:6149-6153.
- Oh-Hora, M., M. Yamashita, P.G. Hogan, S. Sharma, E. Lamperti, W. Chung, M. Prakriya, S. Feske, and A. Rao. 2008. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol.* 9:432-443.
- Omilusik, K., J.J. Priatel, X. Chen, Y.T. Wang, H. Xu, K.B. Choi, R. Gopaul, A. McIntyre-Smith, H.S. Teh, R. Tan, N.T. Bech-Hansen, D. Waterfield, D. Fedida, S.V. Hunt, and W.A. Jefferies. 2011. The Ca(v)1.4 calcium channel is a critical regulator of T cell receptor signaling and naive T cell homeostasis. *Immunity.* 35:349-360.
- Omilusik, K.D., L.L. Nohara, S. Stanwood, and W.A. Jefferies. 2013. Weft, warp, and weave: the intricate tapestry of calcium channels regulating T lymphocyte function. *Front Immunol.* 4:164.
- Orban, C., A. Bajnok, B. Vasarhelyi, T. Tulassay, and G. Toldi. 2014. Different calcium influx characteristics upon Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition in T helper subsets. *Cytometry A.* 85:636-641.
- Oreskes, I., C. Hirsch, K.S. Douglas, and S. Kupfer. 1968. Measurement of ionized calcium in human plasma with a calcium selective electrode. *Clin Chim Acta.* 21:303-313.
- Oukka, M., I.-C. Ho, F. Charles de la Brousse, T. Hoey, M.J. Grusby, and L.H. Glimcher. 1998. The Transcription Factor NFAT4 Is Involved in the Generation and Survival of T Cells. *Immunity.* 9:295-304.
- Paez, P.M., D.J. Fulton, V. Spreuer, V. Handley, C.W. Campagnoni, W.B. Macklin, C. Colwell, and A.T. Campagnoni. 2009. Golli myelin basic proteins regulate oligodendroglial progenitor cell migration through voltage-gated Ca<sup>2+</sup> influx. *J Neurosci.* 29:6663-6676.
- Park, C.Y., A. Shcheglovitov, and R. Dolmetsch. 2010. The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science.* 330:101-105.
- Patel, R., and A.H. Dickenson. 2016. Mechanisms of the gabapentinoids and alpha 2 delta-1 calcium channel subunit in neuropathic pain. *Pharmacol Res Perspect.* 4:e00205.
- Patterson, R.L., D. Boehning, and S.H. Snyder. 2004. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem.* 73:437-465.
- Pechere, J.F., J. Derancourt, and J. Haiech. 1977. The participation of parvalbumins in the activation-relaxation cycle of vertebrate fast skeletal-muscle. *FEBS Lett.* 75:111-114.
- Pelaia, G., A. Vatrella, and R. Maselli. 2012. The potential of biologics for the treatment of asthma. *Nat Rev Drug Discov.* 11:958-972.
- Pelletier, L., and M. Savignac. 2013. Ca(2+) signaling in T-cell subsets with a focus on the role of cav1 channels: possible implications in therapeutics. *Front Immunol.* 4:150.

- Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev.* 83:117-161.
- Perraud, A.L., C. Schmitz, and A.M. Scharenberg. 2003. TRPM2 Ca<sup>2+</sup> permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium.* 33:519-531.
- Popescu, F.D. 2005. Antisense- and RNA interference-based therapeutic strategies in allergy. *J Cell Mol Med.* 9:840-853.
- Prins, D., and M. Michalak. 2011. Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.
- Proft, J., and N. Weiss. 2015. G protein regulation of neuronal calcium channels: Back to the future. *Molecular pharmacology.* 87:890–906.
- Quintana, A., V. Rajanikanth, S. Farber-Katz, A. Gudlur, C. Zhang, J. Jing, Y. Zhou, A. Rao, and P.G. Hogan. 2015. TMEM110 regulates the maintenance and remodeling of mammalian ER-plasma membrane junctions competent for STIM-ORAI signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:E7083-7092.
- Rabin, E.M., J. Ohara, and W.E. Paul. 1985. B-cell stimulatory factor 1 activates resting B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:2935-2939.
- Rajagopal, S., B.L. Fields, and G.L. Kamatchi. 2014. Contribution of protein kinase Ca in the stimulation of insulin by the down-regulation of Cavbeta subunits. *Endocrine.* 47:463-471.
- Rana, A., M. Yen, A.M. Sadaghiani, S. Malmersjo, C.Y. Park, R.E. Dolmetsch, and R.S. Lewis. 2015. Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *The Journal of cell biology.* 209:653-669.
- Revy, P., M. Sospedra, B. Barbour, and A. Trautmann. 2001. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol.* 2:925-931.
- Rizzuto, R., D. De Stefani, A. Raffaello, and C. Mammucari. 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:566-578.
- Rizzuto, R., and T. Pozzan. 2006. Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* 86:369-408.
- Robert, V., E. Triffaux, P.E. Paulet, J.C. Guery, L. Pelletier, and M. Savignac. 2014. Protein kinase C-dependent activation of CaV1.2 channels selectively controls human TH2-lymphocyte functions. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 133:1175-1183.
- Roos, J., P.J. DiGregorio, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J.A. Kozak, S.L. Wagner, M.D. Cahalan, G. Velicelebi, and K.A. Stauderman. 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol.* 169:435-445.
- Sachs, F. 2009. Stretch-activated ion channels: what are they? *Physiology (Bethesda).* 25:50-56.
- Saimi, Y., and C. Kung. 2002. Calmodulin as an ion channel subunit. *Annu Rev Physiol.* 64:289-311.
- Savignac, M., A. Badou, M. Moreau, C. Leclerc, J.C. Guery, P. Paulet, P. Druet, J. Ragab-Thomas, and L. Pelletier. 2001. Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis. *Faseb J.* 15:1577-1579.
- Savignac, M., B. Gomes, A. Gallard, S. Narbonnet, M. Moreau, C. Leclerc, P. Paulet, B. Mariame, P. Druet, A. Saoudi, G.J. Fournie, J.C. Guery, and L. Pelletier. 2004. Dihydropyridine receptors are selective markers of Th2 cells and can be targeted to prevent Th2-dependent immunopathological disorders. *Journal of immunology.* 172:5206-5212.
- Schmitt, E., T. Germann, S. Goedert, P. Hoehn, C. Huels, S. Koelsch, R. Kuhn, W. Muller, N. Palm, and E. Rude. 1994. IL-9 production of naive CD4<sup>+</sup> T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol.* 153:3989-3996.
- Schram, G., M. Pourrier, P. Melnyk, and S. Nattel. 2002. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res.* 90:939-950.

- Schredelseker, J., V. Di Biase, G.J. Obermair, E.T. Felder, B.E. Flucher, C. Franzini-Armstrong, and M. Grabner. 2005. The beta 1a subunit is essential for the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:17219-17224.
- Scott, V.E., M. De Waard, H. Liu, C.A. Gurnett, D.P. Venzke, V.A. Lennon, and K.P. Campbell. 1996. Beta subunit heterogeneity in N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem*. 271:3207-3212.
- Seguin, R.M., and N. Ferrari. 2009. Emerging oligonucleotide therapies for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 18:1505-1517.
- Seidel, M., F.A. Lai, and S. Zissimopoulos. 2015. Structural and functional interactions within ryanodine receptor. *Biochem Soc Trans*. 43:377-383.
- Sekiya, F., Y.S. Bae, D.Y. Jhon, S.C. Hwang, and S.G. Rhee. 1999. AHNAK, a protein that binds and activates phospholipase C-gamma1 in the presence of arachidonic acid. *J Biol Chem*. 274:13900-13907.
- Sekler, I., S.L. Sensi, M. Hershfinkel, and W.F. Silverman. 2007. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol Med*. 13:337-343.
- Shuba, Y.M. 2014. Models of calcium permeation through T-type channels. *Pflugers Arch*. 466:635-644.
- Simms, B.A., and G.W. Zamponi. 2012. Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels. *Cell Mol Life Sci*. 69:843-856.
- Soboloff, J., B.S. Rothberg, M. Madesh, and D.L. Gill. 2012. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 13:549-565.
- Sohn, S., Y. Park, S. Srikanth, A. Arai, M. Song, B. Yu, K.H. Shin, M.K. Kang, C. Wang, Y. Gwack, N.H. Park, and R.H. Kim. 2005. The Role of ORAI1 in the Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res*. 94:1560-1567.
- Sokol, C.L., N.Q. Chu, S. Yu, S.A. Nish, T.M. Laufer, and R. Medzhitov. 2009. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol*. 10:713-720.
- Soussi-Gounni, A., M. Kontolemos, and Q. Hamid. 2001. Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 107:575-582.
- Spilianakis, C.G., M.D. Lalioti, T. Town, G.R. Lee, and R.A. Flavell. 2005. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*. 435:637-645.
- Stokes, L., J. Gordon, and G. Grafton. 2004. Non-voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channels in human T cells: pharmacology and molecular characterization of the major alpha pore-forming and auxiliary beta-subunits. *J Biol Chem*. 279:19566-19573. Epub 12004 Feb 19523.
- Stolting, G., R.C. de Oliveira, R.E. Guzman, E. Miranda-Laferte, R. Conrad, N. Jordan, S. Schmidt, J. Hendriks, T. Gensch, and P. Hidalgo. 2015. Direct interaction of CaVbeta with actin up-regulates L-type calcium currents in HL-1 cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*. 290:4561-4572.
- Szabadkai, G., and M.R. Duchen. 2008. Mitochondria: the hub of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Physiology (Bethesda)*. 23:84-94.
- Tadmouri, A., S. Kiyonaka, M. Barbado, M. Rousset, K. Fablet, S. Sawamura, E. Bahembera, K. Pernet-Gallay, C. Arnoult, T. Miki, K. Sadoul, S. Gory-Faure, C. Lambrecht, F. Lesage, S. Akiyama, S. Khochbin, S. Baulande, V. Janssens, A. Andrieux, R. Dolmetsch, M. Ronjat, Y. Mori, and M. De Waard. 2012. Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *Embo J*. 31:3730-3744.
- Takafuji, S., K. Tadokoro, and K. Ito. 1996. Effects of interleukin (IL)-3 and IL-5 on human eosinophil degranulation induced by complement components C3a and C5a. *Allergy*. 51:563-568.
- Tareilus, E., M. Roux, N. Qin, R. Olcese, J. Zhou, E. Stefani, and L. Birnbaumer. 1997. A Xenopus oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:1703-1708.

- Taylor, J., A. Pereyra, T. Zhang, M.L. Messi, Z.-M. Wang, C. Hereñú, P.-F. Kuan, and O. Delbono. 2014. The Cav $\beta$ 1 subunit regulates gene expression and suppresses myogenin in muscle progenitor cells. *The Journal of cell biology*. 205:829-846.
- Temmerman, K., B. Simon, and M. Wilmanns. 2013. Structural and functional diversity in the activity and regulation of DAPK-related protein kinases. *FEBS J*. 280:5533-5550.
- Tomilin, V.N., A.L. Cherezova, Y.A. Negulyaev, and S.B. Semenova. 2016. TRPV5/V6 Channels Mediate Ca(2+) Influx in Jurkat T Cells Under the Control of Extracellular pH. *J Cell Biochem*. 117:197-206.
- Tran-Van-Minh, A., and A.C. Dolphin. 2010. The alpha2delta ligand gabapentin inhibits the Rab11-dependent recycling of the calcium channel subunit alpha2delta-2. *The Journal of neuroscience* 30:12856-12867.
- Tsien, R.W., and R.Y. Tsien. 1990. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol*. 6:715-760.
- Tsuruta, F., E.M. Green, M. Rousset, and R.E. Dolmetsch. 2009. PIKfyve regulates CaV1.2 degradation and prevents excitotoxic cell death. *J Cell Biol*. 187:279-294.
- Van Petegem, F. 2012. Ryanodine receptors: structure and function. *J Biol Chem*. 287:31624-31632.
- van Rijjt, L.S., S. Jung, A. Kleinjan, N. Vos, M. Willart, C. Duez, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2005. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *The Journal of experimental medicine*. 201:981-991.
- Vance, C.L., C.M. Begg, W.L. Lee, H. Haase, T.D. Copeland, and M.W. McEnery. 1998. Differential expression and association of calcium channel alpha1B and beta subunits during rat brain ontogeny. *J Biol Chem*. 273:14495-14502.
- Vendel, A.C., M.D. Terry, A.R. Striegel, N.M. Iverson, V. Leuranguer, C.D. Rithner, B.A. Lyons, G.E. Pickard, S.A. Tobet, and W.A. Horne. 2006. Alternative splicing of the voltage-gated Ca2+ channel beta4 subunit creates a uniquely folded N-terminal protein binding domain with cell-specific expression in the cerebellar cortex. *J Neurosci*. 26:2635-2644.
- Venkatachalam, K., and C. Montell. 2007. TRP channels. *Annu Rev Biochem*. 76:387-417.
- Vig, M., C. Peinelt, A. Beck, D.L. Koomoa, D. Rabah, M. Koblan-Huberson, S. Kraft, H. Turner, A. Fleig, R. Penner, and J.P. Kinet. 2006. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca2+ entry. *Science*. 312:1220-1223.
- Wang, H., X. Zhang, L. Xue, J. Xing, M.H. Jouvin, J.W. Putney, M.P. Anderson, M. Trebak, and J.P. Kinet. 2016. Low-Voltage-Activated CaV3.1 Calcium Channels Shape T Helper Cell Cytokine Profiles. *Immunity*. 44:782-794.
- Wang, J., Z.H. Lu, H.J. Gabius, C. Rohowsky-Kochan, R.W. Ledeen, and G. Wu. 2009. Cross-linking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T cell activity involving TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 182:4036-4045.
- Wang, Y., X. Deng, S. Mancarella, E. Hendron, S. Eguchi, J. Soboloff, X.D. Tang, and D.L. Gill. 2010. The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science*. 330:105-109.
- Warnier, M., M. Roudbaraki, S. Derouiche, P. Delcourt, A. Bokhobza, N. Prevarskaya, and P. Mariot. 2015. CACNA2D2 promotes tumorigenesis by stimulating cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene*. 34:5383-5394.
- Weber, K.S., M.J. Miller, and P.M. Allen. 2008. Th17 Cells Exhibit a Distinct Calcium Profile from Th1 and Th2 Cells and Have Th1-Like Motility and NF-AT Nuclear Localization. *J Immunol*. 180:1442-1450.
- Wenning, A.S., K. Neblung, B. Strauss, M.J. Wolfs, A. Sappok, M. Hoth, and E.C. Schwarz. 2011. TRP expression pattern and the functional importance of TRPC3 in primary human T-cells. *Biochim Biophys Acta*. 1813:412-423.
- Wenzel, S., L. Ford, D. Pearlman, S. Spector, L. Sher, F. Skobieranda, L. Wang, S. Kirkesseli, R. Rocklin, B. Bock, J. Hamilton, J.E. Ming, A. Radin, N. Stahl, G.D. Yancopoulos, N. Graham,

- and G. Pirozzi. 2013. Dupilumab in Persistent Asthma with Elevated Eosinophil Levels. *N. Engl. J. Med.* 368:2455-2466.
- Westheimer, F.H. 1987. Why nature chose phosphates. *Science.* 235:1173-1178.
- Wheeler, D.G., R.D. Groth, H. Ma, C.F. Barrett, S.F. Owen, P. Safa, and R.W. Tsien. 2012. Ca(V)1 and Ca(V)2 channels engage distinct modes of Ca(2+) signaling to control CREB-dependent gene expression. *Cell.* 149:1112-1124.
- Wills-Karp, M. 2004. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev.* 202:175-190.
- Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, X. Xu, B. Schofield, T.Y. Neben, C.L. Karp, and D.D. Donaldson. 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science.* 282:2258-2261.
- Wu, J., Z. Yan, Z. Li, C. Yan, S. Lu, M. Dong, and N. Yan. 2015. Structure of the voltage-gated calcium channel Ca<sub>v</sub>1.1 complex. *Science.* 350: 2395.
- Yamaguchi, Y., T. Suda, S. Ohta, K. Tominaga, Y. Miura, and T. Kasahara. 1991. Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood.* 78:2542-2547.
- Yamaguchi, Y., T. Suda, J. Suda, M. Eguchi, Y. Miura, N. Harada, A. Tominaga, and K. Takatsu. 1988. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J Exp Med.* 167:43-56.
- Yang, L., A. Katchman, J.P. Morrow, D. Doshi, and S.O. Marx. 2011. Cardiac L-type calcium channel (Cav1.2) associates with gamma subunits. *Faseb J.* 25:928-936.
- Yu, K., Q. Xiao, G. Cui, A. Lee, and H.C. Hartzell. 2008. The best disease-linked Cl<sup>-</sup> channel hBest1 regulates Ca V 1 (L-type) Ca<sup>2+</sup> channels via src-homology-binding domains. *J Neurosci.* 28:5660-5670.
- Yuan, J.P., W. Zeng, G.N. Huang, P.F. Worley, and S. Muallem. 2007. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol.* 9:636-645.
- Zamponi, G.W., E. Bourinet, D. Nelson, J. Nargeot, and T.P. Snutch. 1997. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature.* 385:442-446.
- Zamponi, G.W., J. Striessnig, A. Koschak, and A.C. Dolphin. 2015. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacological reviews.* 67:821-870.
- Zhang, S.L., A.V. Yeromin, X.H. Zhang, Y. Yu, O. Safrina, A. Penna, J. Roos, K.A. Stauderman, and M.D. Cahalan. 2006. Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:9357-9362.
- Zhang, S.L., Y. Yu, J. Roos, J.A. Kozak, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, K.A. Stauderman, and M.D. Cahalan. 2005. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature.* 437:902-905.
- Zhang, Y., Y. Yamada, M. Fan, S.D. Bangaru, B. Lin, and J. Yang. 2010. The beta subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *The Journal of biological chemistry.* 285:2527-2536.
- Zheng, L., P.B. Stathopoulos, G.Y. Li, and M. Ikura. 2008. Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca<sup>2+</sup> sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochem Biophys Res Commun.* 369:240-246.
- Zou, S., S. Jha, E.Y. Kim, and S.E. Dryer. 2008. The beta 1 subunit of L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels independently binds to and inhibits the gating of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Mol Pharmacol.* 73:369-378.

## **Rôle des sous-unités auxiliaires des canaux calciques Ca<sub>v</sub>1 dans les lymphocytes Th2 : Implications thérapeutiques dans l'asthme allergique**

Les canaux calciques incluent notamment les canaux dépendants des stocks (ORAI) et dépendants du voltage (Ca<sub>v</sub>) qui sont considérés de première importance pour l'entrée du calcium dans les cellules non-excitables et excitables, respectivement. Les canaux calciques voltage-dépendants tels que Ca<sub>v</sub>1 sont essentiels pour le fonctionnement des cellules excitables, notamment la transmission neuronale, la contraction musculaire ou la sécrétion hormonale. Cependant, de nombreuses études montrent désormais que les canaux Ca<sub>v</sub>1 sont aussi exprimés dans des cellules non excitables, et sont importants pour les fonctions effectrices des lymphocytes T. Les canaux Ca<sub>v</sub>1 sont constitués de la sous-unité  $\alpha$ 1 formant le pore ionique et des sous-unités auxiliaires  $\beta$  et  $\alpha$ 2 $\delta$ . Ces sous-unités sont importantes pour l'activité électrique du canal, mais aussi pour sa régulation, sa stabilité et son expression à la membrane plasmique dans les cellules excitables. Les travaux de notre groupe ont clairement identifié les sous-unités  $\alpha$ 1 de Ca<sub>v</sub>1.2 et Ca<sub>v</sub>1.3 comme essentielles pour la fonction des lymphocytes Th2, une sous-population de cellules T responsable des maladies allergiques. L'inhibition pharmacologique et génétique de ces canaux réduit de manière significative l'expression des cytokines dans les lymphocytes Th2 chez la souris, mais pas dans les Th1.

Le but de mon travail a été de comprendre si les sous-unités auxiliaires des canaux Ca<sub>v</sub>, et plus particulièrement la sous-unité  $\beta$ , sont nécessaires au fonctionnement des canaux Ca<sub>v</sub>1 dans les lymphocytes Th2 qui ne sont pas des cellules excitables.

Nous avons utilisé des oligonucléotides antisens ciblant toutes les sous-unités  $\beta$  afin de réduire l'expression de  $\beta$ 1 et  $\beta$ 3, les deux sous-unités exprimées dans des lymphocytes Th2. La transfection de Th2 murines et humaines avec ces oligonucléotides diminue l'influx de calcium dépendant du TCR et l'expression des cytokines. En outre, l'effet des oligonucléotides antisens semble résulter de la perte d'expression de la sous-unité  $\alpha$ 1 selon un mécanisme similaire à celui décrit dans les neurones. De plus, L'utilisation de shRNA spécifiques de  $\beta$ 1 et  $\beta$ 3 dans les Th2 de souris montre un rôle essentiel la sous-unité  $\beta$ 1 dans la réponse fonctionnelle des lymphocytes Th2. Enfin, les antisens Ca<sub>v</sub> $\beta$  diminuent l'inflammation dans un modèle d'asthme allergique chez la souris, de même qu'un inhibiteur pharmacologique des sous-unités  $\alpha$ 2 $\delta$ .

Ce travail a donc permis d'identifier les sous-unités auxiliaires des canaux Ca<sub>v</sub> comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le cadre des maladies allergiques telles que l'asthme.

Mots clés : lymphocyte Th2, calcium, canal Ca<sub>v</sub>1, sous-unité  $\beta$ , sous-unité  $\alpha$ 2 $\delta$ , asthme.

## **Role of auxiliary subunits of calcium channels Ca<sub>v</sub>1 in Th2 cells: therapeutic implications in allergic asthma**

Calcium channels include store-operated (ORAI) and voltage-gated (Ca<sub>v</sub>) channels that are considered to be important for calcium entry in non-excitable and excitable cells, respectively. Voltage-gated calcium channels such as Ca<sub>v</sub>1 are essential for excitable cell function, including neuronal transmission, muscle contraction or hormone secretion. However, numerous studies show that Cav1 channels are expressed in non-excitable cells as well, and are important for T cell effector functions. Ca<sub>v</sub>1 channels are composed of the  $\alpha$ 1 subunit forming the ion pore and auxiliary subunits  $\beta$  and  $\alpha$ 2 $\delta$ . These subunits are important for the electric activity of the channel but also for its regulation, its stability and its expression at the plasma membrane in excitable cells. Our group clearly identified the  $\alpha$ 1 subunit of Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>1.3 channels as essential for the function of Th2 lymphocytes, a T cell subset responsible for allergic diseases. Pharmacological and genetic inhibition of these channels significantly reduces the expression of cytokines in mouse Th2 cells, but not in Th1 cells.

The goal of my work was to understand whether the auxiliary subunits of Cav channels, particularly the  $\beta$  subunit, are necessary for the function of Ca<sub>v</sub>1 channels in Th2 lymphocytes that are not excitable cells.

We used antisense oligonucleotides targeting all  $\beta$  subunits to reduce the expression of  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3, the two subunits expressed in Th2 lymphocytes. Transfection of murine and human Th2 with these oligonucleotides decreases TCR-dependent calcium influx and cytokine expression. In addition, the effect of the Ca<sub>v</sub> $\beta$  antisense oligonucleotides seems to result from the loss of expression of the  $\alpha$ 1 subunit, as similarly described in neurons. In addition, the use of shRNA specific to  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 in mouse Th2 shows a critical role the  $\beta$ 1 subunit in the functional response of Th2 lymphocytes. Finally, the Ca<sub>v</sub> $\beta$  antisense oligonucleotides reduce the airway inflammation in an allergic asthma model in mice, as well as a pharmacological inhibitor of  $\alpha$ 2 $\delta$  subunits.

This work has identified auxiliary subunits of Ca<sub>v</sub> channels as new potential therapeutic targets in allergic diseases such as asthma.

Keywords : Th2 cell, calcium, Ca<sub>v</sub>1 channel,  $\beta$  subunit,  $\alpha$ 2 $\delta$  subunit, asthma.