

Les entrées de calcium au voisinage du potentiel de repos : un rôle sur mesure pour les canaux T dans de multiples fonctions

Régis C. Lambert
Nathalie Leresche
Andrei Kozlov
Julien Hering
Yves Maulet
Sylvain Richard
Jean-Louis Bossu
Anne Feltz

De nombreux processus physiologiques sous le contrôle du Ca^{2+} intracellulaire surviennent à des potentiels membranaires proches du potentiel de repos. A ces potentiels, les canaux calcium de type T sont des acteurs privilégiés du contrôle calcique, capables d'engendrer soit un courant dépolarisant de grande amplitude mais transitoire, soit un courant de faible amplitude mais soutenu. Dans les deux cas, ces courants participent étroitement à l'homéostasie calcique intracellulaire et conditionnent l'intégration des signaux cellulaires. Le clonage en 1998-1999 par l'équipe de Perez-Reyes – et depuis par d'autres équipes – de trois canaux T permet d'espérer un progrès rapide des études au niveau cellulaire, de mieux comprendre les fonctions physiologiques et d'ouvrir un nouveau champ d'investigations à visée thérapeutique.

ADRESSES

R.C. Lambert, J. Hering : UMR 8544 Cnrs, Laboratoire de neurobiologie cellulaire et moléculaire, école normale supérieure, 46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France. N. Leresche : FRE 2371 Cnrs, Neurobiologie des processus adaptatifs, Université Paris 6, Bâtiment A, 7, quai saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France. A. Kozlov, Y. Maulet, J.L. Bossu, A. Feltz : FRE 2180 Cnrs, Laboratoire de neurobiologie cellulaire, 5, rue Blaise-Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France. S. Richard : Inserm U. 390, Laboratoire de physiopathologie cardiovasculaire, 34295 Montpellier Cedex 05, France.

Nombre de mécanismes cellulaires dépendent d'entrées de calcium survenant au potentiel de repos de la membrane. A titre d'exemples, citons dans le système nerveux, les potentiels d'action calciques ou les activités oscillatoires rythmiques comme celles du thalamus; et pour les cellules non excitables, la capacitation des spermatozoïdes ou la sécrétion de certaines hormones. La variété de ces fonctions expliquent les nombreux travaux menés pour identifier des canaux qui laissent entrer les ions

calcium préférentiellement aux ions sodium et potassium – cations majoritaires des milieux physiologiques intra- et extracellulaires – et s'ouvrent à des potentiels relativement hyperpolarisés contrairement aux autres canaux calciques (comme par exemple les canaux L du cœur sensibles aux dihydropyridines). Par ailleurs, ces canaux à bas seuil d'activité s'ouvrent transitoirement même si la dépolarisation est maintenue (d'où leur dénomination de canaux T). Trois canaux T ($\alpha 1G$, $\alpha 1H$ et $\alpha 1I$ ou *Cav3.1*, *Cav3.2* et *Cav3.3*) (pour plus de détails, voir l'article de P. Lory et

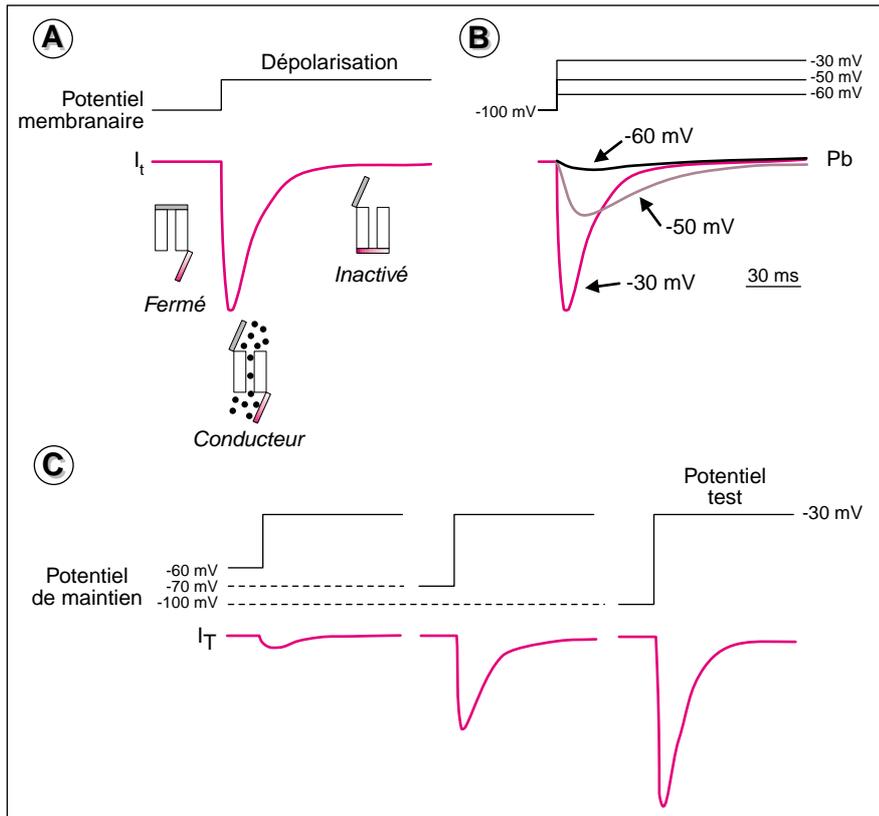
al., p. 979 de ce numéro) ont été récemment clonés. Ils appartiennent comme les canaux sodiques à une famille de canaux à quatre domaines transmembranaires contenant chacun un segment détectant les changements du potentiel membranaire. Ils constituent au sein des canaux calciques un sous-groupe ne présentant globalement qu'environ 30 % d'homologie avec les canaux activés à

haut seuil, canaux L d'une part, et canaux N, P/Q et R, sensibles à diverses neurotoxines mais non aux dihydropyridines, d'autre part. D'un point de vue fonctionnel, les canaux T peuvent être schématisés par un pore membranaire sélectif pour les ions calcium dont l'activité est contrôlée par deux mécanismes distincts, un mécanisme d'activation et un mécanisme d'inactivation (figure 1A). Ainsi

lorsque le potentiel membranaire d'une cellule est maintenu suffisamment négatif (hyperpolarisé), le courant calcique est nul. Une dépolarisation rapide, c'est-à-dire le passage à un potentiel plus positif, entraîne l'activation du canal et l'entrée massive de calcium avec production d'un courant. Cependant, la dépolarisation déclenche également un mécanisme d'inactivation des canaux, empêchant de nouveau la conduction des ions à travers le pore. Cette inactivation est complète en quelques dizaines de millisecondes selon le type de canal considéré et le potentiel appliqué. Plus le potentiel est dépolarisé, plus l'inactivation est rapide (figure 1B). Cette double propriété d'activation-inactivation simultanée est similaire à celle observée pour les canaux sodium, et implique que, lors d'une dépolarisation, la majorité des canaux T n'engendre qu'un courant transitoire. De plus, l'inactivation rapide de ces canaux dans une large gamme de potentiels membranaires implique que l'activation massive de la population des canaux T présents dans une cellule ne pourra être obtenue que si au préalable la membrane a été hyperpolarisée, au moins transitoirement, pour permettre leur désinactivation (figure 1C).

La mesure précise de la sensibilité des deux phénomènes d'activation et d'inactivation au potentiel membranaire révèle un chevauchement partiel de leurs courbes caractéristiques entre -70 et -50 mV, c'est-à-dire dans une fenêtre de potentiel comprenant le potentiel de repos de nombreux types cellulaires (figure 2). Cela signifie qu'à ces potentiels où les canaux T peuvent s'activer, il existe en permanence une population de canaux qui ne sont pas inactivés et qui peuvent engendrer un flux entrant calcique permanent. Ce flux entrant est appelé courant de fenêtre. Il est de faible amplitude puisque seule une petite fraction des canaux est conductrice, mais il revêt une grande importance physiologique.

Comme nous allons le voir par la suite, ces deux types de courants, transitoire ou soutenu, contrôlent les entrées de calcium tant dans des cellules excitables que dans des cellules non excitables.



Dans les cellules non excitables, les canaux T contribuent à une entrée de Ca^{2+} , second messenger ubiquitaire

Canaux T et insertion de nouveau matériel dans la membrane plasmique : la capacitation des spermatozoïdes chez les mammifères

L'activation monospermique de l'ovocyte, de même que la réaction acrosomique du spermatozoïde, déclenche une libération de matériel stocké dans les gamètes. Ce processus d'exocytose implique la fusion de vésicules à la surface membranaire sous l'effet d'une augmentation du calcium intracellulaire. Lors de la capacitation des spermatozoïdes, la pénétration du spermatozoïde dans la zone pellucide de l'ovocyte n'a lieu qu'après libération du contenu de l'acrosome. Il existe donc un lien causal très précis entre le premier contact d'un spermatozoïde avec un ovocyte et la réaction acrosomique (*m/s 1995, n° 4, p. 555*) [1].

Les cations divalents tels que le Ni^{2+} ont une action inhibitrice sur ce processus qui est en revanche insensible à l'action des dihydropyridines [2]. Un tel profil pharmacologique est caractéristique des canaux T présents dans les cellules spermatogéniques. De plus, en étudiant, grâce à des méthodes optiques de microfluorimétrie, l'entrée de Ca^{2+} et l'évolution du potentiel de membrane lors de l'application de ZP3, l'un des composants de la matrice extracellulaire de l'ovocyte, Arnoult *et al.* [3] ont montré que la capacitation ne prend place que dans des cellules très hyperpolarisées. Ces cellules sont donc à un potentiel membranaire permettant la désinactivation des canaux T. Par conséquent, il est vraisemblable que la phase initiale de l'accroissement de la concentration du Ca^{2+} intraspermique soit due à l'ouverture des canaux T en réponse à la dépolarisation membranaire induite par le ZP3. L'articulation entre ces événements initiaux d'hyperpolarisation et d'activation transitoire des canaux calciques, et l'augmentation soutenue du calcium intracellulaire qui aboutit après plusieurs secondes ou minutes

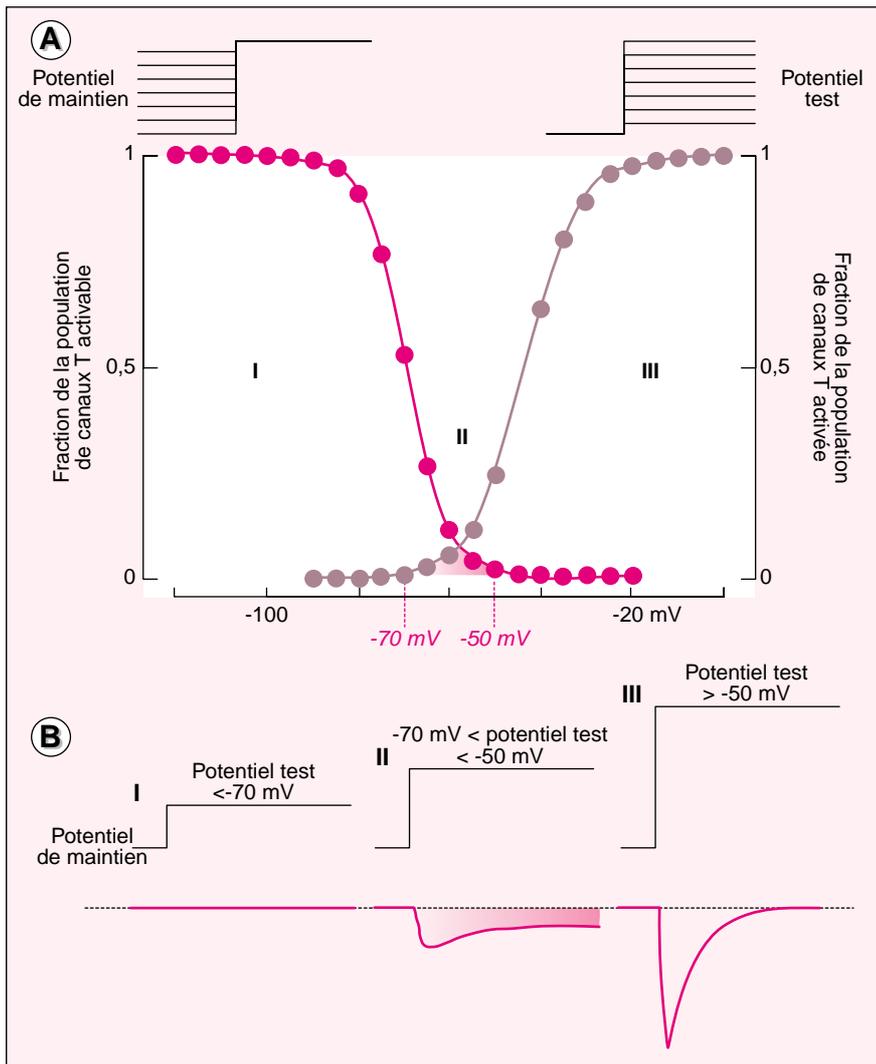


Figure 2. Les canaux T engendrent un courant soutenu. **A.** La fraction de canaux activables en fonction du potentiel de membrane (cercles rouges) est estimée en comparant l'amplitude du courant obtenu pour une dépolarisation test (potentiel test) en fonction du potentiel de membrane appliqué au préalable (potentiel de maintien; protocole de gauche). La sensibilité au potentiel de l'activation (cercles bistres) est estimée en comparant l'amplitude des courants obtenus pour des dépolarisations à des potentiels tests variables, sans modifier le potentiel de maintien qui a été choisi suffisamment hyperpolarisé pour rendre activables le maximum de canaux (protocole de droite). On remarque un croisement des deux courbes pour des potentiels compris entre -70 et -50 mV (zone rouge). Les caractéristiques des courants engendrés par les canaux T découlent directement de ces propriétés d'activation et d'inactivation (voir aussi [57]). **B.** Des potentiels test inférieurs à -70 mV (partie I du graphe A et schéma I) n'activent pas les canaux et donc n'engendrent pas de courant. À l'inverse, des dépolarisations supérieures à -50 mV peuvent activer les canaux mais entraînent également leur inactivation totale. Cela aboutit à la production d'un courant transitoire qui s'annule au bout de quelques dizaines de millisecondes (III). Entre ces deux potentiels (II), une fraction non nulle de canaux est activable et le potentiel est suffisamment dépolarisé pour permettre leur ouverture. Par conséquent, les canaux T engendrent un courant calcique soutenu de faible amplitude appelé courant de fenêtre (zone rouge).

à un plateau et à la réaction acrosomique, reste à déterminer [4].

Canaux T et croissance cellulaire

• Canaux $T\alpha 1H$ dans la myogenèse

La myogenèse, comme la réparation musculaire, consiste en la formation de myocytes multinucléés par fusion de myoblastes mononucléés. L'ensemble de cette phase de fusion est strictement dépendante d'une entrée de Ca^{2+} . Des données récentes attribuent ce signal calcique à l'activité des canaux T qui sont exprimés dans les myoblastes compétents juste avant leur fusion. En effet, le blocage pharmacologique des canaux T (amiloride, Ni^{2+} ...), ou l'injection d'une séquence d'oligonucléotides antisens supprimant spécifiquement la synthèse de la sous-unité $\alpha 1H$, empêche la fusion des myoblastes ainsi que la montée de Ca^{2+} intracellulaire qui la précède [5, 6]. Contrairement à la capacitation des spermatozoïdes, la fusion des myoblastes ne résulte pas de l'activation transitoire des canaux T, mais met en jeu le courant de fenêtre. Ce courant très faible, inférieur à 1 pA, permet néanmoins une charge calcique importante car les pompes d'extrusion du Ca^{2+} cytoplasmique sont peu efficaces à ces stades précoces du développement. D'un point de vue temporel, le déclenchement de la fusion des myoblastes se fait selon un déroulement précis avec mise en place successive de plusieurs perméabilités potassiques (*m/s* 1990, n° 3, p. 245) (figure 3) [7-9].

• Les canaux T dans le cycle cellulaire

Les cellules musculaires lisses artérielles constituent un bon modèle de cellules spécialisées capables de se différencier et de proliférer *in vivo*, au cours de la pathologie vasculaire, ou encore *in vitro* lors de cultures primaires. Il est tout d'abord important de noter que le puissant effet anti-hypertenseur des antagonistes des canaux de type L semble exclure l'intervention des canaux T dans le contrôle de la contraction. De fait, les courants T sont peu exprimés par les cellules artérielles fraîchement isolées [10], à l'exception peut-être de cellules préparées à partir de petites artères dites de « résistance » [1]. En revanche, de nombreuses données expérimentales suggèrent que les

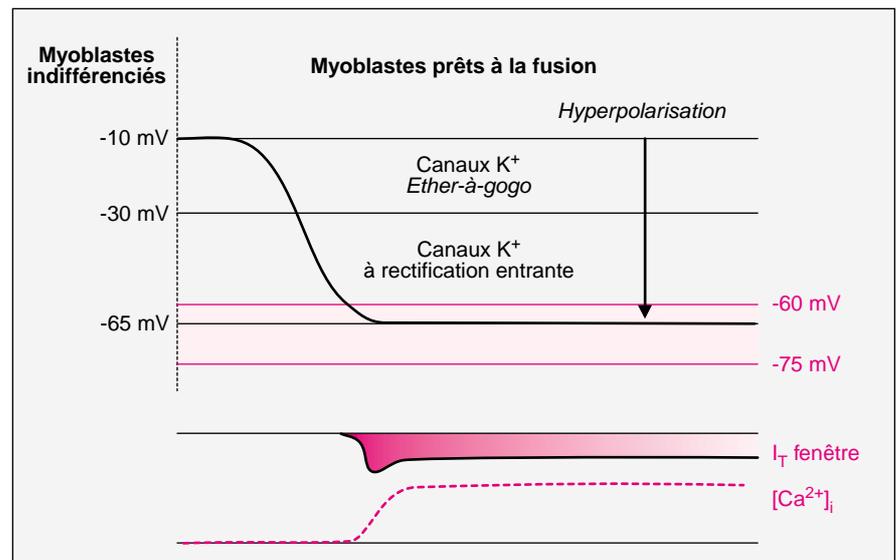


Figure 3. Installation du courant de fenêtre précédant la fusion des myoblastes. Les myoblastes indifférenciés ont un potentiel de membrane de -10 mV environ, et ils deviennent compétents (c'est-à-dire capable de fusionner pour former un myotube) lors d'une hyperpolarisation en deux temps. La synthèse de canaux Ether-à-go abaisse le potentiel membranaire à -30 mV. Par la suite, l'insertion membranaire d'un canal potassium présentant une rectification entrante entraîne une hyperpolarisation à -65 mV. Ce potentiel membranaire étant dans la zone de production du courant de fenêtre des canaux T (symbolisée par les lignes rouges -60 mV, -75 mV), un courant calcique soutenu (I_T fenêtre) s'installe, induisant une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$.

canaux T engendrent un signal calcique lié à l'activité proliférative et/ou trophique des cellules musculaires lisses artérielles (pour revue, voir [10]). Ainsi, des courants T sont enregistrés dans les cultures primaires et les lignées cellulaires issues de tissu artériel provenant d'aorte ou d'artère coronaire [10]. Ces courants n'apparaissent qu'après plusieurs jours en culture. Cette expression est associée à un changement du phénotype des cellules qui se mettent à proliférer. A confluence, cette tendance s'inverse lors du retour vers le phénotype contractile, contrôlé en partie par la densité cellulaire. L'expression des canaux T *in vitro* est donc transitoire et se superpose parfaitement à la phase de prolifération et de perte des propriétés contractiles des cellules [10, 12]. Ces canaux pourraient donc avoir un rôle déterminant au cours du développement ou dans des situations de réparation.

Plus précisément, le courant T des cellules aortiques *in vitro* est exprimé tout particulièrement lors de la transition G1/S du cycle cellulaire [13, 14]. Cette transition suit la fin de la mitose

(phase M) et précède la replication du matériel génétique (phase S) nécessaire à la cellule fille avant la division cellulaire. A l'inverse, en sortie de cycle (phase G0), par exemple lorsque les cellules sont rendues quiescentes après carence en sérum ou lorsqu'elles arrivent à confluence, les canaux T ne sont pas détectés [13, 14]. Le courant L, dont l'expression semble peu dépendante du cycle cellulaire, redevient alors, le courant calcique prédominant, voire exclusif comme sur les cellules fraîchement isolées. Un rôle des canaux T dans l'activation de certains gènes dépendants du calcium au cours du cycle cellulaire paraît donc probable. Il reste à déterminer comment ces canaux T sont activés. En effet, leur activation paraît difficile puisque la grande majorité des canaux T est vraisemblablement inactivée au potentiel de membrane (compris entre -40 et -55 mV) de ces cellules. Cependant, dans ce modèle, les canaux T peuvent créer un courant de fenêtre aux alentours de -60 mV [10]. Par conséquent, seule une hyperpolarisation survenant lors de

la phase G1/S permettrait un recrutement de l'activité des canaux T. La réalité fonctionnelle et l'impact sur l'homéostasie calcique intracellulaire d'un tel courant de fenêtre ont été montrés récemment par utilisation de cellules HEK surexprimant le canal T [15] (voir aussi l'article de P. Lory *et al.*, p. 979 de ce numéro).

Canaux T et sécrétion endocrine de la glande corticosurrénale

Comme pour beaucoup d'hormones, la sécrétion d'aldostérone est sous le contrôle d'une entrée de calcium. Cependant, à la différence de ce qui se passe pour les hormones peptidiques, le calcium contrôle non pas la vidange de vésicules de stockage, mais directement la synthèse de l'hormone qui est libérée en condition de « flux tendu » [16]. Ainsi, sa sécrétion est réglée au niveau de l'entrée de son précurseur – le cholestérol – qui passe, sous l'effet de la concentration locale en calcium, du cytoplasme à la mitochondrie où l'hormone est synthétisée [17].

Chez diverses espèces de mammifères, des canaux calcium de type L (sensibles aux dihydropyridines) et T ont été mis en évidence dans les cellules de la zone glomérulée des glandes surrénales (pour références complémentaires, voir [18]). Initialement, l'implication des courants T dans la stéroïdogénèse a été suggérée par l'effet à long terme de l'ACTH sur l'amplitude de ces courants et sur la libération d'hormone. Par ailleurs, bien que l'activation des canaux L entraîne une forte augmentation de calcium intracellulaire, il a été montré que la sécrétion d'aldostérone déclenchée par la dépolarisation induite lors d'un accroissement de la concentration extracellulaire de K^+ est insensible à l'application d'une dihydropyridine [19]. Cependant, cette sécrétion est bloquée par le mibéfradil, un composé de synthèse, et la tétrandrine, un alcaloïde naturel, qui présentent une sélectivité partielle en faveur des canaux T [20-22]. Par conséquent, la libération hormonale semble directement corrélée à l'entrée de calcium due aux canaux T. Dans des conditions physiologiques, les variations de la concentration de K^+ extracellulaire amènent le potentiel membranaire à des valeurs suffi-

samment positives pour permettre l'activation soutenue des canaux T [23, 24], et le courant de fenêtre résultant règle la synthèse et la libération de l'hormone. On notera la différence des situations rencontrées dans le déclenchement de la myogenèse et de la stéroïdogénèse qui pourtant requièrent toutes deux l'activation du courant de fenêtre T. Dans des myoblastes dont le potentiel initial est très positif (-10 mV: voir figure 3), le domaine de potentiel étroit où existe un courant de fenêtre est atteint par développement d'une hyperpolarisation membranaire. Dans les cellules de la zone glomérulée, dont le potentiel de repos est très négatif, un signal dépolarisant est nécessaire pour déclencher un courant T (figure 4). Dans les cellules de la zone glomérulaire, cette dépolarisation et l'augmentation consécutive de calcium intracellulaire résultent d'un effet de l'angiotensine II qui agit sans doute en

bloquant une conductance potassique qui reste encore à identifier. Cependant, ce composé a une action sécrétagogue variable en fonction de l'espèce animale étudiée et de l'âge des cultures [19, 25, 26]. Cela pourrait être dû à la variabilité de son action sur les canaux T. En effet, l'angiotensine provoquerait un glissement de la courbe d'activation des canaux T vers les valeurs hyperpolarisées chez l'animal jeune et au contraire dépolarisées chez l'adulte. Cela entraînerait respectivement une augmentation ou une diminution du courant de fenêtre à un potentiel donné avec une action différentielle sur la sécrétion. En conclusion, bien que les conditions d'activation conjointe des canaux T et L soient souvent réunies, il apparaît qu'un lien préférentiel existe entre canaux T et mitochondries aboutissant à la mise en jeu spécifique de ce type de canaux calciques dans la sécrétion d'aldostérone.

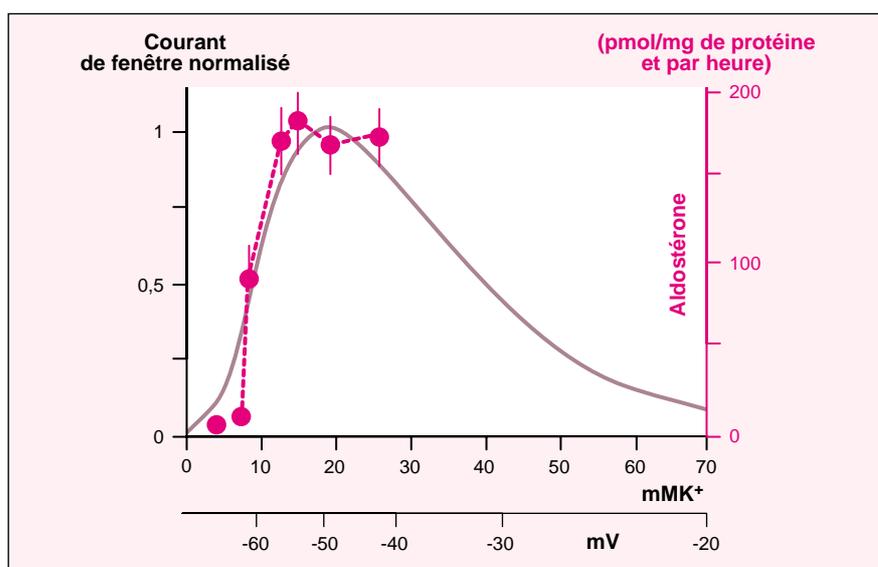


Figure 4. **Canaux T et sécrétion d'aldostérone.** Les cellules de la zone glomérulée de la glande surrénale, mises en culture, sécrètent de l'aldostérone en réponse à un stimulus dépolarisant, sécrétion qui peut être suivie par un dosage radio-immunologique effectué sur le surnageant. La sécrétion (ligne discontinue rouge, échelle de droite) a été déclenchée ici par une élévation de la concentration en potassium, dans le milieu de culture. L'effet dépolarisant d'un milieu de culture contenant une concentration élevée de K^+ a été évalué indépendamment par mesure électrophysiologique du potentiel de repos des cellules. Cela permet de rapporter la sécrétion d'aldostérone à une double échelle en abscisse, K^+ (en mM) et potentiel de repos (mV). Dans une autre série d'expériences, les caractéristiques des canaux T présents dans ces cellules ont été évaluées selon la procédure décrite dans la figure 1. Cela a permis d'évaluer le courant de fenêtre qu'ils engendrent. Ce courant calculé est rapporté ici en ordonnée (ligne continue grise, échelle de gauche). On constate que la sécrétion d'aldostérone se produit dans un domaine dans lequel le potentiel de membrane permet une entrée de Ca^{2+} par les canaux T.

Les canaux T dans les neurones

Localisation neuronale des canaux T

La distribution des divers types de canaux T n'est pas uniforme dans le système nerveux. Le marquage par hybridation *in situ* indique, par exemple, que si des structures comme l'hippocampe offrent une expression comparable des ARN messagers codant pour les isoformes $\alpha 1H$, $\alpha 1I$ et $\alpha 1G$, cette dernière est dominante au niveau des cellules de Purkinje du cervelet. De même, dans le thalamus, il y a pratiquement ségrégation, entre les isoformes $\alpha 1I$ et $\alpha 1G$ limitées respectivement au noyau réticulé et aux noyaux relais, [27-29].

Au niveau des différents compartiments cellulaires, l'étude de la distribution des canaux T, réalisée tant par électrophysiologie et imagerie calcique [30] que plus récemment par immunocytochimie, révèle une densité élevée de ces canaux dans l'arbre dendritique [30-35]. Cette localisation privilégiée soulève de nombreuses questions sur le rôle de ces canaux dans les neurones. Ainsi, leurs propriétés biophysiques peuvent suggérer un impact important de leur activité sur l'intégration dendritique des signaux, tant lors de la conduction des événements synaptiques que pendant l'envahissement rétrograde de l'arborisation dendritique par les potentiels d'action [36]. Par ailleurs, l'étude systématique des propriétés de $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ et $\alpha 1I$ a révélé un comportement différentiel de ces isoformes. Par exemple, seule l'isoforme $\alpha 1I$ peut être activée de façon répétée à haute fréquence et préférentiellement par des événements lents. Ces différences de comportement sont, bien sûr, particulièrement importantes lors de bouffées de potentiels d'action [37] et peuvent également conditionner les réponses synaptiques, comme celles induites par les récepteurs du glutamate de types AMPA à cinétique rapide *versus* NMDA à cinétique lente.

En conclusion, compte tenu de la répartition non uniforme des isoformes, leurs propriétés spécifiques pourraient fortement conditionner le rôle des canaux T selon la structure considérée. De plus, comme nous allons le voir dans les exemples

suivants, les deux modalités d'activation des canaux T (courant de fenêtre *versus* courant transitoire) sont souvent fortement imbriquées.

Canaux T et décharges en bouffées

Le potentiel de membrane d'un neurone varie de manière constante en fonction de l'état physiologique. Pour un potentiel de repos situé autour de $-70mV$, à l'arrivée d'un potentiel post-synaptique dépolarisant excitateur (PPSE), une fraction de la population des canaux T est activée, ce qui entraîne une dépolarisation supplémentaire transitoire appelée potentiel calcique à bas seuil (*figure 5A*). Lors de cette dépolarisation, le potentiel de membrane atteint souvent le seuil d'activation des canaux Na^+ et une bouffée de potentiels d'action sodiques est engendrée. Par conséquent, de telles activations des canaux T affectent profondément la transmission de l'information, en permettant à un PPSE de faible amplitude d'être néanmoins à l'origine de potentiels d'action [38, 39].

Paradoxalement, des bouffées de potentiels d'action peuvent aussi être déclenchées à la suite d'hyperpolarisations de courte durée. Ainsi, dans un neurone dont le potentiel initial est suffisamment dépolarisé ($-50 mV$) pour inactiver un grand nombre de canaux T, l'hyperpolarisation associée aux potentiels postsynaptiques inhibiteurs GABAergiques (PPSI) permet la désinactivation d'une fraction des canaux T dont l'importance dépendra de la durée et de l'amplitude de la période d'hyperpolarisation. La décroissance des PPSI et le retour au potentiel de repos provoque l'ouverture de ces canaux. Là encore, le courant calcique transitoire dépolarise le neurone et le potentiel de membrane peut atteindre le seuil d'activation des canaux Na^+ engendrant ainsi une bouffée de potentiels d'action (voir *figure 5B₁*). Ce phénomène, qui transforme une période d'hyperpolarisation généralement considérée comme inhibitrice en bouffée d'activité neuronale, est appelé activité de rebond [40-42]. Dans les neurones thalamo-corticaux, ce mécanisme est à l'origine des oscillations du potentiel de membrane qui apparaissent lors des fuseaux de sommeil (*figure 5B₂*) [43]. Cependant, le phénomène d'activité

en rebond est présent dans de nombreux autres types cellulaires comme les cellules de l'hippocampe, de l'olive inférieure ou des noyaux profonds du cervelet et, dans certains cas, il a été associé à la plasticité des synapses inhibitrices [44].

L'impact des canaux T sur l'activité neuronale peut s'avérer encore plus complexe si on considère que le courant de fenêtre en tant que courant dépolarisant participe à l'équilibre des charges qui définissent le potentiel de membrane. Un PPSI, en créant une hyperpolarisation transitoire, peut provoquer une diminution du courant de fenêtre présent autour du potentiel de repos (*figure 2*). La réduction de l'entrée de cations entraîne alors une hyperpolarisation supplémentaire qui amplifie et allonge l'action du PPSI [45, 46] (*figure 5C*). Lors du retour au potentiel de repos, facilité par activation de canaux à perméabilité cationique aspécifique engendrant un courant I_h dépolarisant, il y a, ici encore, production d'une décharge en rebond. On voit donc que, par leurs caractéristiques d'activation et d'inactivation autour du potentiel de repos, les canaux T vont fortement influencer la réponse d'un neurone à un signal synaptique en amplifiant ou en inversant la modification de potentiel membranaire qu'il induit.

Canaux T et activités oscillatoires

L'interaction du courant T avec divers courants hyperpolarisants et/ou dépolarisants dépendants du potentiel peut dans certaines cellules aboutir à l'établissement d'oscillations du potentiel membranaire. Ces oscillations ont une fréquence d'environ 2 Hz en raison des caractéristiques biophysiques des canaux T. Ainsi, dans les neurones thalamo-corticaux, l'activation séquentielle des courants I_T et I_h est à l'origine des oscillations intrinsèques de ces neurones (*figure 6A*) [47, 48]. De telles oscillations sont enregistrées pendant les phases de sommeil à onde lente (rythme δ) lorsque les informations synaptiques aboutissant au thalamus sont réduites (*figure 6B*) [49]. Lorsque la boucle thalamo-corticale est intacte, ces oscillations sont intercalées avec des séquences d'activité synaptique en provenance du cortex [50].

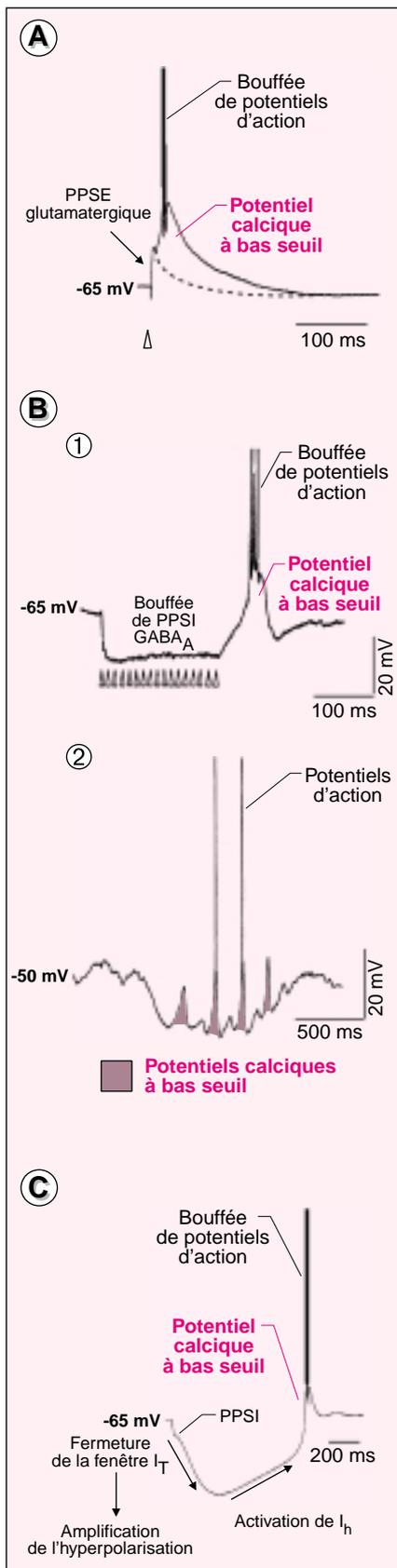


Figure 5. Canaux T et décharges en bouffées de potentiels d'action. Dans des neurones thalamo-corticaux la stimulation d'afférences excitatrices (A) ou inhibitrices (B et C) permet l'activation d'un potentiel calcique à bas seuil sur lequel se superpose une bouffée de potentiels d'action sodiques. **A.** Au potentiel de -65 mV, une importante fraction des canaux T est activable. La stimulation de l'afférence sensorielle (indiquée par un triangle) évoque une réponse consistant en un PPSE glutamatergique dont la décroissance est symbolisée par le pointillé. La dépolarisation due au PPSE permet l'activation des canaux T et la production d'un potentiel calcique à bas seuil. Cette dépolarisation supplémentaire due au potentiel calcique permet alors d'atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action sodiques qui sont émis à haute fréquence (pour la clarté de la figure, les potentiels d'action ont été tronqués en amplitude). **B.** Au contraire, au potentiel de -50 mV, une importante fraction des canaux T est inactivée (non activable). Cependant, la stimulation répétitive (indiquée par les triangles, en B①) d'afférences inhibitrices évoque une bouffée de PPSI par activation de récepteurs de type $GABA_A$ et entraîne une hyperpolarisation transitoire permettant la désinactivation des canaux T. Au retour au potentiel de -50 mV qui suit la fin des stimulations, l'activation des canaux T engendre un potentiel calcique à bas seuil surmonté d'une bouffée de potentiels d'action sodiques. En B②, au cours des fuseaux de sommeil, les neurones thalamo-corticaux reçoivent des bouffées de PPSI $GABA_A$ similaires à celle présentée en B①. L'hyperpolarisation associée à ces séquences synaptiques peut être suffisante pour permettre la désinactivation puis l'activation de canaux T et donc l'apparition de potentiels calciques à bas seuil dont certains peuvent atteindre le seuil de décharge des potentiels d'action sodiques. **C.** Pour un potentiel de repos initial de -65 mV, l'hyperpolarisation initiale associée à un PPSI provoque la diminution du courant de fenêtre qui entraîne secondairement un déplacement du potentiel membranaire vers des valeurs encore plus négatives. Lorsque le potentiel de membrane atteint une valeur suffisamment hyperpolarisée (-80 mV), un courant I_h est activé, produisant une dépolarisation retardée du neurone. Cette dépolarisation permet l'activation transitoire du courant T et la production d'un potentiel calcique en rebond. On notera que cette séquence d'événements conduit à l'émission d'une bouffée de potentiels d'action toutes les secondes environ.

En conclusion, la présence des canaux T conditionne le mode de décharge des neurones par des mécanismes qui peuvent être complexes et impliquent des interactions avec de nombreuses autres conductances. Cependant, bien que cet aspect n'ait pas été développé ici, ces canaux sont également responsables d'entrées de calcium importantes. Par exemple, des expériences menées avec des séquences antisens d'oligonucléotides supprimant l'expression des canaux T dans des neurones sensoriels en culture ont montré que 50 % de l'entrée de Ca^{2+} pendant un potentiel d'action est liée à l'activation des canaux T [51]. Ce flux calcique peut avoir des incidences multiples à court terme sur l'évolution du potentiel membranaire par l'accroissement temporaire de la concentration de Ca^{2+} sous-membranaire et l'induction secondaire de perméabilités contrôlées par le calcium et à effets hyperpolarisant ou dépolarisant (K_{Ca} , Cl_{Ca}).

Vers une thérapeutique liée aux canaux T

Étant donné l'implication des canaux T dans le déterminisme des rythmes d'activité neuronale, divers agents influant sur l'état d'excitabilité du système nerveux ont été testés sur ces courants, comme les anesthésiques et les anti-épileptiques. Les anesthésiques les mieux connus affectent de manière similaire les isoformes $\alpha 1G$ et $\alpha 1H$ avec l'efficacité suivante : propofol ($IC_{50} = 20 \mu M$) > etomidate ($160 \mu M$) > isoflurane ($250 \mu M$) > kétamine ($1,2 \text{ mM}$) [52]. Les courants T sont aussi des cibles désignées dans le traitement des épilepsies avec des pharmacologies qui peuvent être complexes en fonction de l'isoforme. Ainsi la phénytoïne, un anticonvulsivant, a un IC_{50} qui se situe vers $150 \mu M$ pour $\alpha 1G$ mais est 20 fois plus faible pour l' $\alpha 1H$ [52]. L'action de l'éthosuximide, molécule utilisée pour le traitement des épilepsies de type absence, a longtemps été attri-

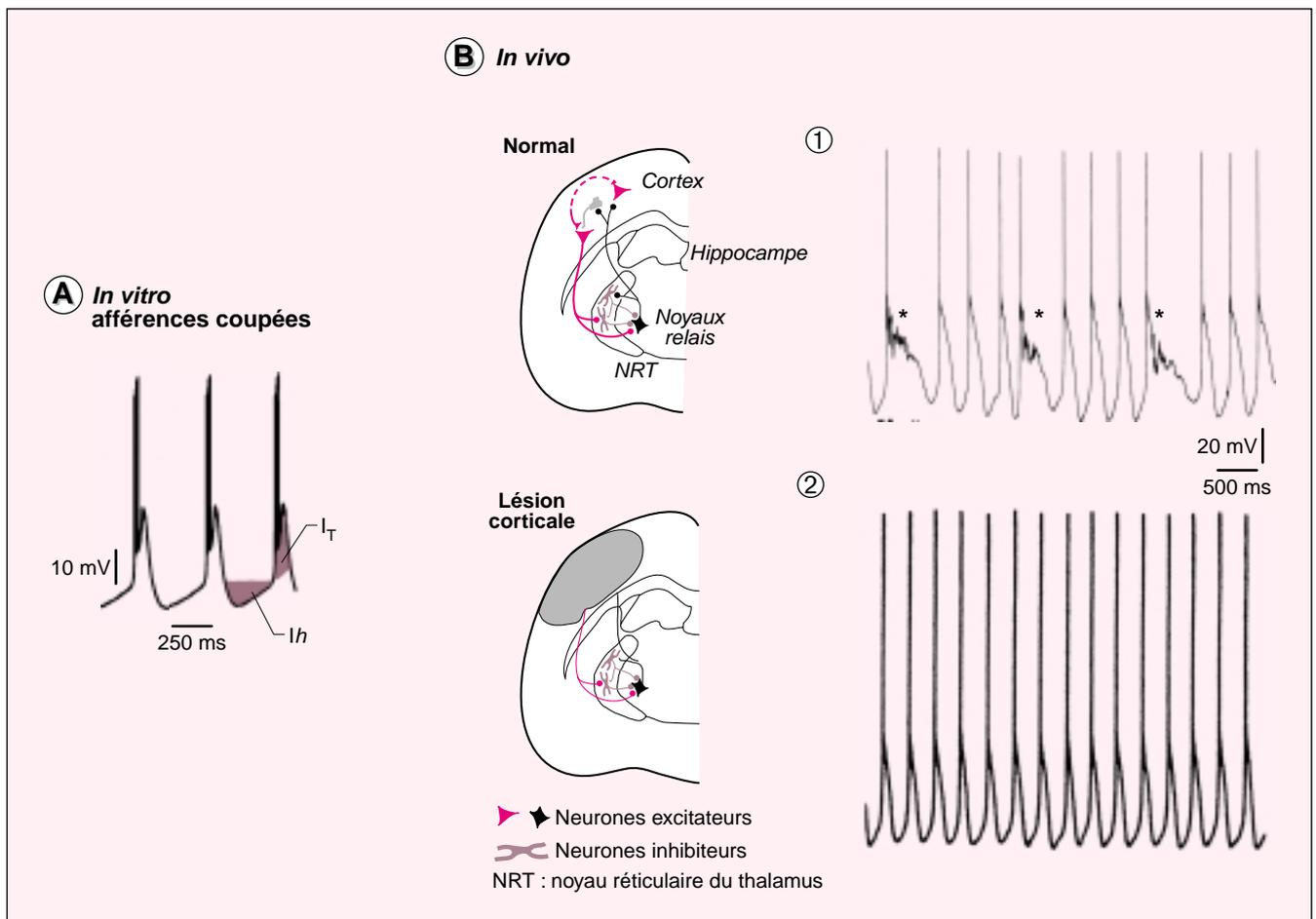


Figure 6. **Canaux T et activités oscillatoires.** **A.** Des neurones thalamo-corticaux issus des noyaux relais du thalamus (voir coupe de cerveau en B) sont enregistrés *in vitro* dans des coupes de cerveau. On notera que, dans cette situation, ces neurones sont dépourvus d'afférences. Leurs potentiels membranaires présentent alors des oscillations à une fréquence de 1 à 2 Hz surmontées par des bouffées de potentiels d'action à haute fréquence. Les oscillations sont sous-tendues par l'alternance de phases de dépolarisation et d'hyperpolarisation dans lesquelles les deux courants I_h et I_T (régions grisées) jouent un rôle fondamental. En effet, les mécanismes décrits dans la figure 5C peuvent se dérouler de façon séquentielle lorsque la cellule évolue spontanément dans le domaine de potentiel qui permet une hyperpolarisation par blocage du courant de fenêtre T. De telles oscillations sont endogènes à tous les neurones thalamo-corticaux. **B.** Lorsque la boucle thalamo-corticale est intacte, des oscillations similaires sont enregistrées *in vivo* dans les neurones thalamo-corticaux pendant les phases de sommeil à onde lente. Ces oscillations sont mélangées à des activités synaptiques en provenance du cortex (indiquées par *) (B1). Les oscillations intrinsèques des neurones thalamo-corticaux apparaissent de manière continue lors de l'ablation des afférences corticales (B2).

buée à un blocage des canaux T du thalamus [53, 54]. Cependant, des résultats *in vitro* plus récents ont remis en question ce mécanisme et ont fait proposer plutôt une action relayée par un blocage des canaux sodiques lents [55]. L'analyse pharmacologique réalisée sur des canaux recombinants a confirmé la faible sensibilité des canaux T à ce produit avec un IC_{50} de 20 mM pour $\alpha 1G$ et H [52]. Enfin, signalons sur les canaux T l'existence d'un site de liaison à haute

affinité du mibéfradil correspondant à un IC_{50} d'environ 100 nM pour l'isomère $\alpha 1H$ [56]. Cependant, ces études pharmacologiques sont encore préliminaires. Il sera sans doute intéressant de revoir le profil pharmacologique de ces substances en fonction de la situation physiologique dans laquelle interviennent les canaux de type T, avec genèse d'un courant de fenêtre ou bien activation par dépolarisation membranaire.

Ces données soulignent la pauvreté

actuelle des outils pharmacologiques disponibles pour les études, tant fondamentales que cliniques, des entrées calciques dues aux canaux T. Cependant, comme nous l'avons brièvement souligné, la multiplicité des rôles attribués à ces canaux motive le développement d'agents spécifiques, agonistes et antagonistes. Le clonage récent des différentes isoformes des canaux T ouvrent de nombreuses perspectives dans ce domaine ■

Remerciements

A. Kozlov bénéficie d'une bourse doctorale de la région Alsace et J. Hering est boursier doctoral du Ministère de la Recherche. Nous remercions tout spécialement C. Arnoult (Grenoble), L. Bernheim (Genève), M. Rossier (Genève) et C. Strube (Lyon) qui nous ont communiqué leurs données les plus récentes sur la fonction des canaux T.

RÉFÉRENCES

1. Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C, O'Toole CMB. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* 1998; 59: 12-6.
2. Arnoult C, Villaz M, Florman HM. Pharmacological properties of mouse spermatogenic T-type calcium current. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 1104-11.
3. Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. Control of the low voltage-activated channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6757-62.
4. O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhart RA, Florman HM. Ca²⁺ entry through store-operated channels in sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 1571-84.
5. Bijlenga P, Liu JH, Haenggeli CA, Fischer-Lougheed J, Bader CR, Bernheim L. T-type α_1H Ca²⁺ channels are involved in Ca²⁺ signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7627-32.
6. Strube C, Monteil A, Nargeot J, Lory P. Evidence for functional expression of α_1H in mouse fetal skeletal muscle cells. 44th annual meeting of the Biophysical Society, New Orleans, LA, USA. *Biophys J* 2000; 78: 460A.
7. Liu JL, Bijlenga P, Fischer-Lougheed J, et al. Role of an inward rectifier K⁺ current and of hyperpolarization in human myoblast fusion. *J Physiol* 1998; 510: 467-76.
8. Occhiodoro T, Bernheim L, Liu JH, et al. Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Lett* 1998; 434: 177-82.
9. Bijlenga P, Occhiodoro T, Liu JH, Bader CR, Bernheim L, Fischer-Lougheed J. An ether-a-go-go K⁺ current, Ih-eag, contributes to the hyperpolarization of human fusion-competent myoblasts. *J Physiol* 1998; 512: 317-23.
10. Richard S, Nargeot J. T-type calcium currents in vascular smooth muscle cells: a role in cellular proliferation? In: Tsien RW, Clozel JP, Nargeot J, eds. *Low-voltage-activated T-type calcium channels*. Tattenthall, England: Adis Int Ltd, 1998: 123-32.
11. Gordienko DV, Clausen C, Goligorski M. Ionic currents and endothelin signaling in smooth muscle cells from rat resistance arteries. *Am J Physiol* 1994; 266: F325-41.
12. Richard S, Neveu D, Carnac G, Bodin P, Travo P, Nargeot J. Differential expression of voltage-gated Ca²⁺ currents in cultivated aortic myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1160: 95-104.
13. Neveu D, Quignard JF, Fernandez A, Richard S, Nargeot J. Differential β -adrenergic regulation and phenotypic modulation of voltage-gated calcium currents in rat aortic myocytes. *J Physiol* 1994; 479: 171-82.
14. Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H, Takeshita A. Cell cycle-dependent expression of L- and T-type Ca²⁺ currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res* 1996; 79: 14-19.
15. 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.
16. Cherradi N, Rossier MF, Vallotton MB, Capponi AM. Calcium stimulates intramitochondrial cholesterol transfer in bovine adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 25971-5.
17. Crivello JF, Jefcoate CR. Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. Kinetics and effects of inhibitors. *J Biol Chem* 1980; 255: 8144-51.
18. Barbara JG, Takeda K. Voltage-dependent currents and modulation of calcium channel expression in zona fasciculata cells from rat adrenal gland. *J Physiol* 1995; 488: 609-22.
19. Barrett PQ, Isales CM, Bollag WB. Calcium channels and aldosterone secretion: modulation by potassium and atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1991; 261: F706-19.
20. Rossier MF, Burnay MM, Vallotton MB, Capponi AM. Distinct functions of T- and L-type calcium channels during activation of bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 1996; 137: 4817-26.
21. Rossier MF, Burnay MM, Maturana A, Capponi AM. Duality of the voltage-dependent calcium influx in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinol Res* 1998; 24: 443-7.
22. Rossier MF, Ertel EA, Vallotton MB, Capponi AM. Inhibitory action of mibefradil on calcium signaling and aldosterone synthesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *J Pharm Exp Ther* 1998; 287: 824-31.
23. Natke Jr E, Kabela E. Electrical response in rat adrenal cortex: possible relation to aldosterone secretion. *Am J Physiol* 1979; 237: E158-62.
24. Rossier MF, Aptel HB, Python CP, Burnay MM, Vallotton MB, Capponi AM. Inhibition of low threshold calcium channels by angiotensin II in adrenal glomerulosa cells through activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 1995; 270: 15137-42.
25. Chen XL, Bayliss DA, Fern RJ, Barrett PQ. A role for T-type Ca²⁺ channels in the synergistic control of aldosterone production by ANG II and K⁺. *Am J Physiol* 1999; 276: F674-83.
26. Rossier MF, Capponi AM. Angiotensin II and calcium channels. *Vitamins Hormones* 2001; 60: 229-84.
27. Craig PJ, Beattie RE, Folly EA, et al. Distribution of the voltage-dependent calcium channel α_1G subunit mRNA and protein throughout the mature rat brain. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 2949-64.
28. Kase M, Kakimoto S, Sakuma S, et al. Distribution of neurons expressing α_1G subunit mRNA of T-type voltage-dependent calcium channel in adult rat central nervous system. *Neurosci Lett* 1999; 268: 77-80.
29. 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.
30. Magee JC, Johnston D. Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science* 1995; 268: 301-4.
31. Destexhe A, Neubig M, Ulrich D, Huguenard J. Dendritic low-threshold calcium currents in thalamic relay cells. *J Neurosci* 1998; 18: 3574-88.
32. Munsch T, Budde T, Pape HC. Voltage-activated intracellular calcium transients in thalamic relay cells and interneurons. *NeuroReport* 1997; 8: 2411-8.
33. Zhou Q, Godwin DW, O'Malley DM, Adams PR. Visualization of calcium influx through channels that shape the burst and tonic firing modes of thalamic relay cells. *J Neurophysiol* 1997; 77: 2816-25.
34. Emri Z, Antal K, Toth TI, Cope DW, Crunelli V. Backpropagation of the delta oscillation and the retinal excitatory postsynaptic potential in a multi-compartment model of thalamocortical neurons. *Neuroscience* 2000; 98: 111-27.
35. Williams SR, Stuart GJ. Action potential backpropagation and somato-dendritic distribution of ion channels in thalamocortical neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 1307-17.
36. Stuart G, Spruston N, Sakmann B, Häusser M. Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 1997; 20: 125-31.
37. Kozlov AS, McKenna F, Lee A, et al. Distinct kinetics of cloned T-type Ca²⁺ channels leads to differential Ca²⁺ entry and frequency dependence during mock action potentials. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 4149-58.
38. Crunelli V, Kelly JS, Leresche N, Pirchio M. On the excitatory post-synaptic potential evoked by stimulation of the optic tract in the rat lateral geniculate nucleus. *J Physiol* 1987; 384: 603-18.
39. Turner JP, Leresche N, Guyon A, Soltesz I, Crunelli V. Sensory input and burst firing output of rat and cat thalamocortical cells: the role of NMDA and non-NMDA receptors. *J Physiol* 1994; 480: 281-95.
40. Llinás R, Mühlethaler M. Electrophysiology of guinea-pig cerebellar nuclear cells in the *in vitro* brain stem-cerebellar preparation. *J Physiol* 1988; 404: 241-58.
41. Thomson AM. Inhibitory postsynaptic potentials evoked in thalamic neurons by stimulation of the reticularis nucleus evoke slow spikes in isolated rat brain slices-I. *Neuroscience* 1988; 25: 491-502.

RÉFÉRENCES

42. Crunelli V, Leresche N. A role for GABAB receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells. *Trends Neurosci* 1991; 14: 16-21.
43. Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 1993; 262: 679-85.
44. Aizenman CD, Manis PB, Linden DJ. Polarity of long-term synaptic gain change is related to postsynaptic spike firing at a cerebellar inhibitory synapse. *Neuron* 1998; 21: 827-35.
45. Williams SR, Toth TI, Turner JP, Hughes SW, Crunelli V. The «window» component of the low threshold Ca^{2+} current produces input signal amplification and bistability in cat and rat thalamocortical neurones. *J Physiol* 1997; 505: 689-705.
46. Hughes SW, Cope DW, Toth TI, Williams SR, Crunelli V. All thalamocortical neurones possess a T-type Ca^{2+} «window» current that enables the expression of bistability-mediated activities. *J Physiol* 1999; 517: 805-15.
47. McCormick DA, Pape HC. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol* 1990; 431: 291-318.
48. Soltesz I, Lightowler S, Leresche N, Jaskik-Gerschenfeld D, Pollard CE, Crunelli V. Two inward currents and the transformation of low-frequency oscillations of rat and cat thalamocortical cells. *J Physiol* 1991; 441: 175-97.
49. Curró Dossi, R, Nunez A, Steriade M. Electrophysiology of a slow (0.5-4 Hz) intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurones *in vivo*. *J Physiol* 1992; 447: 215-34.
50. Steriade M, Contreras D, Curró Dossi R, Nunez A. The slow (< 1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurones: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks. *J Neurosci* 1993; 13: 3284-99.
51. Lambert RC, McKenna F, Maulet Y, *et al.* Low-voltage-activated Ca^{2+} currents are generated by members of the CavT subunit family ($\alpha 1G/H$) in rat primary sensory neurones. *J Neurosci* 1998; 18: 8605-13.
52. Todorovic SM, Perez-Reyes E., Lingel CJ. Anticonvulsants but not general anesthetics have differential blocking effects on different T-type current variants. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 98-108.
53. Coulter DA, Huguenard JR, Prince DA. Specific petit mal anticonvulsants reduce calcium currents in thalamic neurones. *Neurosci Lett* 1989; 98: 74-7.
54. Huguenard JR, Prince DA. Intrathalamic rhythmicity studied *in vitro*: nominal T current modulation causes robust anti-oscillatory effects. *J Neurosci* 1994; 14: 5485-502.
55. Leresche N, Parri HR, Erdemil G, *et al.* On the action of the anti-absence drug ethosuximide in the rat and cat thalamus. *J Neurosci* 1998; 18: 4842-53.
56. Martin RL, Lee JH, Cribbs LL, Perez-Reyes E, Hanck DA. Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 302-8.
57. Nargeot J, Charnet P. Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Med Sci* 1994; 10: 1293-308.

* GLOSSAIRE *

Dépolariation : changement du potentiel de membrane vers des valeurs plus positives.

Hyperpolariation : changement du potentiel de membrane vers des valeurs plus négatives.

PPSE : potentiel postsynaptique excitateur.

PPSI : potentiel postsynaptique inhibiteur.

Summary

Multi-faceted functions for the low-voltage-activated T-type calcium channels

Intracellular Ca^{2+} concentration controls a number of physiological functions some of which are initiated at quite negative membrane potentials (-80 mV to -50 mV). Such is the case for the oscillations recorded in thalamic neurones, but also in non-excitable cells, for spermatozoid capacitation, terminal differentiation of myoblasts or aldosterone secretion. T-type calcium channels are major contributors to this Ca^{2+} signaling. They can generate in this range of potential either a large but transient Ca^{2+} entry or a small but sustained Ca^{2+} current, depending on the recent history of the membrane potential. The cloning in 1998-99 of three T channels by the group of E. Perez-Reyes gives now access to new tools to delineate their exact contribution. The present review focuses on recent progress in our understanding of T channel functions.

TIRÉS À PART

R. Lambert.