

## Du clonage des canaux calciques de type T à l'étude de leurs rôles physiologiques

Philippe Lory  
Arnaud Monteil  
Jean Chemin  
Emmanuel Bourinet  
Joël Nargeot

Le clonage moléculaire des canaux calciques de type T est un aboutissement récent rendu possible par le développement des stratégies de clonage *in silico*. Cet article fait le point sur ce que l'on savait jusque-là des canaux de type T natifs et décrit dans le détail les propriétés moléculaires et fonctionnelles des canaux recombinants correspondants. Il existe une grande diversité moléculaire des canaux de type T puisque trois gènes et de nombreuses isoformes ont été identifiés. On a identifié des canaux recombinants qui présentent une spécificité fonctionnelle ainsi que des signatures électrophysiologiques et pharmacologiques. L'objectif actuel est de développer des outils et des stratégies qui devraient favoriser l'interprétation du rôle des canaux de type T dans des processus physiologiques (développement, sécrétion, activité rythmique...) et pathologiques (hypertrophie cardiaque, prolifération cellulaire, épilepsie...). A court terme, des modèles animaux devraient également être développés.

L'existence de canaux calciques activés pour de faibles dépolarisations membranaires (*low-voltage-activated, LVA*) a été suggérée il y a plus de 20 ans pour expliquer l'activité rythmique déclenchée dans les neurones thalamiques à la suite de leur hyperpolarisation. Cette situation paradoxale d'activité électrique recrutée par l'hyperpolarisation membranaire dans certains neurones semblait s'expliquer par l'existence de canaux calciques partiellement inactivés dans la gamme du potentiel

de repos mais dont l'activation était à nouveau permise par l'hyperpolarisation transitoire de ces neurones, favorisant ainsi la dépolarisation membranaire et l'activation d'autres canaux ioniques, les canaux sodiques en particulier.

L'avènement de la technique du *patch-clamp* au début des années 1980 (*m/s* 1987, n° 9, p. 538) a permis une description électrophysiologique de ces canaux, tant au niveau cellulaire qu'à l'échelon d'un canal unique (*figure 1A*). Les études au niveau cellulaire ont permis l'identification

### ADRESSE

P. Lory, A. Monteil, J. Chemin, E. Bourinet, J. Nargeot: Institut de génétique humaine, Cnrs UPR 1142, 141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 05, France.

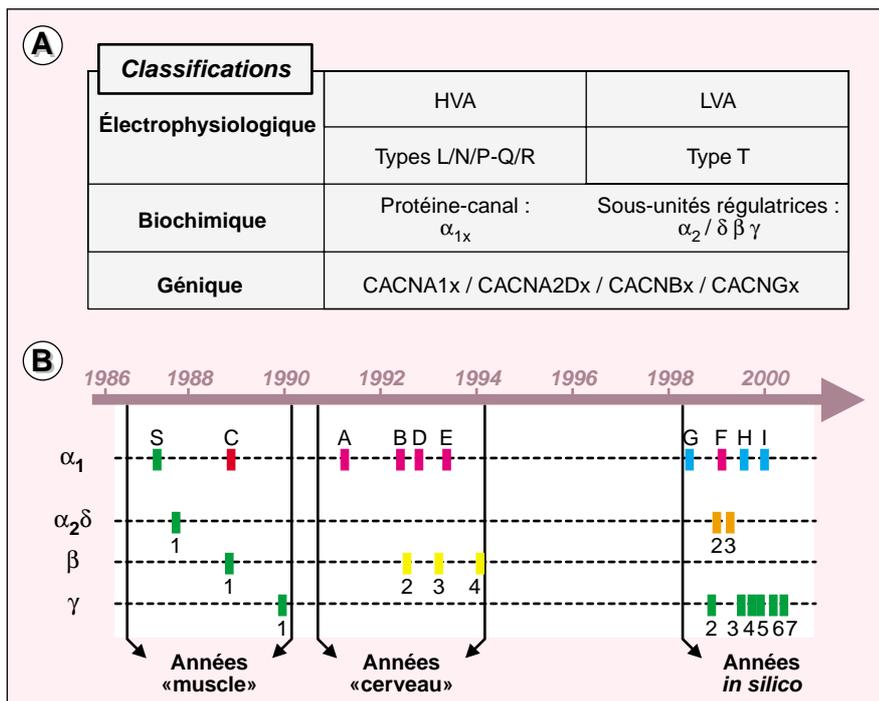


Figure 1. **Les canaux calciques.** **A.** Nomenclature et classification. La première notion de diversité des canaux calciques est électrophysiologique avec la séparation des canaux calciques « haut seuil » s'activant pour de fortes dépolarisations (HVA pour high voltage activated) et ceux « bas seuil » s'activant pour de faibles dépolarisations (LVA pour low voltage activated). Avec l'avènement du patch-clamp et le développement d'inhibiteurs spécifiques, les canaux HVA ont pu être séparés en canaux de type L (sensible aux dihydropyridines), de type N (bloqué par l'oméga-conotoxine), de types P et Q (bloqués par l'oméga-agatoxine IVA) et de type R (résistant). Les canaux LVA sont alors devenus canaux de type T pour « transient/transitoire » ou tiny. La purification et le clonage des canaux HVA ont conduit à l'identification des protéines formant le complexe hétéromultimérique que représente le canal. Les sous-unités canalaire,  $\alpha_1$  sont identifiées par une nomenclature utilisant les lettres A, B, C, D, E, F, G, H, I et S (pour squelettique, la première identifiée :  $\alpha_{1S}$ ). Une nouvelle nomenclature fondée sur des critères phylogéniques est en train de voir le jour (voir figure 3A) [46]. Les protéines associées au canal, les sous-unités régulatrices ( $\alpha_2/\delta$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ ), sont également codées par de multiples gènes : 3 isotypes pour  $\alpha_2/\delta$  ( $\alpha_2/\delta_{1,3}$ ), 4 pour  $\beta$  ( $\beta_{1,4}$ ) et au moins 6 pour  $\gamma$  ( $\gamma_{1-6}$ ). Les gènes codant pour les multiples sous-unités de canaux calciques sont désignés selon la nomenclature en vigueur auprès de la banque de données génétique HUGO/GDB [47]. **B.** Historique du clonage des sous-unités du canal calcique (d'après [48]). Les différentes sous-unités du canal calcique du muscle squelettique (vert), ainsi que l' $\alpha_{1C}$  cardiaque, ont été clonées à la fin des années 1980. D'autres sous-unités, les canaux neuronaux en particulier, ont été isolées par la suite (clonage par homologie [vioiolet]). Avec l'essor des programmes de grand séquençage (génomique humaine, identification d'EST) et des stratégies d'analyse de séquences nucléotidiques, des séquences nouvelles ont été identifiées correspondant à plusieurs sous-unités  $\alpha_1$ , celles des canaux de type T en particulier (bleu), et à des sous-unités régulatrices  $\alpha_2/\delta$  et  $\gamma$ . La sous-unité  $\alpha_{1F}$  dont les mutations sont associées à une forme de rétinopathie pigmentaire de type 2, a été identifiée lors du séquençage d'un cosmide couvrant le chromosome X en Xp11 [49].

d'un courant calcique LVA, transitoire (type T) dans de très nombreux types de neurones, mais également dans les myocytes cardiaques, les cel-

lules musculaires squelettique et vasculaire, ou encore des cellules sécrétrices (corticosurrénale, cellules  $\beta$  du pancréas). Une caractérisation bio-

physique détaillée du courant calcique de type T des neurones thalamiques a permis de confirmer l'hypothèse décrite précédemment en démontrant l'implication des canaux calciques de type T dans la genèse d'activité rythmique (voir l'article de R.C. Lambert *et al.*, p. 989 de ce numéro) (pour revue, voir [1]). D'après le profil d'expression des canaux calciques de type T révélé par les études en *patch-clamp*, un certain nombre d'autres rôles physiologiques ont été suggérés pour ces canaux, en particulier dans l'activité rythmique cardiaque, dans la sécrétion d'hormones, dans la prolifération cellulaire et dans le développement, mais également dans certains processus physiopathologiques tels que l'hypertrophie cardiaque (*m/s* 1999, n° 3, p. 329) et l'épilepsie. Toutefois, pour l'ensemble des études évoquées ici, on s'accordait à reconnaître la nécessité du développement d'outils pharmacologiques sélectifs ou, mieux encore, d'identifier les déterminants moléculaires engendrant les courants calciques de type T. Au cours des deux dernières années, des stratégies moléculaires d'analyse des canaux de type T ont été développées dans plusieurs laboratoires dont le nôtre et nous présentons ici une synthèse de ces premiers travaux moléculaires.

## Historique d'un clonage très attendu

Pour apprécier la portée de la récente identification moléculaire des canaux calciques de type T, il est important de retenir qu'il s'est écoulé environ 20 ans entre l'identification électrophysiologique des courants de type T [2] et le premier clonage moléculaire d'une sous-unité  $\alpha_1$  codant pour un canal calcique de type T [3]. Un autre repère historique important est le clonage il y a près de 15 ans de la première sous-unité  $\alpha_1$  d'un canal calcique de type L, la sous-unité  $\alpha_{1S}$  du muscle squelettique (*figure 1B*) [4]. Il convient donc de se pencher sur les difficultés qui ont été rencontrées pour identifier ces protéines canalaire tant convoitées. Contrairement aux canaux calciques activés pour de fortes dépolarisations membranaires (*high-voltage-activated*-HVA), il n'existe aucun ligand spécifique pour les

canaux de type T susceptible d'être utilisé pour une stratégie de purification biochimique. Cette stratégie avait conduit au clonage des canaux calciques HVA de type L grâce à l'utilisation des dihydropyridines [4] et l'existence de toxines spécifiques des canaux calciques HVA neuronaux N et P/Q a également fortement contribué à la caractérisation biochimique de ces derniers. L'utilisation de techniques de clonage d'ADN complémentaires (ADNc) fondées sur le criblage à faible stringence de banques d'ADNc ou encore sur des stratégies en RT-PCR utilisant des amorces dégénérées avaient permis l'identification de cinq autres sous-unités canalaire  $\alpha_1$  appelées  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$  et  $\alpha_{1E}$  (figure 1B). La sous-unité  $\alpha_{1E}$ , dernière identifiée dans cette série [5], a suscité une attention particulière car, d'après la classification électrophysiologique et pharmacologique du moment, aucun type canalaire ne semblait correspondre aux caractéristiques des canaux recombinants produit par son expression fonctionnelle. Bien que l'étiquette de « potentiel canal calcique de type T » ait collé quelque temps à la sous-unité  $\alpha_{1E}$ , plusieurs études ont rapidement suggéré que la sous-unité  $\alpha_{1E}$  ne pouvait engendrer un courant calcique de type T répondant à l'ensemble des critères électrophysiologiques et pharmacologiques reconnus [6, 7]. Alors que le débat sur son implication potentielle dans la genèse des canaux calciques de type T était relancé par une étude décrivant l'inhibition du courant calcique de type T dans des myocytes cardiaques incubés en présence d'antisens dirigés contre l'ARN messager d' $\alpha_{1E}$  [8], le groupe de R.C. Lambert et A. Feltz, et le nôtre, décrivaient une autre caractéristique importante des canaux calciques de type T en utilisant la même stratégie expérimentale. En effet, l'incubation d'antisens dirigés contre la sous-unité régulatrice  $\beta$  des canaux calciques HVA n'affectait ni les caractéristiques électrophysiologiques, ni la densité de courant calcique de type T [9, 10]. De nombreux travaux avaient montré que les canaux calciques HVA, et plus spécifiquement les canaux recombinants engendrés par les sous-unités  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1E}$  et  $\alpha_{1S}$ , étaient modulés par les sous-unités

régulatrices  $\beta$  [11, 12]. L'absence d'un tel contrôle suggérait donc que les canaux calciques de type T correspondaient à une entité moléculaire distincte de celles identifiées alors.

### Clonage in silico des canaux calciques de type T : un succès plus que virtuel

Devant la résistance des stratégies classiques d'identification, le biologiste moléculaire aurait pu être désabusé si une alternative n'avait été d'analyser l'ensemble des données de séquences consultables à partir des bases de données génétiques *via* internet. C'est cette stratégie qui a été développée par le groupe de Perez-Reyes à Loyola University (IL, États-Unis) et par le nôtre pour aboutir au clonage de trois nouveaux ADNc codant pour les sous-unités  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$  des canaux calciques

de type T (figure 2). Les banques de données contiennent de nombreuses séquences qui proviennent de grands programmes de séquençage (séquençage de génomes ; identification d'étiquettes de transcrits : *EST* pour *expressed sequence tagged*). Si l'annotation de ces séquences est parfois approximative, chaque spécialiste peut toutefois effectuer un criblage *in silico* selon des critères spécifiques et identifier ainsi des séquences d'intérêt permettant d'ajuster la partie expérimentale du clonage de nouveaux ADNc (*m/s 2000, n° 1, p. 22*). Dès 1996, de nouveaux canaux potassiques avaient été identifiés de la sorte [13, 14]. Lors de la mise en place de cette stratégie pour les canaux calciques de type T, plusieurs informations complémentaires sont apparues, indiquant immédiatement qu'il existait plusieurs ADNc correspondant à des sous-unités  $\alpha_1$  non encore décrites. A ce stade des tra-

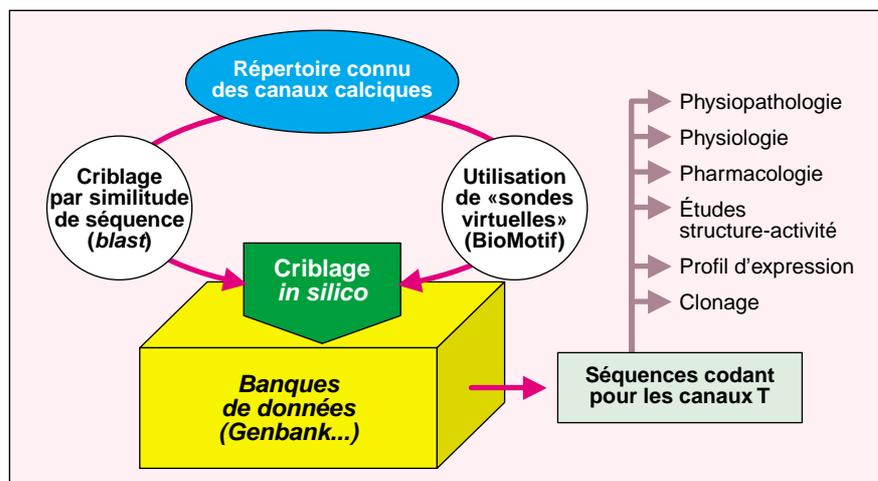


Figure 2. **Stratégies d'identification et d'analyse des canaux de type T.** Grâce aux séquences nucléotidiques et protéiques déjà présentes dans les banques de données, il est possible d'interroger ces mêmes banques de données pour l'existence de séquences faiblement homologues aux premières. Parmi les stratégies possibles, les deux les plus couramment utilisées sont la recherche par similarité de séquence (exemple avec le logiciel blast : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) et la recherche de motifs fonctionnels (exemple avec le logiciel BioMotif : [http://www.infobiogen.fr/doc/bioMotif-doc/bioMotif\\_index.html](http://www.infobiogen.fr/doc/bioMotif-doc/bioMotif_index.html)). Les motifs fonctionnels tels que le senseur de voltage ou le pore du canal peuvent être convertis en sonde virtuelle pour le criblage *in silico*. Les deux stratégies sont bien sûr complémentaires. Les nombreuses séquences identifiées doivent être triées et analysées (analyses phylogéniques). Les séquences d'intérêt ont ensuite été isolées par RT-PCR, puis utilisées comme sonde pour le clonage des  $\alpha_1$  de type T pleine longueur. Le clonage de ces nouveaux canaux permet un ensemble d'études concernant leur profil d'expression, les relations structure-activité, la pharmacologie et leur implication en physiologie et en physiopathologie.

vaux, seul le clonage d'ADNc pleine longueur et l'expression fonctionnelle de ces canaux calciques recombinants pouvaient décider de leur appellation « canaux calciques de type T ».

L'élément de départ du clonage de ces nouvelles sous-unités  $\alpha_1$  fut une première EST humaine identifiée selon son annotation « *similaire mais non identique aux ADNc codant pour les sous-unités  $\alpha_1$  connues* » (GenBank n° H06096). Par comparaison avec les séquences d'ADNc des sous-unités  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1E}$  et  $\alpha_{1S}$ , cette EST semblait couvrir une région transmembranaire (domaine III) mais avec une faible homologie (~30%). L'intérêt de cette séquence était toutefois sa forte homologie (~65%) avec un ADNc provenant de *Caenorabditis elegans*, c54d2.5, décrit comme une protéine canalaire putative (figure 3). Ainsi l'EST H06096 utilisée comme sonde pour le criblage de banques d'ADNc a permis d'aboutir au clonage d'ADNc complets codant pour la sous-unité  $\alpha_{1G}$  chez le rat [3] et chez l'homme [15].

### Trois gènes, de multiples isoformes... Diversité moléculaire des canaux T

A la suite du clonage de l'ADNc codant pour la sous-unité  $\alpha_{1G}$ , le groupe de Perez-Reyes identifiait un second ADNc en utilisant la même sonde (H06096) pour le criblage d'une banque d'ADNc de cœur humain [16]. La sous-unité engendrée par cet ADNc est désignée  $\alpha_{1H}$ . Les deux protéines  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1H}$  sont très homologues (~70%) et partagent de nombreuses caractéristiques. L'identification d'ADNc codant pour la troisième sous-unité,  $\alpha_{1I}$ , a également bénéficié de l'effort du séquençage à grande échelle évoqué précédemment. Trois EST (H55223, H55225 et H55617) couvrant la région transmembranaire correspondant au domaine I présentaient les mêmes caractéristiques d'homologie que celles décrites pour H06096 (~30% avec les  $\alpha_1$  des canaux HVA et ~70% avec c54d2.5). Ces EST avaient été identifiées par la technique d'*exon trapping* (m/s 1995, n° 12, p. 1707), indiquant précisément qu'elles correspondaient au

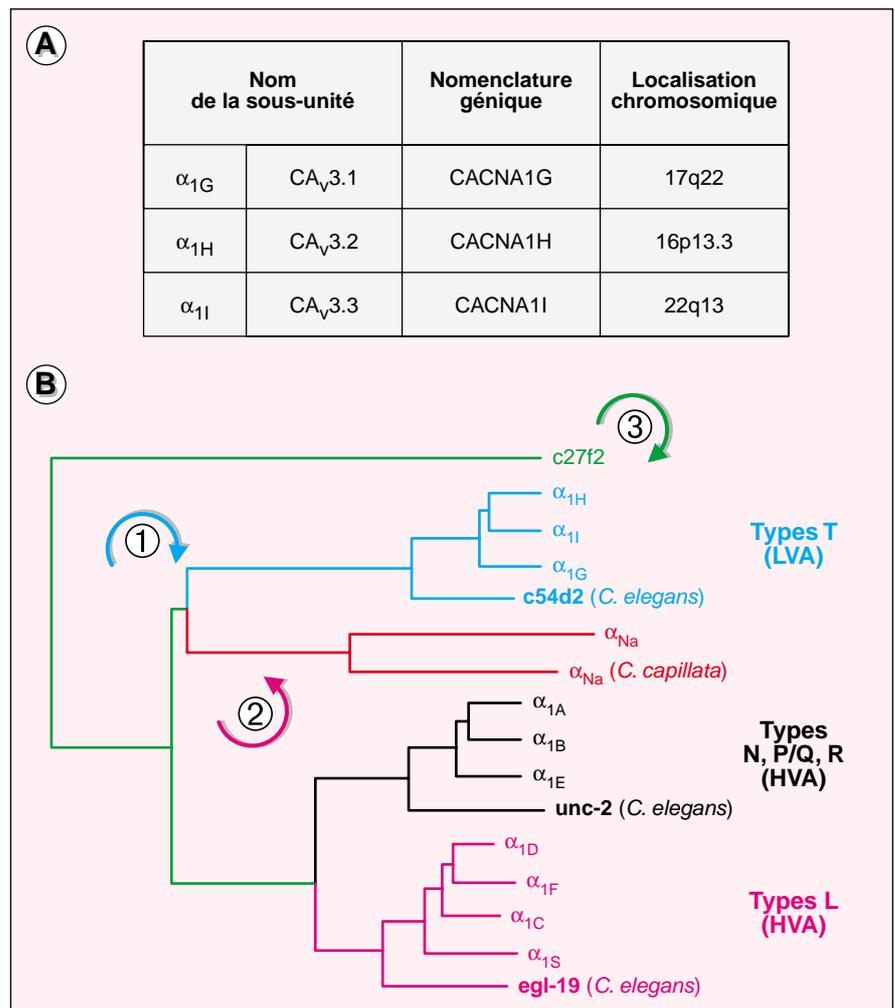


Figure 3. Les canaux calciques de type T. A. Les trois formes de canaux calciques de type T identifiées à ce jour. Les sous-unités  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$  sont également appelées respectivement CA<sub>v</sub>3.1, CA<sub>v</sub>3.2 et CA<sub>v</sub>3.3, respectivement. Les gènes correspondants sont respectivement localisés sur les chromosomes humains 17q22, 16p13.3 et 22q13. B. Dendrogramme illustrant la divergence entre les multiples sous-unités  $\alpha_1$ . L'analyse est faite en utilisant la méthode des distances et seules les régions transmembranaires sont considérées. Les canaux de type T représentent clairement une sous-famille des canaux calciques (flèche 1). Par ailleurs, l'analyse révèle que les canaux sodiques apparaissent phylogénétiquement plus tardivement que les canaux calciques (flèche 2). Enfin, il est intéressant de noter que d'autres canaux à quatre domaines transmembranaires (c27f2) existent (flèche 3).

transcrit d'un gène figurant sur le chromosome 22 humain. Alors que le groupe de Perez-Reyes identifiait la sous-unité  $\alpha_{1I}$  de rat [17], nous avons porté notre effort sur la forme humaine de la sous-unité  $\alpha_{1I}$  en interprétant les données du séquençage du chromosome 22 humain disponibles auprès du centre anglais de grand séquençage, le Sanger Center (Cambridge, Royaume-Uni). Ainsi, parallèlement à l'identification de

l'ADNc codant pour  $\alpha_{1I}$  par les techniques de criblage et de RT-PCR, il a été possible de définir la structure intron/exon du gène CACNA1I correspondant [18]. Plusieurs laboratoires ont contribué à l'identification du répertoire actuel des sous-unités  $\alpha_1$  des canaux de type T en isolant les ADNc codant pour l' $\alpha_{1G}$  de souris [19], une isoforme de l' $\alpha_{1H}$  humaine [20] ou encore une isoforme de l' $\alpha_{1G}$  de rat [21].

Parallèlement à l'identification des premiers ADNc codant pour  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$ , les travaux se sont également portés sur les gènes correspondants désignés *CACNA1G*, *CACNA1H* et *CACNA1I* (figure 3A) qui sont respectivement situés sur les chromosomes humains 17q22, 16p13.3 et 22q12-13 [15, 16, 18]. La structure des gènes *CACNA1G* et *CACNA1I* a été déterminée récemment et celle du gène *CACNA1H* sera bientôt élucidée. Dès les premiers travaux de clonage, il est apparu qu'il existait des isoformes pour chacune des sous-unités  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$ . La caractérisation des gènes *CACNA1G* et *CACNA1I* a confirmé qu'il s'agissait bien d'isoformes engendrées par épissage différentiel, en particulier pour la sous-unité  $\alpha_{1G}$  [15].

### Apport de l'analyse phylogénétique pour l'étude des canaux de type T

L'identification moléculaire d'une troisième classe de canaux calciques ( $Ca_v3$ ), représentée par les sous-unités  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$ , permet une analyse plus globale de l'évolution moléculaire des canaux ioniques. Les canaux sodiques sont généralement présentés comme les cousins éloignés des canaux calciques sans qu'il soit possible de « dater » l'origine respective de chacun d'eux et de préciser la nature de l'ancêtre commun. Avec l'identification des canaux T, et considérant spécifiquement les régions transmembranaires, on constate que ceux-ci apparaissent les premiers dans l'arbre phylogénétique (figure 3B). Ces indications sont importantes et corroborent de nombreuses observations expérimentales qui suggèrent que, chez les organismes les plus anciens, il existe des canaux calciques mais pas de canaux sodiques.

Chez l'organisme modèle, *Caenorabditis elegans*, dont la totalité du génome a été récemment séquencé, il a été décrit un gène orthologue à chacune de ces sous-familles des canaux calciques des vertébrés (figure 3B, *c54d2*: type T; *egl-19*: type L; *unc-2*: non-L). Considérant qu'il s'est produit deux duplications du génome entre *C. elegans* et les vertébrés, il apparaît correct d'émettre l'hypothèse selon laquelle à chaque gène de *C. elegans*, correspond quatre orthologues chez

les vertébrés comme c'est le cas pour les canaux de type L ( $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1F}$  et  $\alpha_{1S}$ ). Ainsi, l'hypothèse d'un quatrième gène codant pour les canaux calciques de type T n'est pas à exclure et notre effort de surveillance des banques de données est maintenu. D'ailleurs, plusieurs études récentes indiquent que le répertoire des protéines canalaires à 4 domaines transmembranaires devrait s'élargir. En effet, deux protéines chez *C. elegans* présentent ces caractéristiques: *c27f2* (figure 3B) et *c11d2*, et un ADNc homologue à *c27f2* a été isolé chez le rat [22]. Une fois encore l'expression fonctionnelle de ces « nouveaux » canaux sera précieuse pour leur caractérisation.

Au niveau protéique, les sous-unités  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$ , ne sont que très faiblement homologues à celles des canaux HVA: ~30 % [18]. Toutefois, les régions transmembranaires sont plus conservées, en particulier les

segments transmembranaires S4 qui remplissent la fonction de senseur de voltage (figure 4). Les principales spécificités des sous-unités  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$ , par comparaison avec celles des canaux HVA, concernent le filtre de sélectivité qui est composé de résidus glutamate (E) et aspartate (D) pour les canaux T (EEDD) alors que, pour les canaux HVA, il comporte 4 résidus glutamate (EEEE: [11]). A ce propos, il est important de noter que les propriétés de perméation (sélectivité  $Ca^{2+}/Ba^{2+}$ , sensibilité au  $Ni^{2+}$  et au  $Mg^{2+}$ ...) des canaux calciques de type T diffèrent considérablement de celles des canaux HVA [23]. Les boucles intracellulaires qui relient les domaines transmembranaires sont particulièrement divergentes avec pour conséquence l'absence du motif de liaison de la sous-unité  $\beta$  [12], des protéines G [24] ou encore du  $Ca^{2+}$  [25]. Ces premières

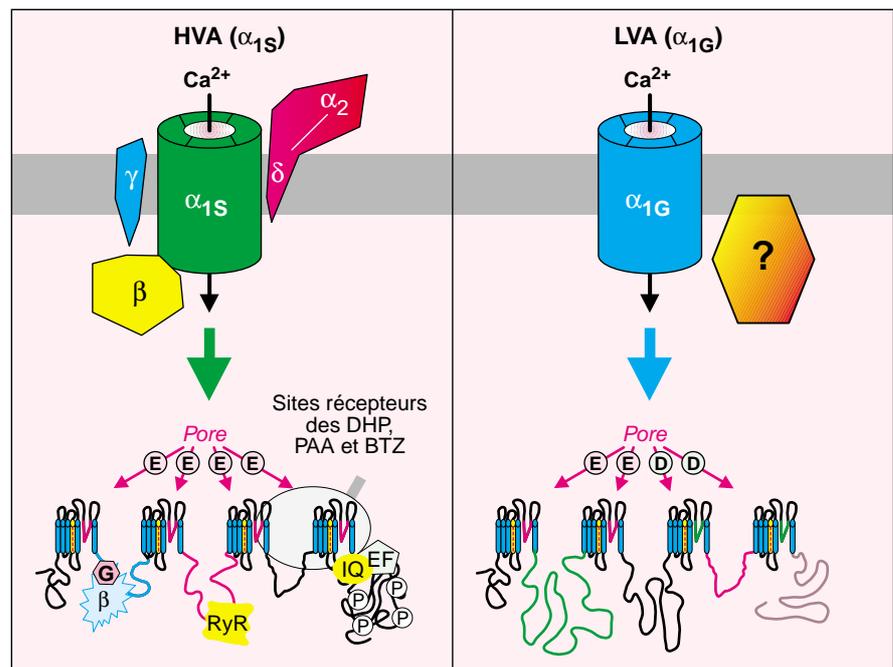


Figure 4. **Comparaison structurale des canaux calciques.** Les canaux calciques HVA représentent un complexe hétéromultimérique alors qu'à l'heure actuelle on ne connaît aucune sous-unité régulatrice spécifique des canaux LVA de type T. Les nombreuses études structure-fonction développées sur les canaux de type L ont identifié les sites d'interaction de la sous-unité  $\beta$ , des protéines  $G\beta\gamma$ , de la calmoduline (IQ) du calcium (EF-hand), de phosphorylation (P) du récepteur de la ryanodine ou encore des antagonistes calciques (DHP: dihydropyridines; PAA: phénylalkylamines; BTZ: benzothiazépines). Aucune cartographie fonctionnelle n'est établie à ce jour pour les canaux de type T. Il est toutefois important de noter que, pour ces canaux, les résidus du filtre de sélectivité du pore (EEDD) diffèrent de ceux identifiés pour les canaux HVA (EEEE) (pour revue, voir [11]).

indications fournies par l'analyse de la séquence primaire des protéines  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$  sont tout à fait en accord avec les caractéristiques fonctionnelles des canaux calciques de type T natifs (figure 4).

### Expression tissulaire des canaux de type T

L'un des premiers réflexes des équipes engagées dans la caractérisation moléculaire des canaux de type T fut d'étudier par une approche en Northern blot, le profil d'expression des transcrits (ARNm) codant pour  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$ . Les trois ARNm, celui codant pour  $\alpha_{1H}$  dans un degré moindre, sont fortement exprimés dans le système nerveux central (SNC). Au niveau périphérique, on retrouve une proportion importante des ARNm codant pour  $\alpha_{1H}$  au niveau du rein [16] et des transcrits codant pour  $\alpha_{1G}$  et au niveau du cœur, de l'ovaire ou encore du placenta [15]. Afin de préciser le profil d'expression chez l'homme de ces trois transcrits pour un grand nombre de tissus, nous avons effectué une analyse par dot blot et RT-PCR qui a confirmé les données décrites ci-dessus et révélé certains détails importants. Tout d'abord, le transcrit codant pour  $\alpha_{1I}$ , sous-unité assez exclusive du SNC, est retrouvé au niveau de la glande corticosurrénale et de la glande thyroïde [16]. Les transcrits codant pour  $\alpha_{1H}$  sont également très présents dans les tissus sécréteurs. Une autre donnée importante révélée par l'étude en dot blot est l'identification d'un niveau élevé de transcrit pour  $\alpha_{1G}$ , dans les tissus foetaux. Une comparaison avec les tissus adultes correspondants suggère une quantité de transcrit supérieure d'un facteur 2 à 10 pour le cœur, la rate, le foie et le rein embryonnaires [15].

Une distribution détaillée des ARNm codant pour  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$  au niveau du SNC a été effectuée par Talley *et al.* [26] par hybridation *in situ*. De cette étude, il est important de retenir que les trois transcrits coexistent dans certaines structures telles que le bulbe olfactif, les neurones pyramidaux de l'hippocampe ou encore le cortex piriforme. De nombreuses autres structures expriment deux transcrits:  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1I}$  (cervelet, olive inférieure), ou  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$

(striatum, noyau réticulo-thalamique) mais  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1H}$  sont rarement exprimés ensemble. Une meilleure définition du profil d'expression de ces sous-unités devra toutefois être effectuée au niveau de la protéine. Plusieurs laboratoires s'activent actuellement pour parfaire la caractérisation d'anticorps spécifiques de chacune des sous-unités [27].

### Propriétés fonctionnelles des canaux T recombinants

Étant donné que de nombreuses études électrophysiologiques avaient défini des critères précis de l'activité des canaux de type T, il était essentiel d'explorer l'activité des canaux recombinants avec ces repères fonctionnels (figure 5). Tout d'abord, avec

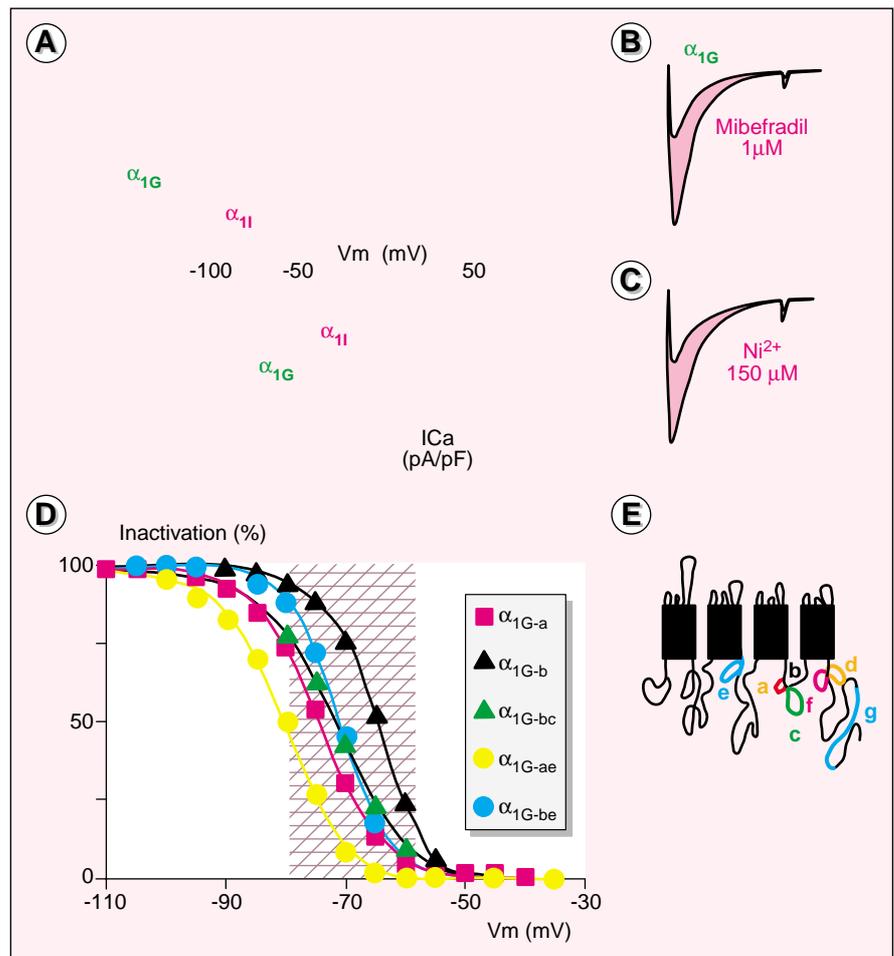


Figure 5. Propriétés fonctionnelles des canaux calciques de type T recombinants. **A.** L'expression fonctionnelle des sous-unités  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1I}$  est analysée dans des cellules recombineuses: les cellules human embryonic kidney (HEK-293) dans lesquelles elles engendrent des canaux LVA de grande amplitude. Les courants associés à la sous-unité  $\alpha_{1G}$  présentent des cinétiques rapides confirmant bien la nature première des canaux de type T. Il est toutefois important de noter que la sous-unité  $\alpha_{1I}$  produit un courant de cinétique d'inactivation plus lente, marquant ici un premier niveau de diversité fonctionnelle des canaux de type T. **B.** Les courants produits par la sous-unité  $\alpha_{1G}$  sont bloqués par le mibefradil ( $IC_{50}$ : 1  $\mu$ M) et **(C)** par le  $Ni^{2+}$  ( $IC_{50}$ : 150  $\mu$ M). **D** et **E.** La sous-unité  $\alpha_{1G}$  présente de nombreuses isoformes. Les variations de séquence sont retrouvées sur les boucles intracellulaires et la région carboxy-terminale. L'analyse des propriétés d'inactivation indique que certaines isoformes sont inactivées dans un degré variable dans la gamme du potentiel de repos des cellules (encadré gris).

l'expression de la sous-unité  $\alpha_{1G}$  seule, les caractéristiques premières d'un courant calcique de type T ont été retrouvées : activation pour de faibles dépolarisations membranaires (LVA) ; cinétique d'inactivation rapide (courant transitoire : T) ; cinétique de désactivation lente ; rapport de perméation  $Ca^{2+}/Ba^{2+}$  proche de 1 (0,5 pour les canaux HVA) et une conductance élémentaire (enregistrée en présence de 100 mM  $Ba^{2+}$ ) d'environ 7 pS [3, 15, 19].

L'étude comparée des propriétés fonctionnelles des canaux engendrés par les trois sous-unités dans les systèmes d'expression fonctionnelle classiques (ovocyte de xénope, cellules de mammifères) a fourni des informations importantes. Si la sous-unité  $\alpha_{1H}$  engendre des courants calciques très proches de ceux obtenus avec  $\alpha_{1G}$  [16, 20, 28], ce n'est pas le cas pour la sous-unité  $\alpha_{1I}$  (figure 5). En effet, le courant calcique produit par  $\alpha_{1I}$  présente des cinétiques d'activation et d'inactivation 6 à 8 fois plus lentes, comparativement à  $\alpha_{1G}$  [17, 18]. Les spécificités des canaux engendrés par  $\alpha_{1I}$  concernent également la gamme des potentiels d'activation et d'inactivation (5 à 8 mV plus positive) et la désactivation (3 fois plus rapide). Une conclusion immédiate qui surgit au vu de ces résultats est qu'il existe une diversité fonctionnelle des canaux de type T reliée à la nature de l'isotype ( $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$ ) de la sous-unité canalaire. La pharmacologie des canaux de type T est peu développée (figure 5). Le mibéfradil a relancé l'intérêt sur ce sujet peu de temps avant le clonage des sous-unités  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$  en étant l'une des premières molécules affectant ces canaux à des concentrations inférieures à 1  $\mu$ M [29]. Toutefois, la séparation pharmacologique des canaux de type T – des autres conductances et entre eux – reste un défi important. Seul l'ion nickel ( $Ni^{2+}$ ) différencie les isotopes T en bloquant les courants produits par  $\alpha_{1H}$  avec une  $IC_{50} \sim 5 \mu$ M, et  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1I}$  avec une  $IC_{50} \sim 150 \mu$ M [18, 30] (figure 5). L'intérêt de ces observations reste limité au travail de laboratoire mais elles permettent d'établir des premiers critères de spécificité des canaux T. C'est ce critère pharmacologique associé à une recherche des transcrits en RT-PCR

qui permet d'identifier les canaux de type T cardiaques comme étant engendrés par la sous-unité  $\alpha_{1G}$  [31] ou ceux du muscle squelettique, formés par la sous-unité  $\alpha_{1H}$  [32, 33]. Le développement de molécules ciblant les canaux de type T peut désormais bénéficier des modèles cellulaires surexprimant les canaux de type T [34]. Une étude récente a également décrit l'effet de molécules précédemment décrites comme « bloqueurs des canaux de type T » tel que l'ethosuximide, le valproate et la phénytoïne sur les canaux engendrés par  $\alpha_{1G}$  [35].

Au-delà de l'existence des trois gènes codant pour les canaux de type T, il est apparu que l'épissage différentiel contribuait fortement à l'augmentation de la diversité moléculaire et fonctionnelle de ces canaux [15, 36]. La sous-unité  $\alpha_{1G}$  humaine présente au minimum sept régions de variations résultant soit de l'épissage de certains exons, soit de l'utilisation d'exons additionnels. Toutes les régions concernées sont situées dans la partie intracellulaire de la protéine (figure 5E). Les isoformes de la sous-unité  $\alpha_{1G}$  présentent un profil d'expression spécifique, certaines étant présentes au niveau du système nerveux, d'autres uniquement dans les tissus périphériques [15]. Une analyse de leurs propriétés électrophysiologiques indique que ces isoformes présentent des propriétés fonctionnelles distinctes (figure 5D). Les propriétés des isoformes d' $\alpha_{1G}$  neuronales ( $\alpha_{1G-a}$  et  $\alpha_{1G-ae}$ ) corroborent bien celles des canaux de type T de certaines préparations neuronales [36]. Dans leur globalité, ces travaux indiquent donc que la nature moléculaire – isotype et isoforme – des canaux de type T doit être prise en compte pour l'analyse et l'interprétation des phénomènes physiologiques associés.

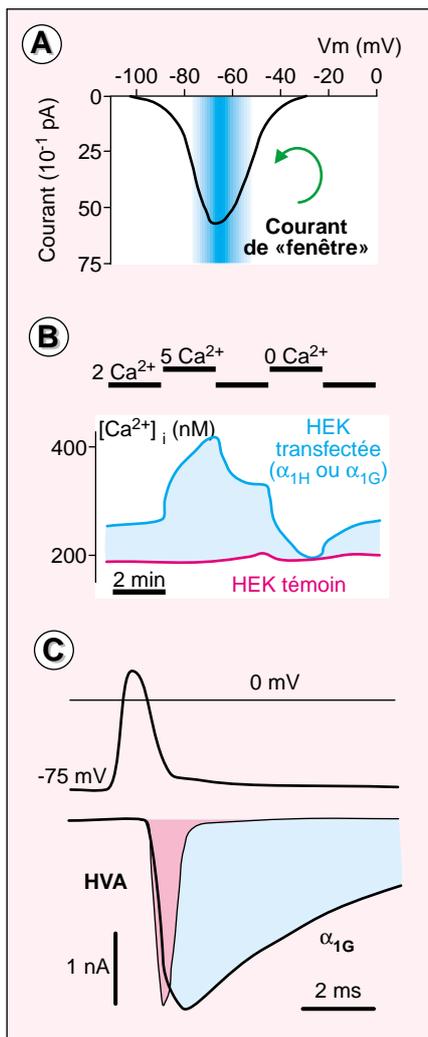
Les études sur les canaux recombinants ont apporté rapidement des informations précieuses pour la compréhension des propriétés fonctionnelles des canaux de type T. L'existence d'un courant de fenêtre (figure 6A), conséquence d'un recouvrement partiel des propriétés d'activation et d'inactivation, a pu être retrouvée sur les canaux recombinants [15, 21] suggérant une éventuelle activité « de fuite » de ces

canaux dans la gamme des potentiels de repos membranaires (-70 mV/-55 mV). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des mesures de  $Ca^{2+}$  intracellulaire par la technique d'imagerie calcique au Fura-2 sur des cellules HEK-293 surexprimant les sous-unités  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1H}$  et nous avons pu démontrer que ces canaux de type T contribuaient à la charge calcique intracellulaire de cellules au repos, c'est-à-dire non dépolarisées (figure 6B) [28].

Une autre caractéristique importante des canaux de type T est la désactivation lente (~5 ms pour  $\alpha_{1G}$  et ~0,3 ms pour les canaux HVA). La désactivation d'un canal correspond au retour à l'état fermé d'un canal ouvert sans que celui-ci ne transite par un état inactivé. Une telle situation se produit lors d'une dépolarisation brève, telle qu'un potentiel d'action neuronal, et peut conduire à une entrée massive d'ion  $Ca^{2+}$  lors de la repolarisation membranaire (figure 6C). Pour vérifier un tel comportement des canaux de type T recombinants, nous avons appliqué, dans les conditions de potentiel imposé, des potentiels d'action d'une durée de 2 ms à des cellules HEK-293 surexprimant des canaux de type T ( $\alpha_{1G}$ ) et HVA ( $\alpha_{1A}$ ). Dans ces conditions expérimentales, les canaux T produisent une grande entrée d'ions  $Ca^{2+}$  7 fois supérieure à celle associée au canal HVA [15]. L'ensemble de ces observations nuance considérablement l'idée pourtant classique d'un courant calcique transitoire (T), en indiquant, d'une part, que les canaux de type T peuvent contribuer à la charge calcique de cellules au repos, charge associée à l'existence d'un courant de fenêtre, et, d'autre part, que l'entrée d'ions  $Ca^{2+}$  via les canaux de type T s'effectue majoritairement lors de la repolarisation cellulaire en accord avec cette caractéristique de désactivation lente de ces canaux [36, 37].

### Clonage des canaux de type T – physiologie et physiopathologie : un retour vers le futur

L'expression fonctionnelle des canaux calciques de type T clonés devrait également permettre d'évaluer l'existence de mécanismes cellu-



**Figure 6. Spécificités fonctionnelles des canaux calciques de type T. A.** Au travers de l'analyse des propriétés d'activation et d'inactivation, il ressort l'existence d'un courant de fenêtre (fuite de  $Ca^{2+}$ ) dans la gamme du potentiel de repos des cellules (zone ombrée). Un tel courant de très petite amplitude a pu être mesuré expérimentalement [31]. **B.** La charge calcique de cellules HEK-293 exprimant des canaux calciques de type T est supérieure à celle des cellules non transfectées et est dépendante de la concentration en  $Ca^{2+}$  externe, mais également de la présence d'ions  $Ni^{2+}$  ou de mibéfradil, tous deux bloqueurs des canaux de type T [28]. **C.** Une autre spécificité des canaux calciques de type T concerne la cinétique de désactivation majeure est de contribuer à une entrée massive d'ions  $Ca^{2+}$  lors d'un potentiel d'action de courte durée. C'est au travers de ces propriétés de « charge calcique » dans la gamme du potentiel de repos des cellules que les canaux calciques de type T contribuent fortement à la signalisation calcique.

recombinants formés de la seule sous-unité  $\alpha_1$  engendraient des courants très semblables aux courants natifs, il est important de considérer que les canaux de type T, tout comme les canaux HVA, peuvent inclure des sous-unités régulatrices (figure 4). Il faut à ce propos rappeler que le contrôle des canaux calciques HVA par les sous-unités  $\beta$  a été décrit pour la première fois en utilisant une stratégie de co-expression fonctionnelle d'une sous-unité canalaire  $\alpha_{1S}$  avec la sous-unité  $\beta_{1a}$  du muscle squelettique [40]. Un des efforts actuels est donc la recherche d'éventuels modulateurs des canaux T, d'autant plus que des études très récentes suggèrent que certaines sous-unités régulatrices des canaux calciques HVA,  $\alpha_2/\delta$  et  $\gamma$ , pourraient moduler l'activité des canaux de type T recombinants [41, 42] – des travaux qui restent toutefois à confirmer.

Si l'implication physiologique des canaux de type T est restée hypothétique dans la plupart des exemples décrits précédemment (activité rythmique cardiaque, sécrétion hormonale, prolifération cellulaire...), les outils et stratégies désormais disponibles devraient permettre d'élucider leurs rôles au niveau cellulaire, tissulaire et également de l'organisme entier. La manipulation des gènes et des ADNc de ces canaux (surexpression, utilisation d'antisens, inactivation) devrait être très informative. Un premier exemple concerne la différenciation musculaire squelettique.

Alors que peu de données suggéraient l'implication des canaux de type T dans cette différenciation, une étude récente a démontré que la présence de canaux calciques de type T ( $\alpha_{1H}$ ) était responsable de la fusion des myoblastes humains [31]. Ces auteurs sont parvenus à cette conclusion en utilisation des antisens spécifiquement dirigés contre l'ARNm d' $\alpha_{1H}$ . Les nombreuses implications physiopathologiques potentielles des canaux de type T devraient également bénéficier de ces nouvelles approches afin de déterminer s'il existe une relation causale entre la présence de canaux T et le phénotype considéré, comme dans le cas du rôle éventuel des canaux de type T dans la prolifération cellulaire des cellules vasculaires lisses [43, 44].

laïres (phosphorylation, adressage, partenaires...) contrôlant l'activité des canaux de type T. A ce jour, aucun système « rapide », par phosphorylation, protéine G... n'est clairement démontrés pour les canaux de type T natifs. Certaines évidences de contrôles des canaux de type T existent toutefois, au niveau de la corticosurrénale en particulier, avec les modulations par l'angiotensine II et la dopamine du courant de type T qui dépendent des protéines G [38, 39] (voir également l'article de R.C. Lambert *et al.*, p. 989 de ce numéro). L'existence de telles modulations pourra être étudiée dans des systèmes receveurs et bénéficier de la possibilité d'ingénierie des canaux recombinants (mutations ponctuelles, constructions chimériques) permettant de préciser les déterminants moléculaires impliqués.

Il est désormais possible d'étudier l'adressage de ces canaux en utilisant des approches complémentaires, en particulier des anticorps et des protéines recombinantes étiquetées avec la GFP (*green fluorescent protein*). Ce champ d'investigation est nouveau pour les canaux de type T puisque aucun outil moléculaire ne permettait jusqu'alors une telle démarche. L'intérêt de développer ces études est renforcé par l'ensemble des observations montrant que l'expression des canaux calciques de type T faisait l'objet de modulations à long terme au cours du développement, dans le phénotype prolifératif ainsi que dans certains processus physiopathologiques (voir également l'article de R.C. Lambert *et al.*, p. 989 de ce numéro).

Enfin, si les premières études ont montré que les canaux de type T

Plusieurs articles ont décrit la présence de canaux de type T dans des cellules prolifératives (cultures primaires, lignées cellulaires). Toutefois, la surexpression de canaux calciques de type T dans la lignée cellulaire HEK-293 ne modifie en rien sa prolifération [28]. L'implication précise des canaux de type T, dans la prolifération cellulaire ou dans l'établissement de tumeurs, reste toutefois une question importante d'autant plus qu'une étude a démontré que le gène *CACNA1G* était inactivé par méthylation dans plusieurs formes de cancer, colorectal et gastrique en particulier [45].

## Conclusions

En conclusion, si l'identification de trois gènes codant pour les canaux calciques de type T et la caractérisation fonctionnelle et moléculaire des produits de ceux-ci ont d'ores et déjà bouleversé le niveau de connaissance de ces canaux, on doit considérer que leur analyse ne fait que démarquer. La mise en place de stratégies de physiologie moléculaire incluant la production de modèles animaux inactivés ou surexprimant l'un des gènes présentés dans cet article (invalidation *versus* transgénique) permettra très prochainement une meilleure interprétation du rôle physiologique de ces canaux calciques. Grâce à l'obtention des canaux de type T recombinants, c'est également la pharmacologie de ces derniers qui devrait progresser. Ainsi, en favorisant une meilleure compréhension du rôle physiologique des canaux de type T, l'estimation de leur implication en physiopathologie, et un ciblage pharmacologique plus efficace, on peut estimer que les travaux décrits dans cet article contribuent d'une façon majeure à l'analyse de la signalisation calcique intervenant dans les cellules non excitables et dans les cellules excitables au repos électrique ■

## Remerciements

Nos recherches sont soutenues par le Cnrs, la Fondation pour la recherche médicale (FRM), l'Association française contre les myopathies (AFM) et l'Association pour la recherche contre le cancer (ARC).

## RÉFÉRENCES

- Huguenard JR. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 1996; 58: 329-48.
- Hagiwara S, Byerly L. Calcium channel. *Annu Rev Neurosci* 1981; 4: 69-125.
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, et al. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 1998; 391: 896-900.
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, et al. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 1987; 328: 313-8.
- Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 1993; 260: 1133-6.
- Randall AD, Tsien RW. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 1997; 36: 879-93.
- Nooney JM, Lambert RC, Feltz A. Identifying neuronal non-L  $Ca^{2+}$  channels-more than stamp collecting? *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18: 363-71.
- Piedras-Renteria ES, Chen CC, Best PM. Antisense oligonucleotides against rat brain alpha1E DNA and its atrial homologue decrease T-type calcium current in atrial myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14936-41.
- Leuranguer V, Bourinet E, Lory P, Nargeot J. Antisense depletion of beta-subunit fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line. *Neuropharmacology* 1998; 37: 701-8.
- Lambert RC, Maulet Y, Mouton J, Beattie R, Volsen S, De Waard M, Feltz A. T-type  $Ca^{2+}$  current properties are not modified by  $Ca^{2+}$  channel beta subunit depletion in nodose ganglion neurons. *J Neurosci* 1997; 17: 6621-8.
- Nargeot J, Charnet P. Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Med Sci* 1994; 10: 1293-308.
- Walker D, De Waard M. Subunit interaction sites in voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 1998; 21: 148-54.
- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SA. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 1995; 376: 690-5.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, et al. A pH-sensitive yeast outward rectifier  $K^{+}$  channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem* 1996; 271: 4183-7.
- Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J. Molecular and functional properties of the human alpha1(G) subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem* 2000; 275: 6090-100.
- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, et al. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type  $Ca^{2+}$  channel gene family. *Circ Res* 1998; 83: 103-9.
- Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, et al. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 1999; 19: 1912-21.
- Monteil A, Chemin J, Leuranguer V, et al. Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha II subunit. *J Biol Chem* 2000; 275: 16530-5.
- Klugbauer N, Marais E, Lacinova L, Hofmann F. A T-type calcium channel from mouse brain. *Pflug Arch* 1999; 437: 710-5.
- Williams ME, Washburn MS, Hans M, et al. Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J Neurochem* 1999; 72: 791-9.
- Zhuang H, Bhattacharjee A, Hu F, et al. Cloning of a T-type  $Ca^{2+}$  channel isoform in insulin-secreting cells. *Diabetes* 2000; 49: 59-64.
- Lee JH, Cribbs LL, Perez-Reyes E. Cloning of a novel four repeat protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *FEBS Lett* 1999; 445: 231-6.
- Carbone E, Lux HD. A low-voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurons. *Nature* 1984; 310: 501-2.
- Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* 1997; 385: 442-6.
- De Leon M, Wang Y, Jones L, et al. Essential  $Ca^{2+}$ -binding motif for  $Ca^{2+}$ -sensitive inactivation of L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Science* 1995; 270: 1502-6.
- Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 1999; 19: 1895-911.
- Craig PJ, Beattie RE, Folly EA, et al. Distribution of the voltage-dependent calcium channel alpha1G subunit mRNA and protein throughout the mature rat brain. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 2949-64.
- Chemin J, Monteil A, Briquaire C, et al. Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS Lett* 2000; 478: 166-72.
- Clozel JP, Ertel EA, Ertel SI. Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *J Hypertens* 1997; 15 (suppl): S17-25.
- Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J* 1999; 77: 3034-42.

## RÉFÉRENCES

31. Leuranguer V, Monteil A, Bourinet E, Dayanithi G, Nargeot J. T-type calcium currents in rat cardiomyocytes during postnatal development: contribution to hormone secretion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2540-8.
32. Bijlenga P, Liu JH, Espinos E, et al. T-type  $\alpha_1H$   $Ca^{2+}$  channels are involved in  $Ca^{2+}$  signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7627-32.
33. Strube C, Monteil A, Nargeot J, Lory P. Evidence for functional expression of  $\alpha_1H$  in mouse fetal skeletal muscle cells. *Biophys J* 2000; 78: 460A.
34. McNaughton NC, Hainsworth AH, Green PJ, Randall AD. Inhibition of recombinant low-voltage-activated  $Ca^{2+}$  channels by the neuroprotective agent BW619C89 (Sipatrigine). *Neuropharmacology* 2000; 39: 1247-53.
35. Lacinova L, Klugbauer N, Hofmann F. Regulation of the calcium channel  $\alpha_1G$  subunit by divalent cations and organic blockers. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1254-66.
36. Chemin J, Monteil A, Bourinet E, Nargeot J, Lory P. Alternatively spliced  $\alpha_{1G}$  ( $Ca_v3.1$ ) intracellular loops promote specific T-type  $Ca^{2+}$  channel gating properties. *Biophys J* 2001; 80: 1238-50.
37. Kozlov AS, McKenna F, Lee JH, et al. Distinct kinetics of cloned T-type  $Ca^{2+}$  channels lead to differential  $Ca^{2+}$  entry and frequency-dependence during mock action potentials. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 4149-58.
38. Lu HK, Fern RJ, Luthin D, et al. Angiotensin II stimulates T-type  $Ca^{2+}$  channel currents via activation of a G protein, Gi. *Am J Physiol* 1996; 271: C1340-9.
39. Drolet P, Bilodeau L, Chorvatova A, Laflamme L, Gallo-Payet N, Payet MD. Inhibition of the T-type  $Ca^{2+}$  current by the dopamine D1 receptor in rat adrenal glomerulosa cells: requirement of the combined action of the G  $\beta\gamma$  protein subunit and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 503-14.
40. Varadi G, Lory P, Schultz D, Varadi M, Schwartz A. Acceleration of inactivation and inactivation by the  $\beta$ -subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature* 1991; 352: 159-62.
41. Dolphin AC, Wyatt CN, Richards J, et al. The effect of  $\alpha_2$ -delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel  $\alpha_1G$ . *J Physiol (Lond)* 1999; 519: 35-45.
42. Klugbauer N, Dai S, Specht V, et al. A family of gamma-like calcium channel subunits. *FEBS Lett* 2000; 470: 189-97.
43. Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H, Takeshita A. Cell cycle-dependent expression of L- and T-type  $Ca^{2+}$  currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res* 1996; 79: 14-9.
44. Richard S, Neveu D, Carnac G, Bodin P, Travo P, Nargeot J. Differential expression of voltage-gated  $Ca^{2+}$ -currents in cultivated aortic myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1160: 95-104.
45. Toyota M, Ho C, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP. Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 4535-41.
46. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000; 25: 533-5.
47. Lory P, Ophoff RA, Nahmias J. Towards a unified nomenclature describing voltage-gated calcium channel genes. *Hum Genet* 1997; 100: 149-50.
48. Randall A, Benham CD. Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Mol Cell Neurosci* 1999; 14: 255-72.
49. Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, et al. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 1998; 19: 260-3.

## Summary

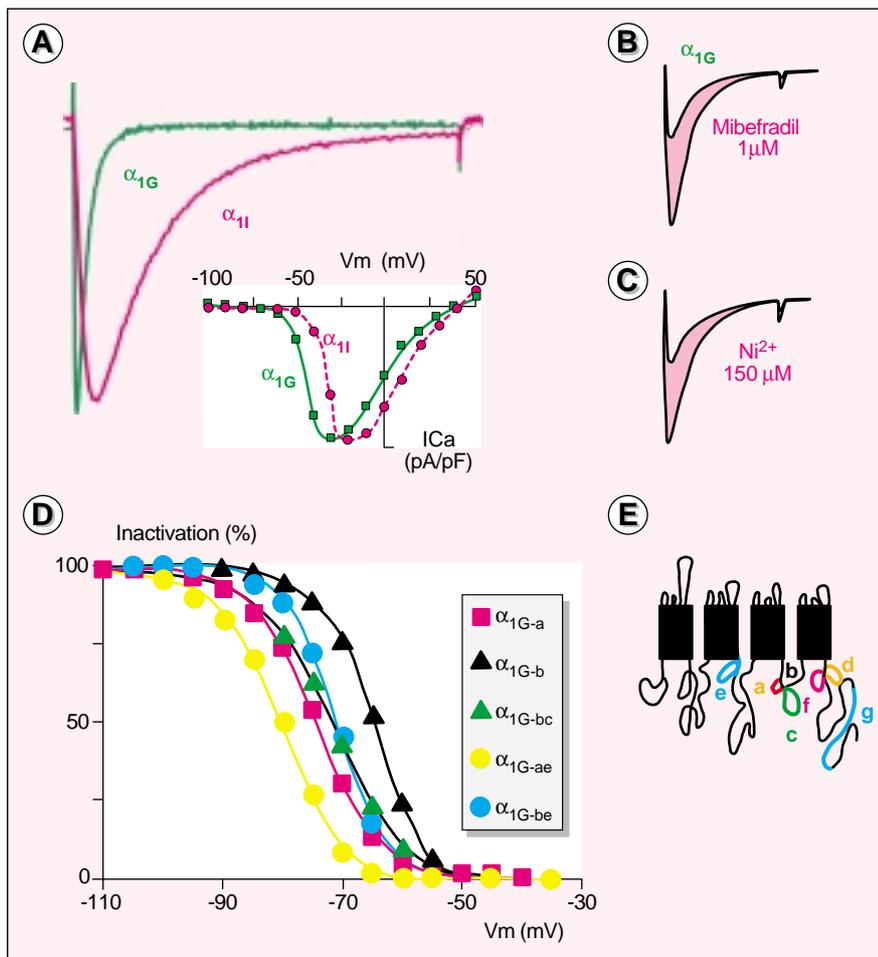
### T-type calcium channels: from cloning to physiology

The cloning of three genes coding for T-type calcium channels has been an important step towards identifying the links between voltage-dependent calcium influx and cellular excitability. The classical electrophysiological measurement of native low-voltage-activated, transient calcium currents (T-type currents) has been further refined by the ability to study individually identified classes of molecules of this channel family, and the possibility of developing therapeutic agents targeting T-type calcium channels. This review describes both the identification and the molecular and functional properties of this novel channel family. T-type calcium channels are thought to play a role in several physiological and pathophysiological processes, such as neuronal and cardiac pacemaker activities, hormone secretion, epilepsy, cardiac hypertrophy. It will be now possible to investigate the precise contribution of these channels in various cellular essays as well as in animal models.

## TIRÉS À PART

P. Lory.

**Erratum:** A la suite d'un incident technique ayant entraîné la disparition de plusieurs éléments clés du schéma, nous republions dans ce numéro la *figure 5* de l'article : « Du clonage des canaux calciques de type T à l'étude de leurs rôles physiologiques » de Philippe Lory *et al.* (*m/s* n° 10, volume 17, p. 984).



**Figure 5. Propriétés fonctionnelles des canaux calciques de type T recombinants.** **A.** L'expression fonctionnelle des sous-unités  $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1I}$  est analysée dans des cellules receveuses: les cellules human embryonic kidney (HEK-293) dans lesquelles elles engendrent des canaux LVA de grande amplitude. Les courants associés à la sous-unité  $\alpha_{1G}$  présentent des cinétiques rapides confirmant bien la nature première des canaux de type T. Il est toutefois important de noter que la sous-unité  $\alpha_{1I}$  produit un courant de cinétique d'inactivation plus lente, marquant ici un premier niveau de diversité fonctionnelle des canaux de type T. **B.** Les courants produits par la sous-unité  $\alpha_{1G}$  sont bloqués par le mibefradil ( $IC_{50}$ : 1  $\mu$ M) et **(C)** par le  $Ni^{2+}$  ( $IC_{50}$ : 150  $\mu$ M). **D** et **E.** La sous-unité  $\alpha_{1G}$  présente de nombreuses isoformes. Les variations de séquence sont retrouvées sur les boucles intracellulaires et la région carboxy-terminale. L'analyse des propriétés d'inactivation indique que certaines isoformes sont inactivées dans un degré variable dans la gamme du potentiel de repos des cellules (encadré gris).

**APOPTOSIS 2003**  
**From signaling pathways**  
**to therapeutic tools.**  
**30 janvier-2 février 2003**  
**European Parliament**  
**Conference Center**  
**Luxembourg**

**Programme préliminaire**

- Biochimie de l'apoptose
- Caspases
- Apoptose et fonction tissulaire
- Inhibiteurs et activateurs de l'apoptose
- Récepteurs-médiateurs de la mort cellulaire
- Signalisation intracellulaire de la mort cellulaire
- Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'apoptose
- La famille des p53
- Mort cellulaire et pathologies
- Apoptose et cancer
- Apoptose et maladies neuronales
- Génomique, protéomique et apoptose
- Mort cellulaire et développement embryonnaire
- Vieillesse, apoptose et cycle cellulaire
- Signalisation du stress et mort cellulaire
- Pharmacologie de l'apoptose

**Renseignements**

Marc Diederich  
 RSL/Centre Universitaire  
 de Luxembourg  
 162A, avenue de la Faïencerie  
 L-1511 Luxembourg, Luxembourg  
 Tél.: + 352 46 66 44 434  
 Fax: + 352 46 66 44 438  
 E-mail: [diederich@cu.lu](mailto:diederich@cu.lu)